

**Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**Identifizierung und Verwendung
pharmakogenetischer Marker zur Individualisierung
der Antipsychotika-Therapie**

Fabian Thomas Czerwensky
aus Berlin

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Werner Steimer betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Budenheim,

Fabian Czerwensky

Dissertation eingereicht am: 30.09.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel
2. Gutachter: Prof. Dr. Werner Steimer

Mündliche Prüfung am: 02.12.2014

Für meine Eltern
und Ina

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungen</u>	1
<u>1. Einleitung</u>	3
1.1 Einführung in die Pharmakogenetik	3
1.2 Einführung in die Schizophrenie	8
1.2.1 Allgemeines bzw. Klassifikation	8
1.2.2 Entstehung der Schizophrenie	10
1.2.3 Therapie der Schizophrenie	11
1.3 Kandidatengene und relevante Polymorphismen.....	14
1.3.1 Polymorphismen im Olanzapinmetabolismus.....	14
1.3.2 Polymorphismen im Kontext einer verbesserten Therapievorhersage	18
1.3.3 Polymorphismen in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme	21
<u>2. Material und Methoden</u>	33
2.1 Beschreibung der Studie.....	33
2.1.1 Studiendesign	33
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	33
2.1.3 Datenerhebung	34
2.2 Statistische Auswertung	36
2.3 Analyse genetischer Polymorphismen.....	37
2.3.1 DNA Extraktion	39
2.3.2 Konventionelle PCR am Thermocycler	39
2.3.3 Enzymatischer Verdau	41
2.3.4 Allel-spezifische PCR.....	42
2.3.5 Gelelektrophorese	42
2.3.6 Sondenbasierte Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion am LightCycler.....	43
2.3.7 Genotypisierung mittels Next Generation Sequencing (NGS) am GS Junior	46
2.3.8 Konstruktion der verwendeten Primer und Sonden	48
2.3.9 Optimierung der PCR Bedingungen	51
2.3.10 Allgemeiner Ablauf und Durchführung einer Genotypisierungsreaktion	52
2.3.11 Nachweis genetischer Polymorphismen	54
2.3.11.1 Nachweis genetischer Polymorphismen im Olanzapinmetabolismus	55
2.3.11.2 Nachweis genetischer Polymorphismen im Kontext einer verbesserten Therapievorhersage	61
2.3.11.3 Nachweis genetischer Polymorphismen in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme	71
<u>3. Ergebnisse</u>	107
3.1 Genotypisierungsmethoden.....	107
3.2 Verteilung der untersuchten Polymorphismen.....	110
3.3 Charakterisierung der Studienpopulationen.....	111
3.4 Ergebnisse der Population „Serum Olanzapin“	113
3.4.1 Demographische Beschreibung	113
3.4.2 Medikation	114

3.4.3 Klinische Einflussfaktoren und Wechselwirkungen	116
3.4.4 Exemplarisches Vorgehen.....	119
3.4.5 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf Serumkonzentrationen	120
3.4.6 Einfluss von Serumkonzentrationen auf Nebenwirkungen sowie Response	126
3.4.7 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf Nebenwirkungen sowie Response	129
3.5 Ergebnisse der Population „Response“	131
3.5.1 Demographische Beschreibung	131
3.5.2. Medikation	131
3.5.3. Klinische Einflussfaktoren und Wechselwirkungen.....	132
3.5.4. Exemplarisches Vorgehen.....	135
3.5.5. Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf das Ansprechen	136
3.6 Ergebnisse der Population „Gewicht“.....	143
3.6.1 Demographische Beschreibung	143
3.6.2 Medikation	145
3.6.3 Klinische Einflussfaktoren und Wechselwirkungen.....	147
3.6.4 Exemplarisches Vorgehen.....	151
3.6.5 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Gewichtszunahme	153
4. Diskussion.....	182
4.1 Population „Serum Olanzapin“	182
4.1.1 Klinische Interaktionen und Wechselwirkungen.....	182
4.1.2 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf Serumkonzentrationen	183
4.2 Population „Response“	187
4.2.1 Klinische Interaktionen und Wechselwirkungen.....	187
4.2.2 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf den Response.....	188
4.3 Population „Gewicht“	193
4.3.1 Klinische Interaktionen und Wechselwirkungen.....	193
4.3.2 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf Gewicht	195
4.3.3 Kombinierte Einflussfaktoren	210
5. Zusammenfassung	213
6. Literaturverzeichnis	216
7. Anhang.....	231
Anhang A1: Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Geräte und Software	231
Anhang A2 Übersicht der verwendeten Primer bei Durchführung einer ALS-PCR.....	234
Anhang A3 Übersicht über die verwendeten Primer zur Sequenzierung mittels GS Junior	235
Anhang A4 Übersicht der verwendeten Primer und Soden	236
Anhang A5 PDS Skala.....	240
Anhang A6 CGI Skala.....	242
Anhang A7 DOTES Skala.....	243
Anhang A8 Häufigkeiten der untersuchten Polymorphismen	244
Anhang A9 Ergänzung der Übersichtstabellen mit der Patientenanzahl der Population „Response“	247
Anhang A10 Gegenüberstellung Ergebnisse rs17782313 und rs489693 Dissertation und Publikation	248
8. Kongressbeiträge, Auszeichnungen und Publikationen.....	251
9. Danksagung	253

Abkürzungen

α (Rezeptor)	Adrenerger Rezeptor
α-MSH	α-Melanozyten stimulierendes Hormon
5-HT	5-Hydroxy-Tryptamin
ABCB1	ATP-Binding Cassette B1
ADP	Adenosindiphosphat
AEA	N-Arachidonyl Ethanolamin
AgRP	Agouti-related Protein
ALS (PCR)	Allel-spezifische (PCR)
AMPK	Acetyl-CoA Carboxylase aktivierte Protein Kinase
ANCOVA	Analyses of Co-variance
ANOVA	Analyses of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BPRS	Brief Psychiatric Rating Scale
BSA	Bovines Serum Albumin
C/D	Quotient aus Serumkonzentration und Tagesdosis
CATIE	Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness
CB (Rezeptor)	Cannabinoid
CFTR (Gen)	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CGI	Clinical Global Impression
CNR1	Cannabinoid Rezeptor 1
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom P 450
D (Rezeptor)	Dopamin
Del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DOTES	Dosage Record and Treatment Emergent Symptom
DRD2	Dopamin Rezeptor D2
ECS	Endocannabinoid System
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
emPCR	Emulsions-basierte PCR
EPS	Extrapyramidales Syndrom
FAAH	Fatty Acid Amid Hydrolase
FMO	Flavin Mono Oxygenase
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FTO	Fat mass and obesity
GABA	Gamma Amino Buttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GC	Guanin und Cytosin
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudie
H (Rezeptor)	Histaminrezeptor
HWE	Hardy Weinberg Equilibrium
ICD	International Classification of Diseases
LC-Red	LightCycler Sensor Sonde
LD	Linkage Disequilibrium
LEP	Leptin
LEPR	Leptin Rezeptor
mACH (Rezeptor)	Acetylcholin
MC4R	Melanocortin 4 Rezeptor
MCH	Melanin-Concentrating Hormon
MCHR	Melanin-Concentrating Hormon Rezeptor
MID	Multiplex Identifier
mRNA	Messenger RNA

MWU (Test)	Mann-Whitney-U
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat-Oxidase
NAE	N-Acetylethanolamin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N-EI	Neuropeptid Glutamic Acid-Isoleucin
N-GE	Neuropeptid Glycin-Glutamic Acid
NGS	Next Generation Sequencing
NPY	Neuro Peptid Y
NV	Normalverteilung
PANSS	Positive and Negative Syndrom Scale
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDE4B	cAMP-spezifische 3',5'-zyklische Phosphodiesterase 4B
PDS	Paranoid-Depressivitäts-Skala
PDS-D	Paranoid-Depressivitäts-Skala-depressive Skala
PDS-P	Paranoid-Depressivitäts-Skala-paranoide Skala
P-GP	P-Glycoprotein
PMAIP1	Phorbol-12-Myristat-13-Acetate-induzierendes Protein 1
PMCH	Pro-Melanin-Concentrating-Hormon
POMC	Pro-Opiomelanocortin
POR	P450 Oxidoreduktase
PRSS16	Serin-Protease-16-Gen
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
tagSNP	Ausgewählter Single Nukleotid Polymorphismus
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TCA	Trizyklische Antidepressiva
UGT	Uridin Diphosphat Glukuronyltransferase
ZNF804A	Zink Finger Protein 804A
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Pharmakogenetik

Pharmakogenetik befasst sich mit dem Einfluss genetischer Variabilität auf die Pharmakotherapie¹ - beschreibt also inwiefern die individuelle genetische Ausstattung auf die Arzneimitteltherapie einwirkt bzw. diese beeinflusst. Hierbei sind die Begriffe Pharmakogenetik und Pharmakogenomik differenziert voneinander zu betrachten: Im Vordergrund der Pharmakogenetik steht meist der kandidatengen-basierte Ansatz. Dieser befasst sich mit der Identifikation und Untersuchung relevanter Gene, für welche ein kausaler Zusammenhang mit starken Nebenwirkungen oder Therapieansprechen postuliert wird. Im Gegensatz hierzu bedient sich die Pharmakogenomik einem Hypothese-freien Ansatz.² In sogenannten genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wird eine Vielzahl an erkrankten Probanden mit einem gesunden Patientenkollektiv verglichen. Die Ergebnisse von GWAS ermöglichen die Identifizierung neuer Genloci im Zusammenhang mit einer bestimmten Erkrankung und bieten somit Aufschluss über die Gründe und möglichen Entstehungsmechanismen einer Erkrankung.²

Grundsätzlich ist die genetische Ausstattung von Mensch zu Mensch zu 99,9 % identisch. Die durch Mutationen entstandenen Unterschiede können jedoch einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung von Krankheiten, die Verstoffwechselung von Medikamenten und das Ansprechen auf eine Arzneimitteltherapie haben.³ Mutationen werden in Genom-, Chromosom- und Genmutationen unterteilt, wobei die Punktmutation den häufigsten Vertreter der Genmutation darstellt.⁴

Mutationen, die in mindestens 1 % der Bevölkerung auftreten werden als Polymorphismen bezeichnet, wobei nicht aus jeder Mutation eine physiologische Konsequenz resultiert. Vielmehr entscheidet die Lokalisation und Art der Mutation über die funktionelle Bedeutung, wobei sich die genaue Vorhersage als schwierig gestaltet. So sind Punktmutationen in genetischen Kontrollregionen meist relevanter, da sich hieraus eine Veränderung der Proteinsynthese ergeben kann. Unter einer sogenannten Missense-Mutation (auch „nicht-synonyme“) versteht man einen Basenaustausch, der zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt und somit auch die Proteinfaltung und -struktur beeinflussen kann.⁴ Auf der anderen Seite kann auch eine stille Mutation („synonyme“, ohne Änderung der Aminosäuresequenz) einen Einfluss auf die Stabilität der mRNA, der Transkription und Translation haben.⁵

Neben den oben beschriebenen Faktoren ist zudem die Lokalisation der Mutation von großer Bedeutung: Für die Entstehung bestimmter Erkrankungen wie der Mukoviszidose oder der Phenylketonurie sind nur Mutationen im Bereich eines Genes relevant (=monogenetische Erkrankung). Im Gegensatz hierzu resultieren polygenetische Erkrankungen wie z.B. Diabetes, Depression und Schizophrenie aus einer Vielzahl von Mutationen unterschiedlicher Gene.

Um den Einfluss verschiedener Mutationen auf die Arzneimitteltherapie zu betrachten, ist es zunächst sinnvoll sich mit der Interaktion zwischen Arzneimittel und Organismus zu befassen. Im Wesentlichen werden diese Wechselwirkungen in Pharmakokinetik und Pharmakodynamik unterteilt.

Die Pharmakokinetik beschreibt den Einfluss des Organismus auf den Arzneistoff (Absorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung), wohingegen die Pharmakodynamik die Wirkungen des Arzneistoffs auf den Organismus beschreibt (Abbildung 1).⁶

So können genetische Veränderungen im Bereich Absorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung zu veränderten Konzentrationen am Wirkort führen. Beispielsweise münden vielfältige Mutationen im CYP2D6 Gen in eine verringerte CYP2D6 Enzymaktivität, woraus eine erhöhte Konzentrationen des Wirkstoffes am Wirkort und ein damit verbundenes, erhöhtes Nebenwirkungsrisiko resultieren.⁷ Polymorphismen im Bereich der Pharmakodynamik können durch eine veränderte Rezeptor- bzw. Zielstruktur ein vermindertes Ansprechen nach sich ziehen. Bekannt sind in diesem Zusammenhang unter Anderem Veränderungen der Vitamin-K-Epoxidreduktase, welche ein individuell unterschiedliches Ansprechen auf eine Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten bewirkt.⁸

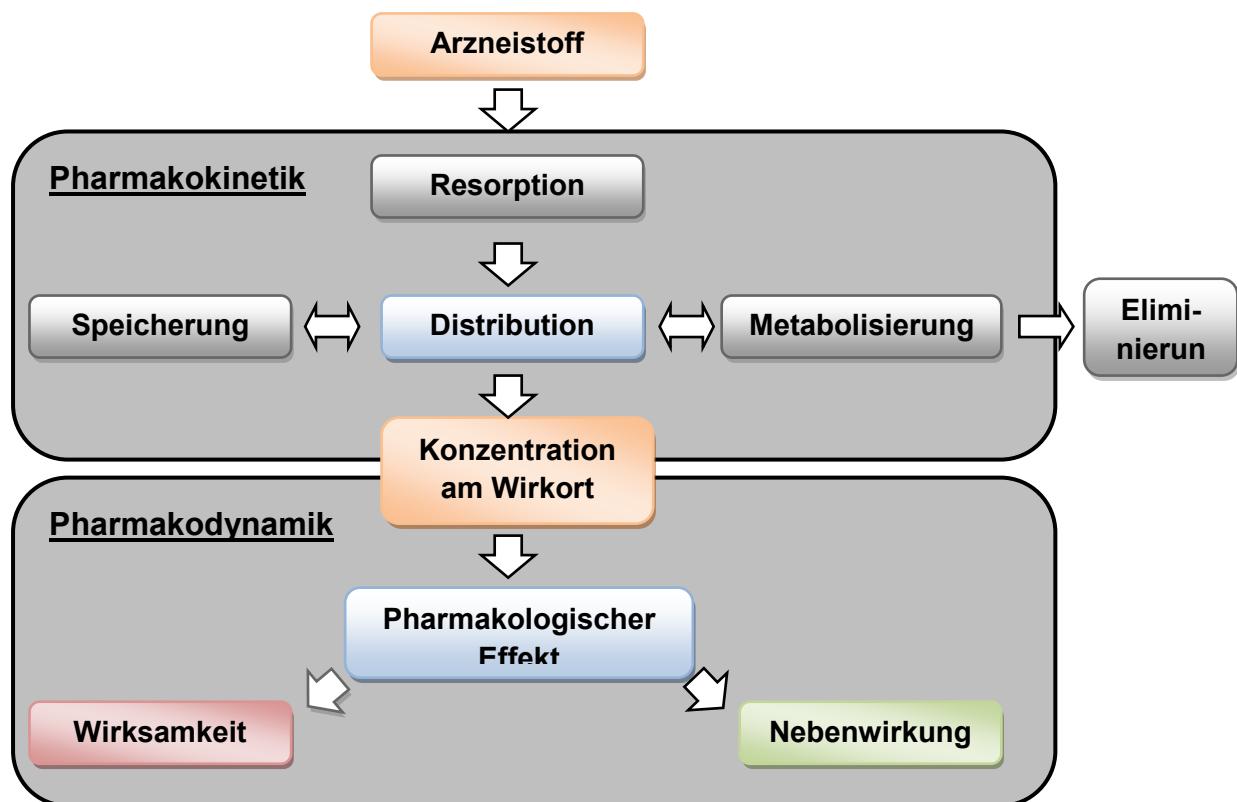


Abbildung 1: Pharmakokinetik und Pharmakodynamik adaptiert von Mutschler et al.⁸

Wieso Pharmakogenetik?

Ziel der Pharmakogenetik ist eine individuelle und maßgeschneiderte Therapie für den Patienten zu ermöglichen. So könnte an Hand des pharmakogenetischen Status eines Patienten ein effektives und sicheres Arzneimittel in einer spezifisch angepassten Dosis ausgewählt werden. Dieses Vorgehen

erhöht die Rate an Patienten, die auf eine Therapie ansprechen, und reduziert das Auftreten von Nebenwirkungen, was mit einer Einsparung von erheblichen Kosten verbunden ist. Allein in den USA treten pro Jahr trotz korrekter Anwendungsweise schätzungsweise 2.2 Millionen schwere Arzneimittel-Nebenwirkungen auf, die zu Kosten in Höhe von 4,3 Milliarde US\$ und bis zu 106.000 Toten führen.⁹ Hieraus lässt sich besonders auf Grundlage der Bedeutung von Polymorphismen auf die Variabilität von Arzneimittelwirkungen, und –nebenwirkungen ein großes Potential ableiten.³ Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die individualisierte Pharmakotherapie in der Zukunft eine zunehmende Rolle spielen und in einem breiten medizinischen Bereich Anwendung finden wird. Im folgenden Abschnitt wird der aktuelle Stand der pharmakogenetischen Forschung erläutert, in welchen Bereichen bereits eine maßgeschneiderte bzw. stratifizierte Therapie zur Verfügung steht und wieso pharmakogenetische Therapieansätze in der Antipsychotika-Therapie sinnvoll erscheinen.

Pharmakogenetische Forschung

Historisch gesehen entstand die pharmakogenetische Forschung in den späten 50er Jahren des 20. Jahrhunderts mit einer starken Fokussierung auf den pharmakokinetischen Bereich.¹⁰ Grund hierfür ist die Auffassung, dass die Konzentration eines Arzneistoffes für die Vermittlung der Wirkung aber auch der Nebenwirkungen maßgeblich verantwortlich ist.¹¹ Polymorphismen mit einem Einfluss auf die Pharmakokinetik konnten die Heterogenität in der Psychopharmako-Therapie jedoch nicht hinreichend genug erklären, weshalb im weiteren Forschungsverlauf auch zunehmend Mutationen im Bereich der Pharmakodynamik in den Fokus der Aufmerksamkeit rückten.⁷

Generell stellt die Pharmakogenetik ein sehr rapide wachsendes Forschungsgebiet dar, welches von drei Entwicklungen wesentlich profitiert hat: Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und immer bessere molekulare Verständnisse von Krankheiten führen zu einer starken Weiterentwicklung des Fachgebietes.¹² Zudem ermöglicht die technische Entwicklung eine immer kostengünstigere Durchführung molekularbiologischer Methoden.¹³

All diese Entwicklungen treiben die individualisierte Therapie voran, welche in einigen Gebieten der Medizin schon Anwendung findet. Jedoch sollte auf Grund der jetzigen Verwendung eher von einer stratifizierten Therapie als von einer individuell zugeschnittene Therapie gesprochen werden.¹² Stratifizierung meint in diesem Sinne die Zusammenfassung verschiedener Patienten zu einem Kollektiv, welches von einer bestimmten Therapie profitiert. Es ist abzusehen, dass in Zukunft das gesamte Patientenkollektiv in immer kleinere Gruppen aufgeteilt wird, die von einer bestimmten Therapie einen besseren Erfolg und weniger Nebenwirkungen zu erwarten haben. Als Beispiel für diese beginnende Stratifizierung ist auch die in den letzten Jahren aufkommende Gendermedizin zu nennen, die sich mit den Unterschieden in der Therapie von Männern und Frauen befasst.¹⁴

Eine weit verbreitete Anwendung findet die Stratifizierung in der Tumortherapie. Als Vorreiter dieser Therapieform ist die Behandlung des Mamma-Karzinoms zu nennen. Bereits in den 1980er Jahren wurde die Anwendung von Tamoxifen mit dem Vorhandensein eines Östrogen-Rezeptor positiven

Brustkrebs verknüpft.¹⁵ Im Jahr 1998 wurde Trastuzumab (Herceptin®), ein spezifischer Antikörper gegen Her-2-Rezeptoren, welcher nur bei Überexpression dieser Rezeptorart Verwendung findet, in Deutschland zugelassen.¹⁶

Als eines von vielen weiteren Beispielen in der stratifizierten Tumorthерапie ist noch die Verwendung von Cetuximab (Erbitux®) und Panutumab (Vectibix®) zu nennen. Bei beiden Medikamenten handelt es sich um Antikörper gegen den EGF Rezeptor, welche nur bei Vorliegen des KRAS Wildtyps Anwendung finden. Das Vorliegen einer KRAS Mutation führt zur Umgehung des durch die Antikörper blockierten Signalweges und resultiert trotz Medikation in eine erhöhte Zellproliferation, weshalb Patienten in diesem Fall nicht von einer Therapie profitieren.¹⁷

Neben der Tumorthерапie finden sich auch andere Bereiche der Medizin, in denen Medikamente nur für ein bestimmtes Patientenkollektiv angewendet werden bzw. nur dort wirksam sind: Ivacaftor (Kalydeco®) gilt als erste kausale Therapie der Mukoviszidose, kommt aber nur bei einer spezifischen G551D Mutation des CFTR Kanales zum Einsatz.¹⁸

Obwohl sich die stratifizierte Therapie nicht in allen Bereichen der Medizin etabliert hat, ist dennoch die Tendenz zu beobachten, dass für immer mehr Medikamente Einschränkungen oder Dosisanpassungen auf Grund bestimmter genetischer Polymorphismen in die Fachinformationen übernommen werden. Hier ist als Beispiel die Testung auf Polymorphismen in der Thiopurinmethyltransferase für 6-Mercaptopurin und Azathioprin zu nennen. Eine verminderte Enzymaktivität ist bei diesen Medikamenten mit einem erhöhten Risiko von akuter Leukopenie und Infektionsgefahr assoziiert.² Als aktuelles Beispiel ist die Einschränkung der Indikation von Codein für ultraschnelle Metabolizer zu nennen: Codein wird durch CYP3A4 zum Morphin bioaktiviert, weshalb es bei sehr schnellen Metabolisierern zu deutlich erhöhten Serumkonzentrationen kommt.¹⁹

Wieso Pharmakogenetik in der Antipsychotika-Therapie/ Ziele der Arbeit

Psychische Erkrankungen nehmen in der heutigen Gesellschaft eine zunehmende Bedeutung ein. Inzwischen zählen sie in Deutschland zur häufigsten Ursache für Frühberentungen. Im Zeitraum von 2000 bis 2009 stieg die Krankenhausfallhäufigkeit von psychisch Kranken um 70 Prozent.²⁰ Neben der Depression gehört die Schizophrenie mit einer Prävalenz von 1 % weltweit zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen.²¹ Atypische Antipsychotika stellen hierbei die Medikamente der Wahl dar, finden aber auch Anwendung in den angrenzenden Indikationsgebieten der wahnhaften bzw. bipolaren affektiven Störungen und Depressionen mit psychotischen Symptomen.²²

Eine stratifizierte bzw. adaptierte Antipsychotika-Therapie existiert zur Zeit nicht. Pharmakogenetische Therapieansätze sind in diesem Bereich dennoch sehr vielversprechend, da sie eine frühzeitige Identifikation von Patienten, die von einer bestimmten Therapie profitieren, ermöglichen. Dies erscheint besonders im Kontext großer interindividueller Unterschiede im Ansprechen auf eine Antipsychotika-Therapie als sinnvoll und zielführend. Beachtliche 78 % der Patienten brechen eine antipsychotische Therapie vor 18 Monaten auf Grund fehlender Effektivität ab.²³ Der häufig

vorgenommene Wechsel zu einem effektiveren Antipsychotikum gestaltet sich hierbei als schwierig, langwierig und ist mit verschiedenen Medikationsversuchen verbunden.²⁴

Neben dem unzureichenden Ansprechen stellen unerwünschte Nebenwirkungen in der Antipsychotika-Therapie ein weiteres und erhebliches Problem dar. Hierbei ist die Gewichtszunahme als relevanteste und bedeutendste Nebenwirkung zu nennen. Eine vermehrte Gewichtszunahme geht mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Diabetes einher²⁵ und stellt einen führenden Grund der Noncompliance dar.^{26, 27} Pharmakogenetische Therapieansätze sind in diesem Kontext sinnvoll, da erhebliche Unterschiede in der Ausprägung der Gewichtszunahme existieren, welche zu einem Großteil auf genetische Faktoren zurückgeführt werden können.²⁸ Eine gezielte prätherapeutische Genotypisierung könnte helfen Hochrisiko-Patienten schon vor der Therapie zu identifizieren, zu erheblichen Einsparungen im Gesundheitswesen beizutragen und den Therapierfolg zu steigern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation und Prüfung relevanter, genetischer Marker im Hinblick auf eine stratifizierte Antipsychotika-Therapie. Hiermit sollte die Frage beantwortet werden, ob bestimmte Polymorphismen ein verändertes Ansprechen bzw. das Auftreten von Nebenwirkungen vorhersagen können.

Hierfür wurden zuerst relevante und vielversprechende Polymorphismen in Kandidatengenen und aus GWAS identifiziert. In einem zweiten Schritt folgte die Entwicklung von Methoden zur Identifikation der jeweiligen Polymorphismen. Um auch eine praxisorientierte Anwendung im klinischen Alltag zu gewährleisten, wurden schnelle, effiziente und verlässliche, auf Fluoreszenz basierende PCR-Methoden am LightCycler entwickelt. Abschließend wurde der Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Effektivität und die Nebenwirkungsrate in einem antipsychotischen Patientenkollektiv untersucht.

Der Hauptfokus der Arbeit lag hierbei auf dem Gebiet der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme. Zudem wurden verschiedene Polymorphismen im Kontext einer veränderten antipsychotischen Therapievorhersage untersucht und die Auswirkung von relevanten Mutationen im Olanzapinmetabolismus auf die Serumspiegel und klinischen Parameter betrachtet.

Auf Grund der vorherrschenden Verwendung von Antipsychotika in der Therapie der Schizophrenie²² wird im anschließenden Kapitel eine Einführung zu diesem Thema gegeben. Nachfolgend werden die untersuchten Polymorphismen und die jeweiligen Kandidatengene differenziert nach den einzelnen Hauptbereichen Pharmakokinetik, Response und Gewichtszunahme vorgestellt.

1.2 Einführung in die Schizophrenie

1.2.1 Allgemeines bzw. Klassifikation

„Als Schizophrenien wird eine Gruppe psychischer Erkrankungen bezeichnet, denen eine vielschichtige Persönlichkeitsstörung mit charakteristischen Veränderungen des Denkens, Fühlens und der Beziehung zur Umwelt zu Grunde liegt“.⁸ Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei 1 %, wobei die Hälfte der Erkrankungen zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr beginnt. Die von Mutschler et al. getroffene Formulierung im Plural deutet schon darauf hin, dass es sich bei der Schizophrenie um eine heterogene Gruppe von Störungen handelt, die in unterschiedlichen Ausprägungen auftritt. Des Weiteren existieren keine pathognomonischen Symptome. Vielmehr gibt es nach Moeller et al. charakteristische Symptombereiche wie Wahn, Halluzination, Ich-Störungen, formale Denkstörungen, affektive Störungen und katatone Symptome. Zwangsläufig muss keines dieser Symptome bei einer Schizophrenie vorliegen, weshalb 20 % der Schizophrenien auch ohne Wahnsymptome auftreten.²⁹

Klinisch diagnostiziert wird die Schizophrenie nach ICD-10. Hierfür müssen über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen, mindestens 1 Symptom der Punkte 1-4 und/oder mindestens 2 Symptome der Punkte 5-9 deutlich auftreten (Tabelle 1; links). Zudem wird die Schizophrenie nach ICD-10 in weitere Subtypen mit jeweils spezifisch vorherrschender Symptomatik unterteilt (Tabelle 1; rechts).

Generell ist die Prognose der Erkrankung relativ gut – bei fast 20 % der Erkrankten kommt es zu einer fast völligen Heilung und bei 40 % der Fälle sind im späteren Krankheitsverlauf psychotische Symptome kaum noch erkennbar. Jedoch gestaltet sich die Therapie für ein Drittel der Patienten als schwierig.⁸ Als positive prognostische Marker haben sich ein akuter Beginn mit deutlich situativen Auslöser und als negative Marker eine längere Erkrankungsdauer erwiesen.²⁹

Tabelle 1: Symptome und Subtypen der Schizophrenie

1) „Positivsymptome“ wie Ich-Störungen (Gedankenlautwerden, Gedankeneingabe, Gedankenentzug, Gedankenausbreitung)	Paranoide Schizophrenie (F20.0) Wahn und Halluzination prägen das klinische Bild Sehr häufig
2) Inhaltliche Denkstörungen (Kontrollwahn, Beziehungswahn, etc.)	Hebephrene Schizophrenie (F20.1) Gekennzeichnet durch läppisch-albernes Verhalten, affektiver Verflachung und Gleichgültigkeit Häufig im Jugendalter
3) Akustische Halluzinationen in Form kommentierender, dialogischer oder anderer Stimmen	Katatone Schizophrenie (F20.2) Psychomotische Störungen stehen im Vordergrund Sehr selten
4) Anhaltender, kulturell unangemessener bizarrer Wahn (z.B. das Wetter kontrollieren zu können oder Kontakt mit Außerirdischen zu haben)	undifferenzierte Schizophrenie (F20.3)
5) Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität	Schizophrenes Residuum (F20.5) Persönlichkeitsänderung im Sinne von Antriebsmangel, Affektarmut und sozialem Rückzug prägt das Bild Meist im Verlauf einer Erkrankung
6) Formale Denkstörungen (Gedankenabreißen, Zerfahrenheit, Neologismen, etc.)	Schizophrenia simplex (F20.6) Symptomarme Form ohne Halluzination und Wahn mit schleichendem Verlauf und zunehmender Minussymptomatik Selten und schwer diagnostizierbar
7) Katatone Symptome (z.B. Haltungsstereotypien, Negativismus, Stupor)	
8) "Negativsymptome" (= Minussymptome) wie Apathie, Sprachverarmung, verflachter oder inadäquater Affekt, zumeist mit sozialem Rückzug	
9) Sozialer Rückzug, Trägheit, Ziellosigkeit	

1.2.2 Entstehung der Schizophrenie

Es gilt als gesichert, dass die Ätiopathogenese der Schizophrenie aus einem multifaktoriellen Hintergrund resultiert. Aus Zwillingsstudien ist bekannt, dass genetische Komponenten einen Großteil (~80 %) dieses multifaktoriellen Modells ausmachen.³⁰ In den letzten Jahren versucht man sehr intensiv mittels GWAS, in denen das Vorkommen von hunderttausenden von Polymorphismen in gesunden Probanden mit Erkrankten verglichen werden, neue Gene im Zusammenhang mit der Schizophrenie zu identifizieren. Zu den vielversprechendsten und gut replizierten Befunden zählen das ZNF804A, das Transkriptionsfaktor 4 und das Major Histo-Kompatibilitäts-Komplex Gen.³¹ Neben den Punktmutationen wird auch die Beteiligung an copy number variations intensiv diskutiert.^{32, 33} Wohlgemerkt nimmt die Anzahl an neuen Markern stetig zu, so dass eine genetische Datenbank aus dem Jahr 2009 allein 7855 Gene im Zusammenhang mit der Schizophrenie beinhaltet.^{31, 34} Nach den neuesten Erkenntnissen wird geschätzt, dass mit 8.300 unabhängigen Polymorphismen 32 % der Varianz in der Anfälligkeit der Schizophrenie erklärt werden können.³⁵ Auch wenn sich über die Validität mancher Befunde streiten lässt, verdeutlicht dies doch, wie komplex und schwierig sich die Suche nach den gentischen Ursachen der Schizophrenie gestaltet.³¹

Aus biochemischer Sicht ist die Dopaminhypothese die am weitesten verbreitete Hypothese zur Entstehung der Schizophrenie. Hierbei geht man von einer unzureichenden D₂-Rezeptor-Aktivierung im mesokortikalen und einer überschießenden D₂-Rezeptor-Stimulation im mesolimbischen System aus. Aus der Überfunktion leitet man die Positivsymptomatik und entsprechend für die Unterfunktion die Negativsymptomatik ab.⁸ Gestützt wird diese Hypothese durch den Wirkmechanismus von Antipsychotika, welche über die Blockade von postsynaptischen D₂-Rezeptoren ihre antipsychotische Wirksamkeit entfalten.³⁶ Zudem können Amphetamine, welche zu einer erhöhten Dopaminkonzentration führen, eine akute Symptomatik in schizophrenen Patienten auslösen.³⁷ Angemerkt sei an dieser Stelle aber auch, dass es sich nur um eine Hypothese handelt, der eindeutige wissenschaftliche Beleg also noch aussteht. Unklar ist außerdem, ob die fehlgeleitete Dopaminfunktion einen zentralen Ursprung in der Entstehung der Schizophrenie einnimmt oder ob es sich nur um einen kleinen Teilbereich der fehlgesteuerten Erregungsleitung handelt.²⁹ In diesem Zusammenhang werden auch immer weitere pathophysiologische Veränderungen der GABAergen, glutamanergen, cholinergen und serotonergen Erregungsübertragung diskutiert.^{38,39}

Neben der Genetik und der fehlgesteuerten Erregungsleitung finden sich auch psychosoziale Faktoren, strukturelle Abnormalitäten des ZNS, Störungen der Informationsverarbeitung und weitere Faktoren im multifaktoriellem Modell der Entstehung der Schizophrenie wieder.⁴⁰

1.2.3 Therapie der Schizophrenie

In der Therapie der Schizophrenie hat sich ein mehrdimensionaler Ansatz, der sowohl psychopharmakologische als auch psycho- und sozialtherapeutische Maßnahmen beinhaltet, etabliert. Zu Beginn der Erkrankung und bei akut ausgeprägter Positivsymptomatik steht meist die Behandlung mit Antipsychotika im Vordergrund. Mit Besserung der Symptomatik und wachsender Gesprächs- und Kooperationsbereitschaft des Patienten gewinnen verhaltenstherapeutische Ansätze an Bedeutung.²⁹

Antipsychotika werden in der Regel in typische und atypische unterteilt, wobei die Grundlage dieser Einteilung eher historisch zu sehen ist. Diese Klassifizierung ist aus heutiger Sicht wenig hilfreich und nicht unumstritten. So favorisiert die World Psychiatric Association die Einteilung in Generationen mit Clozapin, Amisulprid und Olanzapin als zweite, Aripiprazol als dritte und die bisher als typischen bezeichneten Antipsychotika als erste Generation. Eine kürzlich publizierte Netzwerk-Metaanalyse von Leucht et al., die 15 Antipsychotika in 212 Studien mit 43.049 Patienten untersuchte, weist auf die individuell verschiedenen Eigenschaften eines Antipsychotikums hin und betont die differenzierte Betrachtung des jeweiligen Antipsychotikums.⁴¹

Chlorpromazin stellt den ersten Vertreter der Substanzklasse der typischen bzw. der ersten Generation von Antipsychotika dar, welcher 1950 zugelassen wurde. Als weitere Vertreter gelten zudem Perphenazin, Haloperidol, Melperon, und Fluspirilen. Kennzeichnend für diese Medikamente ist die vorherrschende D₂ (D₃)-Rezeptor Blockade. Aus dieser resultiert die Verringerung ausgeprägter Plussymptomatik wie Wahn und Halluzination, bedingt aber auch die Störung des extrapyramidalen Bewegungsapparates durch Dopaminhemmung in anderen Hirnarealen. Die extrapyramidalen-motorischen Störungen lassen sich in Akathisie (ausgeprägte Unruhe), Parkinosoid (Tremor, Rigor, Akinese), Dystonie (abnorme Körperbewegungen) und Dyskinesien (hyperkinetische Bewegungen) unterscheiden. Unter den hyperkinetischen Nebenwirkungen sind besonders Spätdyskinesien auf Grund der irreversiblen Folgeschäden gefürchtet. Frühdyskinesien, werden vom Patienten zwar als sehr unangenehm empfunden, lassen sich in der Regel aber gut medikamentös behandeln.²⁹

Im Jahr 1973 wurde mit Clozapin das erste atypische Antipsychotikum bzw. die zweite Generation von Antipsychotika auf den Markt gebracht. Charakteristisch für diese Substanzgruppe ist ein sehr heterogenes Wirkprofil mit Blockade von Serotonin-, Noradrenalin- und Dopaminrezeptoren. Dieses breite Wirkprofil erlaubt auch die Behandlung von Patienten mit ausgeprägter Negativsymptomatik und kognitiven Defekten. Zudem tritt die charakteristische Nebenwirkungen der EPS deutlich seltener auf, was auch zur Namensgebung der atypischen Antipsychotika führte. Als weiterer Vertreter dieser Substanzklasse sind noch Olanzapin, Risperidon, Amisulprid, Quetiapin, Sertindol und Zotepin zu nennen. Häufig ist die Anwendung der zweiten Generation von Antipsychotika durch die ausgeprägte Gewichtszunahme limitiert, welche am stärksten bei Olanzapin und Clozapin ausgeprägt ist.⁴¹

Generell bestimmt das jeweilige pharmakologische Profil die Nebenwirkungen eines Antipsychotikums, weshalb im Folgenden die Rezeptoraffinität der typischen unerwünschten Arzneimittelwirkung der jeweiligen Rezeptorblockade gegenübergestellt ist (Tabelle 2). Die in den Studienpopulationen verwendeten atypischen Antipsychotika sind nach absteigender

Verordnungsreihenfolge (Olanzapin>Quetiapin>Risperidon>Clozapin) in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt und dem Chlorpromazin gegenübergestellt. Auf die Darstellung von Amisulprid (4. häufigste Studienmedikation) wurde verzichtet, da es eine ausgeprägte, selektive D₂- und D₃-Rezeptoraffinität, wie viele typische Antipsychotika, besitzt. Das beobachtete „atypische“ klinische Verhalten mit einem reduzierten EPS-Risiko und günstiger Beeinflussung von Negativsymptomatik wird mit dem Antagonismus am 5HT₇-Rezeptor in Verbindung gebracht,⁴² die genaue Wirkungsweise ist aber weiterhin unklar.²²

Tabelle 2: Rezeptoraffinitäten der verwendeten atypischen Antipsychotika modifiziert von Gründer²²

Rezeptor	Antipsychotikum					
	Olanzapin	Quetiapin	Risperidon	Clozapin	Chlor-promazin	NW
D ₂	11	160	3,3	180	19	EPS Prolaktin- erhöhung Sexuelle Dysfunktion
5HT ₂	4	294	0,2	1,6	1,4	Gewichts- zunahme Sedation
D ₁	31	455	750	38	56	
D ₄	9,6	1164	17	9,6	12	
mACH	1,9	120	>10000	7,5	60	Mundtrocken- heit Obstipation
α ₁	19	62	2	9	0,6	Schwindel Orthostase Blutdruck- abfall
α ₂	230	2500	56	160	750	
H ₁	7,1	11	59	2,8	9,1	Müdigkeit Sedation Gewichts- zunahme

Dargestellt sind Ki-Werte (nM), welche durch die Kompetition mit Radioliganden um die Bindung an diesen Rezeptoren ermittelt wurden. Die Daten wurden aus verschiedenen Originalpublikationen gemittelt. Sie weichen daher teilweise erheblich von publizierten Daten aus einzelnen Publikationen ab.

Die von Leucht et al. publizierte Metaanalyse ermöglicht auch die Beurteilung der Relevanz einer jeweiligen Nebenwirkung: So zeigte sich für Haloperidol ein erhöhtes Risiko für ein Auftreten von EPS (gefolgt von Zotepin und Chlorpromazin). Ein erhöhter Prolaktinanstieg war vermehrt bei Paliperidon und Risperidon zu finden, während Sertindol und Amisulprid eine deutlich ausgeprägte QT-Zeit – Verlängerung aufwiesen. Alle Antipsychotika, welche in der Netzwerkmetaanalyse untersucht wurden, zeigten ein signifikant besseres Ergebnis als Placebo, so dass an der Wirksamkeit der Medikamente kein Zweifel besteht.⁴¹

1.3 Kandidatengene und relevante Polymorphismen

1.3.1. Polymorphismen im Olanzapinmetabolismus

„Olanzapin gehört zu den meist verschriebenen Antipsychotika weltweit und wurde auch in der Studienpopulation bevorzugt verschrieben. In der bisweilen größten Studie mit Antipsychotika, dem Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Trial, konnte Olanzapin (im Vergleich zu Perphenazin, Quetiapin, Risperidon und Ziprasidon) als effektivste Therapieoption identifiziert werden.²³ Zudem bestätigte eine Netzwerk-Metaanalyse von Leucht et. al. Olanzapin neben Clozapin und Amisulprid als effektivstes Antipsychotikum.⁴¹

Trotz dieser Vorteile ist die Anwendung von Olanzapin häufig mit metabolischen Nebenwirkungen verbunden.⁴³ So konnte im zuvor beschriebene CATIE Trial eine vermehrte Gewichtszunahme und ein Anstieg von Cholesterin und Triglyceriden unter Olanzapin-Therapie identifiziert werden.²³ Auch Leucht et al. identifizierten Olanzapin als Antipsychotikum mit der stärksten Gewichtszunahme.⁴¹

Die Beziehung zwischen Olanzapin Serumkonzentrationen und den metabolischen Nebenwirkungen scheinen nach aktueller Studienlage abhängig von der Konzentration zu sein.^{44,45} Darüber hinaus konnten Olanzapinserum- und Metabolitkonzentrationen als Marker für das klinische Ansprechen identifiziert werden.^{46, 47}

Viele Faktoren können die Serumkonzentrationen von Olanzapin beeinflussen und es existieren große interindividuelle Unterschiede in Dosis-korrigierten Serumkonzentrationen.⁴⁸ So variiert das Verhältnis der Serumkonzentration zur Dosis für 80 % der Patienten in einem Bereich von 0,6-3,1 ng/ml pro mg/Tag, zeigt jedoch eine bis zu 26fache Streuung.⁴⁹

Der Metabolismus von Olanzapin ist in Abbildung 2 dargestellt: Hauptmetabolit stellt hierbei das Olanzapin-10-N-Glukuronid dar, welches durch die Uridin Diphosphat Glukuronyltransferase 1 A4 (UGT1A4) gebildet wird.⁵⁰ Das Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) stellt jedoch das relevanteste Enzym im Olanzapinmetabolismus dar, da nur für seinen Metaboliten N-Desmethylolanzapin eine Korrelation mit der Olanzapin Clearance besteht.^{51, 52} Als weitere, untergeordnete Enzyme in der Biotransformation von Olanzapin sind das CYP2D6 und die flavin-containing monooxygenase zu nennen (FMO).^{51,52}

Zu den bekanntesten Einflussfaktoren der Olanzapin Serumkonzentration zählen das Geschlecht und Inhibitoren bzw. Induktoren von CYP1A2: So weisen männliche Raucher eine deutlich erhöhte Clearance und somit auch erniedrigte Olanzapin Serumkonzentrationen gegenüber weiblichen Nichtrauchern auf.^{51, 53} Trotz dieser bekannten Einflussfaktoren konnte eine multiple lineare Regressionsanalyse mit 627 Patienten und den Einflussfaktoren Dosis, Rauchstatus, Geschlecht, Alter und Körpergewicht nur 24 % der Varianz in Olanzapin Serumkonzentration erklären.^{53“ 54}

Unterschiede in der Aktivität von relevanten Olanzapin metabolisierenden Enzymen könnten daher einen Großteil der verbleibenden interindividuellen Variabilität erklären. Die ausgewählten, vielversprechende Polymorphismen und die zu Grunde liegenden Enzyme werden nun kurz vorgestellt.

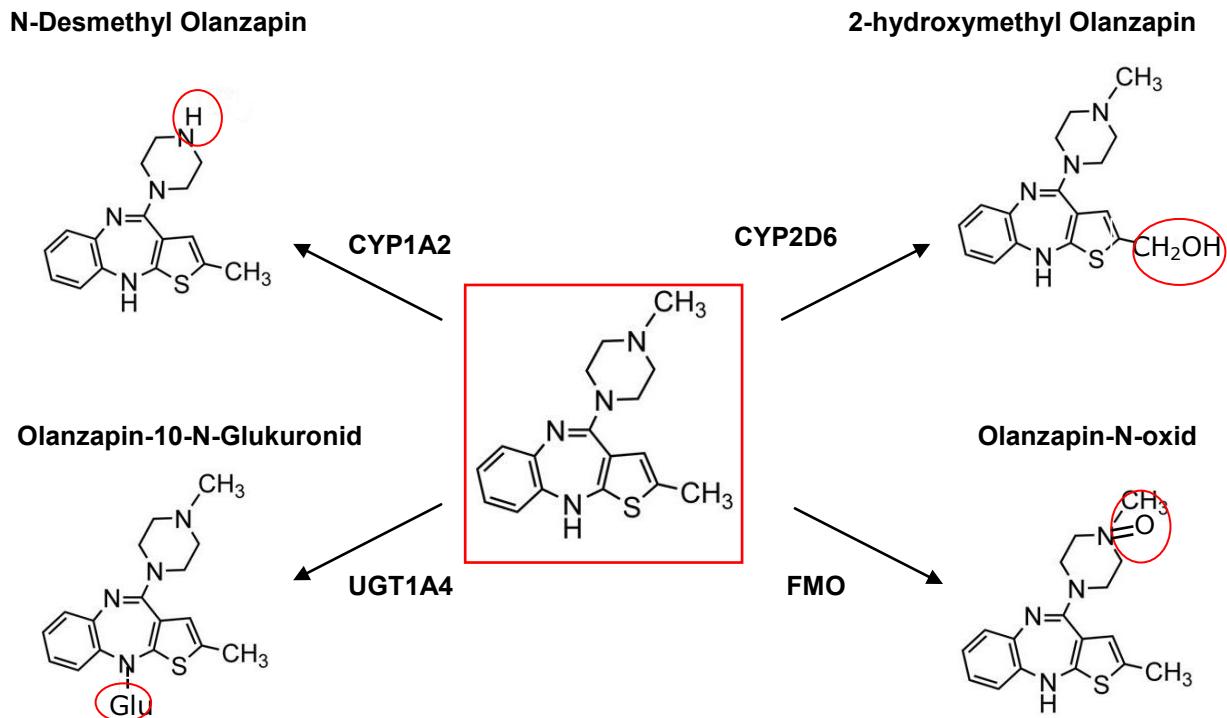


Abbildung 2 Olanzapinmetabolismus

1.3.1.1 CYP1A2

Das CYP1A2 Gen ist auf Chromosom 15 lokalisiert und besteht aus sieben Exons und umfasst einen Bereich von 7,8 kb.⁵⁵ Es kodiert für das CYP1A2 Enzym, welches zur Familie der Cytochrom (CYP) Enzyme gehört und an der Biotransformation von exogenen und endogenen Substraten beteiligt ist.⁵⁶ Hervorzuheben ist hierbei die Schlüsselrolle in der Metabolisierung von Clozapin und Olanzapin.⁵⁷ Generell existiert eine hohe interindividuelle Variabilität sowohl in der CYP1A2 Expression als auch in der Aktivität, welche größtenteils auf genetische Faktoren und Umwelteinflüsse zurückgeführt werden kann.⁵⁸ Bis jetzt wurden 40 verschiedene Mutationen im CYP1A2 Gen identifiziert,⁵⁸ die sich jedoch stark in der Allelhäufigkeit in Abhängigkeit von der Population unterscheiden.⁵⁵ Da viele dieser Mutationen sich im Linkage Disequilibrium befinden und meist sehr selten auftreten, empfahl eine Studie für Routinediagnostik nur die Genotypisierung des *1F und *1D Polymorphismus in Kaukasiern.⁵⁹

rs762551 (*1F) und rs35694136 (*1D) Polymorphismus

Der auch als *1F (-163C>A, rs762551) bezeichnete Polymorphismus ist die am häufigsten auftretende Mutation des CYP1A2 Genes in Kaukasiern und stellt einen Basentausch von Cytosin zu Adenin im Intron 1 des Genes dar.⁵⁵ In vielen Studien geht dieser Polymorphismus mit einer erhöhten Induzierbarkeit des CYP1A2 Enzyms in Rauchern einher.⁶⁰⁻⁶⁴ Auf der anderen Seite liegen widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Einfluss dieses Polymorphismus auf Olanzapin Serumkonzentration vor.⁶⁵⁻⁶⁹ Die Studienlage verdeutlicht die Relevanz weiterer Studien zum klinischen Nutzen einer CYP1A2-Genotypisierung.

Der CYP1A2*1D Polymorphismus (-2467T>delT, rs35694136) stellt eine Deletion der Thymin Base dar und ist ebenfalls im Intron 1 des Genes lokalisiert. In einer zuletzt publizierten Studie konnte ein Einfluss auf die Olanzapin Clearance in Rauchern nachgewiesen werden.⁶⁰ Generell existieren nur wenige Studien in kleinen Population mit nicht mehr als 50 Patienten, die sich mit der Auswirkung des Polymorphismus auf Olanzapin Serumkonzentrationen und Nebenwirkungen befasst haben, sodass die Auswirkung und Relevanz des *1D Polymorphismus weiterhin unklar ist.

1.3.1.2 POR

Das P450 Oxidoreduktase Gen ist lokalisiert auf Chromosom 7 und besteht aus 16 Exons.⁷⁰ Es kodiert für ein 78kDa großes Protein, welches Elektronen von NADP (Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat-Oxidase) auf das Häm-Zentrum des CYP überträgt und somit eine elementare Bedeutung für dessen Funktion darstellt.^{71, 72} In Leber spezifischen POR Knockout Mäusen, zeigt sich ein stark beeinträchtigter hepatischer Metabolismus.⁷³ In Menschen resultieren aus Mutationen im POR Gen eine veränderte Steroidsynthese und kongenitale Missbildungen, wohingegen klinische Effekte auf den Metabolismus weitgehend unbekannt sind.⁷⁴ Jedoch konnten Polymorphismen innerhalb des Genes sowohl mit der CYP1A2 Aktivität in-vitro^{74, 75} als auch in-vivo⁷⁶ assoziiert werden.⁷¹

rs2302429 Polymorphismus

Der rs2302429 Polymorphismus stellt eine Punktmutation der Guanin zur Adenin Base dar und befindet sich im Intron 11 des POR Genes. In einer kürzlich publizierten Studie zeigte dieser Polymorphismus einen signifikanten Einfluss auf die CYP1A2 Aktivität bei Rauchern und Patienten, die das Rauchen eingestellt hatten und konnte als relevanter Einflussfaktor aus 5 weiteren POR Gen Polymorphismen identifiziert werden.⁷¹ Bisher wurde der Einfluss dieser Mutation auf die Serumkonzentration des Olanzapins nicht untersucht.

1.3.1.3 UGT1A4

Die Uridin Diphosphat Glukuronyltranferase (UGT1) gehört zur Gruppe der Phase II Enzyme und ist für mehr als ein Drittel des Phase II Metabolismus verantwortlich.⁷⁷ Generell überträgt dieses Enzym

die Glukuronsäure auf verschiedene lipophile Substrate und trägt somit zu einer besseren Wasserlöslichkeit und beschleunigten Elimination bei.⁷⁸ Die UGT1A4 ist von entscheidender Bedeutung im Olanzapinmetabolismus, da sie die Glukuronidierung zum Olanzapin-10-N-Glukuronid katalysiert, welcher der Hauptmetabolit darstellt.⁵⁰ Von den über 100 identifizierten Mutationen stellt der UGT1A4*2 und der UGT1A4*3 Polymorphismus die am besten untersuchten Varianten innerhalb des UGT1A4 Genes dar.⁷⁹

rs2011425 Polymorphismus

Der UGT1A4*3 Polymorphismus bezeichnet den Basenaustausch vom Guanin zu Thymin und verursacht eine Änderung der Aminosäuresequenz von Leucin zu Valin. Die genannte Punktmutation konnte in zwei in-vitro Studien mit einer erhöhten Glukuronidierung assoziiert werden.⁷⁹ In Bezug auf Olanzapin Serumkonzentrationen konnten zudem in zwei kürzlich publizierten Studien eine verringerte C/D Ratio in Trägern des UGT1A4*3 identifiziert werden.^{65, 80}

Zusammenfassend existieren für alle beschriebenen Polymorphismen außer für den rs2302429 Polymorphismus im POR Gen Studien, die den Einfluss auf die Olanzapin Serumkonzentration untersucht haben. Die Studienlage ist jedoch sehr heterogen und durch kleine Patientenkollektive geprägt, so dass die Relevanz einer Genotypisierung im klinischen Alltag weiterhin unklar ist. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher die bereits vorliegenden Ergebnisse an Hand der eigenen Studienpopulation zu überprüfen und einzuordnen. Der erwähnte rs2302429 Polymorphismus stellt einen interessanten und bisher im Kontext von Olanzapin Serumkonzentrationen nicht erforschten Marker dar, weshalb eine Untersuchung in der Studienpopulation sinnvoll erschien.

Eine weitere Fragestellung die in vorausgegangenen Studien nicht hinreichend genug adressiert wurde, ist der Zusammenhang bzw. die Auswirkung von pharmakokinetischen Markern auf das Ansprechen einer Olanzapin-Therapie. Daher wurde neben dem Einfluss der erwähnten Polymorphismen auf die Olanzapin Serumkonzentration in einem zweiten Schritt untersucht, ob diese allein oder in der Kombination mit weiteren Risikofaktoren auch eine Auswirkung auf das Ansprechen einer antipsychotischen Therapie haben.

1.3.2 Polymorphismen im Kontext einer verbesserten Therapievorhersage

Obwohl alle atypischen Antipsychotika signifikant effektiver als Placebo sind,⁴¹ gibt es doch erhebliche, interindividuelle Unterschiede im Ansprechen auf ein Antipsychotikum. Zudem stellt das nicht oder nur ungenügende Ansprechen auf die primäre Behandlung ein schwerwiegendes Problem dar: So zeigte sich in der Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Studie, dass 74 % (!) der Patienten die Therapie auf Grund von fehlender Effektivität, nicht tolerierbaren Nebenwirkungen oder anderen Gründen vor 18 Monaten abbrachen.²³

Im Rahmen der Dissertation wurden daher neuartige Kandidatengene im Hinblick auf eine verbesserte Therapievorhersage untersucht. Nachfolgend werden vielversprechende Polymorphismen im CNR1 Rezeptor, HHR3 Rezeptor, im ABCB Transporter und im ZNF804A Gen vorgestellt.

1.3.2.1 CNR1 Gene

Der untersuchte rs1049353 Polymorphismus befindet sich in Codon 453 des Cannabinoid Rezeptor 1 Genes, welcher als Prädispositionslokus für Schizophrenie von Cao et al. identifiziert wurde.⁸¹ Im Rahmen der Doktorarbeit wurde der Polymorphismus auch im Kontext der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme untersucht, weshalb für nähere Information auf das Kapitel 1.4.1.4.4 verwiesen sei.

1.3.2.2 Histamin Rezeptor 3 Gen

Das Histamin Rezeptor 3 (HR3) Gen ist auf Chromosom 20q13.33 lokalisiert⁸² und kodiert für den gleichnamigen, präsynaptischen Auto- und Heterorezeptor, welcher im zentralen Nervensystem weit verbreitet ist.⁸³ Als Autorezeptor spielt er eine relevante Rolle in der Regulierung der neuronalen Histaminfreisetzung in-vivo⁸⁴ und ist an der Freisetzung von Dopamin, Acetylcholin und Norepinephrin beteiligt.⁸⁵ Zudem formt der postsynaptische HR3 Heterodimere mit dem Dopamin 2 Rezeptor und moduliert somit negativ die Dopamin Rezeptor 2 Funktion.^{86,87} Auf Grund der vergleichbaren Eigenschaften von inversen HR3 Agonisten/Antagonisten und Antipsychotika in Tiermodellen,⁸⁸ gilt diese Substanzgruppe als vielversprechendes Ziel in der Behandlung der Schizophrenie und weiteren kognitiven Störungen.⁸⁹⁻⁹² Trotz hoher bis moderater Affinität verschiedener atypischen Antipsychotika zu HR3 und anderen Histamin Rezeptoren,^{86,93,94} wurde der Einfluss von Polymorphismen innerhalb des HR3 Genes auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme nicht hinreichend genug untersucht.

rs3787429 und rs3787430 Polymorphismus

Im Bereich des HR3 Genes existieren nur wenige Polymorphismen, die eine häufige Verteilung in der europäischen Bevölkerung besitzen.⁸² Daher kann mit nur 2 stellvertretenden Punktmutationen (rs3787429 und rs3787430) nach dem HapMap Projekt der gesamte Genbereich abgedeckt werden.⁸⁶ Die untersuchten Polymorphismen befinden sich im Exon 3 des HR3 Genes und konnten in einer

kürzlich publizierten Studie als mögliche Marker eines veränderten Therapieansprechens identifiziert werden.⁸⁶

1.3.2.3 ZNF804A Gen

Das ZNF804A Gen ist lokalisiert auf Chromosom 2q32.1 und besteht aus 4 Exons. Es kodiert für ein 1210 Aminosäuren großes Protein, welches im Gehirn exprimiert wird und auf Grund der C₂H₂-Domäne der Zink-Finger Protein-Familie zugeordnet wird.⁹⁵ Das genannte Gen wurde im Rahmen einer GWAS im Jahr 2008 identifiziert,⁹⁶ wobei über die genaue Funktion noch wenig bekannt ist. Eine Vielzahl an Studien deutet jedoch auf eine mögliche Rolle als Transkriptionsfaktor hin, welcher mit Promoterregionen von PRSS16 und COMT interagiert und an der Regulierung weiterer Gene beteiligt ist,⁹⁷ denen eine relevante Rolle in der Schizophrenie zugeschrieben wird.⁹⁸

rs1344706 Polymorphismus

Der rs1344706 Polymorphismus ist im Intron 2 des ZNF804A Genes lokalisiert und stellt den ersten Marker dar, der im Rahmen einer GWAS mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen assoziiert wurde und in weiteren GWAS robust reproduziert werden konnte.^{97, 99,100,101} Zudem zeigte der untersuchte Polymorphismus veränderte Transkriptionslevel des ZNF804A Genes,^{98,99,102} welches für die Regulation weiterer mit Schizophrenie assoziierter Gene (PRSS16, COMT, PDE4B und DRD2) verantwortlich gemacht wird.⁹⁷ Zwei Studien in schizophrenen Patienten postulierten eine verminderte Verbesserung des PANSS Score bei Vorliegen des rs1344706 Risiko AA-Genotyps.^{103, 104}

1.3.2.4 ABCB1 Gen rs28656907(T=>C) und rs28373093 (G=>C)

Das ABCB1 Gen, früher auch als MDR1 Gen bezeichnet, kodiert für das P-Glykoprotein und ist auf Chromosom 7q21.1 lokalisiert. Es fungiert als Effluxtransporter, welcher unter ATP Verbrauch Substrate aus den Zellen schleust¹⁰⁵ und daher vermehrt in Barriere-Regionen wie der Blut-Hirn-Schranke, sowie der Blut-Plazenta-Schranke anzutreffen ist.^{106,107} Aus diesen Gründen nimmt das P-GP eine zentrale Rolle in der Absorption, Distribution und Elimination von vielen Xenobiotika ein, zu denen auch viele Antipsychotika gehören.¹⁰⁸ Obwohl über 1000 SNP im Genbereich identifiziert wurden, konzentrieren sich Studien im Zusammenhang mit Antipsychotika auf drei Polymorphismen (rs1128503, rs2032582, rs1045642) mit divergenten Ergebnissen.¹⁰⁸

rs28656907 und rs28373093 Polymorphismus

Der dinukleotide Polymorphismus rs28656907/rs28373093, lokalisiert in der proximalen Promoterregion des ABCB1 Genes konnte in einer Studie von Loeillet et al. einen Einfluss auf die ABCB1 Expression in lymphoblastoiden B Zell Linien zeigen.¹⁰⁹ In einer späteren Studie an chinesischem Lebergewebe konnte dieser dinukleotide Polymorphismus als stärkstes Assoziationssignal der ABCB1 mRNA Expression identifiziert werden.¹¹⁰ Obwohl die Ergebnisse noch

keine zwingenden Schlüsse zu lassen, stellt eine mögliche, erhöhte Expression des ABCB1 Genes einen interessanten Untersuchungsansatz dar. Hieraus könnte eine vermehrte P-GP Synthese resultieren, die zu einem vermehrten Abtransport der Antipsychotika aus den Geweben und somit zu einem schwächeren Ansprechen auf die Therapie führen könnte.

Zusammenfassend existieren für alle beschriebenen Polymorphismen außer für den dinukleotiden rs28656907 und rs28373093 Polymorphismus Studien, die einen signifikanten Einfluss auf das Responseverhalten zeigen konnten. In Analogie zu den untersuchten pharmakokinetischen Polymorphismen bestehen diese Studien aus heterogenen Patientenkollektiven, sodass die Einordnung und Beurteilung der Erkenntnisse sich als schwierig gestaltet. Zudem ist die Anzahl der vorliegenden Studien limitiert und es existiert für die untersuchten rs3787429 und rs3787430 Polymorphismen beispielsweise nur eine vergleichbare Studie. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher die Hypothesen aus bereits vorliegenden Studien an Hand der eigenen Studienpopulation zu überprüfen. Der dinukleotiden rs28656907 und rs28373093 Polymorphismus stellt einen interessanten und bisher nicht untersuchten Marker dar, weshalb eine Untersuchung in der Studienpopulation sinnvoll erschien.

1.3.3 Polymorphismen in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme

Einführung Gewichtszunahme unter Antipsychotika

Die Gewichtszunahme ist eine bedeutende Nebenwirkung in der Therapie mit atypischen Antipsychotika und ein führender Grund für Noncompliance.^{26, 27} Zudem geht eine gesteigerte Gewichtszunahme mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes einher.²⁵ So verwundert es nicht, dass schizophrene Patienten eine um 20 % verringerte Lebenserwartung aufweisen.^{111, 112}

Das Ausmaß der Gewichtszunahme unterscheidet sich je nach Antipsychotikum: So konnten Leucht et al. in einer kürzlich publizierten Netzwerk-Metaanalyse folgende absteigende Tendenz der Gewichtszunahmefeststellen: Olanzapin>Clozapin>Quetiapin, Risperidon>Paliperidon>Amisulprid >Aripiprazol>Ziprasidon.⁴¹ Die Gewichtszunahme über einen Zeitraum von einem Jahr ist hierbei beträchtlich und erreicht für Olanzapin einen mittleren Wert von 11-17 kg, für Clozapin sowie Quetiapin 10 kg und für Risperidon 8-9kg.^{22, 113}

Wohlgemerkt zeigen nicht alle Patienten unter beispielsweise Olanzapin eine Gewichtszunahme.¹¹⁴ Diese unterliegt individuellen und starken Abweichungen. Die Vorhersage der Gewichtszunahme gestaltet sich daher schwierig zumal wenige konsistente, klinische und demographischen Variablen existieren.²⁸

Genetische Faktoren scheinen nach Zwillingsstudien die stärkste Vorhersagekraft der Gewichtszunahme zu besitzen.²⁸ Allgemein ist aber davon auszugehen, dass die Gewichtszunahme unter Antipsychotika neben der genetischen Komponente aus einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren resultiert: So spielen unter Anderem klinische und demographische Parameter (Schwere und Art der Erkrankung, Alter, Gewicht), die Lebens- und Essgewohnheiten des Patienten und die psychotropen Effekte der Medikation (Sedierung !) eine Rolle.⁴⁵

Da es unter den meisten Antipsychotika zu einem gesteigerten Appetit und/oder einem verzögerten Sättigungsgefühl kommt,^{45, 115} stellen Neuropeptide, die einen Einfluss auf die Energiehomöostase haben, interessante Kandidaten für die genetische Komponente des Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme dar. Obwohl für Antipsychotika keine Rezeptoraffinitäten in relevanten Regelzentren des Gewichtes bekannt sind,⁴⁵ wirken sie indirekt über die Blockade von Dopamin-, Histamin und Serotoninrezeptoren auf den Regelkreis der Energiehomöostase ein.^{45, 115, 116} Polymorphismen in zentralen Regelstellen des Energiehaushaltes bzw. in genannten Rezeptorstrukturen könnten die große interindividuelle Schwankungsbreite in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme erklären.

Daher wird auf den folgenden Seiten kurz auf den vereinfachten Regelkreise der Energiehomöostase eingegangen und die möglichen Veränderungen durch Antipsychotika besprochen. Die sich hieraus ergebenen Kandidatengene werden anschließend aufgeführt.

Allgemeines Leptin-Melanokortin-System

Eine zentrale Rolle in der Regulierung des menschlichen Energiehaushaltes nimmt das Leptin-Melanokortin-System ein (Abbildung 3), welches in der Region des Nucleus Arcuatus im Hypothalamus lokalisiert ist. Leptin wird durch Fettzellen ausgeschüttet und entfaltet seine Wirkung über den Leptinrezeptor, welcher über verschiedene Signalkaskaden die Pro-Opiomelanocortin (POMC) Neurone stimuliert. Aus dieser Stimulation resultiert die vermehrte Bildung und Ausschüttung von α -Melanozyten stimulierenden Hormon (α -MSH). Dieser Neurotransmitter bindet an den Melanocortin 4 Rezeptor (MC4R), was zu einer Reihe von anorexigenen Prozessen wie verminderter Nahrungsaufnahme und erhöhtem Energiebedarf führt. Über eine zweite Signalkaskade hemmt Leptin die Neurone Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related Protein (AgRP), die Ausschüttung ihrer namensgleichen orexigenen Transmitter und führt somit zu einer Verminderung der inhibitorischen Effekte auf die POMC Neurone (Abbildung 3).^{117,118,119}

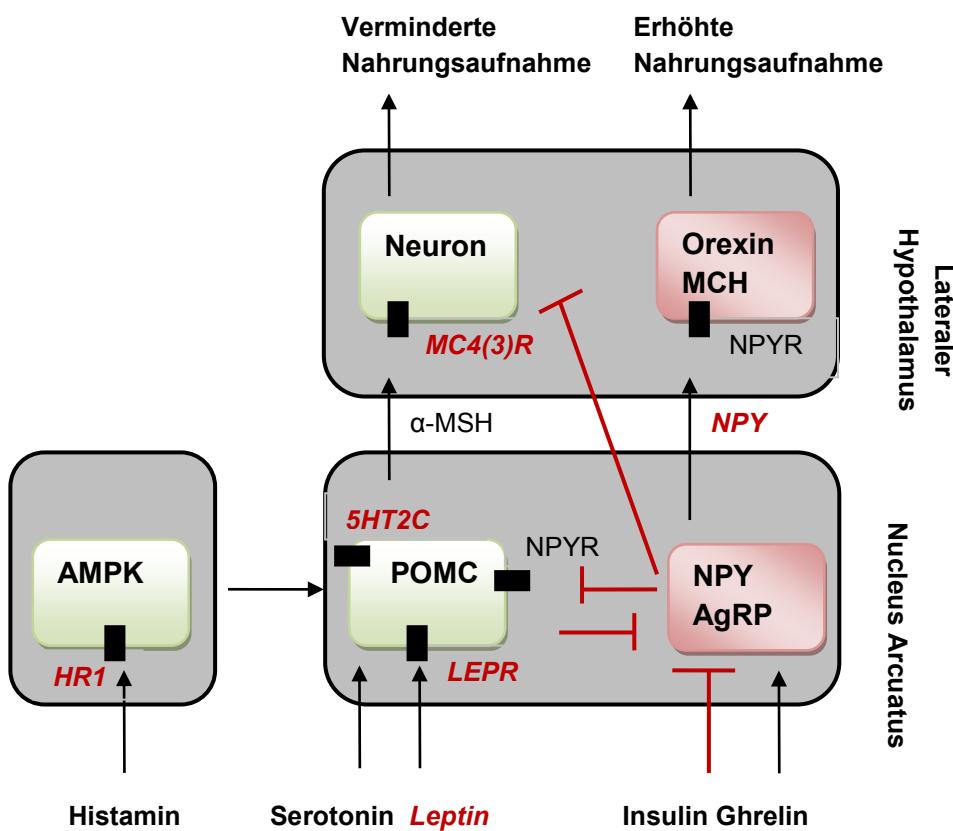


Abbildung 3 Leptin-Melanokortin System adaptiert von Balt et al.¹²⁰

Vereinfacht verläuft die Regulation der Nahrungsaufnahme über zwei neuronale Regelkreise: Der über POMC und nachgeschalteten Neurone vermittelter Signalweg führt zu einer verminderten Nahrungsaufnahme, während aus einer Aktivierung von NPY/AgRP ein Anstieg der Nahrungsaufnahme resultiert. Kursiv und rot markiert sind einige im Rahmen der Doktorarbeit untersuchte Zielstrukturen. Abkürzungen: 5HT_{2C}: Serotoninrezeptor 2C, α -MSH: α -Melanozyten stimulierendes Hormon, HR1: Histamin 1 Rezeptor, LEPR: Leptin Rezeptor, MC4(3)R: Melanocortinrezeptor 3 und 4, MCH: Melanin-Concentrating Hormon; NPY: Neuropeptid Y, NPYR: Neuropeptid Y Rezeptor, POMC: Pro-Opiomelanocortin.

Interessanterweise existiert kein direkter Antagonismus zwischen POMC und NPY/AgRP Neuronen, so dass der Regelkreis ständig aktiviert ist und nur durch hemmende Einflüsse herunter reguliert wird.²⁸ Dieser Mechanismus betont die Relevanz der hemmenden Botenstoffe. Generell handelt es sich bei dieser Darstellung um ein sehr vereinfachtes Modell, da noch viele weitere Signalwege auf die Energiehomöostase einwirken. So wird dieses neben den relevantesten Appetit-stimulierenden Hormonen Ghrelin¹²¹ und Insulin¹²² auch von den Neurotransmittern Serotonin und Histamin beeinflusst.¹²⁰ Serotonin aktiviert über die Bindung an 5HT_{2C} Rezeptoren den über die POMC Neurone laufenden Signalweg mit der Folge einer verminderten Nahrungsaufnahme.¹²³ Histamin führt durch Bindung an seine Rezeptoren ebenfalls zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und gesteigerten Thermogenese.^{115, 124} Zudem wird in der Regulation der Nahrungsaufnahme die kurzzeitige von der längerfristigen Regulation unterschieden: Das Hormon Ghrelin verhindert eine vermehrte Nahrungsaufnahme nach dem Essen, während Leptin und Insulin die längerfristige Aufrechterhaltung der Energieaufnahme und – speicherung gewährleisten.¹²⁵

Beeinflussung der Energiehomöostase durch atypische Antipsychotika

Abbildung 3 bzw. 4 zeigt die im Rahmen der Doktorarbeit untersuchten Polymorphismen und veranschaulicht die mögliche Beeinflussung der Energiehomöostase durch Antipsychotika, für welche eine Beeinflussung der im Regelkreis relevanten Peptide Insulin, Ghrelin^{118,126} und Leptin¹²⁷ identifiziert werden konnte.

Antipsychotika bewirken hierbei über einen ausgeprägten Antagonismus an 5HT_{2C} und Histamin 1 Rezeptoren, eine Reduktion des anorexigenen POMC Signalweges, welcher zu einer verstärkten Essensaufnahme führt.¹²⁰ In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte in weiblichen Ratten eine verminderte Expression von POMC mRNA und eine gesteigerte Expression von NPY und AgRP nach Olanzapin-Injektion identifiziert werden.¹²⁸ Diese Ergebnisse konnten im Rahmen einer weiteren Studie gestützt werden.¹²⁹ Zudem beobachteten Weston-Green et al. eine erhöhte mRNA Expression von GAD65 und eine verminderte CB1R Bindungsdichte.¹²⁹ Aus diesen Befunden postulierten die Autoren eine Herabsenkung der Cannabinoid-Rezeptordichte durch Olanzapin, welche in Verbindung mit einer erhöhten GABA-Synthese zu einer verminderten POMC Expression führt.¹²⁹ Ak et al. konnten auch in first Episode Patienten einen signifikanten Anstieg von Leptin- und NPY-Spiegeln identifizieren und bestätigen somit die Beteiligung des Leptin-Melanokortin-System an der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme im Menschen.¹³⁰

Wichtig ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Wechselwirkung von atypischen Antipsychotika mit dem 5HT_{2C} und Histamin 1 Rezeptor nicht allein die Ausprägung der Gewichtszunahme erklären kann. Eine Studie in Ratten konnte eine dem Olanzapin vergleichbare Gewichtszunahme mit einer Kombination aus einem 5HT_{2C} Antagonisten und Haloperidol (als D₂ Antagonist) identifizieren.¹³¹ Diese Hypothese ist jedoch nicht ausreichend zur Erklärung der Gewichtszunahme unter Risperidon oder Quetiapin.¹¹⁶ Vielmehr scheint eine Wechselwirkung mit verschiedenen Rezeptoren das Ausmaß der Gewichtszunahme zu bedingen. Für eine tiefergehende Beschreibung der zugrundeliegenden

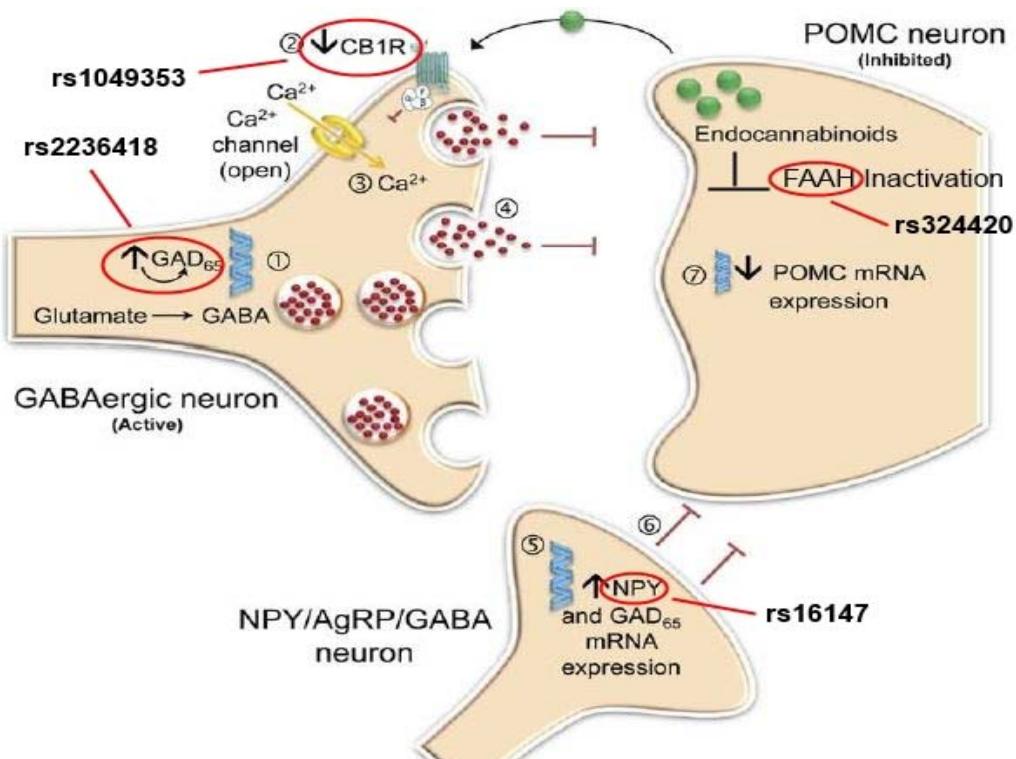


Abbildung 4: postulierter Mechanismus der Olanzapin vermittelten Gewichtszunahme adaptiert von Weston-Green et al.¹²⁹

Eine durch Olanzapin vermittelte Erhöhung der GAD-Expression (1) in Verbindung mit einer erniedrigten CB1R Rezeptordichte (2) übt einen hemmenden Einfluss auf die POMC Neurone aus (3,4), welcher durch eine erhöhte NPY-Expression (5,6) zusätzlich verstärkt wird. Die untersuchten Zielstrukturen sind rot markiert.

Mechanismen und an der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme beteiligten Rezeptorstrukturen sei auf die Übersichtsarbeit von Cocurello et al. verwiesen.¹¹⁵

Zusammenfassend scheint eine über verschiedene Rezeptorstrukturen (hauptsächlich D₂, 5HT_{2C} und H₁) vermittelte Beeinflussung des Leptin-Melanokortin-System eine relevante Rolle in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme zu spielen. Somit stellen Polymorphismen, die per se eine Auswirkung auf zentralen Regelstellten des Leptin-Melanokortin-Systems haben, interessante Marker dar. So konnten beispielsweise Mutationen im Leptin sowie MC4R Gen als Ursache für starkes Übergewicht identifiziert werden.¹³² Eine Kombination aus relevanten Polymorphismen in Verbindung mit veränderten Prozessen der Energiehomöostase könnte somit in eine verstärkte Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme resultieren. Zudem stellten durch Polymorphismen veränderte Expressionsraten relevanter Rezeptorstrukturen einen vielversprechenden Therapieansatz dar.

Nachfolgend werden interessante Polymorphismen und die zu Grunde liegenden Kandidatengene vorgestellt:

1.3.3.1 Fatty Acid Amide Hydrolase Gen (FAAH)

Die fatty acid amide hydrolase (FAAH) ist ein integrales Membranprotein, welches weit verbreitet in Säugetierzellen vorkommt und zur großen Familie der Enzyme gehört, die ein 130 Aminosäuren-Motiv (=Amidase Signatur) enthalten.^{133,134} Das für den FAAH kodierende Gen befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 1p35-p34 und enthält 15 Exons.¹³⁵ Das FAAH Gen inaktiviert den Großteil der endogenen Cannabinoide und nimmt daher eine Schlüsselrolle im Endocannabinoid-System (ECS) ein.¹³⁶ Mäuse mit einer Fehlfunktion des FAAH Genes oder solche, welche mit einem FAAH Inhibitor behandelt wurden, zeigen einen stark erschwertem Abbau der Fettsäuren. Hieraus resultieren stark erhöhte Konzentrationen an Fettsäuren, sowohl in zentralen^{137,138} als auch in peripheren Geweben.^{133,139} Diese erhöhten Konzentrationen an Endocannabinoiden gehen mit einer Aktivierung des ECS einher und sind sehr wahrscheinlich mit Übergewicht assoziiert.^{140,141}

rs324420 Polymorphismus

Bei dem untersuchten rs324420 Polymorphismus handelt es sich um einen Basenaustausch von Cytosin zu Adenin, welcher zu einer Änderung der Aminosäurestruktur (Threonin statt Prolin) an der Stelle 129 des Enzyms führt.¹⁴⁰ In isolierten T-Lymphozyten identifizierten Chiang et al. eine um die Hälfte reduzierte mRNA Expression des FAAH Genes in AA-Genotyp Trägern.¹⁴² Zudem zeigten Träger des A-Allels im Gegensatz zu Wildtyp-Trägern erhöhte Spiegel an N-Arachidonyl Ethanolamin (AEA) und N-Acetylethanolamin (NAE). Darüber hinaus traten bei Übergewichtigen A-Allel-Trägern erhöhte AEA-Spiegel im Vergleich zu normal gewichtigen Risiko-Allel-Trägern auf.¹⁴⁰ Zudem konnte der rs324420 Polymorphismus auch direkt mit Übergewicht und der Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme assoziiert werden.^{143,144}

1.3.3.2 Humane Melanocortin Rezeptor 4 Gen

„Der humane Melanocortin Rezeptor 4 besteht aus 332 Aminosäuren und ist auf Chromosom 18q22 lokalisiert.^{70,71} Der Rezeptor ist der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen und wird sehr stark im Gehirn exprimiert, wo auch die zentrale Kontrolle des Essverhaltens und der Energiehomöostase lokalisiert ist.^{145, 146} Der endogene Ligand für den MC4R stellt das α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) dar, welches zu verminderter Nahrungsaufnahme und erhöhtem Grundumsatz führt.¹⁴⁷ Das MC4R Gen wird als eines der relevantesten Gene bezeichnet, die in einem Zusammenhang mit monogenetischem Übergewicht stehen. So sind bisher über 130 funktionell relevante Mutationen beschrieben,¹⁴⁸ die entweder zu einem Totalverlust oder zu einem Teilverlust der Genfunktion führen.^{149, 150, 151} Übereinstimmend damit weisen 1-6 % der stark adipösen Patienten eine Mutation im MC4R Gen auf.¹³²

rs17782313 Polymorphismus

Der rs17782313 Polymorphismus befindet sich 188 kilobasen (kb) downstream des MC4R Genes und stellt eine Punktmutation vom Thymin zu Cytosin dar. Der Polymorphismus wies im Rahmen einer

groß angelegten GWAS das stärkste Assoziationssignal mit dem BMI auf ($p=2.9\times10^{-6}$).¹⁵² Die Punktmutation befindet sich in einem 190 kb rekombinanten Intervall zwischen der kodierenden Sequenz von PMAIP1 und MC4R. Das PMAIP1 Gen gilt als relativ unwahrscheinlicher Kandidat für die Regulierung des Gewichtes, weshalb Loos et al. das MC4R Gen mit seiner zentralen Rolle in der Energiehomöostase als das kausalere Gen bezeichneten.¹⁵² Die Autoren postulierten daher, dass der identifizierte Polymorphismus einen Einfluss auf die MC4R Expression bzw. Translation ausüben und somit durch eine veränderte Energiehomöostase zu einem unterschiedlichen BMI führen könne.¹⁵²

rs489693 Polymorphismus

Der rs489693 Polymorphismus befindet sich ebenfalls im rekombinanten Intervall zwischen der kodierenden Sequenz von PMAIP1 und MC4R, 32kp upstream des rs17782313 Polymorphismus und 156 kb downstream des MC4R Genes. Malhotra et al. konnten in der ersten GWAS im Kontext der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme den rs489693 Polymorphismus mit einer stark erhöhten Gewichtszunahme assoziieren und diesen in drei unabhängigen Kohorten bestätigen.¹⁵³

Weitere Polymorphismen im Promoter- bzw. Genbereich des MC4R Genes

Aufgrund der zentralen Rolle des MC4R Genes im Energiehaushalt bzw. im monogenetischen Übergewicht des Menschen wurde im Rahmen einer betreuten Masterarbeit¹⁵⁴ der Promoter- und Genbereich des MC4R Genes auf weitere Polymorphismen im Kontext der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme untersucht. Grundlegende Fragestellung war hierbei ob sich relevante Marker identifizieren lassen und ob diese mit den zuvor beschriebenen Polymorphismen (rs17782313 bzw. rs489693) verknüpft sind. Hierbei sollte geklärt werden, ob trotz großer Entfernung der beiden Marker ein Einfluss auf das MC4R Gen über weitere verknüpfte Polymorphismen besteht.

1.3.3.3 FTO Gen

Das Fat mass and obesity (FTO) Gen besteht aus neun Exons, die in einem Bereich von über 400 kb auf Chromosom 16 lokalisiert sind.¹⁵⁵ Das FTO Gen kodiert für eine Nonhäm-(Fell)-Dioxygenase, für welche eine Demethylase-Funktion postuliert wird, welche die Regulation von Genen im Metabolismus beeinflussen kann.^{156,157} Das Gen erlangte Aufmerksamkeit durch eine GWAS, welche Polymorphismen innerhalb des Genes mit Übergewicht und Diabetes assoziieren konnte.¹⁵⁸ Die identifizierten Polymorphismen stellen hierbei die statistisch robustesten Marker mit der größten Effektstärke im Zusammenhang mit Übergewicht und BMI dar.¹⁵⁹ Obwohl das FTO Protein in fast allen Zellen zu finden ist,¹⁵⁶ bleibt die genaue Funktion weiterhin unklar.¹⁶⁰ Eine Mehrzahl an kürzlich publizierten Studien legt jedoch eine Beteiligung des Genes an der Nahrungsaufnahme und im Bereich des Wachstums nahe.^{159, 161, 162}

rs9939609 Polymorphismus

Der rs9939609 Polymorphismus, lokalisiert im ersten Intron des FTO Genes, war die erste Mutation, die im Rahmen einer GWAS mit Übergewicht und BMI assoziiert wurde und vielfach bestätigt werden

konnte.¹⁶⁰ Die funktionale Auswirkung des Basenaustauschs von Thymin nach Adenin ist nicht bekannt. Daher kann nur spekuliert werden, ob die Mutation zu einer Veränderung der FTO Expression oder des Splicevorganges führt oder ob regulatorische Elemente im Intron 1 zu einer Beeinflussung benachbarter Gene führen können.^{163,164} Vieles deutet aber darauf hin, dass der Polymorphismus über die Steuerung von Aminosäurespiegeln zu einer Veränderungen der Appetit-Regulation in Schlüsselregion des Gehirnes führt.¹⁵⁹ Im Kontext der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme konnte in einer kürzlich publizierten Studie ein signifikanter Einfluss des rs9939609 Polymorphismus in einem chronischen Patientenkollektiv identifiziert werden.¹⁶⁵

1.3.3.4 CNR1 Gen

Das CNR1 Gen kodiert für den Cannaboid Rezeptor 1 (CB1), welcher 1988 zum ersten Mal beschrieben wurde.¹⁶⁶ Er gehört zur Gruppe der präsynaptischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 6q14-q15, welcher als Prädispositionslokus für Schizophrenie von Cao et al. identifiziert wurde.⁸¹ Es wird vermutet, dass das Cannabinoid-System eine relevante Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie spielt.¹⁶⁷ Diese Vermutung basiert auf der Grundlage, dass der Gebrauch von Cannabis einen psychotischen Zustand auslöst^{168,169} und die positiven Symptome der Schizophrenie unter Antipsychotika-Therapie verschlechtern kann.^{170,167} Eine Beeinflussung der Schizophrenie erscheint für den CB1 Rezeptor plausibler, da er in vielen Gehirnzellen, in peripheren Geweben und im Fettgewebe vorkommt. Im Gegensatz hierzu wird der CB2 Rezeptor hauptsächlich im Immunsystem exprimiert.¹⁷¹

Der CB1 Rezeptor nimmt auch eine physiologische Rolle im Energiehaushalt, in der Nahrungsaufnahme und im Suchtverhalten ein, was zur Entwicklung von CB1 Antagonisten führte, die im Menschen zu einem Gewichtsverlust und verstärkten Nahrungsaufnahme führen,^{172,173} und als Therapie für Übergewicht eingesetzt wurden.¹⁷⁴ Beide Punkte machen den CB1 Rezeptor zu einem interessanten Kandidatengen, sowohl im Kontext eines veränderten Ansprechens als auch im Kontext der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme.

rs1049353 Polymorphismus

Bei dem untersuchten Polymorphismus handelt es sich um einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin im Codon 453 (Thr) der CNR1 Genes.¹⁷⁵ Eine Vielzahl an Studien konnte den rs1049353 Polymorphismus mit einem veränderten Responseverhalten unter Antidepressiva-¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ und Antipsychotika-Therapie¹⁷⁵ in Verbindung bringen bzw. ein erhöhtes Krankheitsrisiko nachweisen.¹⁷⁹ Zudem konnte der untersuchte Polymorphismus in belgischen, italienischen und dänischen Populationen mit metabolischen Parametern (Waist-to-Hip-Ratio und viszeraler Fettmasse) assoziiert werden.¹⁸⁰⁻¹⁸³

1.3.3.5 Histamin 1 Rezeptor Gen

Histamin ist eines der wichtigsten biogenen Amine und entfaltet seine Wirkung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, von denen bisher 4 identifiziert wurden.^{184,82} Das Histamin Rezeptor 1 (HR1) Gen ist auf Chromosom 3p25 lokalisiert und größtenteils für Hypersensitivitätsreaktionen, weiche Muskelzell-Kontraktionen und vaskuläre Permeabilität verantwortlich. Bis jetzt gilt das Gen als intronlos, tritt jedoch in verschiedenen Splice-Varianten auf.⁸² Kroeze et al. konnten in einer *vitro* Untersuchung zeigen, dass die HR1-Affinität eines Antipsychotikums signifikant mit dem Ausmaß der Gewichtszunahme korreliert.¹⁸⁵ In einer weiteren Studie konnte bestätigt werden, dass Clozapin und Olanzapin die AMPK-Aktivität im Hypothalamus, einem wichtigen Regulator der Nahrungsaufnahme,¹⁸⁶ um ein Vielfaches erhöhen kann.¹⁸⁷ Dieser Effekt blieb jedoch in HR1-Knock-Out-Mäusen aus, weshalb postuliert wird, dass die Erhöhung der AMPK-Aktivität über den HR1 vermittelt wird.¹⁸⁷ Antipsychotika können also über Blockade des HR1, die AMPK -Aktivität im Hypothalamus direkt erhöhen, woraus eine verstärkte Nahrungsaufnahme resultiert.¹⁸⁸ Indirekt vermögen Antipsychotika aber auch durch Antagonismus und die Modulation anderer Neurotransmittersysteme, die Histaminfreisetzung zu beeinflussen.¹⁸⁸ Auf Grund der genannten physiologischen Zusammenhänge stellt der HR1 eines der kausalsten Gene der Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme dar.

rs346070, rs346074 und rs346075 Polymorphismus

Der rs346070 Polymorphismus befindet sich in der Exon Splicing Enhancer Region des HR1 Genes, wohingegen die rs346074 und rs346075 Polymorphismen in der Transskriptionsfaktorbindestelle des HR1 Genes lokalisiert sind. Die untersuchten Polymorphismen (rs346070 und rs346074(5)) sind im Gegensatz zu Mutationen innerhalb des HR1 Genes häufig in der kaukasischen Bevölkerung vertreten⁸² und konnten in einer kürzlich publizierten Studie einen signifikanten Einfluss auf den BMI bei Patienten, die mit einem atypischen Antipsychotikum behandelt wurden, zeigen.¹⁸⁹

1.3.3.6 PMCH Gen

Das MCH-precursor Gen (PMCH) ist auf Chromosom 12 lokalisiert und wird überwiegend in den Bereichen des Hypothalamus exprimiert.¹⁹⁰ Es kodiert für die drei Neuropeptide Neuropeptide Glycine-Glutamic Acid (N-GE), Neuropeptide Glutamic Acid-Isoleucine (N-EI) und Melanin-Concentrating Hormone (MCH).¹⁹⁰ Letzteres Neuropeptid hat sich als kritischer Säugetiereffektor der Energiehomöostase in verschiedenen genetischen und pharmakologischen Studien erwiesen.^{191,192,193-195} Das MCH stellt ein sehr potentes Orexigen dar, welches seine Wirkung über die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren MCHR1 und MCHR2 vermittelt.¹⁹⁶ Die akute Erhöhung des Neuropeptides führt zu einer verstärkten Nahrungsaufnahme, wohingegen eine chronische Erhöhung zu einem Gewichtsanstieg führt.¹⁹⁶ Die genaue Rolle der beiden anderen Neuropeptide ist unklar.¹⁹⁷ In einer genomweiten Linkage-Studie konnten die Marker D12S97 und D12S366 auf Chromosom 12q24, in der Nähe des PMCH Genes, mit Übergewicht unter Antipsychotika-Therapie assoziiert werden.¹⁹⁸

rs7973796 Polymorphismus

Die Autoren der zuvor erwähnten GWAS postulieren das PMCH Gen auf Grund seiner Bedeutung im Energiehaushalt und der Nähe zum identifizierten Lokus als das kausalste Gen, welches den identifizierten Marker erklären könnte.^{197, 198} Von dieser Hypothese ausgehend untersuchten Chagnon et al. die Region in der Nähe des PMCH Genes nach relevanten Mutationen und konnten den rs7973796 Polymorphismus als weit verbreiteten Polymorphismus identifizieren. Der rs7973796 Polymorphismus befindet sich 4,5 kb entfernt von der 5'-Region des PMCH-Genes und konnte in dieser Studie mit einem erhöhten BMI in Olanzapin therapierten Patienten assoziiert werden.¹⁹⁷

1.3.3.7 LEP und LEPR Gen

Das menschliche Neuropeptid Leptin wird von dem Gen LEP kodiert, welches auf Chromosom 1q31.3 lokalisiert ist und aus drei Exons besteht.^{127, 199} Der Leptinsignalweg wird durch den Leptin Rezeptor (LEPR) vermittelt, welcher zur Familie der Cytokinrezeptoren gehört, auf Chromosom 1p31 anzutreffen ist und aus 20 Exons besteht.^{200, 201} In der Region des Nucleus Arcuatus vermittelt Leptin über den POMC/Melanocortin Signalweg eine Unterdrückung des Hungergefühls und eine Anhebung des Energiebedarfes (siehe Abbildung 3 und 4). Zudem hemmt Leptin, als relevanter Regulator der Energiehomöostase, die Produktion zweier Appetit stimulierender Hormone (NPY, Agouti-related Peptide).²⁰² Studien konnten übereinstimmend erhöhte Leptinkonzentrationen bei Patienten, die mit Antipsychotika behandelt wurden, identifizieren.²⁰³ Obwohl diese Erhöhung eher ein sekundärer Effekt der Gewichtszunahme und kein primärer Effekt der Antipsychotika-Therapie darstellt, ist die Entstehung einer Leptinresistenz durch Antipsychotika möglich und ein plausibler Grund für eine verstärkte Gewichtszunahme.^{45, 127, 203}

rs7799039 Polymorphismus

Der untersuchte Polymorphismus ist in der Promoterregion des LEP Genes lokalisiert und stellt eine Punktmutation von Guanin zu Adenin dar. Für Träger des mutierten AA-Genotyps konnte eine doppelt so hohe Leptinsekretion und eine um 60 % erhöhte mRNA Transkription gegenüber Wildtyp-Trägern nachgewiesen werden.²⁰⁴ Die Ergebnisse aus zwei publizierten in-vivo Studien^{205, 206} weisen auf erhöhte Leptinspiegel in A-Allel Trägern hin und sprechen somit übereinstimmend mit der zuvor beschriebenen in-vitro Studie für eine erhöhte Leptinsekretion in Risikoträgern.

rs1137101 Polymorphismus

Der rs1137101 Polymorphismus befindet sich im Exon 6 des LEPR Genes und wird auch als Q223R Polymorphismus bezeichnet. Die funktionelle Auswirkung der Punktmutation ist nicht hinreichend genug geklärt. Bisher konnte in einer in-vitro Studie kein Einfluss auf die Leptin-Sekretion und Transkription beobachtet werden.²⁰⁷ Jedoch konnte der rs1137101 Polymorphismus in weiteren Studien mit Übergewicht¹²⁷ und einer erhöhten Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme assoziiert werden.^{208, 209}

1.3.3.8 5HT_{2C} Rezeptor Gen

Das 5HT_{2C} Rezeptor Gen ist auf Chromosom X lokalisiert und kodiert für den gleichnamigen G-Protein gekoppelten Rezeptor,²¹⁰ welcher an der neuronalen Steuerung einer Reihe von physiologischen und Verhaltens-Prozessen beteiligt ist.²¹¹ Der 5HT_{2C} Rezeptor gilt als relevanter Serotonin Rezeptor in der Regulation der Energiehomöostase.²¹² 5HT_{2C} Rezeptor Agonisten führen zu einer verminderten, wohingegen Antagonisten zu einer verstärkten Nahrungsaufnahme führen.²¹³ Auf Grund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass Antipsychotika mit dem höchsten Risiko einer Gewichtszunahme (Olanzapin und Clozapin) einen ausgeprägten Antagonismus für den 5HT_{2C} Rezeptor zeigen,²¹⁴ stellt das 5HT_{2C} Rezeptor Gen eines der kausalsten und am meisten untersuchte Gen im Kontext der Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme dar.

rs3813929 Polymorphismus

Der untersuchte Polymorphismus befindet sich in der Promotorregion des 5HT_{2C} Rezeptor Genes und stellt eine Punktmutation von Cytosin zu Thymin dar,²¹¹ für welche eine Änderung der Promoteraktivität beschrieben wurde.²¹⁵ Der rs3813929 Polymorphismus stellt im Kontext der Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme den am besten untersuchten Marker dar. Das T-Allel zeigte in einer Meta-Analyse einen protektiven Effekt auf die Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie.²¹³

Der rs3813929 Polymorphismus wurde in einer früheren Doktorarbeit bereits in einer kleineren Kohorte im Kontext der Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme untersucht.²¹⁶ Zur Betrachtung von Interaktionseffekten zwischen verschiedenen Genen wurde der untersuchte Polymorphismus auch in die jeweiligen Studienpopulationen dieser Doktorarbeit einbezogen.

1.3.3.9 NPY Gen

Das NPY Gen ist auf Chromosom 7q15.1 lokalisiert, besteht aus 4 Exons und kodiert für ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid.²¹⁷ Es gehört zu den potentesten orexigenen Peptiden und vermittelt seine Effekte über die G-Protein gekoppelte NPY Rezeptor Familie, wobei die höchste Affinität für den NPY2 Rezeptor besteht.^{217,218,219} NPY nimmt eine zentrale Rolle im Leptin-Melanokortin System ein (siehe Abbildung 3 und 4), indem es hemmend auf den POMC/MC4R Signalweg einwirkt und somit indirekt zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme führt. Zudem kann das Hormon aktiv über die nachgeschalteten Transmitter Orexin und MCH in die Regulation der Energiehomöostase eingreifen. Tierstudien konnten erhöhte Expressionsraten des MCH Rezeptors²²⁰ und des NPY²²¹ nach Olanzapin-Injektion identifizieren, was die Bedeutung des genannten Neuropeptides in der Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme betont.

rs16147 Polymorphismus

Der untersuchte Polymorphismus stellt eine Punktmutation von Thymin zu Cytosin da und befindet sich in der Promoter Region des Genes. In C-Allel Trägern konnte eine um 30 % verminderte basale

NPY Expression nachgewiesen werden.²²² In zwei kürzlich publizierten Studien konnte zudem eine Assoziation des rs16147 Polymorphismus mit Übergewicht und Leptinspiegeln identifiziert werden.^{223,224} Basierend auf der Funktion des NPY Genes und der funktionellen Bedeutung des Polymorphismus erscheint eine mögliche Beeinflussung der Energiehomöostase mit Auswirkungen auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme als plausibel. Diese These wird durch eine Studie von Tiwari et al. gestützt, welche das C-Allel mit einer höheren Gewichtszunahme in antipsychotisch behandelten Patienten assoziieren konnte.²¹⁸

1.3.3.10 GAD Gen

Das Glutamatdecarboxylase 2 (GAD2) Gen ist auf Chromosom 10p11.23 lokalisiert und kodiert für ein 65kDa große Untereinheit der Glutamatsäuredecarboxylase (GAD) 65.²²⁵ Letztere katalysiert die Bildung zu γ -Aminobuttersäure (GABA), welche eine der relevantesten hemmenden Neurotransmitter im ZNS von Säugetieren darstellt.²²⁶ Veränderungen der GABA Synthese und Regulation führen zu schweren pathologischen Zuständen und liegen der Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen wie der Schizophrenie oder Epilepsie zu Grunde.²²⁶ Zudem wird GABA in NPY Neuronen ausgeschüttet und hemmt die anorexigen wirkenden POMC Neurone (siehe Abbildung 3 und 4).²²⁷ Der Marker DS10S197, welcher sich im Intron 7 des GAD2 Genes befindet, konnte in mehreren Studien mit Übergewicht assoziiert werden,^{228,229,230} weshalb das GAD2 Gen als mögliches Kandidatengen des Übergewichtes bezeichnet wird.²³¹ Auch wenn die Beteiligung des Genes an Übergewicht kontrovers diskutiert wird,²³² sprechen die Ergebnisse einer Studie in weiblichen Ratten, die eine erhöhte GAD65 mRNA Expression nach subchronischer Olanzap-Injektion zeigen konnten, für eine mögliche Beeinflussung der Energiehomöostase.¹²⁹

rs2236418 Polymorphismus

Der untersuchte Polymorphismus befindet sich in der Promoter Region des Genes und stellt eine Mutation von Guanin zu Adenin dar. Boutin et al. konnten eine 6-fach erhöhte transkriptionale Aktivität des mutierten AA-Genotyp im Gegensatz zum Wildtyp nachweisen.²³¹ Zudem konnte der rs2236418 Polymorphismus in gleichnamiger Studie mit Übergewicht und Skalen zur Identifizierung des Hungergefühls assoziiert werden.²³¹

Auch wenn zusammenfassend für einen Großteil der untersuchten Polymorphismen bereits Erkenntnisse aus Studien existieren, erweist sich die Einordnung und Beurteilung der Ergebnisse auf Grund sehr heterogener und kleiner Patientenkollektive als schwierig. Beispielsweise liegt für den untersuchten rs7973796, den rs489693, den rs16147 und den Polymorphismen im HR1 Rezeptor (rs346070, rs346074 und rs346075) nur eine vergleichbare Studie vor. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher die Hypothesen aus bereits vorliegenden Studien an Hand der eigenen Studienpopulation zu überprüfen. Des Weiteren wurden mit dem rs17782313 und dem rs2236418 Polymorphismus interessante Marker untersucht, die in pharmakogenetischen Studien bisher nicht erfasst wurden.

Eine weitere Fragestellung die in vorausgegangenen Studien nicht hinreichend genug adressiert wurde, ist die Kombination identifizierter Risikofaktoren. Daher wurde in einem zweiten Schritt untersucht, ob die zuvor identifizierten pharmakogenetischen Risikofaktoren in der Kombination mit klinischen Risikofaktoren eine bessere Unterscheidung in Hoch- bzw. Niedrigrisiko-Patienten ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Beschreibung der Studie

2.1.1 Studiendesign

Als Grundlage der Auswertungen dienten die Daten einer Diagnostikstudie, die im Zeitraum Mai 2002–Dezember 2009 an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar (Direktor: Prof. Dr. med. H. Förstl) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar (Direktor: Prof. Dr. med. D. Neumeier) durchgeführt wurde.

Die Studie wurde prospektiv und in Bezug auf den Genstatus doppelblind angelegt, wohingegen die Auswertung retrospektiv erfolgte. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Fakultät für Medizin der TU München bewilligt und entspricht den Anforderungen der Deklaration von Helsinki. Verantwortlicher Projektleiter war Herr Prof. Dr. W. Steimer (Oberarzt des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie). Die Überwachung der Studie erfolgte durch Herrn Dr. W. Kissling und Herrn Prof. Dr. S. Leucht (Oberärzte der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie).

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie aufgenommen wurden alle neu in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar stationär aufgenommenen Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten, und sich nach Aufklärung über die Studie mit ihrer Teilnahme schriftlich einverstanden erklärten. Die Einwilligung zur Studienteilnahme konnte jederzeit widerrufen werden.

Einschlusskriterien

- > 18 Jahre
- Vorliegen von Grunderkrankungen, die eine Therapie mit Antidepressiva oder Antipsychotika notwendig machen (ICD-10: F2 – F6-Diagnosen)

Ausschlusskriterien

- organisch bedingte Psychosen und Depressionen, Demenzen, Abhängigkeitserkrankungen, Persönlichkeits- oder Essstörungen, sowie Schwangerschaft und Stillzeit
- Einweisung in die Psychiatrie auf Grund gerichtlicher oder behördlicher Anordnung

2.1.3 Datenerhebung

Bei der stationären Aufnahme der Patienten in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar wurden demographische Daten, psychiatrische Vorgeschichte, sowie Körpergröße und Gewicht erfasst. Zudem wurde die medikamentöse Therapie einschließlich Begleitmedikation festgehalten. Die Behandlung erfolgte nach lokaler, klinischer Praxis und erlaubte durch das offene Studiendesign auch eine individuelle Dosisanpassung des jeweiligen Medikamentes. Die Diagnose der Erkrankung wurde nach ICD-10 gestellt. Der Krankheitszustand der Patienten zum Aufnahmezeitpunkt wurde durch die Paranoid-Depressivitäts-Skala (PD-S)²³³ und dem Clinical Global Impression (CGI)²³⁴ beurteilt.

Zur Bestimmung des pharmakogenetischen Status wurde im Rahmen der routinemäßigen Blutabnahmen EDTA-Blut entnommen. Des Weiteren wurden für viele Patienten zusätzlich Serumproben gesammelt. Die Abnahme erfolgte in der Regel im Talspiegel in Woche 4 der Medikation. Um einen Steady State Zustand zu gewährleisten, wurde zudem mindestens eine Woche einer konstanten Dosis vor Blutentnahme vorausgesetzt.

Nach 4 Wochen wurde der Therapieerfolg anhand CGI und PD-S bestimmt und eventuell aufgetretene Nebenwirkungen global mit Hilfe einer abgewandelten Form der DOTES-Skala (Dosage Record and Treatment Emergent Symptom scale)²³⁵ dokumentiert. Zudem wurde die Gewichtszunahme notiert.

Die PD-S (Paranoid-Depressivitäts-Skala)

Bei der PD-S handelt es sich um einen Selbstbeurteilungsbogen, mit dessen Hilfe der Zustand des Patienten und die Schwere paranoider und depressiver Symptome beurteilt werden kann. Der Patient füllt hierzu selbstständig einen Fragebogen bestehend aus je 16 Fragen zur Feststellung ängstlich-depressiver (PDS-D) bzw. paranoider Krankheitsanzeichen (PDS-P), acht Kontroll-Fragen zur Messung der Krankheitsverleugnung sowie drei Fragen zur Feststellung der Testmotivation der Probanden aus (siehe Anhang A5).

Da für Psychopharmaka die Response-Raten für Placebo bis zu 41 % betragen können,^{236, 237} wurde nur eine Verringerung der paranoiden- bzw. depressiven Symptome um mindestens 50 % als Behandlungserfolg gewertet.

Der CGI (Clinical Global Impressions)

Bei der CGI-Skala handelt es sich im Gegensatz zum PDS um eine Fremdbeurteilungsskala, welche durch den behandelnden Arzt ausgefüllt wird und sich in drei Teile gliedert lässt. Der erste Teil dient der Einschätzung des aktuellen Schweregrades der Krankheit (CGI 1 bzw. CGI-S), wohingegen der zweite Teil die Zustandsänderung eines Patienten (CGI 2 bzw. CGI-I) und der dritte Teil das Verhältnis aus gewünschten und unerwünschten Arzneimittelwirkungen (=therapeutischen Wirksamkeitsindex, CGI 3) erfasst (siehe Anhang A6).

Alle Patienten, die nach CGI 2 einen sehr verbesserten bzw. verbesserten Zustand (CGI 2-Werte 2 und 3) nach vier Wochen Behandlungsdauer zeigten, wurden als Responder eingestuft. Patienten, die nur wenig Besserung bis Verschlechterung zeigten (CGI 2-Werten zwischen 4 und 8) wurden als Nicht-Responder klassifiziert.

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

Zur Beurteilung von Nebenwirkungen wurde eine leicht modifizierte Form der DOTES-Skala verwendet.²³⁸ Hierbei dokumentiert der behandelnde Arzt in welchem Umfang (gering, mäßig oder stark) und in welcher Art Nebenwirkungen während einer 4-wöchigen Therapie aufgetreten sind (siehe Anhang A7).

Als Grundlage für die Einteilung der Patienten in Nebenwirkungs-positiv bzw. -negativ diente die abschließende Einschätzung des Arztes wie stark die Begleitsymptome den Patienten beeinträchtigt haben. Patienten mit mäßiger oder deutlicher Beeinträchtigung wurde als Nebenwirkungs-positiv, Patienten mit keiner oder nur schwacher Beeinträchtigung als Nebenwirkungs-negativ klassifiziert.

2.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 21 (SPSS Inc., Chicago, USA). Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau $\alpha \leq 0.05$ (zweiseitig) wurden als statistisch signifikant betrachtet. Auf Grund des explorativen Charakters der Studie und der schwierigen Interpretation von Subgruppenanalysen wurde auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet.²³⁹ Die Beurteilung der Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov–Smirnov- bzw. Shapiro–Wilk-Test oder Quantile-Quantile-Plot. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden quantitative Variablen mittels T-Test (2 Gruppen) bzw. ANOVA (>2 Gruppen) und nicht normalverteilte, quantitative Variablen unter Anwendung des Mann-Whitney-U- (2 Gruppen) bzw. Kruskal-Wallis-Test (>3 Gruppen) ausgewertet. Bei Vorlage von qualitativen Variablen fand der Chi²-Test-Anwendung bzw. bei Verletzung der Voraussetzungen (<20 % der Zellen unter n=5) der Fisher-Exakt Test. Zudem erfolgte die Auswertung möglicher Korrelationen in Abhängigkeit von der Normalverteilung und Merkmalsausprägung mittels Pearson-Korrelation (NV, quantitativ), Spearman-Korrelation (nicht NV, quantitativ-ordinal) bzw. Kendall- τ -Korrelations-Koeffizient (ordinal-skalierte Variablen). Zur Berücksichtigung von Verzerrungseffekten wurden außerdem Co-Varianz Analysen verwendet (ANCOVA),²⁴⁰ die in den jeweiligen Bereichen (Gewicht, Response und Pharmakokinetik) unter Angabe der eingeschlossenen Variablen aufgeführt sind.

Das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts der jeweiligen untersuchten Polymorphismen wurde mittels Chi²-Test unter Verwendung des angegebenen Online Tools geprüft.²⁴¹ Die Ergebnisse sind in Anhang A8 aufgeführt, wobei ein P-Wert unter 5 % eine Verletzung des HWE anzeigt.

Die Untersuchung eines Kopplungsgleichgewichtes (Linkage Disequilibrium) erfolgte mittels Cubex OnlineTool,²⁴² wobei die Ergebnisse unter Angabe des D'- bzw. r²-Wertes den Ergebnissen der untersuchten Polymorphismen zu entnehmen sind. Der Wert D' macht hierbei eine Aussage über die Kopplung von Genotypen unabhängig von der Verteilung und dient als Grundlage zur Bildung von Haplotypen. R² findet dagegen Anwendung in tagSNP Analysen, in denen ein möglichst großer Genbereich unter Verwendung von nur wenigen SNPs untersucht wird.

2.3 Analyse genetischer Polymorphismen

Nachstehend abgebildet ist der allgemeine Ablauf der praktischen Arbeit (Abbildung 5). Auf der rechten Seite finden sich Verweise zu den Abschnitten dieses Kapitels, die die jeweilige Methodik näher beschreiben. Die verwendeten Reagenzien, Geräte sowie Software sind in Anhang A1 beschrieben. Der Arbeitsprozess beginnt (soweit noch nicht geschehen) mit der Extraktion der DNA aus den Leukozyten des Patientenblutes. Diese kann anschließend mittels verschiedener Genotypisierungsmethoden zur Identifikation eines relevanten Polymorphismus benutzt werden. Im Vordergrund stand hierbei die Entwicklung von Genotypisierungsmethoden, die eine schnelle, effiziente und verlässliche praktische Anwendung gewährleisten und somit leicht in die Routine Diagnostik übernommen werden können. Da die auf Fluoreszenz basierende PCR-Methode am LightCycler alle diese Eigenschaften vereint, stellte diese Genotypisierung die Methode der Wahl dar.

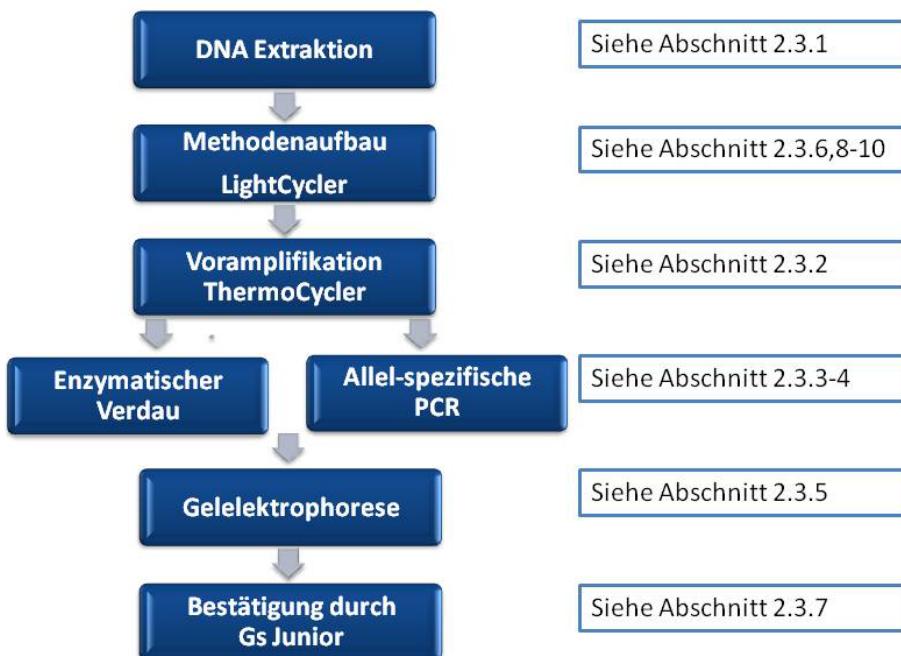


Abbildung 5 schematischer Ablauf der praktischen Arbeit

Nach erfolgreichem Methodenaufbau wurde durch enzymatischen Verdau oder Allel-spezifischer PCR für ~50 Patienten eine Validierung der Methodik durchgeführt. Auf Grund der einfacheren Handhabung wurde der enzymatische Verdau bevorzugt, so dass die Allel-spezifische PCR nur bei Fehlen einer passenden Schnittstelle Anwendung fand. Die Generierung des Amplikons für die ALS PCR erfolgte am Thermocycler, wohingegen für den enzymatischen Verdau, sofern möglich, die bereits generierten Amplikons aus dem LightCycler Lauf verwendet wurden. Ermöglichte das Amplikon auf Grund mehrerer Schnittstellen des verwendeten Enzyms keine befriedigenden Ergebnisse, wurden neue Primer erzeugt und mit diesen ein Amplikon am Thermocycler generiert. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und weitere Einzelheiten sind der jeweiligen

Methode zu entnehmen (siehe Abschnitt 2.3.11.1-3). Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide, sowie Amplikongrößen und Schmelztemperaturen finden sich Anhang 1 (LightCycler) bzw. 2 (ALS PCR).

Nach erfolgreichem Methodenaufbau und Validierung der Ergebnisse erfolgte die Vermessung der relevanten Proben. Bei stark abweichenden Peaks in der Schmelzkurvenanalyse erfolgte die Sequenzierung der Region um die Sensorsonde mittels GS Junior. Hierbei sollten zusätzlich auftretende Mutationen im Bereich der Sonden identifiziert werden bzw. weitere Gründe für die abweichenden Peaks gefunden werden.

2.3.1 DNA Extraktion

Bei Aufnahme eines Patienten in die Studienpopulation erfolgte zur Bestimmung des genetischen Status die Entnahme von 2,7ml EDTA-Blut mit einer Sarstedt-Monovette®. Zur Gewinnung der DNA wurden jeweils 300 µl EDTA-Blut verwendet, welches mit Hilfe eines Extraktionskits (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega) aus den Leukozyten extrahiert wurde. Die Aufbereitung erfolgte nach Herstellerangaben und lieferte je nach Leukozytenzahl des Patienten einen DNA-Extrakt mit einer Konzentration von 50-150 ng/µl. Die DNA wurde jeweils zweimal extrahiert, wobei ein Aliquot zusammen mit dem EDTA Blut bei -70 °C gelagert wurde. Das andere Aliquot konnte direkt für Genotypisierungsreaktionen weiterverwendet werden und wurde bei 4-8 °C gelagert.

2.3.2 Konventionelle PCR am Thermocycler

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) gehört zur Grundausstattung eines molekular-biologischen Labors und wurde bereits Anfang der 1980er Jahre von K.B. Mullis und Mitarbeitern der Firma Cetus entwickelt.⁴ Mit dieser in-vitro Reaktion gelingt es einfach und effizient kleinste Mengen an DNA innerhalb kurzer Zeit zu vervielfältigen.

Eine erfolgreiche PCR setzt die Verwendung von zwei Primern (Oligonukleotide) voraus, die sich komplementär an das 5'- und 3'-Ende einer Zielsequenz anlagern. Die Bekanntheit der zu vervielfältigenden Sequenz stellt also die wichtigste Voraussetzung bzw. eine Limitation dieser Methodik dar. Neben den erwähnten Template-DNA und Primern werden die vier verschiedenen Desoxyribonukleosid-Triphosphat-Bausteine, eine thermostabile DNA-Polymerase und eine Pufferlösung, welche für die Funktion und Stabilität der Polymerase von entscheidender Bedeutung ist, benötigt.

Eine PCR beginnt in der Regel mit einem Denaturierungsschritt für 2-3 Minuten bei Temperaturen um 93-95 °C, bei welchen die Wasserstoffbrücken der DNA-Doppelhelix gespalten und diese in Einzelstränge überführt werden. Bei Verwendung sogenannter Hot-Start-Polymerasen oder bei Sequenzen mit hohem Anteil an GC-reichen Basen kann der erste Denaturierungsschritt bis auf 10 Minuten verlängert werden. Nach diesem Schritt folgen 30-40 Zyklen, die sich wiederum in einen kurzen **Denaturierungsschritt**, dem **Annealing** und der **Elongation** unterteilen lassen.

Das sogenannte **Annealing** erfolgt bei einer Temperatur von wenigen Grad Celsius unter der Schmelztemperatur des Primerpaars und ermöglicht so optimale Bedingungen für eine Anlagerung der Primer an die DNA: Bei zu niedrigen Temperaturen erhöht sich die Anzahl unspezifischer Nebenprodukte und eine erhöhte Temperatur verringert die Anzahl der sich anlagernden Primer und somit die DNA Ausbeute.

In der sich anschließenden **Elongationsphase** werden die Basen zwischen den angelagerten Primern mittels Polymerase und den verschiedenen Desoxyribonukleosid-Triphosphaten aufgefüllt. Dies geschieht bei Temperaturen, bei denen die verwendete Polymerase ein Optimum zeigt, welches bei der verwendeten Taq-Polymerase bei 72 °C liegt. Nach Ablauf aller Einzelschritte, die in der Regel und in Abhängigkeit von der Amplikonlänge um die 30 Sekunden beträgt, folgt eine abschließende und lange Elongationsphase von 7 Minuten und ein Abkühlen der Proben auf < 10 °C.

Durch die geschilderten Schritte erfolgt eine exponentielle Anreicherung der DNA, die von der Zykluszahl n abhängig ist. Obwohl theoretisch eine 2^n fache Vervielfältigung der DNA Menge möglich ist, werden in der Praxis auf Grund von Nebenprodukten und Zerstörung thermolabiler Substanzen nur 70-80 % der theoretischen Produktmenge gebildet.²⁴³

Die PCR wurde im Rahmen der praktischen Arbeit zur Validierung einer zuvor entwickelten LightCycler Methode verwendet. Bei Vorlage einer geeigneten Enzymschnittstelle diente diese Methodik als Grundlage für den enzymatischen Verdau (siehe Abschnitt 2.3.3) bzw. bei Fehlen einer solchen als Grundlage für die Allel-spezifische PCR (siehe Abschnitt 2.3.4). Die erhaltenen Produkte wurden anschließend an Hand der Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.3.5) untersucht.

2.3.3 Enzymatischer Verdau

Der enzymatische Verdau oder Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) dient dem Nachweis von bekannten Punktmutationen. Bei dieser Methodik verwendet man Restriktionsendonukleasen, Enzyme, die bei Vorliegen einer spezifischen DNA-Sequenz von 4-10 Basenpaaren eine Schnittstelle erzeugen. Zur Unterscheidung einer Punktmutation wird das Enzym so ausgewählt, dass z.B. nur bei Vorliegen des Wildtyps eine Schnittstelle generiert wird, während das Amplikon der Mutante unverändert bleibt. An Hand der jeweiligen Bandenmuster in der Gelelektrophorese kann anschließend der jeweilige Genotyp zugeordnet werden.

Die Identifizierung der jeweiligen Schnittstellen erfolgte mit dem Programm Nebcutter,²⁴⁴ wobei die verwendeten Enzyme in der folgenden Tabelle 3 aufgelistet sind. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist der jeweiligen Methode zu entnehmen (siehe Abschnitt 2.3.11.1-3). Weitere Einzelheiten zu den verwendeten Primern finden sich in Anhang A2. Bezogen wurden die jeweiligen Restriktionsenzyme, Puffer und BSA von der Firma New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main).

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Bezeichnung des Restriktionsenzyms	Herkunft (Erstisolierung)	Erkennungssequenz und Schnittstelle	Polymorphismus
Apol	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	5'...RAATTY...3' 3'...YTTAAR...5'	rs346075
BsaAI	<i>Bacillus stearothermophilus</i> G668	5'...YACGTR...3' 3'...RTGCAY...5'	rs7973796
BsaJI	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5'...CCNNGG...3' 3'...GGNNCC...5'	rs324420
Bsrl	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5'...ACTGGN...3' 3'...TGACCN...5'	rs489693
BtsCI	<i>Bacillus thermosphaericus</i>	5'...GGATGNN...3' 3'...CCTACNN...5'	rs2302429
CviKI-1	<i>Chlorella virus</i>	5'...RGCY...3' 3'...YCGR...5'	rs16147
Dral	<i>Deinococcus radiophilus</i>	5'...TTTAAA...3' 3'...AAATT...5'	rs2236418
HinP1I	<i>Haemophilus influenzae P1</i>	5'...GCGC...3' 3'...CGCG...5'	rs7799039
Mspl	<i>Moraxella species</i>	5'...CCGG...3' 3'...GGCC...5'	rs1137101
Ndel	<i>Neisseria denitrificans</i>	5'...CATATG...3' 3'...GTATAC...5'	rs346070 rs35694136
StuI	<i>Streptomyces tubercidicus</i>	5'...AGGCCT...3' 3'...TCCGGA...5'	rs2011425 rs28656907/rs28373093

N = A/C/G/T, R = A/G, Y = C/T

2.3.4 Allel-spezifische PCR

Die Allel-spezifische (ALS) PCR stellt eine kostengünstige Alternative zum Nachweis einer Punktmutation dar²⁴⁵ und wurde im Rahmen der praktischen Arbeit immer dann verwendet, wenn für die RFLP kein geeignetes Enzym zur Verfügung stand. Generell wird für eine ALS PCR je ein Wildtyp- und ein Mutationsansatz benötigt, der einen Primer enthält der jeweils nur zum 3'-Ende des Wildtypes oder der Mutante komplementär ist. So enthält z.B. der Wildtypansatz einem zum Wildtyp passenden Forward Primer. Bei Vorlage des homozygoten Wildtyp-Genotyps zeigt sich bei anschließender Gelelektrophorese eine spezifische Bande für den Wildtypansatz. Da sich der Mutationsprimer aus dem Mutationsansatz in der letzten Position vom Wildtyp-Primer unterscheidet, kommt es unter optimalen Bedingungen und spezifischer Annealing Temperatur zu keiner Vervielfältigung des Mutations-Amplikons und folglich keiner ersichtlichen Bande. Bei Vorhandensein eines heterozygoten Genotyps wären sowohl eine Wildtyp- als auch eine Mutationsbande zu erkennen.

Um die Spezifität der ALS Primer zu erhöhen, wurde an der vorletzten Stelle zum 3'-Ende eine weitere Basenfehlpaarung eingebaut. Hierbei wurden die Primer so konstruiert, dass bei einem nur schwach destabilisierenden Effekt zwischen ALS Primer und DNA Template ein stark destabilisierender Effekt an der vorletzten Basenstelle eingefügt wurde. In umgekehrter Weise wurde bei schon vorhandenem stark destabilisierendem Effekt der letzten Base nur eine schwach destabilisierende Fehlpaarung eingefügt.²⁴⁶ Diese Vorgehensweise unterbindet z.B. bei Vorlage eines homozygoten Wildtyp-Genotyps mit nur schwach destabilisierenden Effekt die Bildung von Produkten im Mutationsansatz, da durch die eingeführte weitere Basenfehlpaarung eine Bindung des Mutations-spezifischen Primer an die Template-DNA unterbleibt.

Zur Auswahl der geeigneten Allel-spezifischen Primer wurde das WASP-Tool verwendet²⁴⁷ welches Primer nach beschriebener Vorgehensweise generiert. Diese wurden unter Beachtung der in Abschnitt 2.3.8.1 aufgeführten Vorgaben modifiziert. Bei Fehlen des untersuchten Polymorphismus in der Datenbank des Tools wurden die Primer selbst generiert. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist der jeweiligen Methode zu entnehmen (siehe Abschnitt 2.3.11.1-3). Darüber hinaus listet Anhang A2 weitere Einzelheiten, wie beispielsweise die genaue Sequenz der verwendeten Primer, Schmelztemperatur etc. auf.

2.3.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt ein trägerelektrophoretisches Verfahren dar und beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld (Migration).²⁴⁸ In Abhängigkeit von der Länge migrieren die negativ geladenen DNA Fragmente unterschiedlich schnell zur positiv geladenen Anode. Das als Trägermedium verwendete Agarosegel unterstützt durch seine Molekularsieeffekte zusätzlich den Trennungseffekt und ermöglicht durch die Änderung der Agarosekonzentration eine Steuerung des Trennungsverhaltens. Zur Identifikation der aufgetrennten Banden versetzt man das Agarosegel mit Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert und bei Anregung durch UV Licht eine Fluoreszenz zeigt. Mit Hilfe spezieller Längenmarker ist eine Einschätzung der Basenpaarlänge

des jeweiligen Fragmentes möglich. Die exakte Konzentration des Gels und die Verweildauer in der Elektrophoresekammer ist der jeweiligen Methode zu entnehmen (siehe Abschnitt 2.3.11.1-3).

2.3.6 Sondenbasierte Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion am LightCycler

Die sondenbasierte Genotypisierung am LightCycler stellt eine Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR dar. Sie bietet durch hohe Heiz- und Kühlraten (bis zu 20 °C/s) und eine damit verbundene kurze Zyklusdauer (20 bis 60 s) eine schnellere Durchführung und ermöglicht sowohl eine Echtzeit-Amplifikation als auch eine direkte Auswertung der Ergebnisse ohne Benutzung weiterer molekulargenetischer Methoden wie RFLP und Gelelektrophorese. Das LightCycler 2.0 Instrument stellt hierbei eine Weiterentwicklung des LightCycler dar und bietet 2 zusätzliche Kanäle (610 und 670nm) für die Detektion von HybProbe Sonden.²⁴⁹

Neben Schmelzkurvenanalysen ermöglicht der LightCycler auch Amplifikationsanalysen (qualitative und quantitative Methoden),²⁴⁹ welche im Rahmen der Promotion jedoch nicht verwendet wurden und daher nicht näher beschrieben sind. Die einzige Ausnahme hiervon bildet die Quantifizierung von Amplikons für das Next Generation Sequencing (NGS, siehe folgender Abschnitt 2.3.7). Hierbei wird mittels eines hochsensitiven Fluoreszein Farbstoffs (Quant-iT Pico Green®), welcher an die doppelsträngige DNA bindet, und einem DNA Standard eine Eichgerade erzeugt. Aus dieser kann anschließend die ermittelte Fluoreszenz einer jeweiligen Probe einer DNA Konzentration zugeordnet werden.

Generell beruht die Detektion auf der Fluorimetrie, wobei Sequenz-unabhängige von den Sequenzspezifischen Detektionsmethoden unterschieden werden. Auf Grund der höheren Genauigkeit und einfacheren Handhabung wurde für Schmelzkurvenanalysen nur das Sequenz-spezifische HybProbe bzw. das Simple-Probe Format verwendet.

Für das HybProbe Format werden neben den PCR-üblichen Reagenzien zur Erzeugung eines Amplikons (Primer, Nukleotide, Polymerase, Puffer und Magnesium) sowohl eine Sensorsonde als auch eine Ankersonde, die in einem Abstand von 2-5bp angelagert sind, benötigt. Eine der Sonden wird an ihrem 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein, die andere beispielsweise mit dem Fluoreszenzfarbstoff LC-Red-640 markiert. Während des Detektionsprozesses wird der Farbstoff Fluoreszein (Donor, D) durch eine Diode, die Licht mit der Wellenlänge 470nm emittiert, energetisch angeregt und überträgt einen Teil der Anregungsenergie auf den Farbstoff LC-Red-640 (Akzeptor, A). Das emittierte Licht des angeregten Farbstoffes LC-Red-640 kann anschließend vom LightCycler Fluorimeter detektiert werden. Dieser Vorgang wird auch als Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) bezeichnet (Abbildung 6).

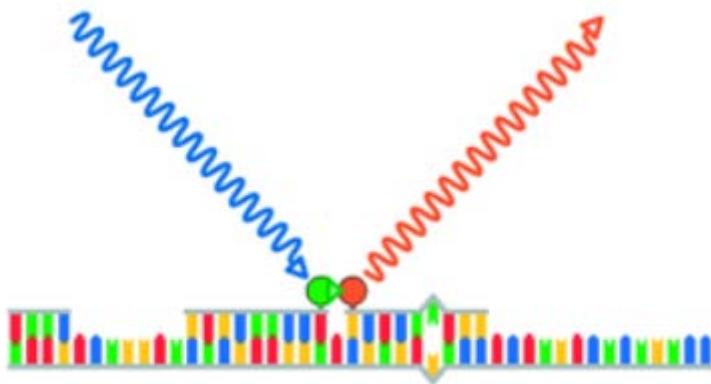


Abbildung 6: Schematische Darstellung des FRET-Prozesses bei Hybridisierungssonden (nach LightCycler Probe Design Software 2.0 Manual Version 1.0²⁵⁰)

Nach der Vervielfältigung des jeweiligen Amplikons findet eine kontinuierlich Temperaturerhöhung von 0,1 bis 0,2 °C/sec statt. Mit zunehmender Temperatur lösen sich die Sonden vom komplementären Strang ab, mit der Folge eines abnehmenden Fluoreszenzsignals. Bildet man die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur ab, ergibt sich der Schmelzpunkt der Sonde aus dem Wendepunkt in der ersten negativen Ableitung dieser Funktion. Der Schmelzpunkt ist als die Temperatur definiert, bei welcher die Hälfte der Sensorsonden an der Ziel-DNA gebunden bzw. frei vorliegt. Liegt nun eine Mutation im Bereich der Sensorsonde vor, führt dies zu einem destabilisierenden Effekt, sodass für die Mutante ein verringelter Schmelzpunkt nachgewiesen werden kann. Der jeweilige Genotyp lässt sich nun an Hand der Schmelzkurve identifizieren, wobei Wildtyp und Mutante einen spezifischen Peak und die Heterozygote beide Peaks aufweist. Durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und die Detektion bei verschiedenen Wellenlängen ist auch eine parallele Bestimmung von mehreren Polymorphismen möglich.

Eine Abwandlung des beschriebenen Ansatzes stellt das Simple-Probe-Format dar. Hierbei wird nur eine Sonde, welche über einen sogenannten Quencher mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein verbunden ist, benötigt.

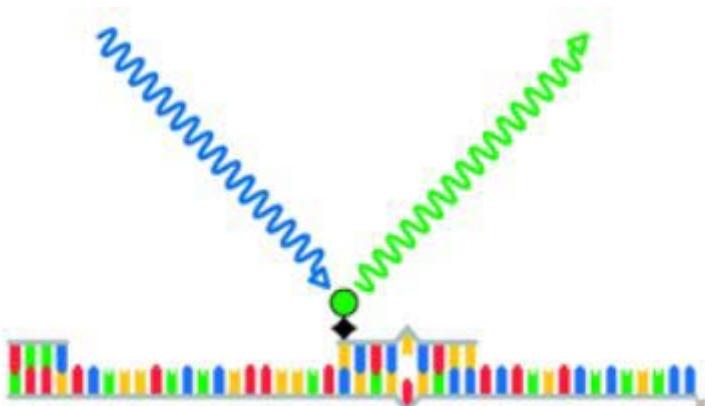


Abbildung 7 Schematische Darstellung des FRET-Prozesses bei Simple-Probe Sonden (nach LightCycler Probe Design Software 2.0 Manual Version 1.0²⁵⁰)

Liegt diese Simple-Probe frei in Lösung vor, verhindert der Quencher eine Emission von Licht. Bindet jedoch die Sonde an die Ziel-DNA, reduziert sich dieser Effekt, so dass es bei der Anregung durch den LightCycler zu einer Emission von grüner Fluoreszenz kommt (Abbildung 7). Auch in diesem Fall kommt es durch eine Mutation im Bereich der Simple-Probe zu einem destabilisierenden Effekt, welcher an Hand eines erniedrigten Peaks in der Schmelzkurve identifiziert werden kann.

Die erfolgreiche Entwicklung einer neuen Genotypisierungsmethode am LightCycler ist an die Einhaltung bestimmter Vorgaben geknüpft, welche zusammen mit der genauen Vorgehensweise in den anschließenden Kapiteln (2.3.8-10) näher beschrieben sind.

2.3.7 Genotypisierung mittels Next Generation Sequencing (NGS) am GS Junior

Das von der Firma Roche vertriebene Gerät war eines der ersten kommerziell erhältlichen NGS-Gerät. Hauptvorteile dieses Gerätes stellen die Amplikongröße von bis zu 500bp und die kurze Laufzeit von 10 Stunden dar.⁴ Generell lässt sich der Gesamtprozess in die Bereiche **Library Preparation**, **Emulsion-Based Clonal Amplification (emPCR Amplification)** und **Sequenzierung** unterteilen.

Library Preparation

Am Anfang des Sequenzierungsprozesses steht die Generierung einer Amplikon-Datenbank. Hierbei werden verschiedene Amplikons mittels PCR und spezifischer Primer (siehe folgender Abschnitt 2.3.8.1) erzeugt, aufgereinigt und Primeraddukte entfernt. Anschließend wird der Gehalt der jeweiligen Amplikons am LightCycler quantifiziert und ein gesamter Pool aller Amplikons erzeugt, in welchem jedes Amplikon in einer Konzentration von 10^7 Molekülen pro μl vorliegt.

Emulsion-Based Clonal Amplification (emPCR Amplification)

In diesem Arbeitsschritt werden Amplikons durch eine Erkennungssequenz auf den jeweiligen Primern (A/B-Adaptoren) an ein sogenanntes Capture Bead gebunden. Mit Hilfe des Ultra-Turrax Gerätes und synthetischen Ölen wird eine Wasser in Öl Emulsion erzeugt, in welcher in jeder Mizelle ein DNA-Fragment in einem reaktiven Kompartiment vorliegt. Durch anschließende PCR im Thermocycler wird die am jeweiligen Bead gebundene DNA innerhalb einer Mizelle vervielfältigt (Abbildung 8).

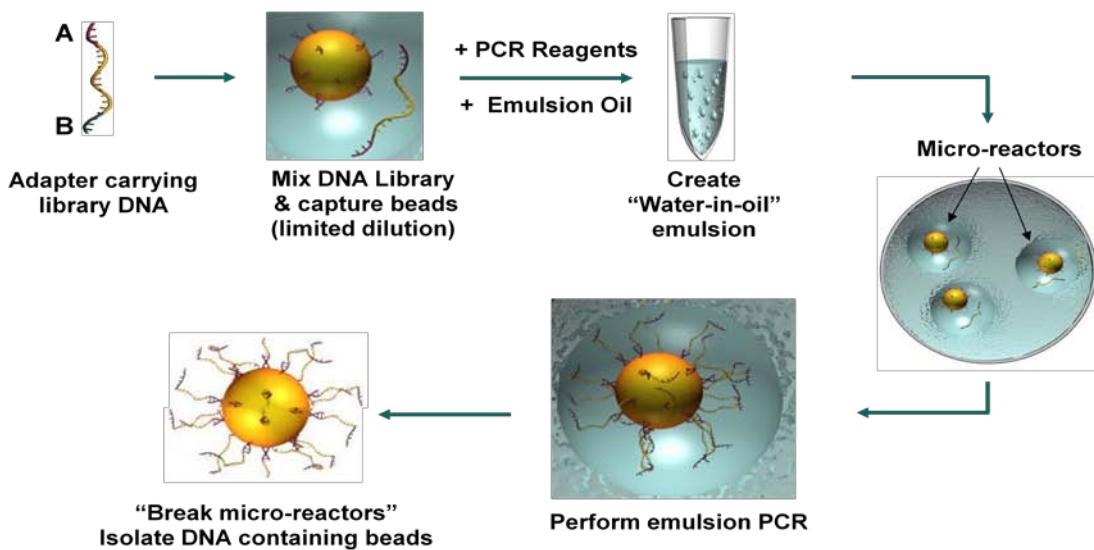


Abbildung 8: Schematische Darstellung und Ablauf der emPCR (Quelle: GS Junior Sequencing Amplicon Workflow Version 3)

In einem anschließenden Aufreinigungsschritt binden sogenannte Enrichment Primer an die am Bead gebundene DNA und verbinden diesen mit einem weiteren, magnetischen Bead. Mit Hilfe eines Magnetic Particle Concentrator erfolgt anschließend die Trennung von Beads mit erfolgter

Vervielfältigung der DNA und Beads ohne gebundene DNA. Im letzten Arbeitsschritt wird überprüft, ob die Anzahl der Beads im geforderten Bereich (500.000-2.000.000 Beads) liegt.

Sequenzierung

In einem anschließenden Aufreinigungsschritt binden sogenannte Enrichment Primer an die am Bead gebundene DNA und verbinden diesen mit einem weiteren, magnetischen Bead. Mit Hilfe eines Magnetic Particle Concentrator erfolgt anschließend die Trennung von Beads mit erfolgter Vervielfältigung der DNA und Beads ohne gebundene DNA. Im letzten Arbeitsschritt wird überprüft, ob die Anzahl der Beads im geforderten Bereich (500.000-2.000.000 Beads) liegt.

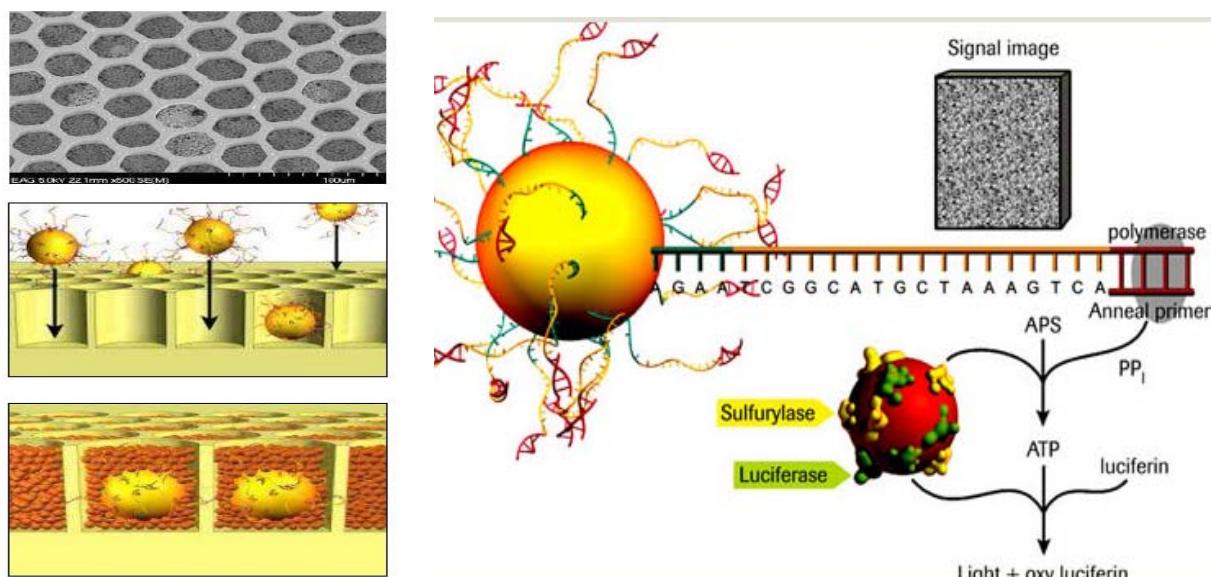


Abbildung 9: Schematische Darstellung Sequenzierung (Quelle: GS Junior Sequencing Amplicon Workflow Version 3)

Im letzten Arbeitsprozess werden die Beads auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Hierbei nimmt jedes Bead einen spezifischen Platz in einem Well ein. Die Reaktionsräume werden anschließend mit verschiedenen Schichten aus Nukleotiden, DNA-Polymerase, Puffer und Kontrollbeads überschichtet (Abbildung 9) bzw. abgewaschen. Die Sequenzierung erfolgt hierbei mittels Pyrosequenzierung:

Der Einbau eines Nukleotides durch die Polymerase ist mit einem Verbrauch bzw. einer Spaltung von ATP in APS und PP_i verbunden, welches durch die Sulfurylase wiederum in ATP umgewandelt wird. Die Luciferase kann das ATP wiederum hydrolyseren und benutzt Luciferin zur Erzeugung von Licht. So erfolgt eine Aussendung von Licht nur bei Einbau einer Base, welche durch Lichtemission gemessen werden kann (Abbildung 9). Die Signalstärke gibt die Anzahl eingebauter identischer Nukleotide wieder. Die Lichtsignalveränderung eines Wells über die Zeit wird als sogenanntes Flowgram dargestellt und ergibt die Basenabfolge der Sequenz.

2.3.8 Konstruktion der verwendeten Primer und Sonden

2.3.8.1 Konstruktion der Primer

Nach der Identifikation eines relevanten Polymorphismus wurde mit Hilfe der NCBI-Datenbank²⁵¹ ein DNA Bereich von 500 bp um die jeweilige Punktmutation extrahiert und mit Hilfe des Primer3Plus Tools²⁵² Primer zur Erzeugung eines Amplikons in diesem Bereich generiert, wobei Amplikons mit einer Größe <400 bp bevorzugt wurden. Die Schmelztemperaturen der Primer wurden hierbei in einem Bereich von 55-60 °C festgelegt, um optimale Ergebnisse zu gewährleisten und ein sekundäres Annealing zu unterbinden. Da Primerlängen unter 16 bp meist nicht spezifisch genug an die Zielstruktur binden und mit zunehmender Primerlänge die Ineffizienz der PCR zunimmt, wurde bei der Konstruktion der jeweiligen Primerpaare eine Primerlänge von ~ 20 bp angestrebt. Zudem stellt ein GC-Gehalt von 40-60 % eine adäquate Bindung an die Ziel-DNA sicher. Zur Vermeidung von Fehlprodukten wurde auf einen geringen Unterschied in der Schmelztemperatur von Vorwärts- und Rückwärtsprimer geachtet, der maximal 1,6 °C betrug (siehe Anhang A2). Auf Grund ihres häufigen Vorkommens im Genom wurden außerdem repetitive und Palindrom-Sequenzen vermieden. Die Ausbildung von Haarnadelstrukturen innerhalb eines Primers und die Bildung von Primer-Dimeren beispielsweise zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimern kann die für die PCR Reaktion zur Verfügung stehende Primermenge deutlich reduzieren und zu weiteren unerwünschten Nebenprodukten führen. Daher wurde mit Hilfe des Oligoanalyzer 1.5 Tools versucht die Bildung der beschriebenen Primerstrukturen so weit wie möglich zu unterbinden, wobei Haarnadelstrukturen mit einer Gibbs Energie (ΔG) von -3 bis -4 kcal/mol und Primerdimere mit einer ΔG von -6 bis -8 kcal/mol akzeptiert wurden.²⁵³

Für die Konstruktion von Primern für das **NGS** sind grundlegend die gleichen Anforderungen einzuhalten und zu beachten. Zusätzlich werden die Primer mit spezifischen Adaptor- (blau) und Schlüsselsequenzen (rot) versehen (Abbildung 10). Der Multiplex Identifier (MID; Orange bzw. Gelb) stellt eine aus zehn Basen bestehende Erkennungssequenz dar und dient bei paralleler Bestimmung verschiedener Proben, der Identifikation des jeweiligen Patienten. Die verwendeten MIDs bzw. die gesamte Sequenz der verschiedenen Primer für eine Sequenzierung am GS Junior ist den jeweiligen Methoden (2.3.11.1.3./2.3.11.1.7. bzw. Anhang 3) zu entnehmen.

Forward primer (Primer A):

5'-CGTATCGCCTCCCTCGGCCATTCAG-(**MID**)-(template-specific sequence)-3'

Reverse primer (Primer B):

5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-(**MID**)-(template-specific sequence)-3'

Abbildung 10: Fusionsprimer nach Handbuch GS Junior System Guidelines for Amplicon Experimental Design August 2010

Grundlegend sollten die Amplikons inklusive Fusionsprimer eine Länge von 400 bp nicht überschreiten und verschiedene Amplikons nicht mehr als 150 bp voneinander variieren. Für weitere Informationen

sei auf das Handbuch des Herstellers (GS Junior System, Guidelines for Amplicon Experimental Design, Roche August 2010) verwiesen.

Abschließend wurde die Richtigkeit der Primer bzw. die spezifische Bindung an die vorgesehene Zielstruktur an Hand des BLAS (Basic Local Alignment) Tool überprüft.²⁵⁴ Hierbei gleicht das beschriebene Tool die Primersequenz mit dem menschlichen Genom ab und identifiziert an welchen Stellen des Genoms und mit welcher Basenlänge sich die Primersequenz anlagert. Nach Sicherstellung der spezifischen Bindung der Primers an die Zielstruktur, konnte der Primer für die Genotypisierung verwendet werden.

Nach Herstellung und Zusendung der angeforderten Sonden durch die Firma Invitrogen wurde das Lyophilisat mit sterilem Wasser zu einer Konzentration von 25-50 μ M verdünnt, aliquotiert und für die weitere Verwendung lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt.

Der Anhang A4 gibt, aufgeteilt in die Themenschwerpunkte Pharmakokinetik, Response und Gewichtszunahme einen Überblick über die Basenfolgen und Schmelztemperaturen der für die Genotypisierung genutzten Primer sowie die Länge der entstehenden PCR-Produkte.

2.3.8.2 Konstruktionen der Sonden

Für die Konstruktion der HybProbe-Sonden gelten ähnliche Anforderungen im Bezug auf die Länge und die Vermeidung von monotonen, repetitiven, haarnadelstruktur-bildenden Sequenzen wie schon bereits für die Primer beschrieben. Die Länge der Sonde sollte hierbei im Bereich zwischen 20-30 Nukleotiden liegen. Von essentieller Bedeutung für die Funktion einer Genotypisierungsmethode ist zudem die Lage und Anordnung der Sensorsonde: Diese sollte im optimalen Falle mittig über der Punktmutation, jedoch mindestens 4 Basenpaare vom Sondenende entfernt, angeordnet werden. Damit die jeweiligen Genotypen zuverlässig identifiziert und unterschieden werden können, spielt auch die Ausprägung der Stabilitätsänderung, welche durch die Punktmutation verursacht wird, eine entscheidende Rolle. Je stärker der destabilisierende Effekt der nichtkomplementären Base ausgeprägt ist, desto größer ist die Differenz zwischen Wildtyp- und Mutantenpeak in der späteren Schmelzkurven-Auswertung. Nachfolgend ist die empirisch ermittelte Basenpaarstabilität für Sonden-DNA-Duplexe in abnehmender Stabilität aufgeführt.²⁵⁵

G:C > A:T > G:T \geq G:A > T:T \geq G:G > A:A \geq C:C > C:T > C:A

Nach Möglichkeit wurden daher immer Sonden konstruiert die eine größtmögliche Differenz in der Basenpaarstabilität (z.B. GC vs. CT) erlaubten. Um einen FRET zu gewährleisten, sollte zwischen Sensor und Ankersonde ein Abstand von 1-5 bp liegen. Zudem sollte die Ankersonde eine $\sim 5^{\circ}\text{C}$ höhere Schmelztemperatur als die Sensorsonde besitzen, damit bei zunehmender Temperatur die Fluoreszenzintensität weiterhin zuverlässig gemessen werden kann. Generell wird nach

Herstellerangaben eine 3'-Fluoreszein und eine 5'-LCRed Markierung bei benachbarten Sonden und eine 5-10 °C höhere Schmelztemperatur als die des Primerpaars empfohlen. Wie auch bei den Primern wurde an Hand des Oligoanalyzer 1.5 Tools die Bildung von Sonden-Dimeren und Primer-Sonden-Dimeren untersucht bzw. eine ΔG von -6- bis -8 kcal/mol für die jeweiligen Dimere akzeptiert.²⁵³

Generell wurde nach Möglichkeit das HybProbe- dem Simple-Probe Format vorgezogen, weil es eine simultane Bestimmung mehrerer Polymorphismen ermöglicht und zudem weniger anfällig für Fehler und Abweichungen ist. Ließ die zugrundeliegende Sequenz jedoch ein HybProbe-Format nicht zu, wurde auf das Simple-Probe Format ausgewichen. Hierbei ist neben den oben aufgeführten Anforderungen darauf zu achten, dass die Fluoreszein Markierung in einem Abstand von 3-4 Basen zur Mutation und zum Sondenende erfolgt. Zudem sollte die komplementäre Region in der Nähe der markierten Base keine Guanin-Base enthalten.

Abschließend wurde die Richtigkeit und Spezifität mit Hilfe des BLAS Tool überprüft.

Nach Herstellung und Zusendung der angeforderten Sonden durch die Firma TIB Molbiol wurde das Lyophilisat mit sterilen Wasser zu einer Konzentration von 3 μ M verdünnt, aliquotiert und für die weitere Verwendung lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt.

Der Anhang A4 gibt, aufgeteilt in die Themenschwerpunkte Pharmakokinetik, Response und Gewichtszunahme, einen Überblick über die Basenfolgen und Schmelztemperaturen der für die Genotypisierung genutzten Sonden.

2.3.9 Optimierung der PCR Bedingungen

Neben der Primer- und Sondensequenz sind noch weitere Faktoren für das Gelingen einer PCR erforderlich. Hierbei ist die Magnesium-Konzentration von entscheidender Rolle, da sie zum einen als Cofaktor der Polymerase dient, zum anderen die Anlagerung der Primer an die DNA beeinflusst. Zudem ist aber auch die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das Zyklus- und Temperaturre Programm des Thermo- bzw. LightCycler von essentieller Bedeutung. Daher wurde in Vorversuchen die optimale Konzentration von Sonden, Primern und Nukleotiden ermittelt und die PCR-Reaktion hinsichtlich Annealingtemperatur, Zykluszahl und –länge und Elongationszeit optimiert.

Lieferten die oben genannten Maßnahmen kein befriedigendes Ergebnis, wurde der Reaktionsverstärker Dimethylsulfoxid (DMSO) dem Ansatz hinzugefügt. DMSO destabilisiert GC-reiche DNA-Abschnitte und führt zu einer schnelleren Elongation und einem höheren Gehalt an fehlerfreien PCR-Produkten.

Generell fand bei der PCR am LightCycler das Prinzip der asymmetrischen PCR Anwendung. Hierbei wird die Bindung der Sonde an den komplementären DNA Strang begünstigt. Dies wird durch Erhöhung der Konzentration des zur Sonde komplementären Primers erzielt. Für Multiplex Ansätze am LightCycler wurde jede Methode einzeln optimiert bevor eine Kombination und weitere Optimierung stattfand. Da die verwendeten Farbstoffe ein breites Emissionsspektrum besitzen und sich gegenseitig überlagern, wurde eine Colour Compensation nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt.²⁵⁶ Diese filtert die Nebensignale des jeweils anderen Farbstoffes und vermeidet Fehler bei der Zuordnung von Peaks in der Schmelzkurve.

2.3.10 Allgemeiner Ablauf und Durchführung einer Genotypisierungsreaktion

Nachfolgend sind die Arbeitsschritte der jeweiligen Genotypisierungsmethoden aufgeführt:

Für eine Genotypisierungsreaktion am **LightCycler** werden die hierfür benötigten Reagenzien (Primer, Sonden, MgCl₂, Puffer und evtl. DMSO) ausreichend mittels Vortexmischer geschüttelt und zentrifugiert. Die jeweilige Menge an Reagenzien (siehe Abschnitt 2.3.11.1-3) wird in eine Stammlösung für n+2 Proben pipettiert. Anschließend wird der Ansatz mit kurz zuvor aus dem Kühlschrank genommener Polymerase versetzt, gut vermischt und zentrifugiert. Aus der Stammlösung werden pro Probe je 19 µl entnommen und damit die Glaskapillare des LightCycler befüllt. Zur Vermeidung fehlerhafter Ergebnisse durch Kontamination wurde jedem Lauf eine Leerkontrolle hinzugefügt. Anschließend wird 1 µl der jeweiligen DNA ergänzt, die Glaskapillare verschlossen, das gesamte LightCycler-Karussell zentrifugiert und der Lauf gestartet.

Reaktionsansätze am Thermocycler laufen in analoger Weise ab. Im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Methode ist hier die Verwendung von 200 µl Eppendorf-Cups und die Überschichtung mit einem Tropfen Mineralöl als Schutz vor Verdunstung zu nennen. Für eine **Allel-spezifische PCR** werden je Probe zwei Reaktionsgefäße benötigt.

Bei **enzymatischem Verdau** eines zuvor amplifizierten Produktes wurden die hierfür benötigten Reagenzien (H₂O, Puffer und evtl. Bovines Serum Albumin (BSA)) ausreichend mittels Vortexmischer geschüttelt und zentrifugiert und in eine Stammlösung für n+1 Proben pipettiert. Kurz vor Reaktionsbeginn wurde das Enzym aus dem Kühlschrank genommen und dem Ansatz hinzugefügt. Pro Probe wurden jeweils 10 µl Stammlösung mit 10 µl des zuvor amplifizierten Produktes und einem Tropfen Mineralöl versetzt und für die in der jeweiligen Methode beschriebene Zeit (siehe Abschnitt 2.3.11.1-3) in ein vortemperiertes Wasserbad bzw. einen Heizblock gestellt.

Zur Überprüfung einer erfolgten Amplifikation und zur Identifizierung des Genotyps bei enzymatischem Verdau und Allel-spezifischer PCR wurde die **Gelelektrophorese** verwendet.

Die hierfür benötigten Agarosegele wurden gemäß den Herstellerangaben aus PeqGold Universalagarose und 1x TBE-Puffer (UltraPure™ 10x TBE Puffer 1:10 verdünnt) in Konzentrationen um 2 % (m/V siehe Abschnitt 2.3.11.1-3) hergestellt. Zur Differenzierung von Fragmenten, die sich in nur wenigen Basenpaaren unterscheiden, wurde MetaPhor™ Agarose in einer Konzentration von 3,5 % verwendet. Der Lösung wurde eine definierte Menge Ethidiumbromid (1 µl) im Verhältnis 1:10000 zugesetzt. Nach der Gelierung wurde das Gel mit 1x TBE Puffer überschichtet und im Kühlschrank aufbewahrt. Das jeweilige Amplifikationsprodukt wurde mit 5 µl eines Gel-Ladepuffers versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach Ablauf der Gelelektrophorese, welche bei 100V zwischen 30 und 45 Minuten in einem Mupid-Gelelektrophoresesystem erfolgte, wurden die Banden auf den Gelen unter Absorption von UV-Strahlung und anschließender Fluoreszenzemission mit Hilfe einer Photoprint-Station sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

Die **Sequenzierung** am GS Junior umfasst sehr viele Arbeitsschritte, weshalb nur relevante Abweichungen vom Protokoll des Herstellers wiedergegeben werden können.

Die Generierung des Amplikons erfolgte am Thermocycler und wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (weitere Informationen sind der jeweiligen Methode in den Abschnitten 2.3.11.1.3. bzw. 2.3.11.1.7. zu entnehmen). Anschließend erfolgte die Aufreinigung nach Amplicon Library Preparation Method Manual (Roche, Stand Juni 2013). Hierbei wurde auf die Kontrolle der kurzen Fragmente (Kapitel 3.4 im genannten Manual) verzichtet und stattdessen einen doppelte Aufreinigung (Wiederholung der Arbeitsschritte 3.2.1 im genannten Manual) durchgeführt. Zur Quantifizierung der jeweiligen DNA im LightCycler wurden 20 µl des 1:200 verdünnten Pico-Green Reagenzes mit 20 µl des 1:100 verdünnten gereinigten Amplikon DNA Samples vermengt. 20 µl dieser Mischung wurden in die Kapillaren des LightCycler pipettiert und mit folgendem Programm quantifiziert: 40 °C 30 sec; 5x [40 °C 1 sec]; 40 °C 30 sec.

Die Herstellung und Durchführung der Emulsions-PCR und anschließende Aufreinigung erfolgte nach emPCR Amplification Method Manual- Lib-A (Roche, Stand Mai 2012). Generell lag die Anzahl der erhaltenen Beads nach erfolgter emPCR oberhalb der Grenze von 2.000.000. Zur Vermeidung wurde die Amplikonlibrary mit einer Konzentration von 10^7 Molekülen pro µl auf 10^5 Moleküle pro µl verdünnt und von dieser 15 µl für die emPCR verwendet.

Die anschließende Sequenzierung am GS Junior erfolgte nach Sequencing Method Manual (Roche, Stand November 2011).

Die abschließende Datenanalyse wurde nach Hersteller-Handbuch (454 Sequencing System Software Manual, Roche, Software Version 2.5p1, August 2010) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Einschätzung der Qualität eines Laufes mit der Software GS Run Browser. Diese Software verwendet nur Reads einer vordefinierten Qualität zu weiteren Auswertung und differenziert in die Filter „Dots“, „Mixed“, „Short Primer“ und „Short Quality“. Hierbei entfernt der Dots Filter kurze Reads bzw. Reads mit einer hohen Anzahl an Fehlpaarungen. Der Mixed Filter schließt Reads mit zu starken Signalen im Bereich eines Wells (z.B. durch Bindung verschiedener DNA-Fragmente an ein Bead) von der Auswertung aus. Zuletzt entfernen die Short Primer und Quality Filter nicht vollständige bzw. unvollständig gelesene Reads.

Zur Zuordnung des jeweiligen Genotyps wurde die GS Amplicon Variant Analyzer Software verwendet. Die Kodierung der MIDs erfolgte hierbei nach dem Either-Verfahren, welches eine gelesene Sequenz nach Identifikation nur einer MIDs des Forward oder Reverse Primers in die Datenauswertung einbezieht. Auszüge der Ergebnisse aus den genannten Software Programmen sind den jeweiligen Methoden (2.3.11.1.3. bzw. 2.3.11.1.7.) zu entnehmen.

2.3.11 Nachweis genetischer Polymorphismen

Im Folgenden sind die neu entwickelten Methoden am LightCycler sowie die zugehörigen Validierungsmethoden unterteilt nach der Studienpopulation (Olanzapinmetabolismus => „Serum Olanzapin“, im Kontext eines veränderten Therapieansprechens => „Response“, Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme => „Gewicht“) aufgeführt. Die Grundlagen zum allgemeinen Methodendesign, Ablauf und Optimierung der Reaktion sind hierbei den Abschnitten 2.3.8-10 zu entnehmen, die genauen Sequenzen der Oligonukleotide sowie deren Schmelztemperaturen und Amplikonlängen dem Anhang A2. Nach einer kurzen Beschreibung der jeweiligen Methode wird jeweils eine Tabelle mit dem verwendeten Zyklusprogramm und der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie eine Abbildung der Schmelzkurve aufgeführt.

2.3.11.1 Nachweis genetischer Polymorphismen im Olanzapinmetabolismus

2.3.11.1.1 rs35694136 (CYP1A2) und rs2011425 (UGT1A4)

Der rs35694136 Polymorphismus wird auch als CYP1A2*1D -2467T>delT Polymorphismus bezeichnet und stellt eine Deletion der Thymin Base im Intron 1 des CYP1A2 Genes dar. Der rs2011425 Polymorphismus (UGT1A4*3) bezeichnet den Basenaustausch vom Thymin zu Guanin und verursacht auch eine Änderung der Aminosäuresequenz (Leucin>Valin) innerhalb des UGT1A4 Genes.

Die Sensorsonde des **rs35694136 Polymorphismus** (LCRed705-TGATTGTGGCACATGAACCCC-Phosphat) wurde bei dieser Methode komplementär zum Wildtyp T-Allel konstruiert, an ihrem 5'-Ende mit LCRed705 markiert und am anderen Ende mit einer Phosphatgruppe geschützt. Zwei Basen zuvor wurde die Ankersonde (GAGGTCGAGGCTGCAGTGAGC-Fluoreszin) angeordnet, die am 3'-Ende mit Fluoreszin markiert wurde. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte für den Wildtyp ein Maximum von 65 °C, wohingegen ein Fehlen der Thymin-Base durch das Maximum bei 60 °C angezeigt wurde. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 4 bzw. Abbildung 11 zu entnehmen.

Die oben beschriebene Methode wurde im weiteren Untersuchungsverlauf durch die Bestimmung des **rs2011425 Polymorphismus** ergänzt. Die Sensorsonde (LCRed640-AGCATGCGGGAG GCCTTGCG-Phosphat) bindet bei dieser Bestimmung komplementär zum Wildtyp T-Allel. Zwei Basen zuvor wurde die Ankersonde (GCCCACTGATGGCAGCCCCTGGC-Fluoreszin) angeordnet, die am 3'-Ende mit Fluoreszin markiert wurde. In der Schmelzkurvenanalyse kann der Wildtyp durch den Peak bei 71 °C identifiziert werden. Bei Austausch der Thymin-Base durch ein Guanin ergibt sich eine Schmelzpunkterniedrigung auf 65 °C (Abbildung 12)

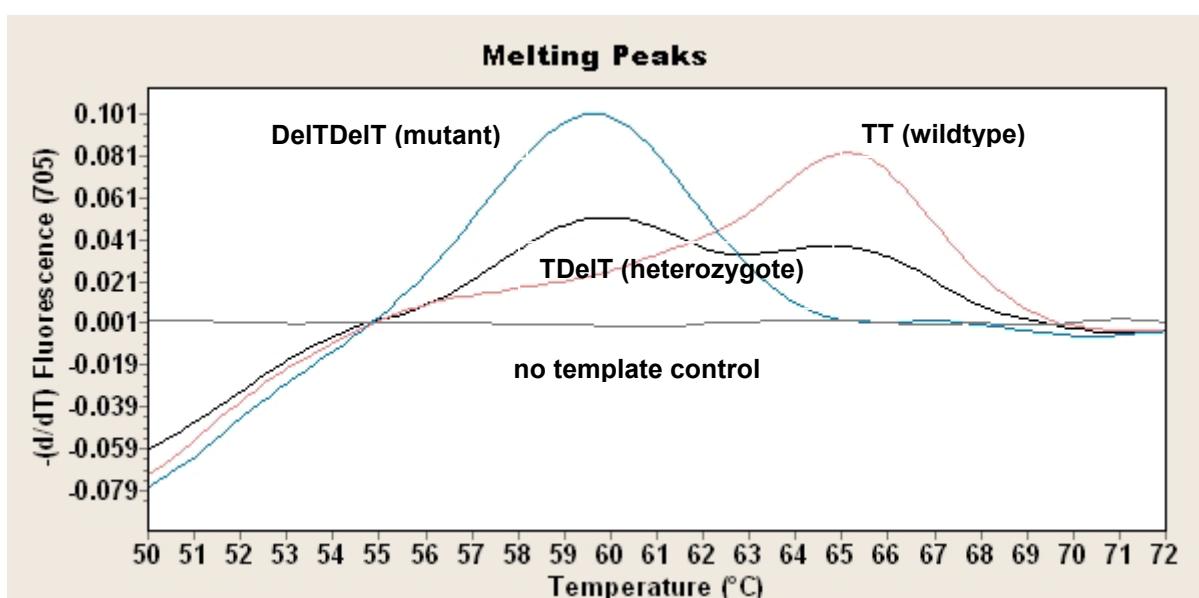


Abbildung 11: rs35694136 Schmelzkurve

Tabelle 4: rs35694136 und rs2011425 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 59 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 50 °C - 80 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (μ l)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	12		
MgCl ₂	1,7	25 mM	3,125 mM
F-Primer CYP1A2*1D	0,4	25 μ M	500 nM
R-Primer CYP1A2*1D	0,5	25 μ M	625 nM
F-Primer UGT1A4*3	0,3	25 μ M	375 nM
R-Primer UGT1A4*3	0,5	25 μ M	625 nM
Sen CYP1A2*1D	0,4	3 μ M	60 nM
Anc CYP1A2*1D	0,4	3 μ M	60 nM
Sen rs2011425	0,3	3 μ M	45 nM
Anc rs2011425	0,3	3 μ M	45 nM
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l (19 μ l Stammlösung und 1 μ l DNA)

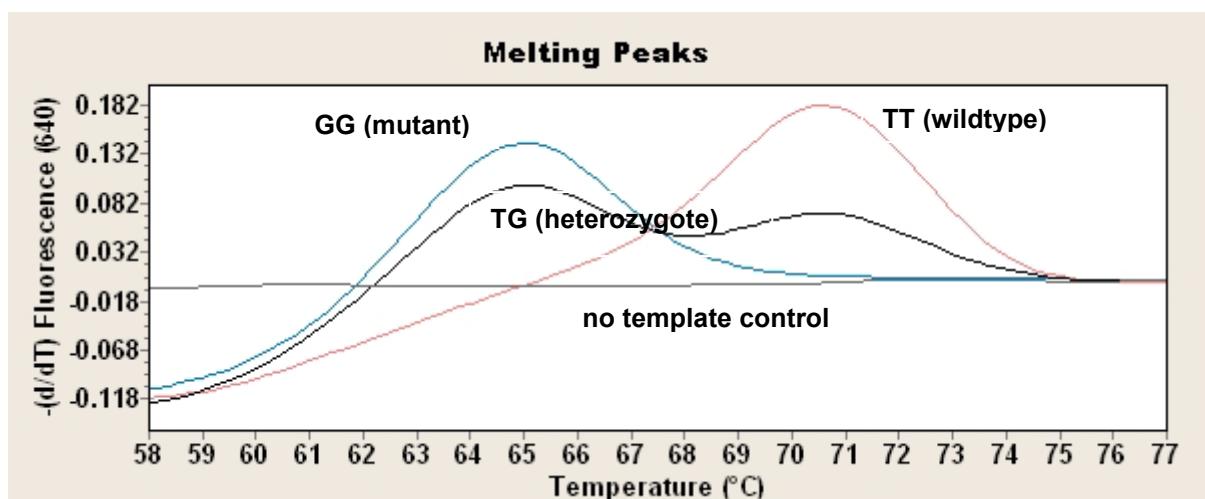


Abbildung 12: rs2011425 Schmelzkurve

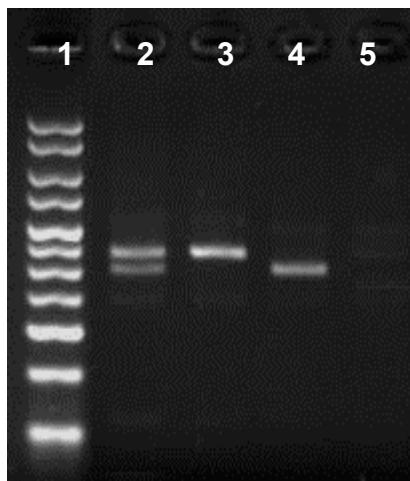
Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode des **rs35694136 Polymorphismus** wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym BtsCI durchgeführt: Hierfür wurde die von Chida et al. publizierte Methode an die Bedingungen im PCR Labor des Institutes angepasst und optimiert. Die genaue Zusammensetzung des Ansatzes kann Tabelle 5 entnommen werden. Anschließend wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes mit 10 µl Stammlösung (7 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 1 µl Enzym NdeI mit 20000 U/ml) vermischt und bei 37 °C für 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet das Wildtyp T-Allel, so dass sich 2 Fragmente mit 148 bp und 19 bp ergeben; bei Fehlen der Thyminbase verbleibt das Amplifikationsprodukt bei 167 bp. Die Bandenmuster können Abbildung 13 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

Tabelle 5: rs35694136 Amplifikongenerierung am Thermocycler

Zyklusprogramm			
W: 95 °C 300 sec; 35x [94 °C 30 sec – 49 °C 10 sec – 72 °C 60 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	15,3		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	0,5x
dNTP Peqlab	0,4	5 mM	100 µM
RFLP F CYP1A2*1D	0,5	25 µM	625 nM
RFLP R CYP1A2*1D	0,5	25 µM	625 nM
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl

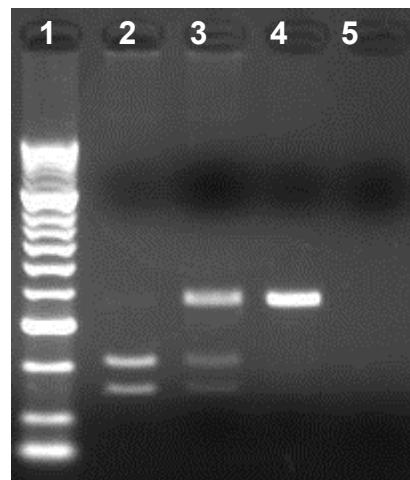
¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode des **rs2011425 Polymorphismus** wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym StuI durchgeführt: Hierfür wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes aus dem LightCycler Lauf mit 10 µl Stammlösung (7 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 1 µl Enzym StuI mit 10000 U/ml) vermischt und bei 37 °C für 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur das Wildtyp T-Allel, sodass sich 2 Fragmente mit 210 bp und 155 bp ergeben, wohingegen die Mutante bei 365 bp verbleibt. Die Bandenmuster können Abbildung 14 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.



1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Heterozygote: 167 bp + 148 bp + 19 bp (TDeiT)
3. Mutante: 167 bp (DeiTDeiT)
4. Wildtyp: 148 bp + 19 bp (TT)
5. Leerkontrolle

Abbildung 13: rs35694136 enzymatischer Verdau mit NdeI, Agarosegel 3.5 % (Metaphor), 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V



1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Wildtyp: 210 bp + 155 bp (TT)
3. Heterozygote: 365 bp + 210 bp + 155 bp (TG)
4. Mutante: 365 bp (GG)
5. Leerkontrolle

Abbildung 14: rs2011425 enzymatischer Verdau mit StuI, Agarosegel 2.0 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

2.3.11.1.2 rs762551 bzw. CYP1A2*1F Polymorphismus (CYP1A2)

Die Bestimmung des CYP1A2*1F-Allels erfolgte mittels einer bereits etablierten Methode wie in der Dissertation von Herrn Popp beschrieben.²⁵⁷

2.3.11.1,3 rs2302429 Polymorphismus (POR)

Der rs2302429 Polymorphismus (UGT1A4*3) stellt eine Punktmutation der Guanin zur Adenin Base dar und befindet sich im Intron 11 des POR Genes.

Die Sensorsonde (TGAGGTTGGATGCCAGGTGG-Fluoreszein) wurde bei dieser Methode komplementär zum mutierten A-Allel konstruiert und an ihrem 3'-Ende mit Fluoreszein markiert. In einem Abstand von 2 Basen folgte die Ankersonde (LCRed610-TGGAAGAGGCCCTGGGT GAGTGG-Phosphat), die am 5'-Ende eine LCRed610 Markierung erhielt und am anderen Ende durch eine Phosphatgruppe geschützt wurde. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte für die Mutante ein Maximum von 66 °C. Der Wildtyp konnte durch ein Peak bei 60 °C identifiziert werden. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 6 bzw. Abbildung 15 zu entnehmen.

Tabelle 6: rs2302429 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 58 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 50 °C - 75 °C bei 0.1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	14,2		
MgCl ₂	1,4	25 mM	2,75 mM
Forward POR	0,3	25 µM	375 nM
Reverse POR	0,5	25 µM	625 nM
Sen rs2302429	0,3	3 µM	45 nM
Anc rs2302429	0,3	3 µM	45 nM
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

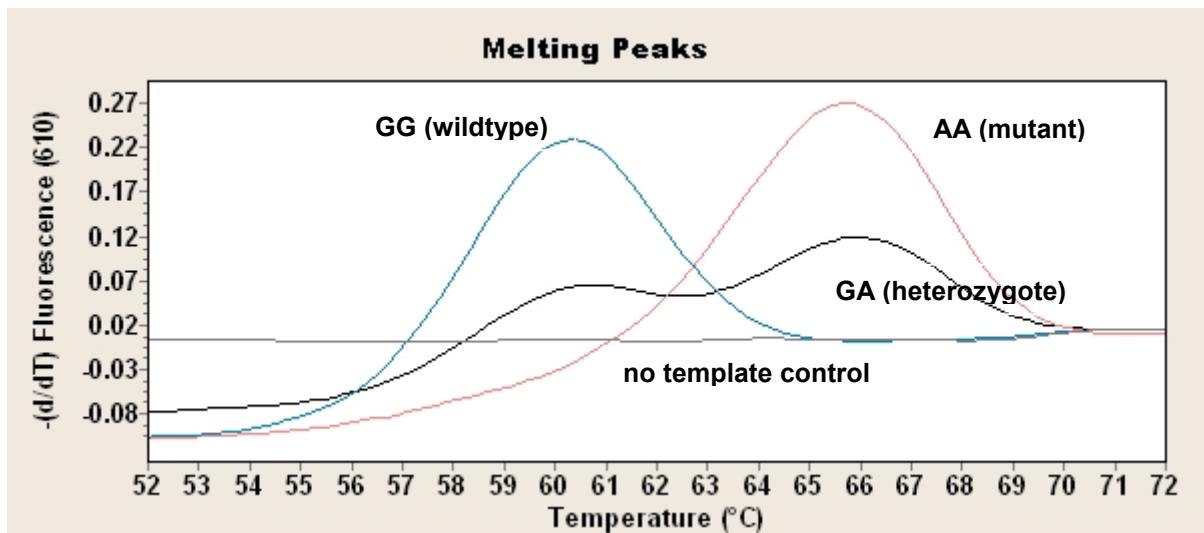
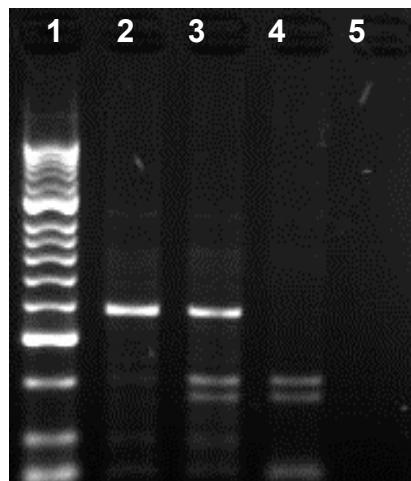


Abbildung 15: rs2302429 Schmelzkurve

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode des **rs2302429 Polymorphismus** wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym BtsCI durchgeführt: Hierfür wurden 10 µl des zuvor mit dem LightCycler-Lauf generierten PCR-Produktes mit 10 µl Stammlösung (7 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 1 µl Enzym BtsCI mit 20000 U/ml) vermischt und bei 50 °C für 3 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet das mutierte A-Allel, sodass sich 2 Fragmente mit 202 bp und 178 bp ergeben. Der Wildtyp kann durch das Amplifikationsprodukt bei 380 bp identifiziert werden. Die Bandenmuster können Abbildung 16 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.



1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Wildtyp: 380 bp (GG)
3. Heterozygote: 380 bp + 202 bp + 178 bp (GA)
4. Mutante: 202 bp + 178 bp (AA)
5. Leerkontrolle

Abbildung 16: rs2302429 enzymatischer Verdau mit BtsCI, Agarosegel 2.0 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

2.3.11.2 Nachweis genetischer Polymorphismen im Kontext einer verbesserten Therapievorhersage

2.3.11.2.1. rs3787429 und rs3787430 Polymorphismus (HRH3)

Beide untersuchten Polymorphismen stellen eine stille Punktmutation von Cytosin zu Thymin dar und befinden sich im Exon 3 des HRH3 Genes.

Für den rs3787429 Polymorphismus wurde die Sensorsonde (LCRed640-CATGCGCTTCTC CAGCGAGG-Phosphat) komplementär zum Wildtyp C-Allel konstruiert und am 5'-Ende mit LCRed640 Farbstoff bzw. am 3-Ende mit einer Phosphatgruppe versehen. In einem Abstand von 2 Basen wurde die Ankersonde (CTGGGTGAAGCTCTGGGACACCATC-Fluoreszein) angeordnet. Hieraus ergab sich eine Schmelztemperatur von 62,5 °C für das Wildtyp-C-Allel und 55,5 °C für das mutierte T-Allel. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 7 bzw. Abbildung 17 zu entnehmen.

Tabelle 7: rs3787429/30 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 40x [95 °C 10 sec – 58 °C 20 sec – 72 °C 25 sec]; 50 °C - 75 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	12,2		
MgCl ₂	0,6	25 mM	1,75 mM
F monoplex HRH3	0,5	25 µM	625 nM
R monoplex HRH3	0,5	25 µM	625 nM
Sen rs3787429	0,5	3 µM	75 nM
Anc rs3787429	0,5	3 µM	75 nM
Sen2 rs3787430	0,6	3 µM	90 nM
Anc2 rs3787430	0,6	3 µM	90 nM
DMSO	1,0		
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

Für den rs3787430 Polymorphismus wurde die Sensorsonde (GGACGCCGACGGCTTGG-Fluoreszein) ebenfalls komplementär zum Wildtyp C-Allel konstruiert, jedoch mit Fluoreszein am 3'-

Ende versehen. In einem Abstand von 2 Basen folgte die Ankersonde (LCRed705-CCCTCTTGAGTGAGCGCGGCCT) mit 3'-LD-705 Markierung und einer 5'-Phosphatgruppe (LCRed705-CCCTCTTGAGTGAGCGCGGCCT). Es wurden Maxima in der Schmelzkurve von 64 °C und 55,5 °C beobachtet, die dem Wildtyp C-Allel bzw. dem mutierten A-Allel zugeordnet werden können. (Abbildung 18)

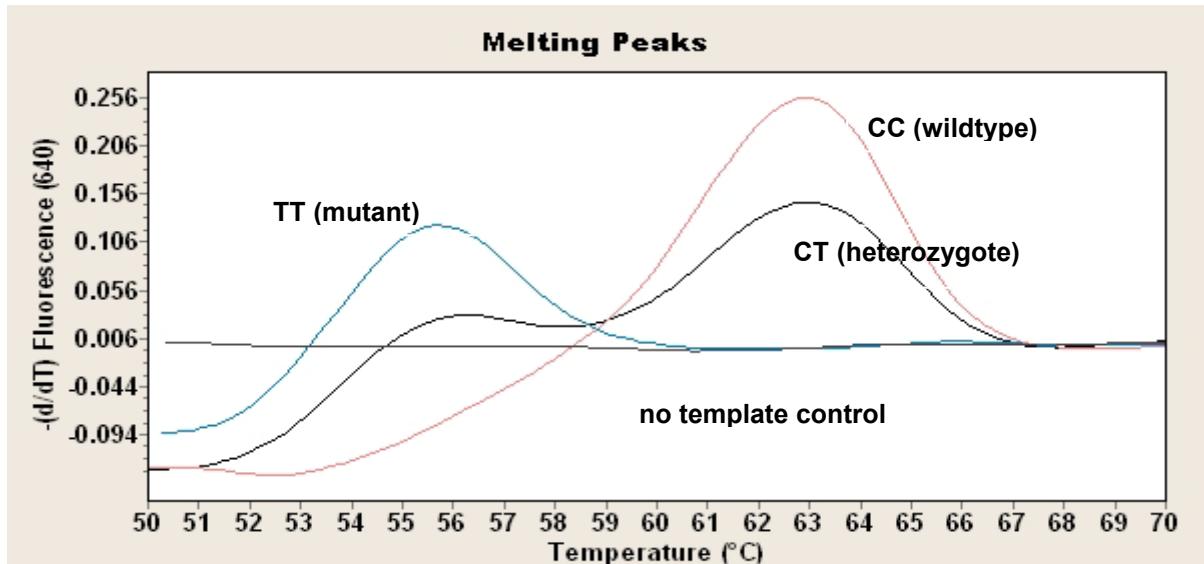


Abbildung 17: HRH3 rs3787429 Schmelzkurve

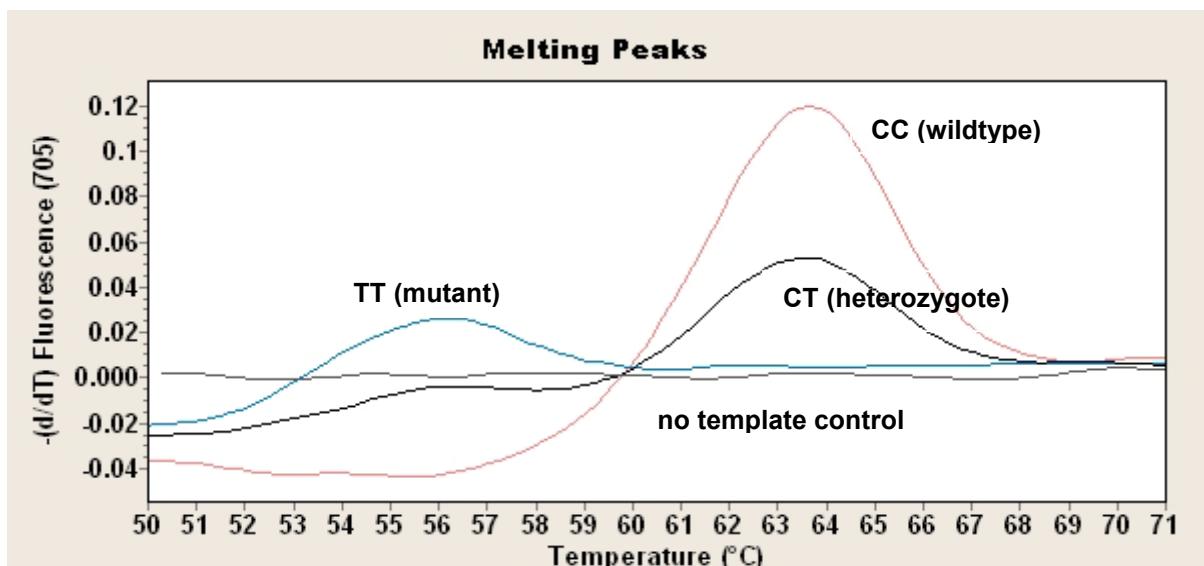


Abbildung 18: HRH3 rs3787430 Schmelzkurve

Als Validierungsmethode für den **rs3787429** Polymorphismus wurde eine ALS PCR am Thermocycler entwickelt: Hierfür wurde ein Reverse Primer (TTCACCCACCTCCAGCTC) für beide Ansätze und jeweils ein Forward Primer für den Wildtyp (ATCTTCATGCGCTTCTCCAC) und für die Mutante (ATCTTCATGCGCTTCTCCACT) konstruiert. Da das PCR Produkt reich an GC-haltigen Basen ist,

wurden 10 % DMSO hinzugefügt. Die genaue Zusammensetzung des optimierten Ansatzes ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: rs3787429 ALS PCR-Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
W: 95 °C 300 sec; 30x [93 °C 30 sec – 57 °C 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	13,3		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	0,5x
dNTP Peqlab	0,4	5 mM	100 µM
ALS FW rs3787429 oder ALS FM rs3787429	0,5	25 µM	625 nM
ALS R rs3787429	0,5	25 µM	625 nM
DMSO	2		
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

An Hand des 113 bp großen Amplifikationsproduktes (Abbildung 19) konnten die verschiedenen Genotypen zuverlässig identifiziert werden. In beiden Ansätzen ergaben sich schwache Fehlbanden, die die Präsenz der Hauptbande aber nicht überdeckten, so dass die untersuchten Proben problemlos zugeordnet werden konnten und die Ergebnisse der LightCycler Methode bestätigten.

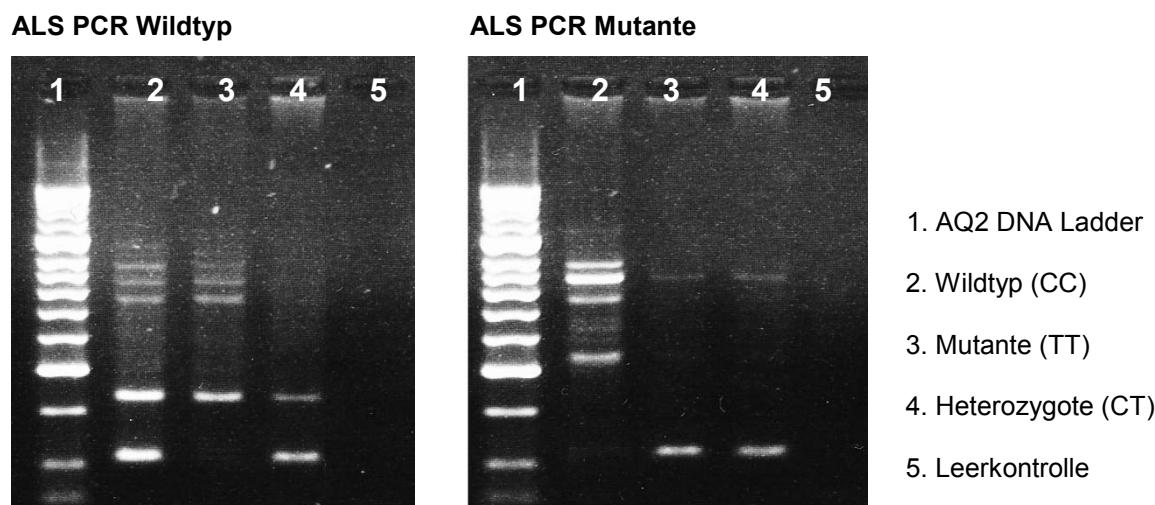


Abbildung 19: rs3787429, Gelektrophorese, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

Als Validierungsmethode für den **rs3787430** Polymorphismus wurde ebenfalls eine ALS PCR am Thermocycler entwickelt: Hierfür wurden ein Forward Primer (AGGAGGCCAGAAGGAGGTTTC) und jeweils ein Reverse Wildtyp Primer (AAGAGGGGCTCCAAGCAG) und ein Reverse Mutant Primer (CAAGAGGGGCTCCAAGCAA) verwendet. Da die Primer auch in dieser Methode einen GC Gehalt von über 50% besitzen, wurden 10% DMSO für den Wildtypansatz und 5% DMSO für den Mutationsansatz hinzugefügt (näheres siehe Tabelle 9). Zur Optimierung der Ergebnisse wurde für den Wildtypansatz eine Annealingtemperatur von 54,5 °C und für den Mutationsansatz eine Temperatur von 55,5 °C gewählt.

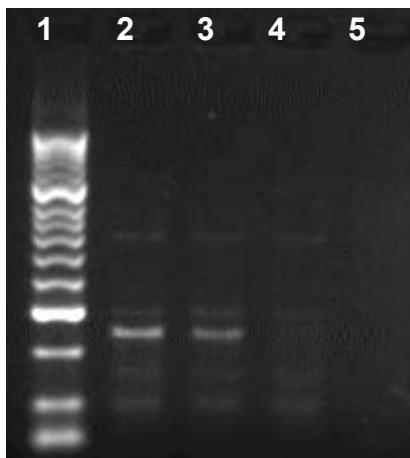
Tabelle 9: rs3787430 ALS PCR-Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
W: 95 °C 300 sec; 34x [93 °C 30 sec – 54,5 °C (W) / 55,5 °C (M) 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	13,3		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	0,5x
dNTP Peqlab	0,4	5 mM	100 µM
ALS Forward rs3787430	0,5	25 µM	625 nM
ALS RW rs3787430 oder ALS RM rs3787430	0,5	25 µM	625 nM
DMSO	2 (W) 1(M)		
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl

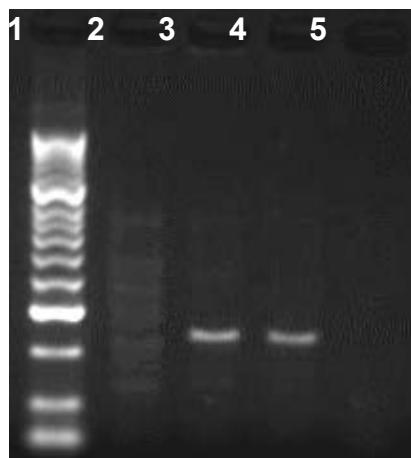
¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

Das 243 bzw. 242 bp lange Amplifikationsprodukt wurde anschließend auf einem 2% Gel aufgetrennt (Abbildung 20). Hierbei konnten für die untersuchten Proben die Ergebnissen der LightCycler Methode bestätigt werden.

ALS PCR Wildtyp



ALS PCR Mutante



1. AQ2 DNA Ladder
2. Wildtyp (CC)
3. Heterozygote (CT)
4. Mutante (TT)
5. Leerkontrolle

Abbildung 20: rs3787430 Gelelektrophorese, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

2.3.11.2.2 rs1344706 Polymorphismus (ZNF804A)

Der rs1344706 Polymorphismus ist im Intron Bereich des ZNF804A Genes lokalisiert und stellt eine Punktmutation von Thymin zu Guanin dar.

Die Sensorsonde (CAAAAACATCAGAATCAACTTCTGGA-Fluoreszein) wurde hierbei komplementär zum Wildtyp T-Allel konstruiert und an ihrem 3'-Ende mit Fluoreszein markiert. In einem Abstand von 2 Basenpaaren folgte die Ankersonde (LCRed640-TCTATCTGGAAAGTAA TCAAAGGTTTACAGG-Phosphat), die am 5'-Ende eine LCRed640 Markierung erhielt und am anderen Ende durch eine Phosphatgruppe geschützt wurde. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte für den Wildtyp ein Maximum von 61 °C, wohingegen der Austausch der Thymin-Base durch das Maximum bei 56 °C identifiziert werden kann. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 10 bzw. Abbildung 21 zu entnehmen.

Tabelle 10: rs1344706 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 58 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 50 °C -75 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	14,2		
MgCl ₂	1,4	25 mM	2,75 mM
Forward ZNF804A	0,3	25 µM	375 nM
Reverse ZNF804A	0,5	25 µM	625 nM
Sen rs1344706	0,3	3 µM	45 nM
Anc rs1344706	0,3	3 µM	45 nM
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

Als Validierungsmethode für den rs1344706 Polymorphismus wurde eine ALS PCR am Thermocycler entwickelt: Hierfür wurde ein Reverse Wildtyp (ATATCCAAGAAGTTGATTCTGACA) und ein Reverse Mutant Primer (TCCAAGAAGTTGATTCTGACC) mit einer Fehlpaarung an der vorletzten Stelle generiert, um eine spezifische Anlagerung zu begünstigen. Zur Bestimmung wurden jeweils ein Wildtyp- und ein Mutationsansatz verwendet. Diese enthalten den identischen Forward Primer (GCACATGAGTAGTGAGGTT) und unterscheiden sich nur durch Zugabe des Reverse Primers. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 11 zu entnehmen.

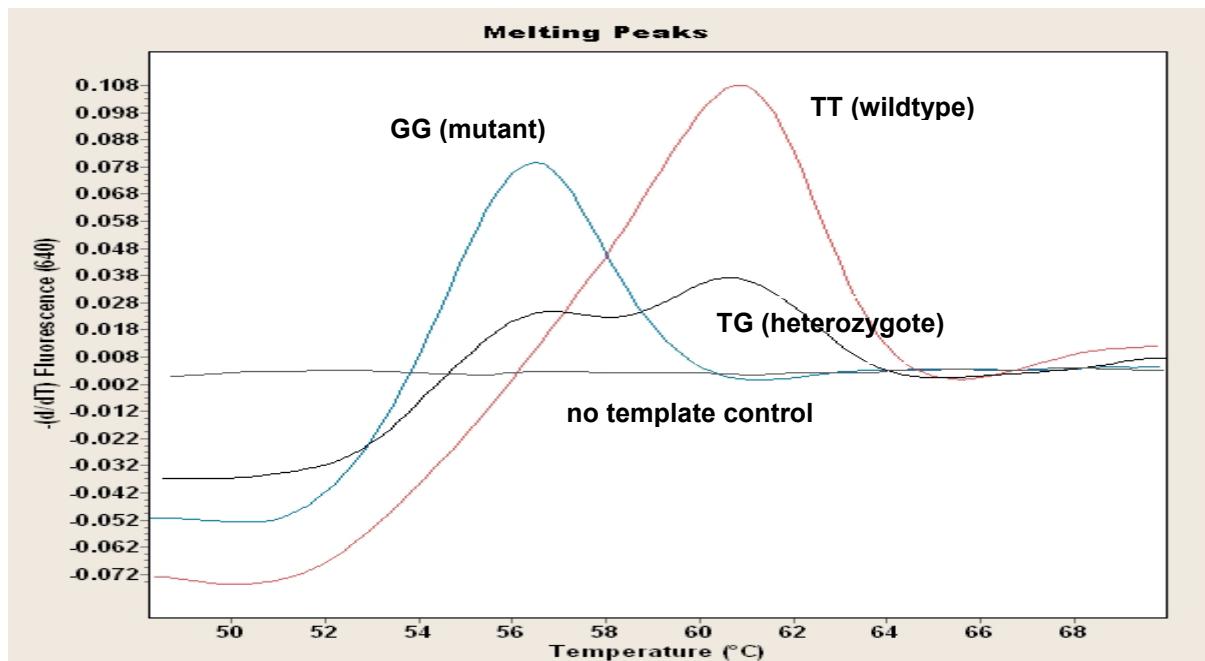


Abbildung 21: rs1344706 Schmelzkurve

Tabelle 11: rs1344706 ALS PCR-Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
94 °C 180 sec; 33x [93 °C 30 sec – 54,5 °C 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	15,3		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	0,5x
dNTP Peqlap	0,4	5 mM	100 µM
ALS F ZNF804A	0,5	25 µM	625 nM
ALS RW ZNF804A oder ALS RM ZNF804A	0,5	25 µM	625 nM
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl

¹bezogen auf ein Gesamtvolume von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

An Hand des 157 bzw. 154 bp großen Amplifikationsproduktes (Abbildung 22) konnten die verschiedenen Genotypen zuverlässig identifiziert werden und stimmten für die untersuchten Proben mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

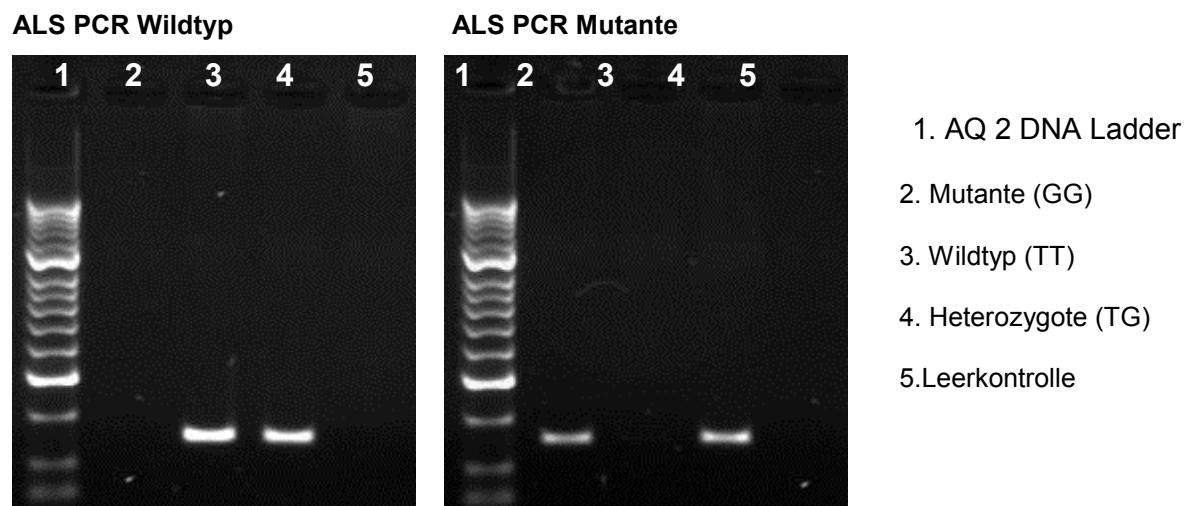


Abbildung 22: rs1344706 Gelelektrophorese, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

2.3.11.2.3 ABCB1: rs28656907(T=>C) und rs28373093 (G=>C)

Der dinukleotide Polymorphismus rs28656907/rs28373093 ist in der proximalen Promoterregion des ABCB1 Genes lokalisiert und stellt eine Punktmutation von Thymin/Guanin zu Cytosin/Cytosin dar.

Beide Punktmutationen befinden sich direkt nebeneinander, können aber auf Grund des vorliegenden LD von 1 ohne Probleme identifiziert werden. Die Sensorsonde (GCTCTTCTACACCTTTAGGGTT-Fluoreszein) wurde hierbei komplementär zum Gegenstrang des Wildtyp T- bzw. G-Alleles konstruiert und an ihrem 3'-Ende mit Fluoreszein markiert. 2 Basen zuvor wurde die Ankersonde (LCRed640-GGCATACTCCTTCTGAGAATTCTCGTCT-Phosphat), die am 5'-Ende eine LCRed640 Markierung erhielt und am anderen Ende durch eine Phosphatgruppe geschützt wurde, angeordnet. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte für die beiden Wildtypen ein Maximum von 62,5 °C, wohingegen der Austausch der benachbarten Basen zu einer starken Temperaturverschiebung führt und durch den Peak bei 50 °C identifiziert werden kann. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 12 bzw. 23 zu entnehmen.

Tabelle 12: rs28656907 und rs28373093 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 58 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 50 °C - 75°C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	14,2		
MgCl ₂	1,4	25 mM	2,75 mM
Forward ABCB1	0,3	25 µM	375 nM
R ABCB1	0,5	25 µM	625 nM
Sen ABCB1	0,3	3 µM	45 nM
Anc ABCB1	0,3	3 µM	45 nM
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

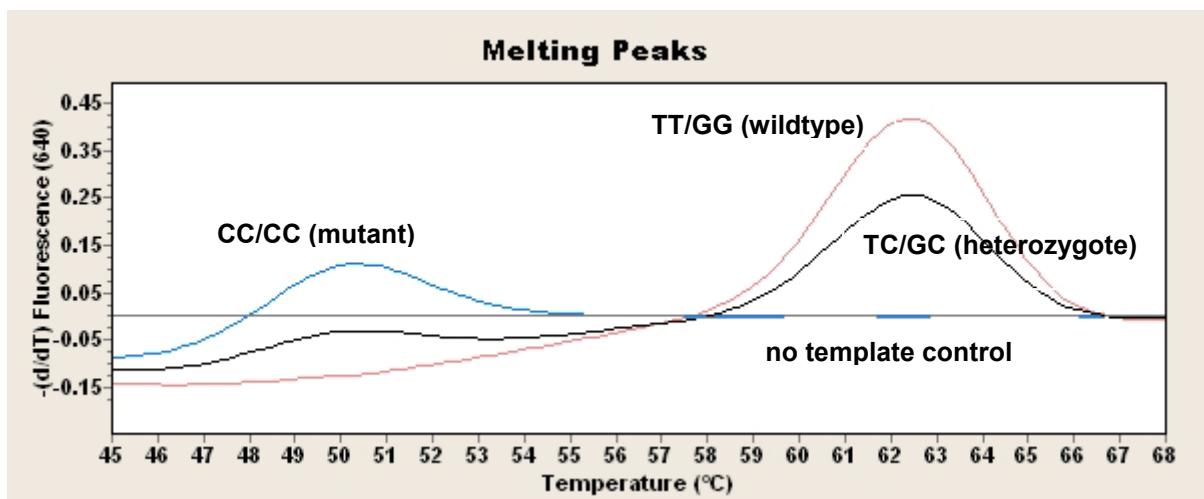
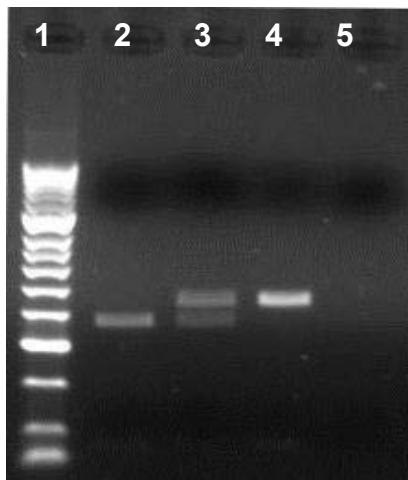


Abbildung 23: rs28656907 und s28373093 Schmelzkurve

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym Stul durchgeführt: Hierfür wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes aus dem LightCycler Lauf mit 10 µl Stammösung (7 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 1 µl Enzym Stul mit 10000 U/ml) vermischt und bei 37 °C für 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur bei Vorliegen der beiden mutierten Allele, so dass sich 2 Fragmente mit 374 bp und 72 bp ergeben. Der Wildtyp kann durch das Amplifikationsprodukt bei 446 bp identifiziert werden. Die Bandenmuster können der Abbildung 24 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.



1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Mutante: 374 bp + 72 bp (CC/CC)
3. Heterozygote: 446 bp + 374 bp + 72 bp (TC/GC)
4. Wildtyp: 446 bp (TT/GG)
5. Leerkontrolle

Abbildung 24: rs2302429 enzymatischer Verdau mit Stul, Agarosegel 2.0 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

2.3.11.3 Nachweis genetischer Polymorphismen in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme

2.3.11.3.1 rs324420 Polymorphismus (FAAH)

Bei dem untersuchten rs324420 Polymorphismus handelt es sich um einen Basenaustausch von Cytosin zu Adenin, welcher zu einer Änderung der Aminosäurestruktur (Threonin statt Prolin) an der Stelle 129 des FAAH Enzyms führt.

Die Sensorsonde (GCTGTCTCAGGCCCCAAGGCAG-LCRed640) wurde an ihrem 3'-Ende mit dem LCRed640 Farbstoff markiert und so konstruiert, dass sie komplementär zum Strang des Wildtypes ist. Um einen optimalen FRET Übergang zu gewährleisten, folgte in einem Abstand von 2 Basenpaaren die Ankersonde (Fluoreszein-CCTGCTCTATGGCGTCCCTGTGAGCCTC), die an ihrem 5'-Ende mit Fluoreszein markiert wurde. Aus den Gegebenheiten folgte eine Schmelztemperatur von 70 °C für das Wildtyp-C-Allel und 63,5 °C für das mutierte G-Allel. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 13 bzw. Abbildung 25 zu entnehmen.

Tabelle 13: rs324420 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 40x [95 °C 10 sec – 60 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 58 °C – 78 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	14,4		
MgCl ₂	0,6	25 mM	1,75 mM
FA Pro129Thr	0,5	25 µM	625 nM
RA Pro129Thr	0,3	25 µM	375 nM
Sen Pro129Thr	0,6	3 µM	90 nM
Anc Pro129Thr	0,6	3 µM	90 nM
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

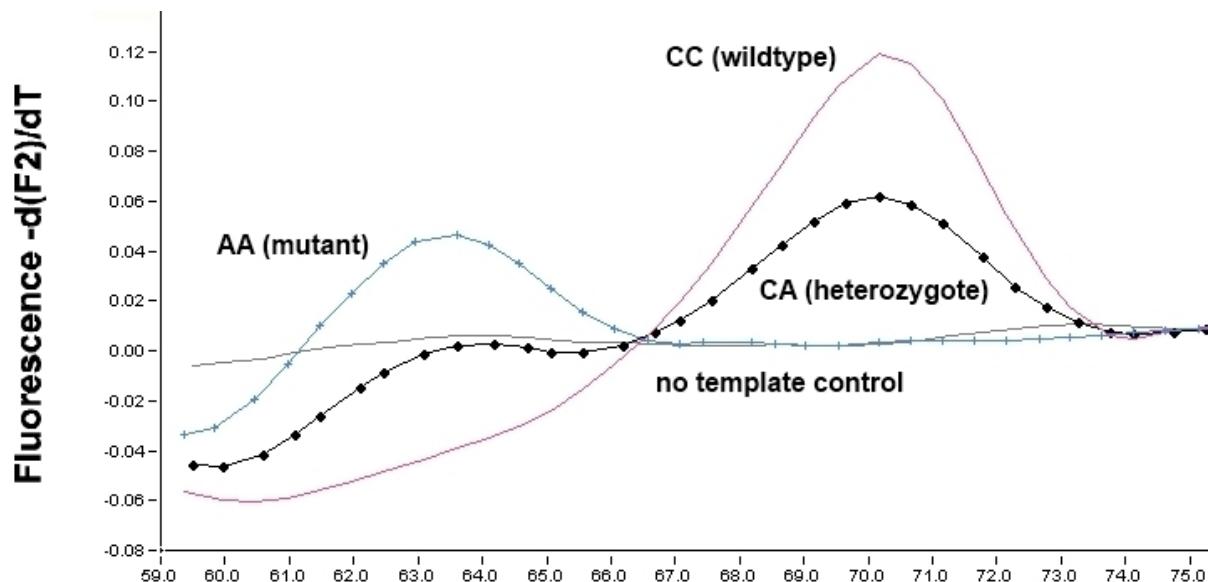


Abbildung 25: Pro129 rs324420 Schmelzkurve **Temperature (°C)**

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode wurde zusätzlich für 60 Proben ein enzymatischer mit dem Enzym BSAJI durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl PCR-Produkt aus dem vorausgegangenen LightCycler Lauf und 10 µl Stammlösung (6 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 2 µl Enzym BSAJI mit 5000 U/ml) bei 60 °C für 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur das Wildtyp C-Alell, sodass sich 2 Fragmente mit 133 bp und 71 bp ergeben; das mutierte A-Alell verbleibt unverändert mit 204 bp. Die Bandenmuster können Abbildung 26 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

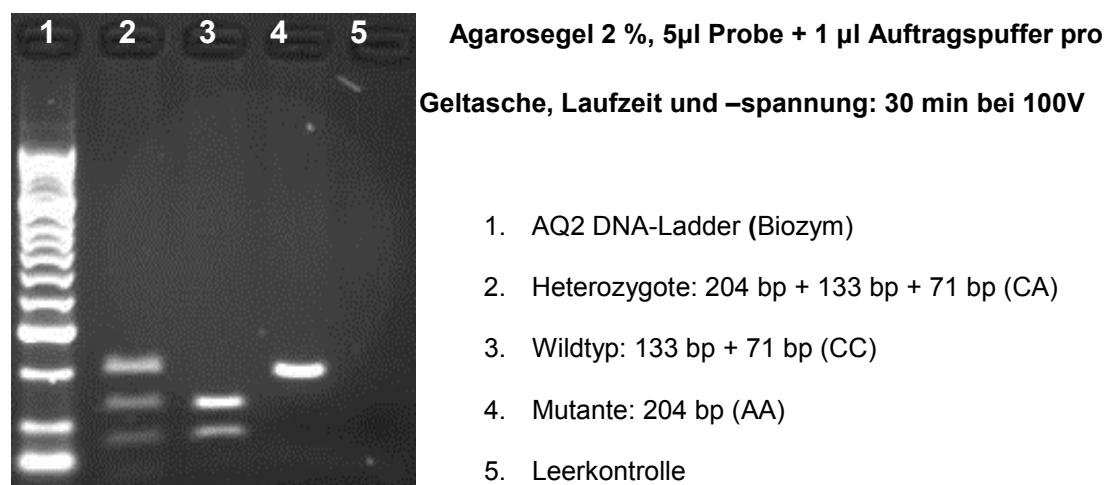


Abbildung 26: rs324420 enzymatischer Verdau mit BSAJI

2.3.11.3.2. rs17782313 und rs489693 Polymorphismus

Der **rs17782313 Polymorphismus** befindet sich 188 kilobasen (kb) downstream des MC4R Genes und stellt eine Punktmutation von Thymin zu Cytosin dar, während bei dem rs489693 Polymorphismus eine Punktmutation von Adenin zu Cytosin, 156 kb downstream des MCR4 Genes, vorliegt.

Um einen großen Peakabstand zu gewährleisten wurde die Sensorsonde komplementär zum mutierten C-Allel konstruiert und an ihrem 3'-Ende mit Fluoreszein markiert (GAGATTGTATCCCG ATGGAAATGACAAGAA-Fluoreszein). Die in einem Abstand von 2 Basen folgende Ankersonde wurde an ihrem 5'-Ende mit LCRed640 und an ihrem 3'-Ende mit Phosphat versehen (LCRed640-GCTTCAGGGGGAAAGGTGACATTAAAGTTGG-Phosphat). In der Schmelzkurvenanalyse konnten Wildtyp-Träger an Hand des Maximums von 57,5 °C und mutierte Allel-Träger an Hand des Maximums von 63 °C identifiziert werden.

Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 14 bzw. Abbildung 27 zu entnehmen.

Tabelle 14: rs17782313 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 58 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 52 °C – 67 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	12,6		
MgCl ₂	1,4	25 mM	2,75 mM
Forward MC4R	0,5	25 µM	625 nM
Reverse MC4R	0,5	25 µM	625 nM
Sen MC4R	0,5	3 µM	75 nM
Anc MC4R	0,5	3 µM	75 nM
DMSO	1		
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

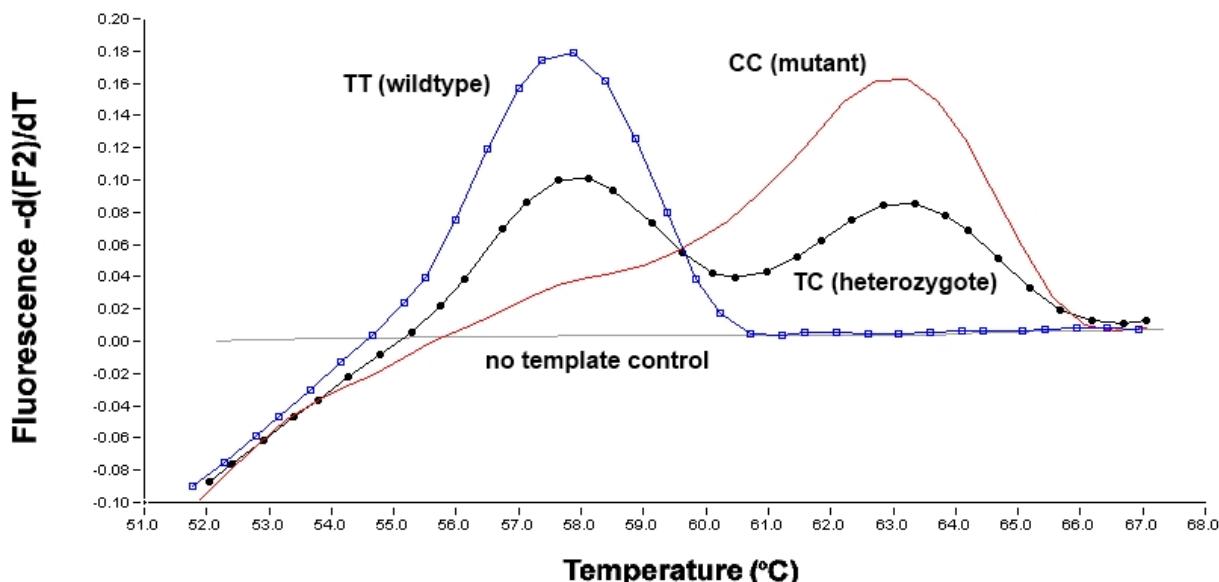


Abbildung 27: MC4R rs17782313 Schmelzkurve am LC 1.5

Im späteren Forschungsverlauf wurde die oben aufgeführte Methode vom LC 1.5 auf den LC 2.0 übertragen und um den weiteren Polymorphismus rs489693 ergänzt, was aber keine relevante Auswirkung auf den Verlauf und die Peaks in der Schmelzkurve hatte (Abbildung 28).

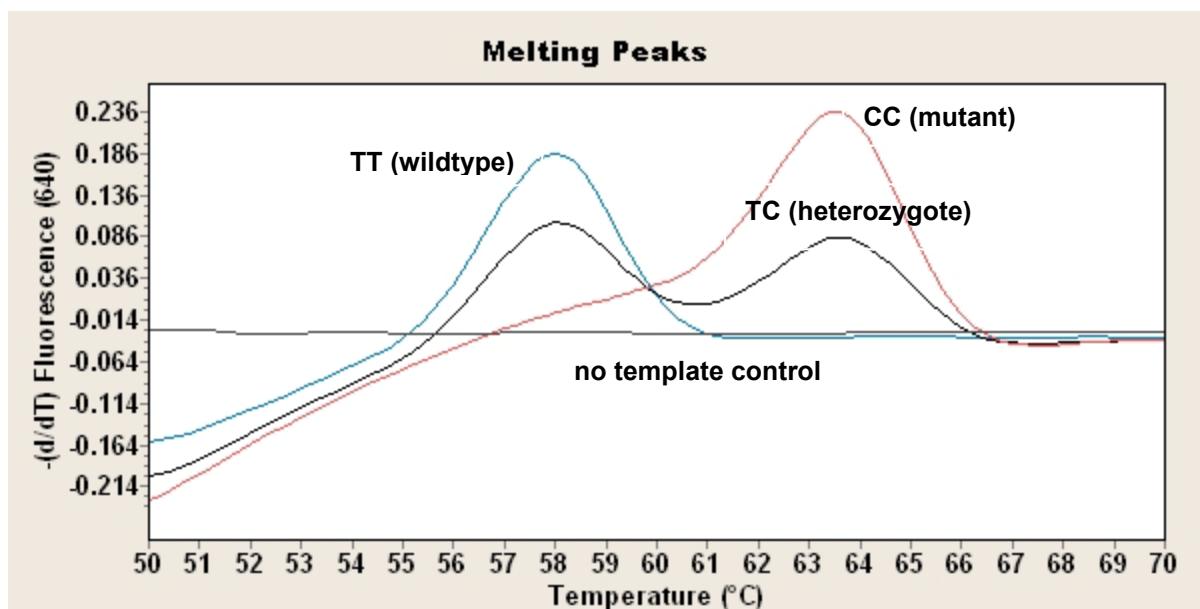


Abbildung 28: MC4R rs17782313 Schmelzkurve am LC 2.0 (zusammen mit rs489693)

Für den **rs489693 Polymorphismus** wurde die Sensorsonde komplementär zum mutierten C-Allel konstruiert, an ihrem 5'-Ende mit LCRed705 markiert und am 3'-Ende durch eine Phosphatgruppe geschützt (LCRed705-CTGTTGTCATTAGTTCCCGTTGTT-Phosphat). Zwei Basenpaare zuvor wird die Ankersonde, die an ihrem 5'-Ende mit Fluoreszein versehen wurde, angelagert (CCAGATTTGGTCAA TACAGGTCATGTCTTAA-Fluoreszein). Der Wildtyp kann an Hand des Peaks

bei 58 °C und die Mutante an Hand des Peaks bei 64 °C in der Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 29) identifiziert werden. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: rs17782313 + rs489693 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 58 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 50 °C – 75 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	11,7		
MgCl ₂	1,4	25 mM	2,75 mM
Forward MC4R	0,5	25 µM	625 nM
Reverse MC4R	0,5	25 µM	625 nM
F rs489693	0,3	25 µM	375 nM
R rs489693	0,5	25 µM	625 nM
Sen MC4R	0,5	3 µM	75 nM
Anc MC4R	0,5	3 µM	75 nM
Sen rs489693	0,3	3 µM	45 nM
Anc rs489693	0,3	3 µM	45 nM
DMSO	0,5		
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

Als Validierungsmethode für den **rs17782313** Polymorphismus wurde eine ALS PCR am Thermocycler entwickelt: Hierfür wurde ein Forward Wildtyp (TAAAGCAGGAGAGATTGTATCAT) und ein Forward Mutant Primer (TAAAGCAGGAGAGATTGTATCAC) mit einer Fehlpaarung an der vorletzten Stelle generiert, um eine spezifische Anlagerung zu begünstigen. Zur Bestimmung wurden jeweils ein Wildtyp- und ein Mutationsansatz verwendet. Diese Ansätze enthalten den identischen Reverse Primer (AAGCTACCTCAATCCCAGAT) und unterscheiden sich nur durch Zugabe des Forward Primers voneinander. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 16 zu entnehmen.

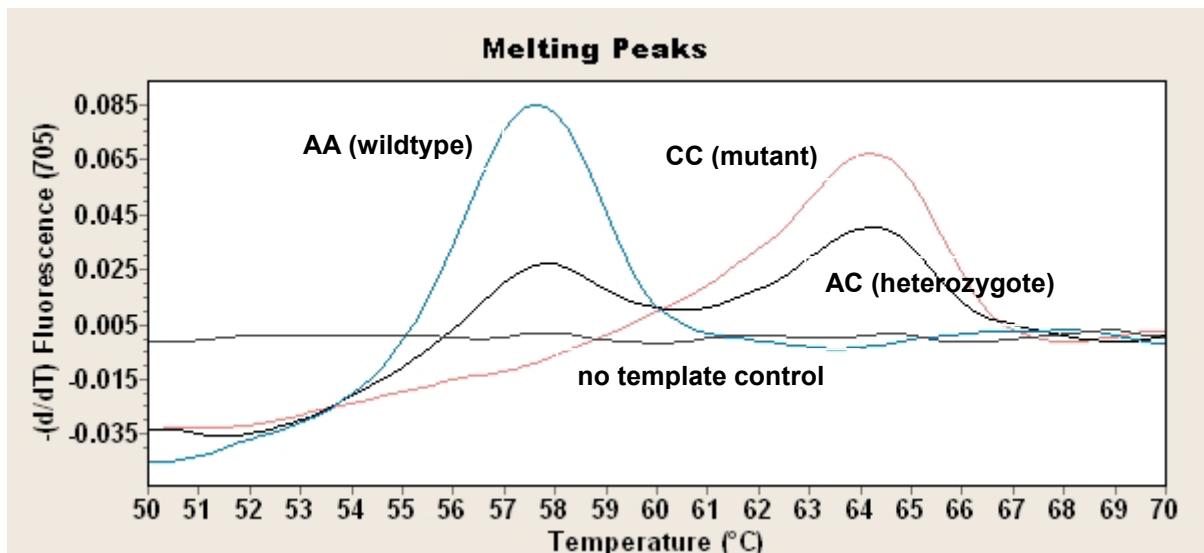


Abbildung 29 MC4R rs489693 Schmelzkurve

Tabelle 16: rs17782313 ALS PCR-Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
94 °C 180 sec; 30x [93 °C 30 sec – 54 °C 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	15,3		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	0,5x
dNTP Peqlap	0,4	5 mM	100 µM
ALS F-Wildtyp MC4R oder ALS F-Mutante MC4R	0,5	25 µM	625 nM
ALS R-Primer MC4R	0,5	25 µM	625 nM
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

An Hand des 119bp großen Amplifikationsproduktes (Abbildung 30) konnten die verschiedenen Genotypen zuverlässig identifiziert werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

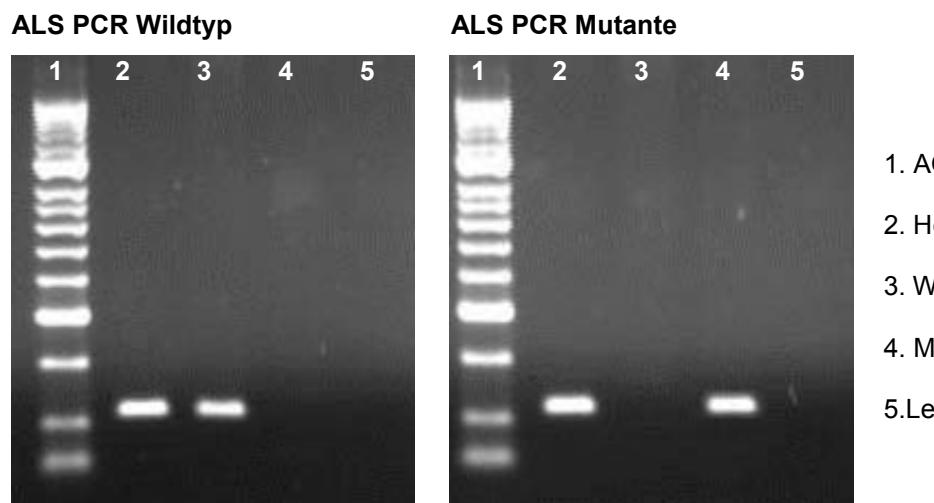


Abbildung 30: rs17782313 Gelelektrophorese, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 30 min bei 100V

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode (**rs489693 Polymorphismus**) wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym BSRI durchgeführt. Hierfür wurde mit dem Ansatz aus Tabelle 17 und den Primern aus der zuvor beschriebenen LightCycler Methode ein Amplikon erzeugt. Anschließend wurden 10 µl dieses Amplikons und 10 µl Stammlösung (6 µl H₂O, 2 µl NEB3 Puffer 10x, 2 µl Enzym BSRI mit 5.000 U/ml) bei 65 °C für 3 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur das Wildtyp A-Allel, sodass sich 2 Fragmente mit 223 bp und 54 bp ergeben; das mutierte C-Allel verbleibt unverändert mit 277 bp. Die Bandenmuster können Abbildung 31 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

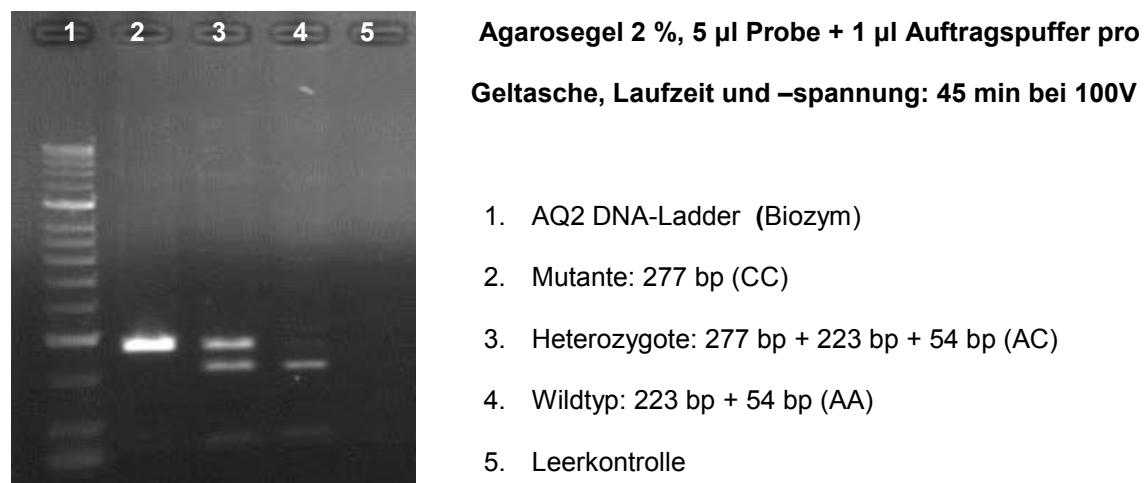


Abbildung 31: rs489693 enzymatischer Verdau mit BSRI

Tabelle 17: rs489693 Amplikongenerierung am Thermocycler

Zyklusprogramm			
W: 95 °C 300 sec; 30x [93 °C 30 sec – 58 °C 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration¹
H ₂ O, steril	15,3		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	0,5x
dNTP Peqlab	0,4	5 mM	100 µM
F rs489693	0,5	25 µM	625 nM
R rs489693	0,5	25 µM	625 nM
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

2.3.11.3.3. rs9939609 Polymorphismus (FTO)

Der rs9939609 Polymorphismus ist im ersten Intron des FTO Genes lokalisiert und stellt eine Punktmutation von Adenin zu Thymin dar.

Es wurde eine neue Fluoreszenz-basierte LightCycler Methode entwickelt, die in Tabelle 18 näher beschrieben ist. Da auf Grund des hohen Anteils an AT-haltigen Basenpaaren eine ausreichend hohe Schmelztemperatur für die Sensor- und Ankersonden nicht realisierbar war, wurde nur eine einzige Sonde zur Detektion verwendet. Die 28 bp lange Simple-Probe (CTTGCAGCTGCTGTGAATXTTAGT GATGC) wurde so konstruiert, dass sie komplementär zum Wildtyp des Polymorphismus ist. Der vorliegende A>T Polymorphismus besitzt nur eine geringe Differenz der Stabilität möglicher Basenpaarungen. Folglich ergibt sich nur eine geringe Temperaturdifferenz der Maxima in der abgeleiteten Schmelzkurve mit einem Maximum von 61 °C für den Wildtyp Genotyp und 59,5 °C für mutierte Allel Träger. Trotz des geringen Peakabstandes war auf Grund der geringen Streuung der Peaksignale eine Identifikation der Genotypen problemlos möglich. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 18 bzw. Abbildung 32 zu entnehmen.

Tabelle 18: rs9939609 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 59 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 52 °C – 67 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	13,5		
MgCl ₂	1,4	25 mM	2,75
Forward FTO	0,5	25 µM	625 nM
Reverse FTO	0,3	25 µM	375 nM
simple FTO	0,3	3 µM	45 nM
DMSO	1		
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

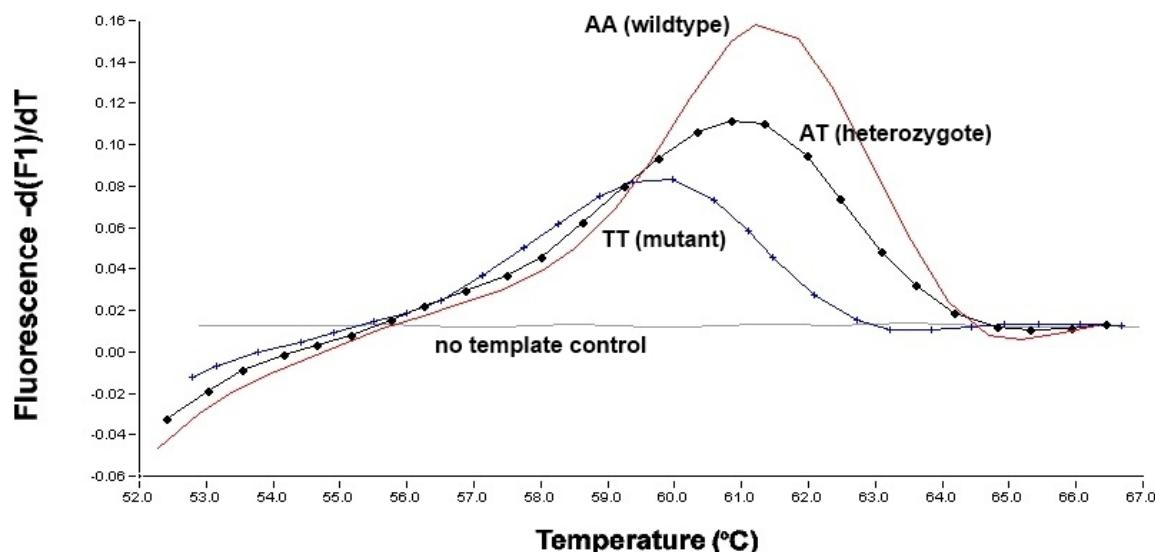


Abbildung 32: FTO rs9939609 Schmelzkurve

Als Validierungsmethode für den **rs9939609** Polymorphismus wurde eine ALS PCR am Thermocycler entwickelt: Für den Wildtyp bzw. Mutationsansatz wurde ein Wildtyp Reverse Primer (AGACTATCCAAGTGCATCAGT) und ein Mutant Reverse Primer (AGACTATCCAAGTGCATCAGA) mit einer Fehlpaarung an der vorletzten Stellen generiert. Weitere zusätzliche Reagenzien neben dem Forward Primer (GCAAAATGGCAACACACACT) können der Tabelle 19 entnommen werden. Zur Verbesserung der Ergebnisse wurde für den Wildtypansatz (W) eine Annealing-Temperatur von 54,7 °C und für den Mutationsansatz (M) eine Annealing-Temperatur von 55,5 °C gewählt.

An Hand des 236 bp großen Amplifikationsproduktes (Abbildung 33) konnten die verschiedenen Genotypen zuverlässig identifiziert werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

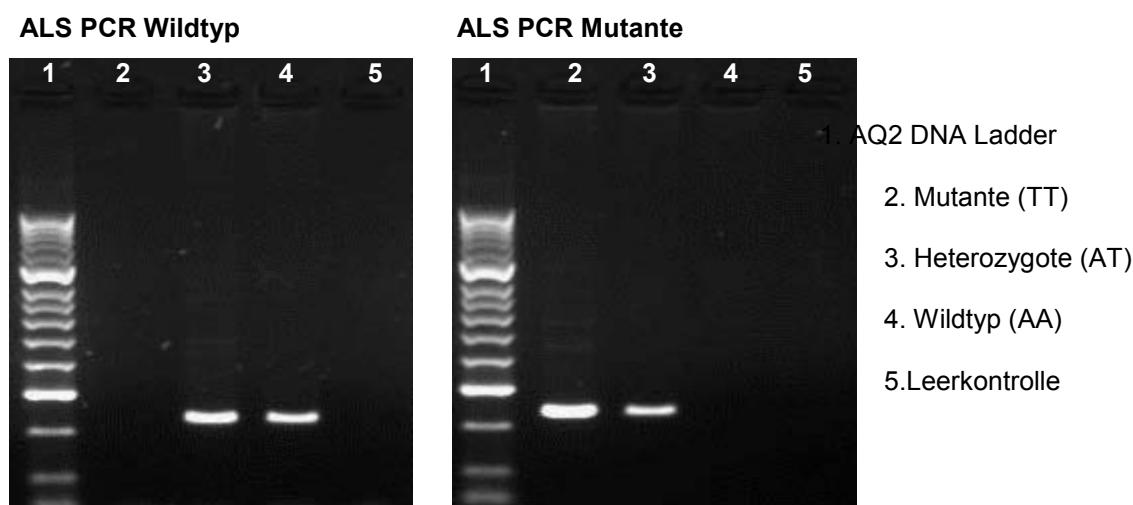


Abbildung 33: FTO rs9939609 Gelelektrophorese, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und -spannung: 45 min bei 100V

Tabelle 19: rs9939609 ALS PCR-Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
W: 94 °C 180 sec; 30x [93 °C 30 sec – 54,7 °C 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
M: 94 °C 180 sec; 30x [93 °C 30 sec – 55,5 °C 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration¹
H ₂ O, steril	15,1		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	1x
dNTP Peqlab	0,4	5 mM	100 µM
ALS Forward FTO	0,6	25 µM	750 nM
ALS R Wildtyp FTO oder ALS R Mutante FTO	0,6	25 µM	750 nM
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

Kontrolle unklarer Ergebnisse mittels NGS am GS Junior

Einige wenige Proben lieferten abweichende Ergebnisse von der eben beschriebenen LightCycler Methode. Exemplarisch sind hierfür 2 Proben in Abbildung 34 dem standardmäßigen Kurvenverlauf (schwarz) gegenüber gestellt. Beim Vergleich fällt ein zusätzlicher Peak bei 55 °C auf. Die starke Temperaturniedrigung lässt auf eine weitere Punktmutation im Bereich der Simple-Probe schließen. Hierbei könnte es sich um den rs76804286 Polymorphismus handeln, bei welchem nur in 2,5 % der Fälle eine Mutation von Adenin zu Guanin vorliegt. Die Sonde musste auf Grund weiterer fehlender Möglichkeiten über diesen Bereich ausgerichtet werden. Eine gute Möglichkeit diese Hypothese zu überprüfen liefert das NGS (Beschreibung der Grundlagen bzw. Vorgehensweise siehe Abschnitt 2.3.7 bzw. 2.3.10).

Hierfür wurden im Rahmen eines Methodentransfers 3 nicht zu identifizierende Proben, die den oben abgebildeten, abweichenden Peak zeigten und 2 Proben mit den bekannten Genotypen (AA,AT) als Kontrolle verwendet. Zunächst wurde für die jeweilige Probe ein Amplikon erzeugt (Tabelle 20) und dieses in der Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurden die Primer der Ursprungsmethode um eine Identifikationssequenz (MID 23-27, genau Sequenz der Primer siehe Anhang A3), welche später die Zuordnung zur jeweiligen Probe ermöglicht und um spezifische Adapter-Bindungsstellen ergänzt (siehe Abbildung 10).

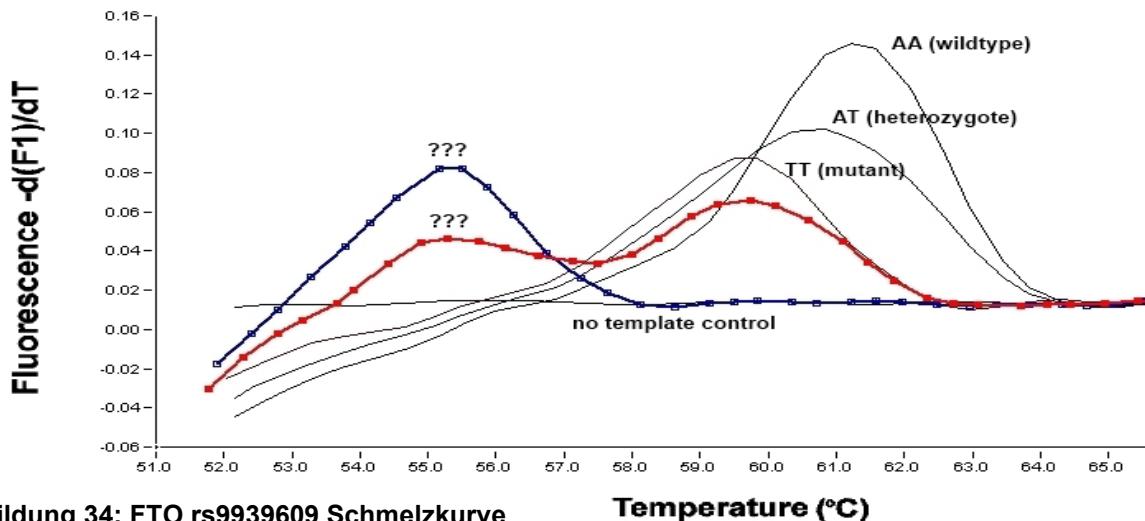


Abbildung 34: FTO rs9939609 Schmelzkurve

Temperature (°C)

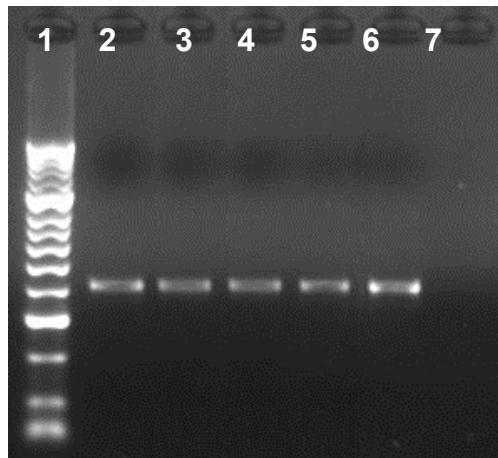
Tabelle 20: rs9939609 Generierung einer Amplikondatenbank

Zyklusprogramm			
W: 94 °C 180 sec; 33x [94 °C 15 sec – 59 °C 45 sec – 72 °C 60 sec]; 72 °C für 8 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	18,75		
Puffer Roche II	2,5	10x (mit 13mM MgCl ₂)	0,5x
dNTP Roche	0,5	10 mM	200 µM
FTO-Forward MID 23-27	1	50 µM	2000 nM
FTO-Reverse MID 23-27	1	50 µM	2000 nM
Hifi Polymerase	0,25	5 U/µl	1,25 U/µl

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

1 µl Amplifikationsprodukt wurde anschließend mit 1µl Auftragpuffer (5x Biozym) gemischt und auf einem 2 %-igem Agarosegel (PeqGold Universalagarose) für 45 min bei 100 V aufgetrennt. Die Bande bei 423 bp zeigte die erfolgreiche Generierung der jeweiligen Amplikons an (Abbildung 35).

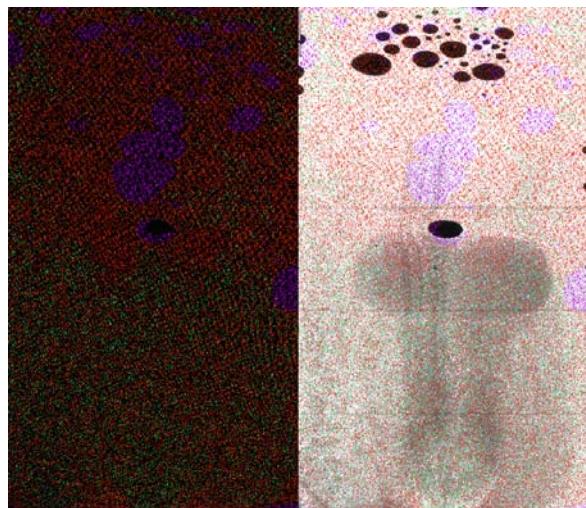
Nach anschließender Aufbereitung und Sequenzierung nach Handbuch (siehe Abschnitt 2.3.10) konnte die Qualität des Laufes (Abbildung 36) beurteilt und die jeweiligen Proben einem Genotyp zugeordnet werden (Abbildung 37).



1. AQ2 DNA Ladder
- 2-6. Proben B59, J136, J166, T138, T159
7. Leerkontrolle

Abbildung 35: Gelelektrophorese der Fusionsprimer Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der jeweiligen Beads und gibt einen groben Überblick über die Qualität des Laufes: Es zeigt sich ein hoher Anteil an Luftblasen (schwarz bzw. lila) und im oberen Teil der Picotiterplatte eine Vielzahl an nicht gelesenen Reads (rot). Zudem konnte mit Hilfe des Programmes GS Run Browser die Anzahl der Reads, welche die vorgegebenen Qualitätsmerkmale erfüllten und in die Auswertung mit einbezogen wurden, betrachtet werden (Abbildung 36). Für die Beschreibung der einzelnen Qualitätskriterien sei auf Abschnitt 2.3.10 verwiesen.



TCAG (Library)		Region	
		1	Total
Raw Wells	257,506	257,506	
Key Pass Wells	230,858	230,858	
Failed	50,878	50,878	
Mixed	26,150	26,150	
Short Quality	108,266	108,266	
Short Primer	47	47	
Passed Filter Wells	43,500	43,500	
% Dot + Mixed	33.37	33.37	
% Short	46.92	46.92	
% Passed Filter	18.84	18.84	

Abbildung 36: Abbildung der Picotiterplatte und Anzahl gelesener Reas

Auch bei dieser Betrachtung fällt ein hoher Anteil an Reads auf, welche die Filterkriterien nicht erfüllen konnten. Der höchste Anteil fehlerhafter Reads (46,92 %, Abbildung 36) wird demnach durch zu kurze Fragmente verursacht. Diese hohe Fehlerrate ist der Umstellung des Herstellers auf Reagenzien mit veränderter Konzentration geschuldet. Hieraus resultiert eine erhöhte Amplifikation kurzer DNA-Fragmente und dies zieht weitere Reinigungsschritte zur Entfernung dieser nach sich, welche in diesem Lauf testweise ausgelassen wurden. Die Sequenzierung für den im Kapitel 2.3.11.1.7. beschriebenen rs7799039 Polymorphismus erfolgte mit einer doppelten Aufreinigung nach

Herstellerskript (siehe Kapitel 2.3.10). Zudem ist der hohe Anteil fehlerhafter Reads durch die hohe Anzahl an Luftblasen zu erklären.

Trotz dieser Einschränkungen konnten 43.500 Reads zur Auswertung verwendet werden, so dass für jede Probe eine ausreichende Anzahl an Reads (Durchschnitt: 678 Reads/Probe; 252-1077 Reads/Probe), die die jeweiligen Qualitätskriterien erfüllten, zur Verfügung standen. Darüber hinaus konnten keine relevanten Unterschiede zwischen Forward und Reverse Sequenzierung identifiziert werden.

Reference	Variant	Max	B59	J136	J166	T138	T159
FT0	164:A/G	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32
FT0	197:T/C	0.40	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00
FT0	244:A/-	100.00	▼ 88.24	▼ 96.06	100.00	▼ 83.47	▼ 81.35
FT0	244:A/T	▼ 18.65	9.00	▼ 3.94	0.00	▼ 16.53	▼ 18.65
FT0	246:T/A	▼ 18.65	9.00	▼ 3.94	0.00	▼ 16.53	▼ 18.65
FT0	253.5:-/A	▼ 1.84	0.00	0.00	0.00	1.11	▼ 1.84
FT0	377:G/A	100.00	0.00	49.14	0.00	47.91	100.00
FT0	386:G/-	▼ 2.78	0.00	0.00	▼ 2.78	0.00	0.00
FT0	401:A/-	▼ 1.73	▼ 1.73	▼ 1.32	0.76	0.00	0.00
FT0	442:T/C	0.56	0.00	0.00	0.00	0.56	0.00
FT0	rs9939609	98.74	▼ 98.27	48.68	98.74	49.12	0.00
FT0	rs76804286	100.00	100.00	50.51	52.40	0.00	0.00

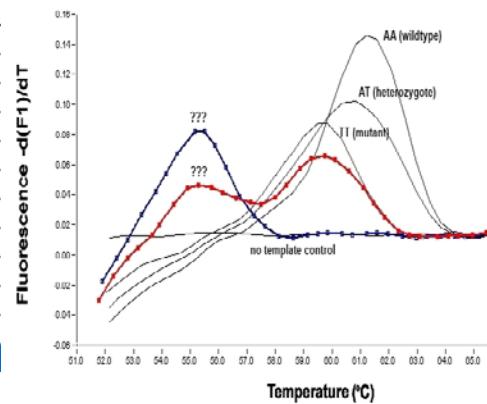


Abbildung 37 Ergebnisse der Softwareauswertung

Die Kontrollen bestätigen hier die Ergebnisse der Lightcycler Methode: Kontrollprobe T159 zeigt ein charakteristisches Wildtyp-Peak im LightCycler Lauf und hat nach oben abgebildeter Grafik keine Mutation für den rs9939609 und den rs76804286 Polymorphismus. Auch die Kontrollprobe T138 zeigte keine Mutation im rs76804286 Polymorphismus, jedoch liegt bei 49 % der Reads eine Mutation im rs9939609 Polymorphismus vor, was die Ergebnisse eines heterozygoten Genotyps bestätigt. Für die Proben B59, J136 und J166 zeigt sich für den rs76804286 Polymorphismus eine Mutation (J136,J166 = 50 % = Heterozygote, B59 = 100 % = homozygote Mutante).

Somit kann die Hypothese bestätigt werden, dass die abweichenden Peaks durch die rs76804286 Mutation ausgelöst werden. Diese Mutation destabilisiert die sich anlagernde Sonde, was zu einer weiteren Schmelzpunktterniedrigung führt. Somit ist der Peak bei 55,5° (B59; blau, in rechter Abbildung) an das Vorliegen einer homozygoten Mutation des rs9939609 und des rs76804286 Polymorphismus geknüpft. Die Kombination aus der homozygoten Mutante des rs9939609 Polymorphismus mit der Heterozygoten des rs76804286 Polymorphismus führt zu den Peaks von 55,5 °C und 59,5 °C (J166; rot in rechter Abbildung). Die Kombination der beiden Heterozygoten ergibt einen verschobenen Peak in Nähe der AT-Bande der FTO-Methode (J136; nicht abgebildet). Auf Grund der Ergebnisse konnten die unklaren Ergebnisse einem Genotyp zugeordnet werden.

2.3.11.3.4. rs1049353 Polymorphismus (CNR1)

Bei dem untersuchten Polymorphismus handelt es sich um eine stille Mutation in Codon 453 (Thr) im CNR1 Gen, die einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin darstellt.

Um einen hohen Temperaturunterschied der verschiedenen Schmelzkurven zu gewährleisten wurde die Sensorsonde komplementär zum mutierten A-Allel konstruiert, das 5'-Ende mit einer Phosphatgruppe geschützt und das 3'-Ende mit LCRed640 markiert (LCRed640-ATCAAGAGCACAGTCAAGATTGCCAAGGT-Phosphat). Die Ankersonde (CAGTGTTCACAGGGCC GCAGAAAGCT-Fluoreszein) erhält eine 3'-Fluoreszein Markierung und befindet sich 2 Basen entfernt vor der Sensorsonde. Aus den Gegebenheiten folgte eine Schmelztemperatur von 69,5 °C für das mutierte A-Allel und 65,5 °C für das Wildtyp G-Allel. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 21 bzw. Abbildung 38 zu entnehmen.

Tabelle 21: rs1049353 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 58 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 60 °C – 73 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	13,0		
MgCl ₂	1,8	25 mM	3,25 mM
Forward 1359 G/A	0,4	25 µM	500 nM
Reverse1359 G/A	0,3	25 µM	375 nM
Sen 1359 G/A	0,5	3 µM	75 nM
Anc 1359 G/A	0,5	3 µM	75 nM
DMSO	0,5		
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹ bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20µl (19µl Stammlösung und 1µl DNA)

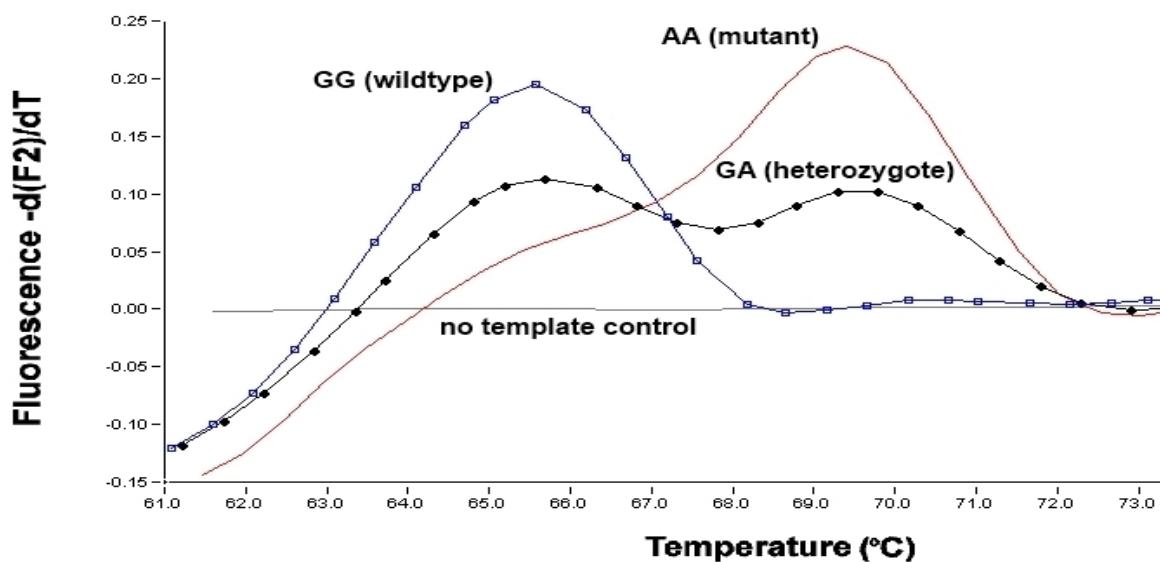


Abbildung 38: 1359G/A rs1049353 Schmelzkurve

Als Validierungsmethode für den rs1049353 Polymorphismus wurde eine ALS PCR am Thermocycler entwickelt: Hierfür wurde neben dem Reverse Primer (CACCTTTCATGAGCATGGTA) jeweils ein Forward Primer für den Wildtyp (GAAAGCTGCATCAAGAGCAAG) und die Mutante (GAAAGCTGCATCAAGAGCAAA) konstruiert. Auf Grund der geringen Temperaturunterschiede der beiden Primer konnte eine Bestimmung bei einer Annealing Temperatur von 56,7 °C sowohl für den Wildtyp- als auch für den Mutationsansatz durchgeführt werden. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 22 zu entnehmen.

An Hand des 200 bp großen Amplifikationsproduktes (Abbildung 39) konnten die verschiedenen Genotypen zuverlässig identifiziert werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

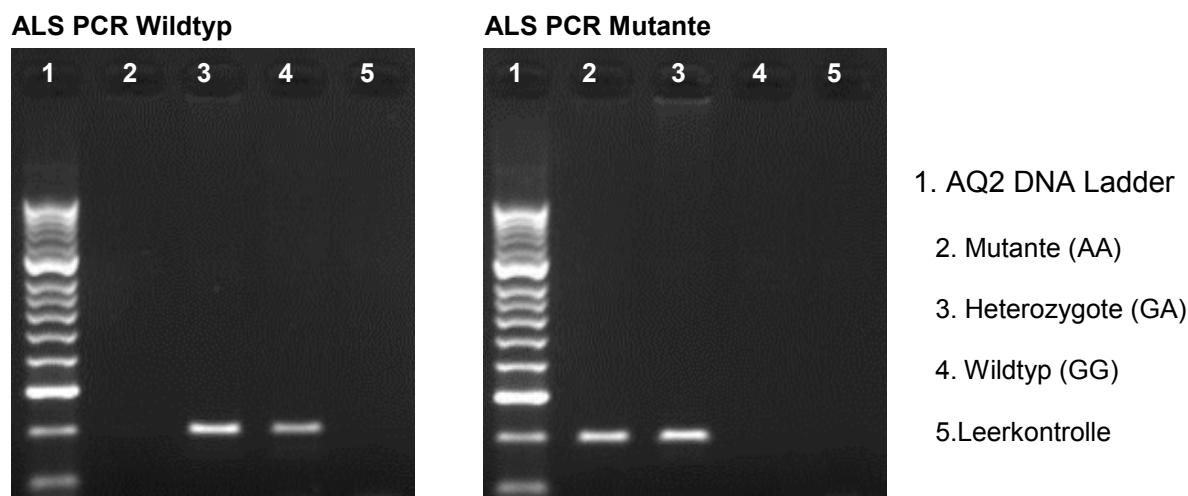


Abbildung 39: rs1049353 Gelelektrophorese, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

Tabelle 22: rs1049353 ALS PCR-Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
W: 94 °C 180 sec; 30x [93 °C 30 sec – 56,7 °C 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	15,3		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	0,5x
dNTP Peqlab	0,4	5 mM	100 µM
ALS Wildtyp 1359 G/A oder ALS Mutante 1359 G/A	0,5	25 µM	625 nM
ALS R 1359 G/A	0,5	25 µM	625 nM
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

2.3.11.3.5. rs346070, rs346074 und rs346075 Polymorphismus (HRH1)

Der rs346070 (C>T) Polymorphismus befindet sich in der Exonic Splicing Enhancer Region, während der rs346074 (A>G) und rs346075 (A>C) Polymorphismus in der Transskriptionsfaktorbindestelle des HRH1 Genes lokalisiert sind.

Die Sensorsonde (GCTAAACCACAATATGTATAGCACATG-Fluoreszein) wurde hierbei komplementär zum Wildtyp C-Allel des **rs346070 Polymorphismus** konstruiert. In einem Abstand von 2 Basenpaaren folgte die Ankersonde (LCRed610-GTGCCTGTACAAGCTGATGTTTGTATTTGTG-Phosphat), die am 5'-Ende eine LCRed610 Markierung erhielt und am 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe geschützt wurde. Die Schmelzkurvenanalyse dieser Methode zeigte eine Maximum bei 62 °C bzw. 57 °C, welches dem Wildtyp C-Allel bzw. dem mutierten T-Allel zuordnen ist.. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 23 bzw. Abbildung 40 zu entnehmen.

Die Bestimmung des **rs346074 Polymorphismus** wurde so aufgebaut, dass die Sensorsonde (CAGTAATAGATTAAATGATGCCTCTGGG-Fluoreszein) komplementär an das A-Allel des Wildtypes bindet. In einem Abstand von 2 Basen folgt die Ankersonde (LCRed640-TGTCCATTA GCAGAGGGCAGCCA-Phosphat), die an ihrem 5'-Ende mit LCRed640 markiert wurde. Aus den Gegebenheiten folgt ein Maximum von 62,5 °C für den Wildtyp Genotyp und ein Maximum von 59 °C für das mutierte A-Allel (Abbildung 41).

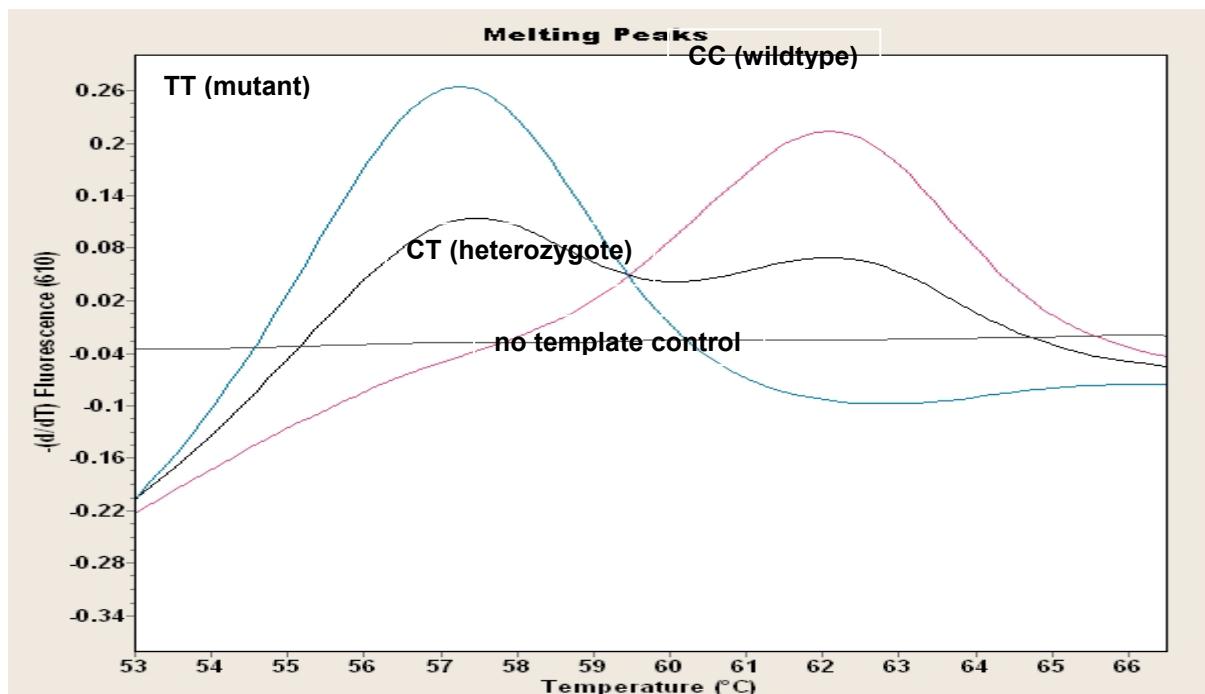


Abbildung 40: HRH1 rs346070 Schmelzkurve

Für den **rs346075 Polymorphismus** wurde eine Sensorsonde (AGCTTTCTCAACCCATGTCTTACA TTTTC–Fluoreszein) konstruiert, die komplementär zum mutierten C-Allel ist. In einem Abstand von 2 Basen folgt die an ihrem 5'-Ende mit LCRed705 markierte Ankersonde (LCRed705–TGGG ATGAAGGGTTAACGGCCTC-Phosphat). In der Schmelzkurve (Abbildung 42) zeigte sich ein Maximum von 65,5 °C für die Mutante (Genotyp CC) und ein Maximum von 60 °C für den Wildtyp (Genotyp AA).

Tabelle 23: rs346070/74/75 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 57 °C 20 sec – 72 °C 25 sec]; 50 °C – 72 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	11,4		
MgCl ₂	1,2	25 mM	2,5 mM
F monoplex rs346074(5)	0,5	25 µM	625 nM
R monoplex rs346074(5)	0,5	25 µM	625 nM
F kombi rs346070	0,5	25 µM	625 nM
F kombi rs346070	0,5	25 µM	625 nM
Sen1.2 rs346074	0,5	3 µM	75 nM
Anc1.2 rs346074	0,5	3 µM	75 nM
Sen2.2 rs346075	0,5	3 µM	75 nM
Anc2.2 rs346075	0,5	3 µM	75 nM
Sen3 rs346070	0,5	3 µM	75 nM
Anc3 rs346070	0,5	3 µM	75 nM
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

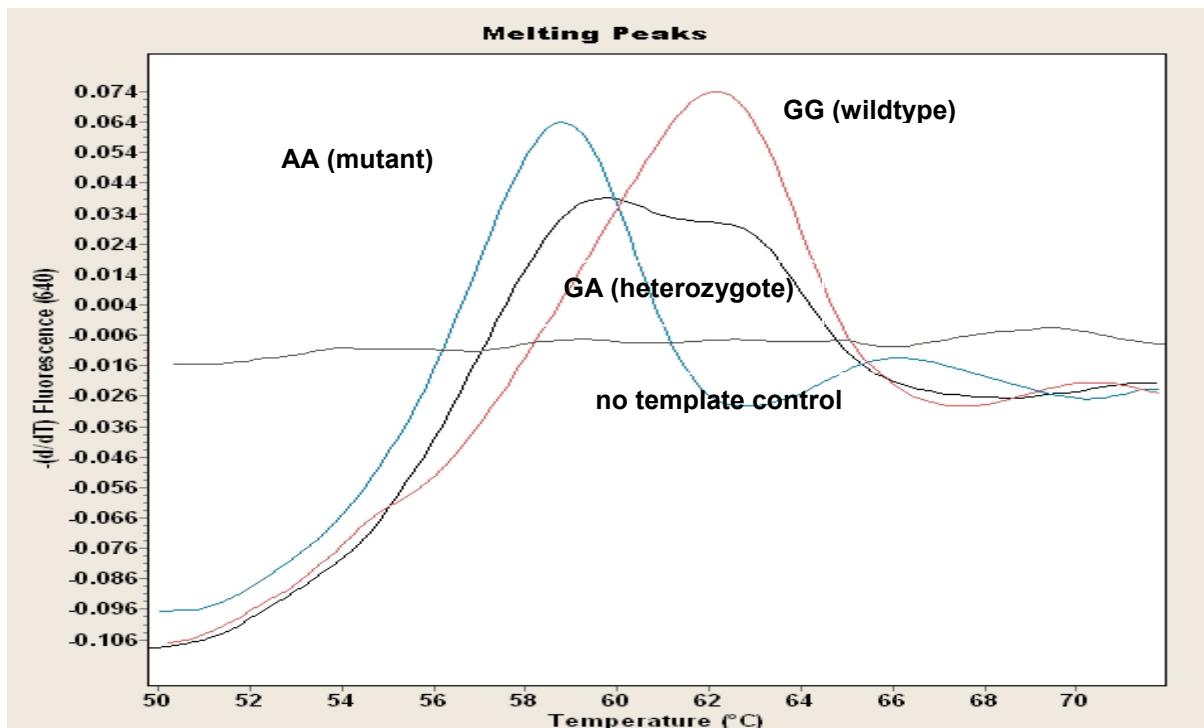


Abbildung 41: HRH1 rs346074 Schmelzkurve

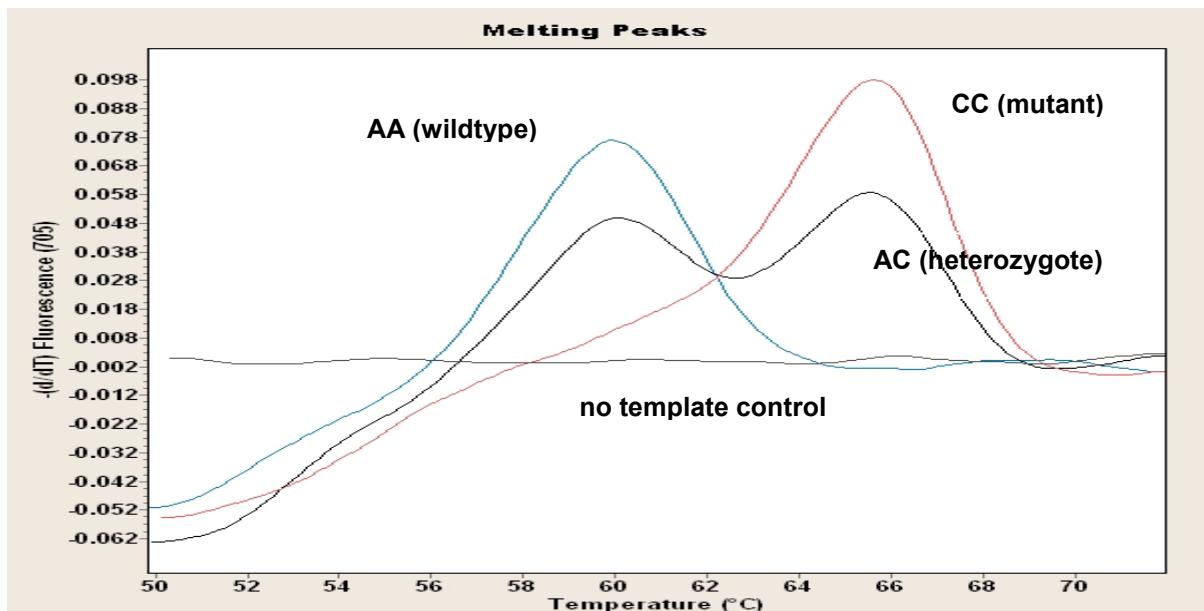
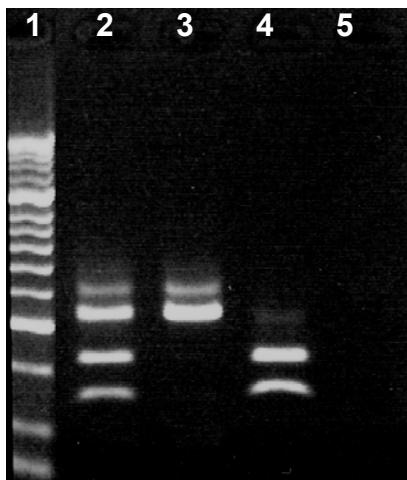


Abbildung 42: HRH1 rs346075 Schmelzkurve

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode des **rs346070 Polymorphismus** wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym NdeI durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl PCR-Produkt aus dem vorausgegangenen LightCycler Lauf und 1 0µl Stammlösung (6 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 2 µl Enzym NdeI mit 20.000 U/ml) bei 37 °C für 3 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur das mutierte T-Allel, so dass sich 2 Fragmente mit 215 bp und 124 bp ergeben; das Wildtyp C-Allel verbleibt unverändert mit 339 bp. Die Bandenmuster können Abbildung 43 entnommen

werden. Es ergab sich eine Fehlbande bei 400 bp, die die Auswertung aber nicht weiter störte. Zudem war auch nach deutlicher Überschreitung (8h!) der empfohlenen Inkubationszeit (15min) bei 37 °C eine schwache Wildtypbande für das homozygote A-Allel zu erkennen, welche auf Grund der ausgeprägteren restlichen Banden die Genotyp Bestimmung nicht weiter erschwerte. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

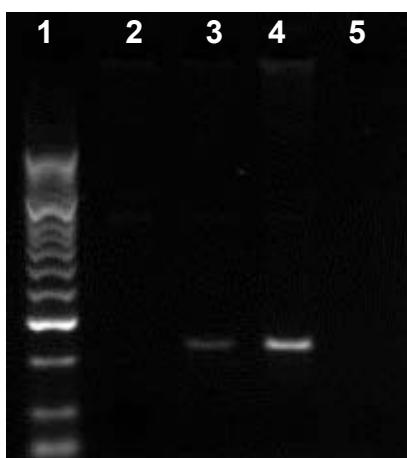


1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Heterozygote: 339 bp + 215 bp + 124 bp (CT)
3. Wildtyp: 339 bp (CC)
4. Mutante: 215 bp + 124 bp (TT)
5. Leerkontrolle

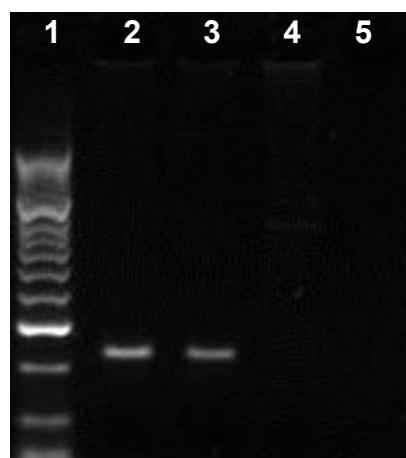
Abbildung 43: rs346070 enzymatischer Verdau mit NdeI Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

Als Validierungsmethode für den **rs346074** Polymorphismus wurde eine ALS PCR am Thermocycler entwickelt: Hierbei wurde jeweils ein Forward Wildtyp Primer (GAGCTATTAATCAGATAGTACA GTAAAGA) oder ein Forward Mutant Primer (AGCTATTAAATCAGATAGTACAGTAAGG) jeweils mit dem Reverse Mutant Primer (ACATATGCACGAGGGCAG) vermischt. Die genaue Zusammensetzung des Wildtyp- bzw. Mutationsansatzes ist Tabelle 24 zu entnehmen. Da der Reverse Primer in dieser Methode einen GC Gehalt von über 50 % besitzt, wurde 10 % DMSO hinzugefügt.

ALS PCR Wildtyp



ALS PCR Mutante



1. AQ2 DNA Ladder
2. Mutante (GG)
3. Heterozygote (AG)
4. Wildtyp (AA)
5. Leerkontrolle

Abbildung 44: rs346074 Gelelektrophorese, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

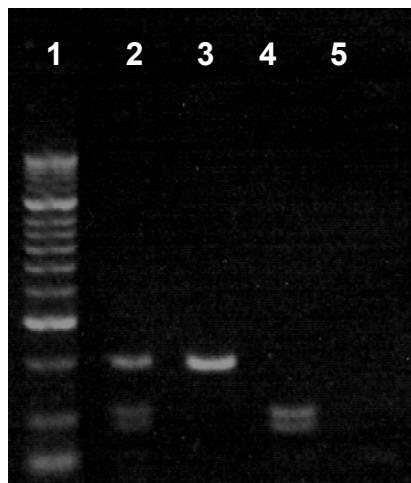
An Hand des 231 bp (=Wildtypbande) bzw. 232 bp (=Mutationsbande) langen Amplifikationsproduktes konnten die verschiedenen Genotypen zuverlässig identifiziert werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein (Abbildung 44).

Tabelle 24: rs346074 ALS PCR-Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
W: 95 °C 300 sec; 30x [93 °C 30 sec – 54,5 °C 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (μ l)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	13,8		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	0,5x
dNTP Peqlab	0,4	5 mM	100 μ M
ALS FW rs346074 oder ALS FM rs346074	0,5	25 μ M	625 nM
ALS Reverse 346074	0,5	25 μ M	625 nM
DMSO	1,5		
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/ μ l	1,5 U/ μ l

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l (19 μ l Stammlösung und 1 μ l DNA)

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode des **rs346075 Polymorphismus** wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym Apol durchgeführt: Hierfür wurden für 57 Proben 10 μ l PCR-Produkt aus dem voraus-gegangenen LightCycler Lauf und 10 μ l Stammlösung (5,8 μ l H₂O, 2 μ l NEB3 Puffer 10x, 0,2 μ l BSA, 2 μ l Enzym Apol mit 10.000 U/ml) bei 50 °C für 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur das Wildtyp A-Allel, sodass sich 2 Fragmente mit 110 bp und 92 bp ergeben; das mutierte C-Allel verbleibt unverändert bei 202 bp. Die Bandenmuster können Abbildung 45 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.



- 1 AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
- 2 Heterozygote: 202bp + 110bp + 92bp (AC)
- 3 Mutante: 202bp (CC)
- 4 Wildtyp: 110bp + 92bp (AA)
- 5 Leerkontrolle

Abbildung 45: rs346075 enzymatischer Verdau mit Apol, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

2.3.11.1.6. rs7973796 Polymorphismus

Der rs7973796 Polymorphismus befindet sich 4,5 kb entfernt von der 5'-Region des PMCH-Genes und stellt eine Punktmutation von Adenin zu Guanin dar.

Da auf Grund des hohen Anteils an AT-haltigen Basenpaaren eine ausreichend hohe Schmelztemperatur für die Sensor und Anker-Sonden nicht realisierbar war, wurde nur eine einzige Sonde zur Detektion verwendet. Die 31bp lange Simple-Probe (CCAGTTXAATGATACGTA TGTTGAAGTATTTC) wurde so konstruiert, dass sie komplementär zum mutierten G-Allel ist. Aus den Gegebenheiten folgte eine Schmelztemperatur von 60 °C für das mutierte G-Allel und 54,5 °C für das Wildtyp-A-Allel. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 25 bzw. Abbildung 46 zu entnehmen.

Tabelle 25: rs7973796 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 40x [95 °C 10 sec – 57 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 48 °C – 66 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	14,1		
MgCl ₂	1,7	25 mM	3,125 mM
F.2 Primer PMCH	0,4	25 µM	500 nM
R-Primer PMCH	0,5	25 µM	625 nM
PMCH rs7973796	0,3	3 µM	45 nM
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym BSaAI durchgeführt: Hierfür wurden 10µl PCR-Produkt aus dem vorausgegangenen LightCycler Lauf und 10µl Stammlösung (6µl H₂O, 2µl NEB4 Puffer 10x, 2µl Enzym BSaAI mit 5000 U/ml) bei 37 °C für 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur das mutierte G-Allel, sodass sich 2 Fragmente mit 250bp und 134bp ergeben; das Wildtyp A-Allel verbleibt unverändert bei 384bp. Die Bandenmuster können Abbildung 47 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

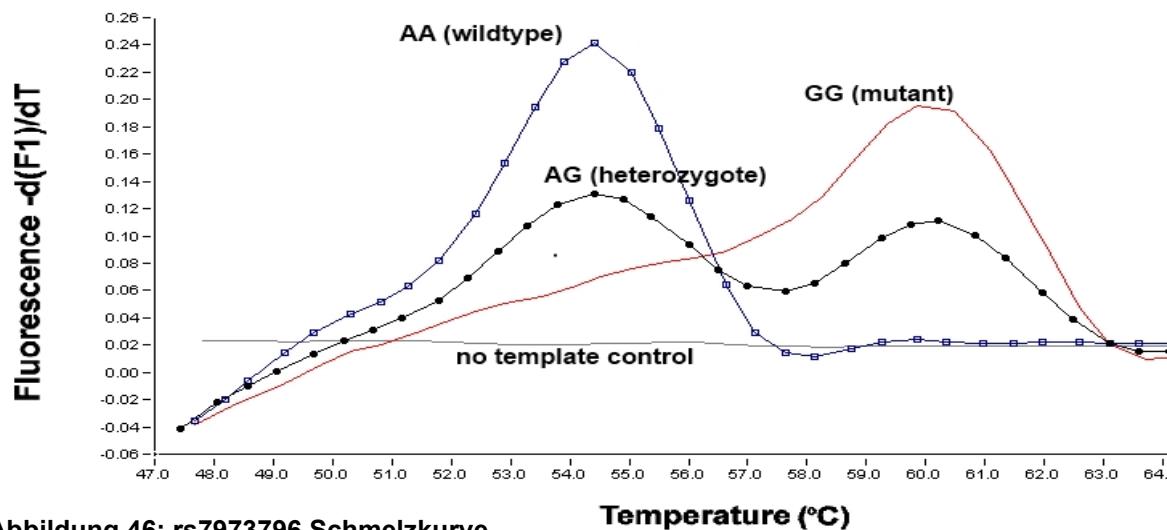
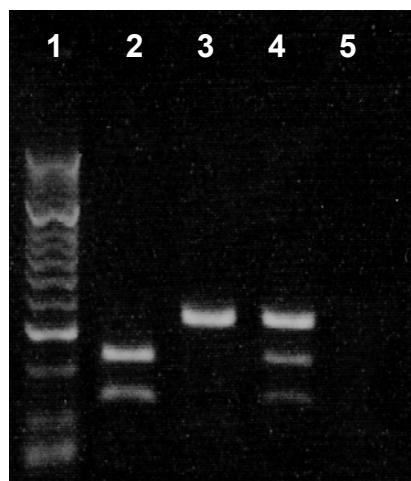


Abbildung 46: rs7973796 Schmelzkurve

Temperature (°C)



1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Wildtyp: 384bp (AA)
3. Heterozygote: 384bp + 250bp + 134bp (GA)
4. Mutante: 250bp + 134bp (GG)
5. Leerkontrolle

Abbildung 47: rs7973796 enzymatischer Verdau mit BSaAI, Agarosegel 2 %, 5µl Probe+1µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 30 min bei 100V

2.3.11.1.7. rs7799039 (LEP) und rs1137101 (LEPR) Polymorphismus

Der untersuchte rs7799039 Polymorphismus ist in der Promoterregion des LEP Genes lokalisiert und stellt eine Punktmutation von Guanin zu Adenin dar. Im Gegensatz hierzu befindet sich der rs1137101 (A>G) Polymorphismus in Exon 6 des LEPR Genes und wird auch als Q223R Polymorphismus bezeichnet.

Die Sensorsonde (CGACAGGGTTGCACTGATCC-Fluoreszein) wurde bei dieser Methode komplementär zum mutierten A-Allel des rs7799039 Polymorphismus konstruiert. In einem Abstand von 2 Basen folgte die Ankersonde (LCRed640-CCGCCTCAGTCTCCCTAAGTGC-Phosphat), die am 5'-Ende eine LCRed 640 Markierung erhielt und am 3'-Ende durch eine Phosphatgruppe geschützt wurde. Die Schmelzkurve dieser Methode zeigte ein Maximum bei 65,5 bzw. 60 °C, welches dem mutierten A-Allel bzw. dem Wildtyp G-Allel zu zuordnen ist. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 26 bzw. Abbildung 48 zu entnehmen.

Die Bestimmung des rs1137101 Polymorphismus wurde so aufgebaut, dass die Sensorsonde (LCRed-705-TAATTTCCAGTCACCTCTAATGTCAG-Phosphat) komplementär an das A-Allel des Wildtypes bindet. In einem Abstand von 2 Basen folgt die Ankersonde (CCTTATGTGTTGAAAA TCACATCTGGTGG-Fluoreszein), die an ihrem 5'-Ende mit LCRed640 markiert wurde. Aus den Gegebenheiten folgt ein Maximum von 65 °C für den Wildtyp und ein Maximum von 60,5 °C für das mutierte G-Allel (Abbildung 49).

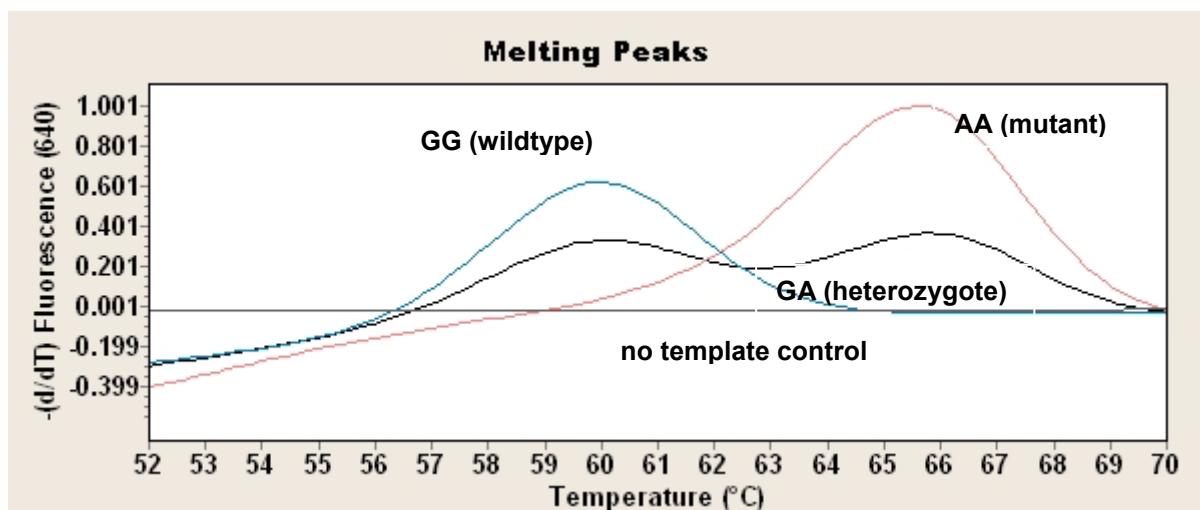


Abbildung 48: rs7799039 Schmelzkurve

Tabelle 26 rs7799039 und rs1137101 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 40x [95 °C 10 sec – 59 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 48 °C – 72 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (μ l)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	12,5		
MgCl ₂	1,3	25 mM	2,625 mM
F-Primer LEP	0,4	25 μ M	500 nM
R-Primer LEP	0,5	25 μ M	625 nM
F-Primer LEPR	0,4	25 μ M	500 nM
R-Primer LEPR	0,5	25 μ M	625 nM
Sen rs7799039	0,3	3 μ M	45 nM
Anc rs7799039	0,3	3 μ M	45 nM
Sen rs1137101	0,4	3 μ M	60 nM
Anc rs1137101	0,4	3 μ M	60 nM
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l (19 μ l Stammlösung und 1 μ l DNA)

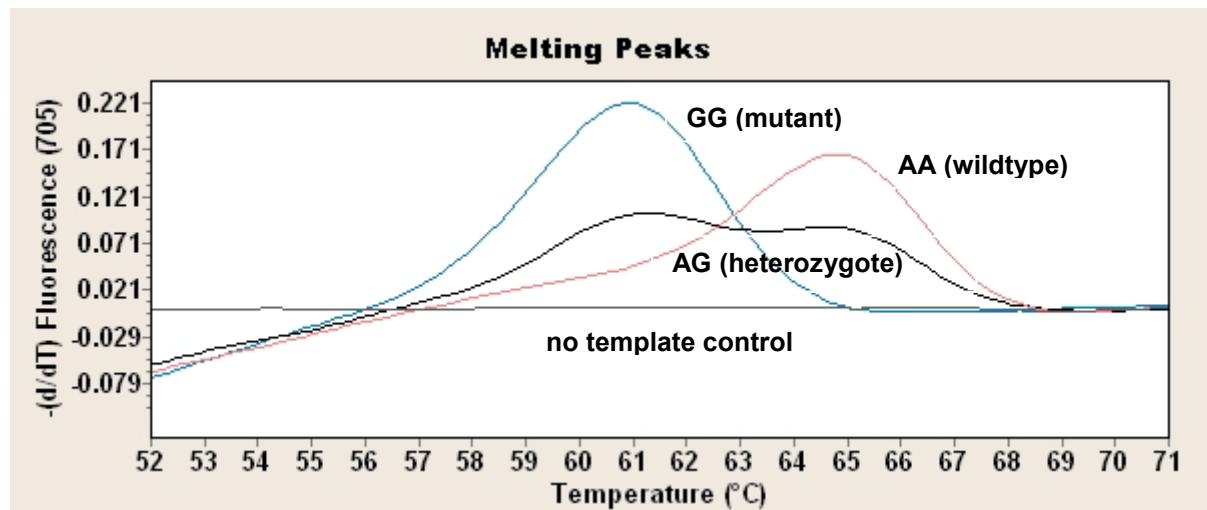


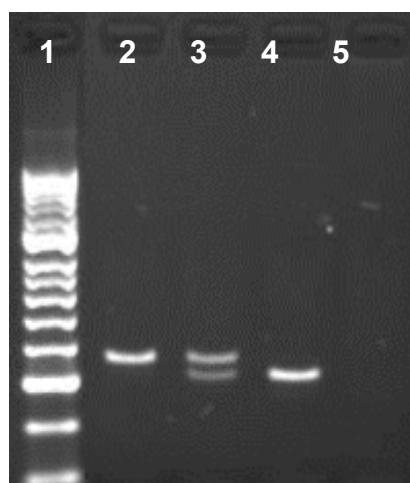
Abbildung 49: rs1137101 Schmelzkurve

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode des **rs7799309 Polymorphismus** wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym HinP1I durchgeführt: Die Primer der LightCycler Methode erlaubten auch die Generierung eines Amplikons, wobei die genaue Zusammensetzung Tabelle 27 entnommen werden kann. Anschließend wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes mit 10 µl Stammlösung (7 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 1 µl Enzym HinP1I mit 10000 U/ml) vermischt und bei 37 °C für 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet das G-Allel des Wildtypes in 2 Fragmente mit 321 bp und 50 bp, wohingegen das mutierte A-Allel unverändert bei 371 bp verbleibt. Die Bandenmuster können Abbildung 50 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.

Tabelle 27 rs7799039 und rs1137101 Amplikongenerierung am Thermocycler

Zyklusprogramm			
W: 95 °C 300 sec; 33x [93 °C 30 sec – 59 °C 30 sec – 72 °C 30 sec]; 72 °C für 7 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	15,3		
Qbiogene Incubation Puffer	2	10x	0,5x
dNTP Peqlab	0,4	5 mM	100 µM
F-Primer LEP(R)	0,5	25 µM	625 nM
R-Primer LEP(R)	0,5	25 µM	625 nM
Taq Polymerase Qbiogene	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl

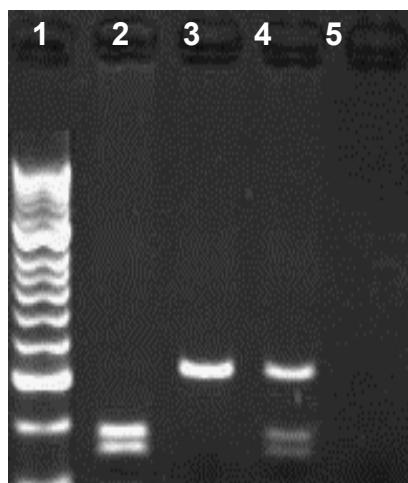
¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)



1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Mutante: 371 bp (AA)
3. Heterozygote: 371 bp + 321 bp + (50 bp) (GA)
4. Wildtyp: 321bp + (50 bp) (GG)
5. Leerkontrolle

Abbildung 50: rs7799039 enzymatischer Verdau mit HinP1I, Agarosegel 1,5 %, 7 µl Probe + 1µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode des **rs1137101 Polymorphismus** wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym Mspl durchgeführt: Auch bei dieser Kontrollmethode erlaubten die Primer der LightCycler Methode die Generierung eines Amplikons, wobei sich die Zusammensetzung des Ansatzes nur durch die Primer von der vorherigen Methode unterscheidet (Tabelle 27). Anschließend wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes mit 10 µl Stammlösung (7 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 1 µl Enzym Mspl mit 20000 U/ml) vermischt und bei 37 °C für 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur das mutierte G-Allel, sodass sich 2 Fragmente mit 151 bp und 187 bp ergeben; das Wildtyp A-Allel verbleibt unverändert bei 338 bp. Die Bandenmuster können Abbildung 51 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.



1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Mutante: 187 bp + 151 bp (GG)
3. Wildtyp: 338 bp (AA)
4. Heterozygote: 338 bp + 187 b + 151 bp (AG)
5. Leerkontrolle

Abbildung 51: rs1137101 enzymatischer Verdau mit Mspl, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

Kontrolle unklarer Ergebnisse mittels NGS am GS Junior

Einige wenige Proben lieferten abweichende Ergebnisse von der zuvor beschriebenen LightCycler Methode. Exemplarisch sind hierfür 4 Proben mit unterschiedlichem Verlauf in Abbildung 52 dem standardmäßigen Kurvenverlauf (schwarz) gegenüber gestellt. Beim Vergleich fallen zusätzliche Peaks bei 53, 55 und ein sehr ausgeprägtes, breites Peak um 64 °C auf. Die Temperaturerniedrigung der beiden Peaks lässt auf eine weitere Punktmutation im Bereich der Sensor Sonde schließen. Hierbei könnte es sich um den rs72563764 Polymorphismus handeln, welcher der untersuchten Mutation vorgelagert ist und in 6,9 % (nach NCBI dbSNP Datenbank; Kaukasisches Sample) der Fälle eine Mutation von Cytosin zu Thymin aufweist. Die Sonde musste auf Grund weiterer fehlender Möglichkeiten über diesen Bereich ausgerichtet werden. Für den breiten Peak um 64 Grad könnte auch ein weiterer Polymorphismus verantwortlich gemacht werden.

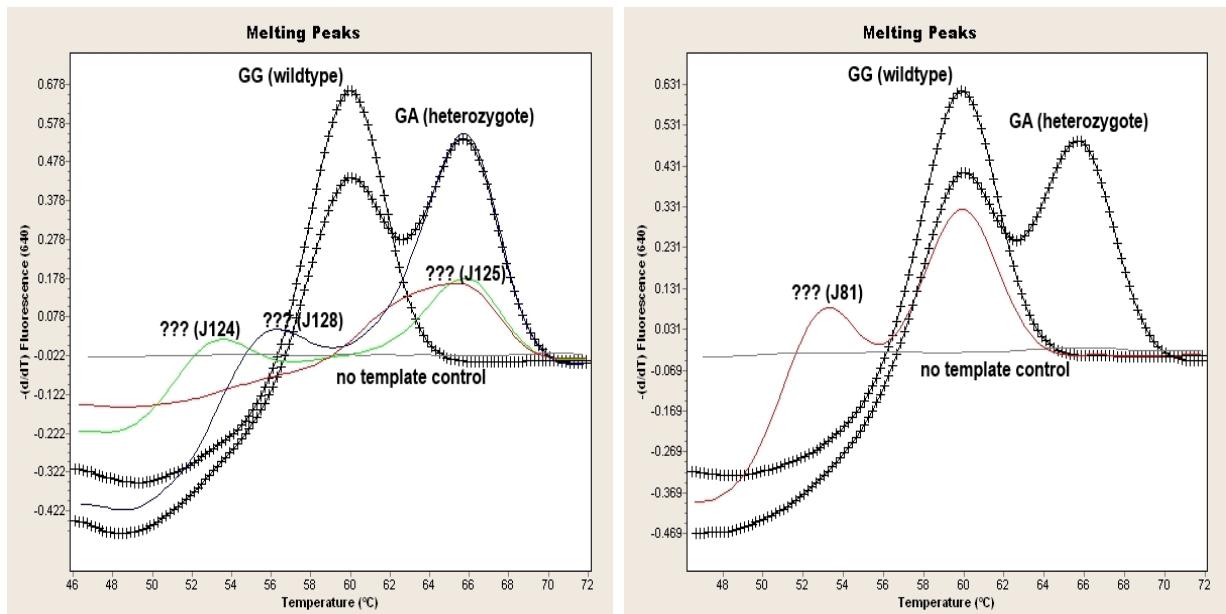


Abbildung 52: LEP rs7799039 Schmelzkurve

Die Schmelzkurve ergibt sich durch das Auftragen der negativen Ableitung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur. Für die Proben J81 und J124 ergeben sich bei 640 nm ein zusätzlicher Peak bei 53 °C, für J128 bei 55 °C und für J125 einen sehr breiten Peak um 64 °C.

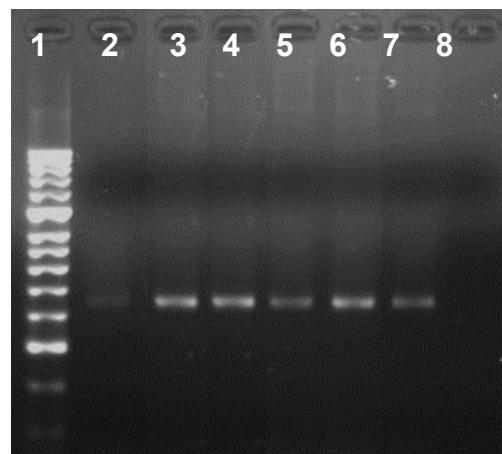
Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde Analog zur FTO Methode das Next Generation Sequencing (Beschreibung der Grundlagen bzw. Vorgehensweise siehe Abschnitt 2.3.7 bzw. 2.3.10) angewendet. Hierfür wurden im Rahmen eines Methodentransfers die oben abgebildeten Proben und 2 Proben mit den bekannten Genotypen (GG, GA) als Kontrolle verwendet. Zuerst wurde für die jeweilige Probe ein Amplikon erzeugt (Tabelle 28) und dieses in der Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurden die Primer der Ursprungsmethode um eine Identifikationssequenz (MID 23-28), welche später die Zuordnung zur jeweiligen Probe ermöglicht und um ein spezifische Adapter-Bindungsstellen ergänzt (siehe Abbildung 10). Abweichend von Tabelle 28 wurden für 2 Proben ein Temperaturprogramm mit 33 Zykluswiederholungen, einer Annealing Temperatur von 59 °C und Primer mit einem Volumen von je 0,6 µl verwendet, was zu einer erhöhten Amplikommenge führte.

1 µl Amplifikationsprodukt wurde anschließend mit 1 µl Auftragpuffer (5x Biozym) gemischt und auf einem 2 %-igem Agarosegel (PeqGold Universalagarose) für 45 min bei 100 V aufgetrennt. Die Bande bei 441 bp zeigte die erfolgreiche Generierung der jeweiligen Amplikons an. (Abbildung 53).

Nach anschließender Aufbereitung und Sequenzierung nach Handbuch (siehe Abschnitt 2.3.10) konnte die Qualität des Laufes (Abbildung 54) beurteilt und die jeweiligen Proben einem Genotyp zugeordnet werden (Abbildung 55). Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der jeweiligen Beads und gibt einen groben Überblick über die Qualität des Laufes: Es zeigt sich eine weitgehend homogene Verteilung mit einem geringen Anteil an Luftblasen (in den unteren Ecken rechts und links).

Tabelle 28 rs7799039 ALS PCR-Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
W: 94 °C 180 sec; 30x [94 °C 15 sec – 58 °C 45 sec – 72 °C 60 sec]; 72 °C für 8 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	22,7		
Puffer Roche II	3	10x (mit 13mM MgCl ₂)	
dNTP Roche	0,6	10 mM	200 µM
LEP-Forward MID 23-28	1,2	50 µM	2000 nM
LEP-Reverse MID 23-28	1,2	50 µM	2000 nM
HiFi-Polymerase	0,3	5 U/µl	1,5 U/µl
DNA Einsatz	1,0		

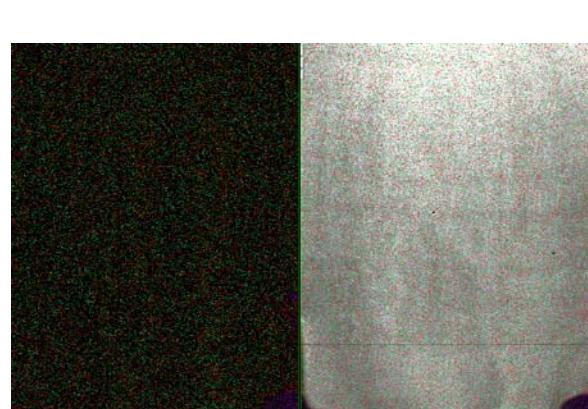


1. AQ2 DNA Ladder

2-7. Proben

8. Leerkontrolle

Abbildung 53 Gelelektrophorese der Fusionsprimer, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V



TCAG (Library)		Region	
		1	Total
Raw Wells	249,236	249,236	
Key Pass Wells	236,363	236,363	
Failed			
Dot	10,413	10,413	
Mixed	31,905	31,905	
Short Quality	89,919	89,919	
Short Primer	10	10	
Passed Filter	103,280	103,280	
% Dot + Mixed	17.90	17.90	
% Short	38.05	38.05	
% Passed Filter	43.70	43.70	

Abbildung 54 Picotiterplatte und Anzahl der gelesenen Reads

Zudem konnte mit Hilfe des Programmes GS Run Browser die Anzahl der Reads, welche die vorgegebenen Qualitätsmerkmale erfüllten und in die Auswertung mit einbezogen wurden, betrachtet werden. Für die Beschreibung der einzelnen Qualitätskriterien sei auf Abschnitt 2.3.10 verwiesen. Die doppelte Aufreinigung resultierte in einer Verminderung der kurzen Fragmente (38,05 % vs. 46,92 %, Abbildung 54) und resultiert durch die weitgehend luftblasenfreie Picotiterplatte in eine deutlich erhöhte Anzahl an verwertbaren Reads (103.280 vs. 43.500 im Vergleich zu der unter 2.3.11.1.3 beschriebenen Methode). Es ergab sich für jede Probe eine ausreichende Anzahl an Reads (Durchschnitt: 1285 Reads/Probe; 166-2420 Reads/Probe), die die jeweiligen Qualitätskriterien erfüllten. Zudem konnten keine relevanten Unterschiede zwischen Forward und Reverse Sequenzierung identifiziert werden.

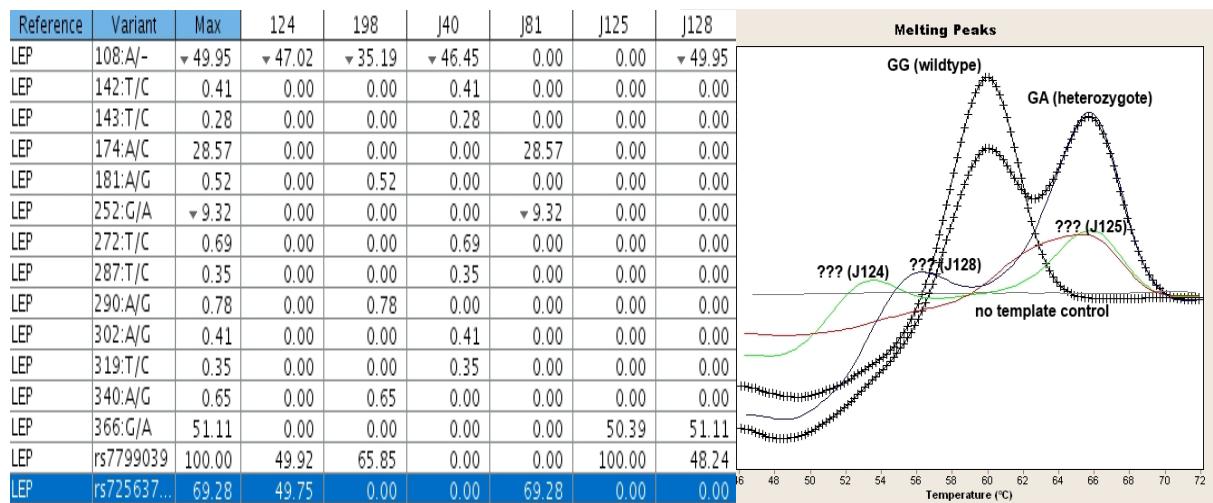


Abbildung 55: Ergebnisse der Softwareauswertung

Die Kontrollen bestätigen hier die Ergebnisse der LightCycler Methode: Kontrollprobe J40 zeigte ein typisches Wildtyp Peak im LightCycler Lauf und hat nach oben abgebildeter Grafik keine Mutation für den rs7799039 und den rs72563764 Polymorphismus (0 % mutiertes Allel). Auch die heterozygote Kontrollprobe J198 zeigte einen typischen Peak im LightCycler Lauf und konnte auch im GS Junior Lauf als Heterozygote (66 % mutiertes Allel) identifiziert werden. Die Linksverschiebung des Wildtyp Peaks bei 53 °C für die Proben J124 und J81 beruhen auf dem vorgelagerten rs72563764 Polymorphismus, für den beide Proben heterozygot sind (50 % bzw. 69 % mutiertes Allel). Der 55 °C Peak der Probe J128 ist durch eine zusätzliche Mutation in 51 % der Fälle zu erklären und ergibt in Kombination mit dem homozygoten, mutierten Allel des rs7799039 Polymorphismus den breiten Peak bei 64 °C.

Somit liegt den abweichenden Peaks nicht nur der vermutete rs7799039 Polymorphismus zu Grunde, sondern auch eine weitere, nicht beschriebene Mutation. Beide Mutation befinden sich im Bereich der Sensorsonde und führen zu einer Destabilisierung, welche zu einer Schmelzpunktniedrigung führt. Auf Grund der Ergebnisse konnten die unklaren Proben einem Genotyp zugeordnet werden.

2.3.11.1.8 rs3813929 Polymorphismus (5-HTR2C)

Die Bestimmung des rs3813929 Polymorphismus erfolgte mittels einer bereits etablierten Methoden wie in der Dissertation von Frau Laika beschrieben.²¹⁶

2.3.11.1.9 rs16147 (NPY) und s2236418 Polymorphismus (GAD)

Bei dem untersuchten rs16147 Polymorphismus handelt es sich um eine Punktmutation von Thymin zu Cytosin, welche in der Promoter Region des NPY Genes lokalisiert ist. Der rs2236418 Polymorphismus ist zwar auf einem anderen Gen (GAD2) lokalisiert, wurde aber aus Zeit und Kostengründen mit dem rs16147 Polymorphismus in einer Methode kombiniert. Auch der rs2236418 Polymorphismus befindet sich innerhalb der Promotoregion des genannten Genes und stellt eine Punktmutation von Guanin zu Adenin dar.

Für den **rs16147 Polymorphismus** wurde die Sensorsonde (LCRed640-CAACAGGACTACCAACC CACTG-Phosphat) am 5'-Ende mit LCRed640 Farbstoff markiert, durch eine Phosphatgruppe geschützt und so konstruiert, dass sie komplementär zum Strang des Wildtypes ist. Um einen optimalen FRET Übergang zu gewährleisten, wurde 2 Basen zuvor die am 5' Ende mit Fluoreszein markierte Ankersonde (AGCAGCCCAGACGATTCTTGTCCT-Fluoreszein), angeordnet. Aus den Gegebenheiten folgte eine Schmelztemperatur von 62 °C für das Wildtyp-A-Allel und 57 °C für das mutierte G-Allel. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Verlauf der Schmelzkurve ist Tabelle 29 bzw. Abbildung 56 zu entnehmen.

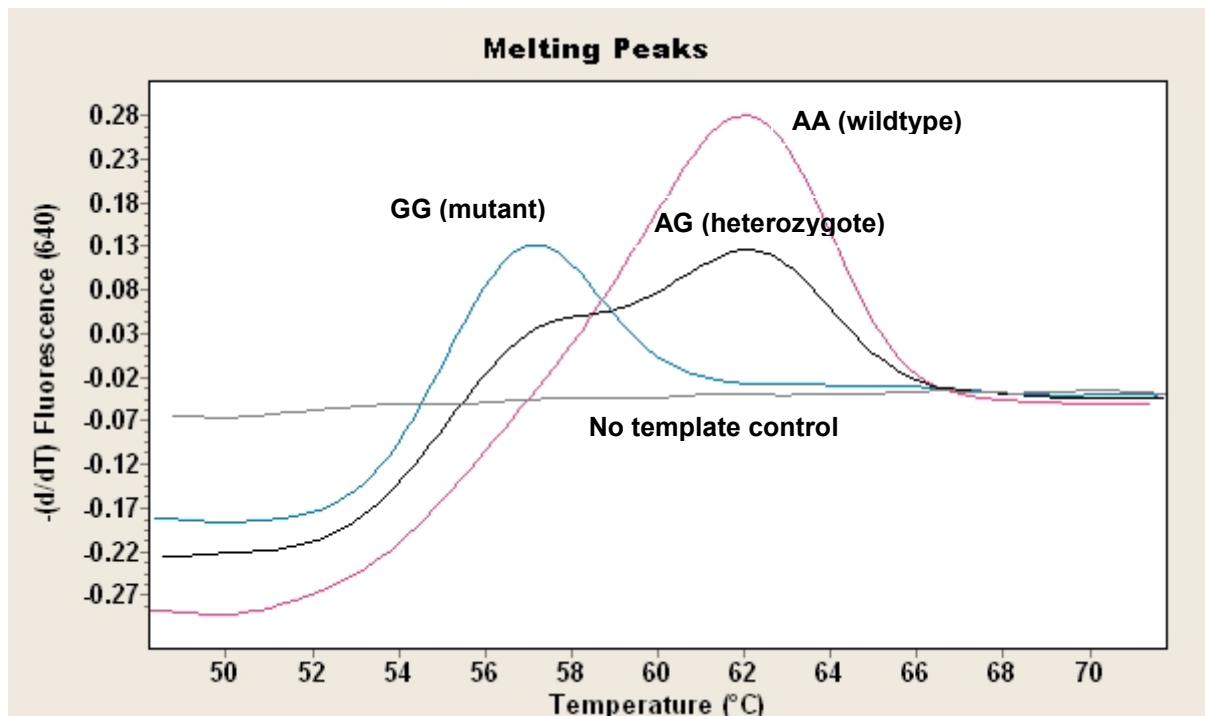


Abbildung 56: rs16147 Schmelzkurve

Für den **rs2236418 Polymorphismus** wurde die Sensorsonde (LCRed705-CGGTCTTTAAAGCTCCCC-Phosphat komplementär zum mutierten A-Allel konstruiert, am 5'-Ende mit LCRed705 Farbstoff markiert und durch eine Phosphatgruppe geschützt. Um einen optimalen FRET Übergang zu gewährleisten, wurde 2 Basen zuvor die am 5'-Ende mit Fluoreszein markierte Ankersonde (GGCTCCGAGGACCCTAGGTAGT-Fluoreszein), angeordnet. Aus den Gegebenheiten folgte eine Schmelztemperatur von 61 °C für das mutierte A-Allel und 55 °C für das Wildtyp C-Allel (Abbildung 57).

Tabelle 29: rs16147 und rs2236418 Methodenbeschreibung

Zyklusprogramm			
95 °C 90 sec; 35x [95 °C 10 sec – 58 °C 20 sec – 72 °C 30 sec]; 50 °C – 72 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	12,25		
MgCl ₂	1,3	25 mM	2,625 mM
F-Primer NPY	0,15	50 µM	375 nM
R-Primer NPY	0,5	25 µM	625 nM
F-Primer GAD	0,15	50 µM	375 nM
R-Primer GAD	0,25	50 µM	625 nM
Sen NPY	0,3	3 µM	45 nM
Anc NPY	0,3	3 µM	45 nM
Sen GAD	0,4	3 µM	60 nM
Anc GAD	0,4	3 µM	60 nM
DMSO	1,0		
LightCycler DNA Master Mix	2	10x	0,5x

¹bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl (19 µl Stammlösung und 1 µl DNA)

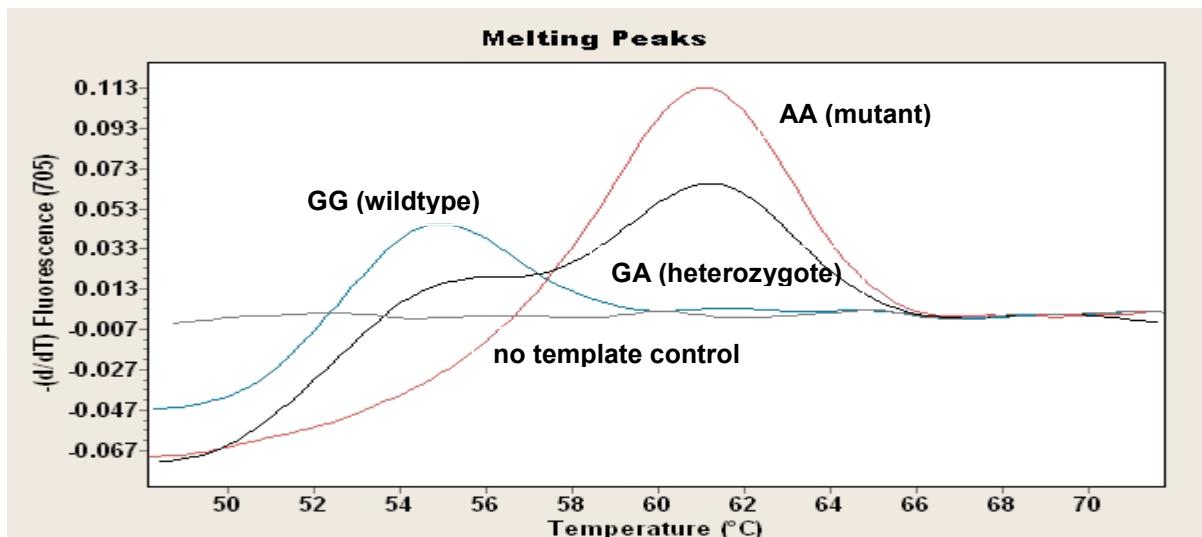
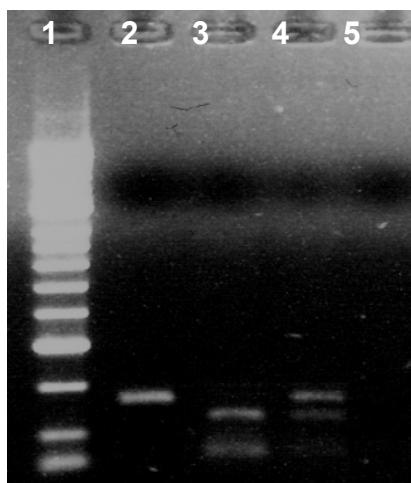


Abbildung 57: rs2236418 Schmelzkurve

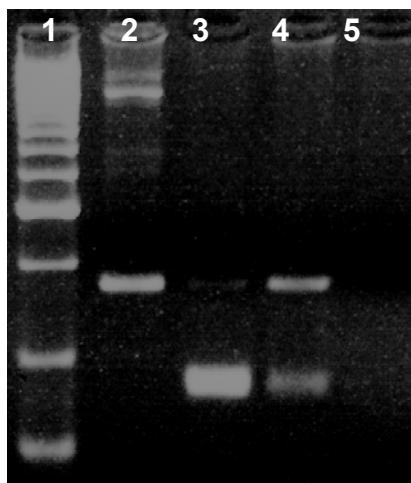
Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode des **rs16147 Polymorphismus** wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym CViKI-1 durchgeführt. Anwendung fanden hierbei Primer, welche die Generierung eines Amplikons mit nur einer spezifischen Schnittstelle ermöglichen. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist dem standardmäßigen Ansatz aus Tabelle 27 zu entnehmen. Die besten Ergebnisse wurden hierbei mit 30 Zyklen und einer Annealingtemperatur von 57,7 °C erzielt. Anschließend wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes mit 10 µl Stammlösung (6 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 2 µl Enzym CViKI-1 mit 5000 U/ml) vermischt und bei 37 °C für 3 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur das mutierte G-Allel, sodass sich 2 Fragmente mit 113 p und 38 bp ergeben; das Wildtyp A-Allel verbleibt unverändert bei 151 bp. Die Bandenmuster können Abbildung 58 entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.



1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Wildtyp: 151 bp (AA)
3. Mutante: 113 bp + 38 bp (GG)
4. Heterozygote: 151 bp + 113 bp + 38 bp (AG)
5. Leerkontrolle

Abbildung 58: rs16147 enzymatischer Verdau mit CViKI-1, Agarosegel 2 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 30 min bei 100V

Für die Validierung der am LightCycler etablierten Methode des **rs2236418 Polymorphismus** wurde ein enzymatischer Verdau mit dem Enzym Dral durchgeführt: Auch bei dieser Kontrollmethode erlaubten die Primer der LightCycler Methode die Generierung eines Amplikons, wobei die Zusammensetzung analog zu Tabelle 27 ist. Hierbei wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes mit 10 µl Stammlösung (7 µl H₂O, 2 µl NEB4 Puffer 10x, 1µl Enzym Dral mit 20000 U/ml) vermischt und bei 37 °C für 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Das Restriktionsenzym schneidet nur das mutierte A-Allel, sodass sich 2 Fragmente mit 86 bp und 83 bp ergeben; das Wildtyp G-Allel verbleibt unverändert bei 169 bp. Die Bandenmuster können Abbildung 59 entnommen werden, wobei die Banden für das A-Allel (86 bp +83 bp) auf Grund ihrer Differenz von nur 3b p als eine zusammen-hängende Bande zu erkennen sind. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten mit den Ergebnissen der LightCycler Methode überein.



1. AQ2 DNA-Ladder (Biozym)
2. Wildtyp: 169 bp (GG)
3. Mutante: 86 bp + 83 bp (AA)
4. Heterozygote: 169 bp + 86 bp + 83 bp (AG)
5. Leerkontrolle

Abbildung 59: rs1137101 enzymatischer Verdau mit Mspl, Metaphor-Gel 3,5 %, 5 µl Probe + 1 µl Auftragspuffer pro Geltasche, Laufzeit und –spannung: 45 min bei 100V

3. Ergebnisse

3.1 Genotypisierungsmethoden

Die Gesamtpopulation wurde in Abhängigkeit von dem Vorhandensein der untersuchten Merkmale in drei Subpopulationen („Serum Olanzapin“, „Response“ und „Gewicht“) unterteilt. Patienten mit mehreren relevanten Parametern (beispielsweise Gewicht und Serumspiegel) wurden sowohl in der Subpopulation „Gewicht“ als auch in der pharmakokinetischen Kohorte (= Olanzapin Serum) untersucht, sodass es zu Überschneidungen in den einzelnen Populationen kommt. Für die jeweilige Subpopulation wurden vielversprechende Polymorphismen identifiziert, die im Kapitel 1.4 näher charakterisiert sind. Für die anschließend aufgeführten Punktmutationen wurden neue sondenbasierte LightCycler Methoden entwickelt (siehe Abschnitt 2.3.11.1-3). Jede Methode wurde zudem mit einem klassischen Genotypisierungs-Verfahren für mindestens 50 Proben auf Richtigkeit geprüft. Hierbei wurde für mit *markierte Polymorphismen eine ALS PCR (siehe Abschnitt 2.3.11.1-3 bzw. Anhang A2) und für die restlichen Polymorphismen ein enzymatischer Verdau (siehe Abschnitt 2.3.3) durchgeführt.

Olanzapin Serum

- CYP1A2*1D (rs35694136) und UGT1A4 (rs2302429)
- POR (rs2011425)

Response

- CNR1 (rs1049353)
- HRH3 (rs3787429* und rs3787430*)
- ZNF804A (rs1344706*)
- ABCB1 (rs2865690/rs28373093)

Gewicht

- FAAH (rs324420)
- MC4R (rs17782313* und rs489693)
- FTO (rs9939609*)
- CNR1 (rs1049353*)
- HRH1 (rs346070, rs346074* und rs346075)
- PMCH (rs7973796)
- LEP (rs7799039) und LEPR (rs1137101)
- NPY (rs16147) und GAD (rs2236418)

Insgesamt konnten mit den neu entwickelten Lightcycler Methoden 21 Polymorphismen zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden. Zudem wurden die sonden-basierten Genotypisierungs-Ergebnisse mittels enzymatischem Verdau oder allel-spezifischer PCR an Hand von mindestens 50 Proben bestätigt. Hierbei wurden außer der von Chida et al.²⁵⁸ adaptierten Kontrollmethode des rs35694136 Polymorphismus alle Verfahren neu entwickelt. Mit Ausnahme von 5 Patienten, die im Folgenden näher spezifiziert sind, konnten an Hand der entwickelten Verfahren alle untersuchten Proben den jeweiligen 21 Genotypen zugeordnet werden.

Für zwei Polymorphismen (rs9939609 und rs7799039) kam es auf Grund weiterer Punktmutationen innerhalb der Bindungsstellen der Sonden für wenige Patienten zu abweichenden Peaks. Durch Sequenzierung der relevanten Stellen konnten auch diese Proben einem Genotyp zugeordnet werden. Einzelheiten hierzu sind den jeweiligen Methoden (siehe Abschnitt 2.3.11.1.3. bzw.6) zu entnehmen.

Für den rs489693 Polymorphismus konnte auch nach mehrmaliger Extraktion der DNA für zwei Patienten kein Ergebnis erhalten werden. Zudem lieferten die Schmelzkurzen zweier weiterer Proben keine Ergebnisse in der Kombinationsbestimmung mit einem weiteren Polymorphismus. Die Einzelbestimmung des rs489693 Polymorphismus führte für diese 2 Proben zu Abweichungen in der Schmelzkurve (siehe Abbildung 60). Da die zuverlässige Bestimmung des Genotyps für 4 Proben nicht möglich war, wurden diese von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

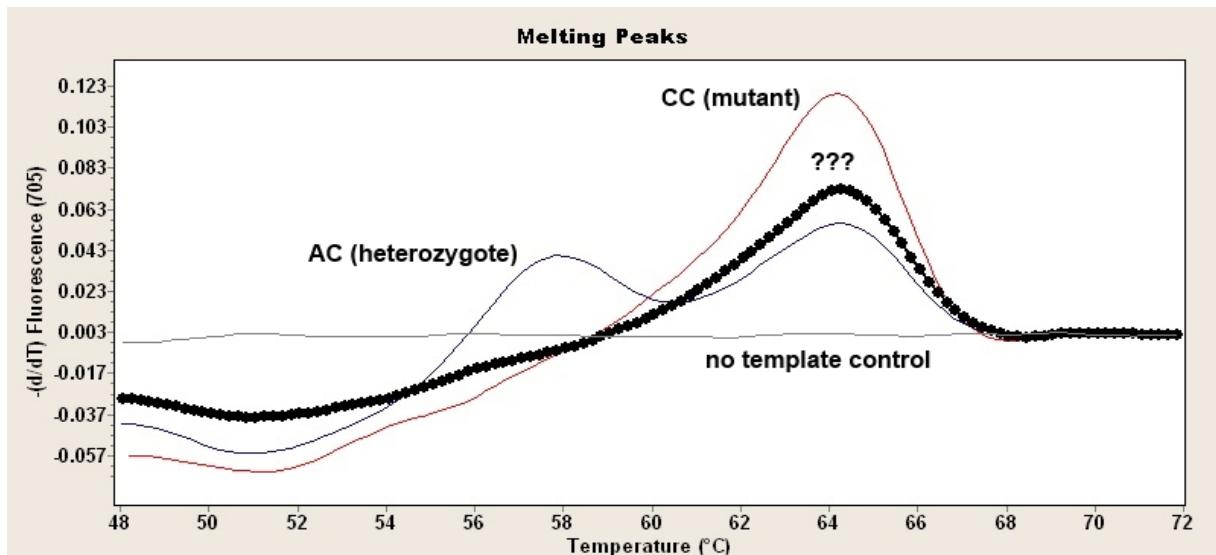


Abbildung 60 rs489693 abweichende Peaks

Zudem kam es für eine Probe bei der Bestimmung des rs1049353 Polymorphismus zu Abweichungen in der Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 61). Da auch nach mehrmaliger DNA-Extraktion der gleiche Peak-Verlauf identifiziert werden konnte, wurde die Probe von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Unbekannte Polymorphismen innerhalb der Bindungsstelle der Sonden könnten die beschriebenen Abweichungen erklären.

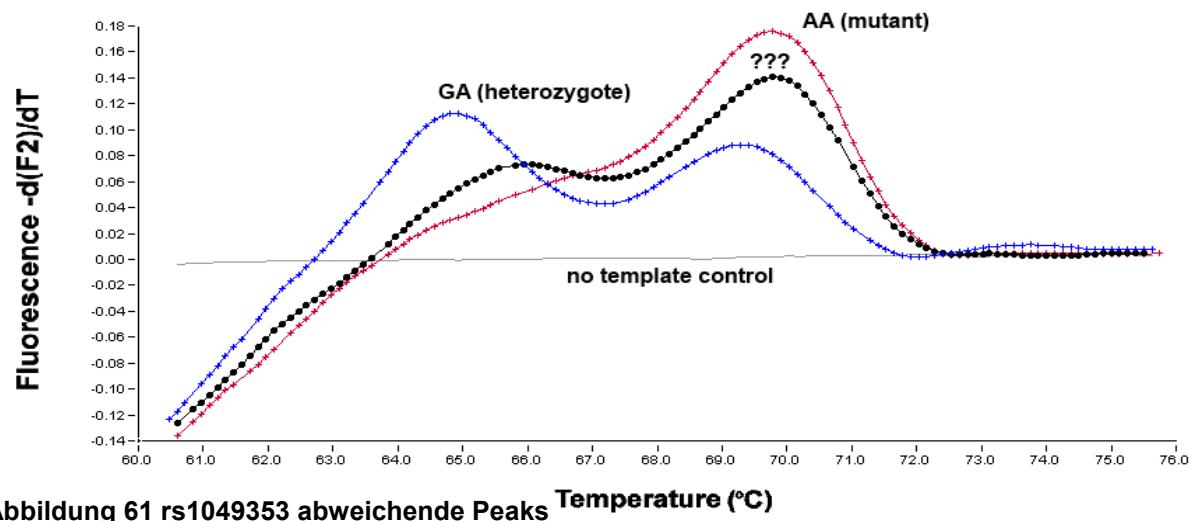


Abbildung 61 rs1049353 abweichende Peaks

3.2 Verteilung der untersuchten Polymorphismen

Die Verteilung der jeweiligen Genotypen für alle untersuchten Polymorphismen ist in Anhang A8 den Ergebnissen der HAPMAP-EU Population gegenüber gestellt.

Es zeigt sich eine vergleichbare Verteilung der untersuchten Polymorphismen. Zudem befinden sich fast alle untersuchten Polymorphismen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (nähere Angaben siehe Anhang A8). Einzige Ausnahme hiervon stellt der CYP1A2*1D und der rs2865690/rs28373093 Polymorphismus dar. Die Abweichung des CYP1A2*1D Polymorphismus ist auf einen erhöhten Anteil an delT/delT-Genotyp Trägern zurückzuführen ist. Dies ist allein dem Zufall geschuldet und auf Grund einer vergleichbaren Häufigkeit des delT-Alleles in europäischen Studien (6,1 % vs. 3,4-11 %; zusammengefasst in der Arbeit von Perera et al.)²⁵⁹ ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse gewährleistet. Auch für den rs2865690/rs28373093 Polymorphismus ist die Abweichung von der erwarteten Verteilung durch Zufall und nicht durch besondere Selektionskriterien verursacht.

3.3 Charakterisierung der Studienpopulationen

Um den Einfluss der bestimmten Polymorphismen auf die **Gewichtszunahme (Population „Gewicht)**, den **Response (Population „Response“)** und **pharmakokinetische** Fragestellungen (**Population „Serum Olanzapin“**) zu untersuchen, wurden aus einer Gesamtpopulation von $n=572$, welche schon an anderer Stelle charakterisiert und ausgewertet wurde,²⁶⁰ drei weitere Teilpopulationen gebildet (Abbildung 62). Generell handelt es sich bei allen Populationen in Bezug auf die genetische Abstammung um eine sehr homogene Gruppe mit einem Anteil von Kaukasiern um 98 %. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der antipsychotischen Therapie lag, wurden nur Patienten, die mindestens ein atypisches Antipsychotikum im Rahmen ihres Klinikaufenthaltes erhalten hatten, in die jeweiligen Teilpopulationen eingeschlossen. Patienten, die im Rekrutierungszeitraum mehrfach in stationärer Behandlung waren, wurden nur zum ersten Aufnahmezeitpunkt berücksichtigt.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs von genetischen Polymorphismen und Antipsychotika vermittelter **Gewichtszunahme** wurde die Teilpopulation n_1 ($n=350$) gebildet, welche nur Patienten beinhaltet, für die Gewichtsdaten zu Beginn der Therapie und nach 4 Wochen zur Verfügung standen. Des Weiteren wurde eine Subpopulation n_{1b} ($n=178$) generiert, in welche keine Patienten eingeschlossen wurden, die weitere stark gewichtsinduzierende Medikation (trizyklische Antidepressiva, Mirtazapin, Lithium, Valproinsäure und Paroxetin)²⁶¹ oder die gewichtsneutralen Antipsychotika Ziprasidon und Aripiprazol erhalten hatten. Hiermit sollte die Komedikation als Verzerrungsfaktor der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme limitiert werden. Zur differenzierten Betrachtung der Gewichtszunahme in zuvor unbehandelten Patienten wurde zudem eine Subpopulation n_{1c} ($n=90$) mit Patienten, die sich zum ersten Mal einer antipsychotischen Behandlung unterzogen, generiert.

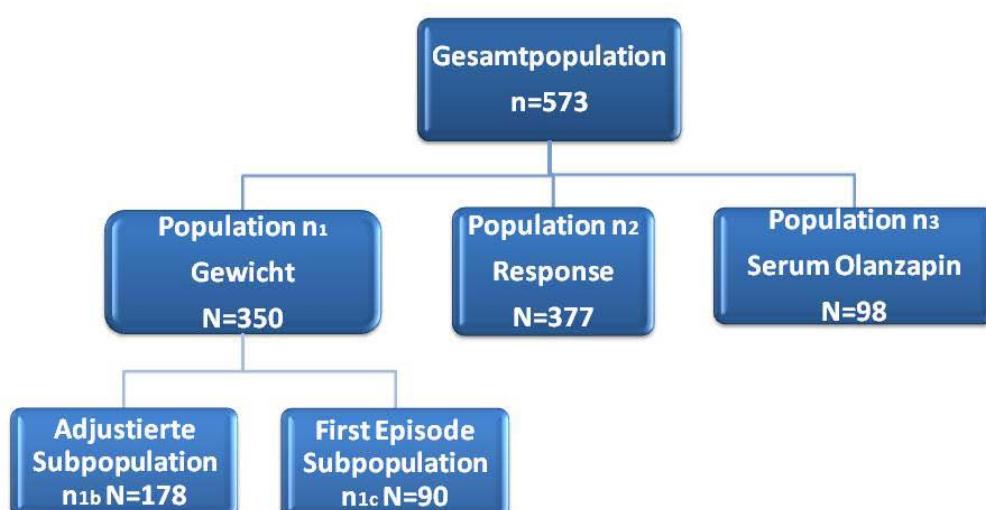


Abbildung 62: Überblick der gebildeten Teilpopulationen

Um den Einfluss eines genetischen Polymorphismus auf das **Ansprechen** einer antipsychotischen Therapie zu untersuchen, wurde eine weitere Teilpopulation n_2 ($n=377$) gebildet, welche nur Patienten

beinhaltet für die mindestens ein Parameter (CGI, PDS-D/P) zur Charakterisierung des Ansprechens einer antipsychotischen Behandlung zur Verfügung stand.

Die dritte Population n_3 ($n=98$) beinhaltet nur Patienten, die für mindestens 4 Wochen eine Olanzapin-Therapie erhalten hatten und für welche Olanzapin Serumkonzentration ermittelt wurden. Diese Kohorte wurde hinsichtlich des Einflusses **pharmakokinetischer** Polymorphismen untersucht.

Nachfolgend wird jede Teilpopulation separat demographisch charakterisiert, auf weitere klinische Einflussfaktoren untersucht und anschließend der Einfluss der jeweiligen Polymorphismen aufgeführt.

3.4 Ergebnisse der Population „Serum Olanzapin“

3.4.1 Demographische Beschreibung

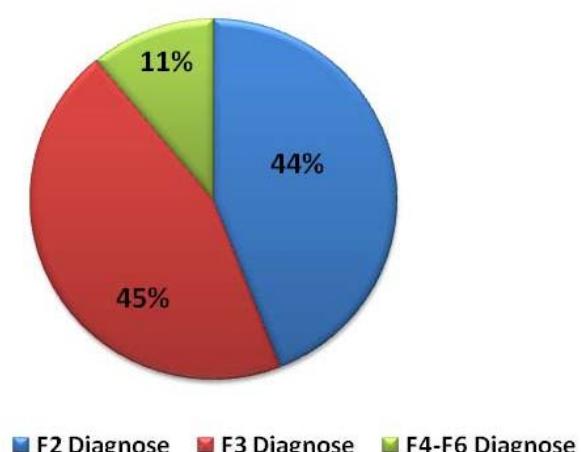
Von den 98 Patienten der Population „Serum Olanzapin“ waren 54 (55,1 %) weiblich und 44 (44,9 %) männlich. Der Anteil der Raucher betrug 40,8 %. Eine positive Familienanamnese bezüglich psychiatrischer Erkrankungen hatten 36 (39,1 %) von 92 Patienten, für die diese Information verfügbar war. Zudem zeigten 34 (35,4 %) von 96 Patienten mit dem hinterlegten Merkmal eine erste Episode einer psychiatrischen Erkrankung.

Tabelle 30 und Abbildung 63 geben einen Überblick über die demographischen Daten, den Krankheitszustand der Patienten zum Aufnahmezeitpunkt und die Verteilung der Diagnosen:

Der Durchschnittspatient zeigt sich als 40-jähriger mit leichtem Übergewicht (BMI~25) und ausgeprägten paranoiden und depressiven Symptomen, welche im Vergleich zu den anderen untersuchten Populationen (siehe Abschnitt 3.5.1 bzw. 3.6.1) leicht stärker ausgeprägt sind. Zudem fällt bei der Verteilung der Diagnosen ein gleichmäßiger Anteil von F2 und F3 Diagnosen auf.

Tabelle 30 und Abbildung 63

Variable	n	Mittelwert \pm SD
Alter	98	41,4 \pm 14,6
Gewicht Aufnahme	93	72,8 \pm 15,1
Größe	97	171,2 \pm 9,6
BMI Aufnahme	92	24,9 \pm 4,7
Aufenthaltsdauer	98	78,1 \pm 38,5
PDS-P Aufnahme	93	9,4 \pm 8,5
PDS-D Aufnahme	93	19,2 \pm 9,9
CGI-Aufnahme	98	6,1 \pm 0,7
Dosis (mg)	98	14,7 \pm 7,3
Serum-konzentration (ng/ml)	98	24,6 \pm 18,3
C/D (ng/ml*mg)	98	1,7 \pm 1,2



3.4.2 Medikation

Die nachfolgenden Tabelle 31 und Abbildung 64 geben einen Überblick über die Medikation der Population „Serum Olanzapin“. Die Mehrheit der Patienten (75,5 %) erhielten Olanzapin als einziges atypischen Antipsychotikum. Nur die Minderheit (28,6 %) wurde sowohl mit atypischen als auch mit typischen Antipsychotika behandelt. Bei der Kombination von Olanzapin mit einem weiteren atypischen Antipsychotikum stellten Risperidon (n=8), Quetiapin (n=7), Amisulprid und Paliperidon (n=4) die Präparate mit der häufigsten Anwendung dar. Bei der antidepressiven Medikation stellten Mirtazapin, Citalopram und trizyklische Antidepressiva die am häufigsten verwendeten Medikamente dar. Als Komedikation erhielten die meisten Patienten Biperiden (n=18), Lithium (n=19) und Benzodiazepine (nicht eingetragen). Zudem erhielten 7 Patienten den starken CYP1A2 Induktor Carbamazepin und 4 Patienten Valproinsäure, Medikamente, welche nachweislich zu reduzierten Olanzapin Serumkonzentrationen führen.^{49, 262} Da die Anzahl der individuellen CYP1A2 Substrate zu gering für eine einzelne statistische Auswertung waren, wurden CYP1A2 Substrate (nach der Arbeit von Flockhart et al.)²⁶³ zu einem Faktor zusammengefasst (Vorhandensein Ja (n=38) bzw. Nein).

Tabelle 31: Medikation nach Studienpopulation

Therapie nur mit Atypikum		70
Anzahl der Atypika	1	74
	2	22
	3	1
	4	1
Therapie Atypikum +Typikum		28
Anzahl der Typika	1	25
	2	3
Häufigste Typika Komdektion	Pipamperon	8
	Haloperidol	8
	Perazin	1
Häufigste Antidepressiva Komedikation	Mirtazapin	30
	Citalopram	25
	TCA	13

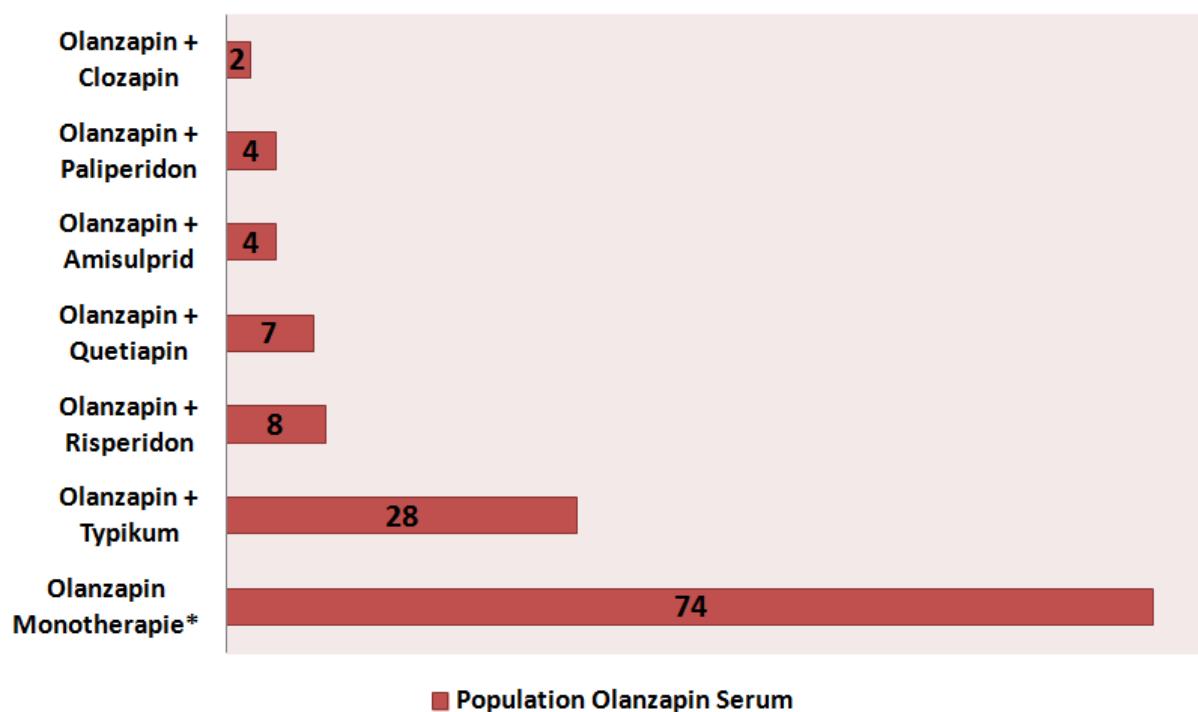


Abbildung 64: Verarbreichte Studienmedikation

* Monotherapie bezogen auf atypische Antipsychotika, Gabe von Typika möglich

3.4.3 Klinische Einflussfaktoren und Wechselwirkungen

Relevante klinische Einflussfaktoren stellen hierbei das Geschlecht, Alter, Gewicht sowie mögliche Komedikationen mit einem Einfluss auf den Olanzapinmetabolismus dar.^{49, 53, 79} Auf der nächsten Seite findet sich ein Überblick über die erhaltenen Olanzapin -Dosen, und -Serumkonzentrationen in Abhängigkeit von diesen Einflussfaktoren. Zudem wurde der Einfluss auf korrigierte Serumkonzentrationen untersucht, wobei sowohl eine Dosis-Korrektur (=Serumkonzentration /Olanzapindosis) als auch eine Dosis- und Gewichts-Korrektur (=Serumkonzentration/Olanzapindosis x Gewicht zur Aufnahme in kg) durchgeführt wurde.

Zwischen **Männern und Frauen** konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der untersuchten Parameter identifiziert werden. Im Gegensatz zu Frauen erhielten Männer jedoch höhere Dosen (15,4 vs. 14,1 mg; p=0,402) und wiesen trotzdem niedrige Serumkonzentration (24,0 vs. 24,8 ng/ml; p=0,936) auf.

Patienten mit einer Komedikation des potenteren CYP1A2 Induktors **Carbamazepin** zeigten ein signifikant erniedrigtes C/D-Verhältnis (0,7 vs. 1,8 ng/ml*mg; p=0,017). Die offensichtlich durchgeführte Dosisanpassung war hierbei nicht ausreichend und resultierte bei Patienten mit einer Carbamazepin Komedikation in Serumspiegel unterhalb des empfohlenen therapeutischen Bereichs von 20-80 mg/ml (Tabelle 32).

Im Gegensatz hierzu führte die Dosisanpassung (16,9 vs. 13,2 mg; p=0,014) bei **Rauchern** zu vergleichbaren Serumspiegeln von Rauchern gegenüber Nicht-Rauchern.

In einer kürzlich publizierten Studie konnte ein dem Rauchen vergleichbarer Einfluss von **Valproinsäure** auf die Olanzapin Serumkonzentration nachgewiesen werden.²⁶² Auch in der untersuchten Population konnte eine dem Rauchen vergleichbare Reduktion der Olanzapin C/D-Ratio (1,3 vs. 1,7 ng/ml*mg; p=0,461) bei Patienten mit Valproinsäure Komedikation beobachtet werden, wobei der Unterschied nicht signifikant war. Zudem erschwert die Tatsache, dass 2 dieser 4 Patienten Raucher waren und ein Patient zusätzlich Carbamazepin erhalten hatten, die Interpretation der Ergebnisse.

Da nur 7 bzw. 4 Patienten Carbamazepin oder Valproinsäure als Komedikation erhielten, wurden diese **CYP1A2 Induktoren** mit dem Rauchstatus zu einem Faktor zusammengefasst. Patienten, die einen CYP1A2 Induktoren erhielten, zeigten ein signifikant erniedrigtes Olanzapin C/D-Verhältnis (2,0 vs.1,4 ng/ml*mg; p=0,007).

Neben diesen Faktoren wurde der Einfluss der **Komedikationen** untersucht. Hierbei hatte weder die Anzahl der antipsychotischen Medikationen noch das Vorhandensein eines CYP1A2 Substrates einen signifikanten Einfluss auf das Olanzapin C/D-Verhältnis (p=0,100 bzw. p=0,927).

Tabelle 32: Klinische Einflussfaktoren auf Olanzapin Serumkonzentration

Untersuchter Parameter	Dosis (mg)	Serum-konzentration (ng/ml)	C/D Ratio (ng/ml per mg)	Körpergewicht korrigierte C/D Ratio (ng/ml per mg/kg)
Geschlecht				
Frauen (n=54,51)	14,2 ± 7,4	24,8 ± 18,7	1,9 ± 1,4	124,5 ± 99,8
Männer (n=44,42)	15,4 ± 7,2	24,0 ± 18,1	1,6 ± 0,8	124,4 ± 67,2
p	0,402	0,934	0,222	0,9393
Carbamazepin				
Nein (n=91,87)	14,5 ± 7,3	25,5 ± 18,6	1,8 ± 1,2	129,5 ± 86,8
Ja (n=7,6)	16,9 ± 7,5	12,5 ± 7,5	0,7 ± 0,2	51,1 ± 19,0
p	0,422	0,068	0,017	0,030
Rauchen				
Nein (n=58,57)	13,2 ± 6,7	24,6 ± 18,5	1,9 ± 1,3	134,5 ± 93,9
Ja (n=40,36)	16,9 ± 7,3	24,6 ± 18,3	1,5 ± 0,9	108,5 ± 70,6
p	0,014	0,992	0,067	0,157
Valproinsäure				
Nein (n=94,89)	13,7 ± 7,4	24,8 ± 18,4	1,7 ± 1,2	125,9 ± 87,4
Ja (n=4)	15,0 ± 4,1	20,6 ± 18,5	1,3 ± 0,8	91,8 ± 50,3
p	0,936	0,660	0,461	0,442
CYP1A2 Induktoren				
Nein (n=53,52)	13,2 ± 6,8	25,9 ± 18,7	2,0 ± 1,3	142,2 ± 94,6
Ja (n=45,41)	16,5 ± 7,5	23,1 ± 17,9	1,4 ± 0,9	101,9 ± 68,9
p	0,024	0,439	0,007	0,024

Weder das **Alter** noch das **Gewicht bei Aufnahme** konnten signifikant mit Serumspiegeln von Olanzapin bzw. dem C/D-Verhältnis korreliert werden ($p>0,317$ bzw. $p>0,362$). Eine separate Auswertung von Patienten über (n=87) und unter 60 Jahren (n=11) analog zur Studie von Haslemo et al.²⁶² identifizierte einen Trend zu niedrigen Serumspiegeln für Patienten über 60 Jahren (14,6 vs. 25,9 ng/ml; $p=0,054$). Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in den Olanzapindosen (11,9 vs. 15,7 mg; $p=0,171$) und im C/D-Verhältnis (1,4 vs. 1,8 ng/ml*mg; $p=0,316$) beobachtet werden.

Eine Differenzierung nach **Diagnose** resultierte in erwartungsgemäß höheren Dosen und damit verbundenen Serumkonzentrationen von Patienten mit einer F2 gegenüber einer F3 Diagnose (18,6 vs. 11,1 mg und 34,7 vs. 15,5 ng/ml; $p<0,001$).

3.4.4 Exemplarisches Vorgehen

In den nachfolgenden Kapiteln werden die statistischen Ergebnisse, der unter 2.3.11.1 beschriebenen Polymorphismen aufgeführt, welche im Kontext veränderter Serumspiegel, untersucht wurden.

Mit Hilfe einer ANOVA wurde der Einfluss der jeweiligen Genotypen auf die Serum- bzw. korrigierten Serumspiegel untersucht. Hierbei wurde auf eine gleichmäßige Verteilung von CYP1A2 Induktoren (Rauchen, Carbamazepin bzw. Valproinsäure) CYP1A2 Substraten und Art der Medikation in den verschiedenen Genotypgruppen geprüft. Auf Grund der geringen Häufigkeit von *1F CC-Genotyp Trägern und *1D delTdelT-Genotyp Trägern wurden diese in weiteren statistischen Auswertungen zusammengefasst (*1F-C-Allel, *1D-delt-Allel).

Zur Vermeidung von Verzerrungsfaktoren wurde die Dosis-korrigierte Serumkonzentration von Olanzapin als abhängige Variable in einem ANCOVA Modell untersucht. Dieses Modell beinhaltet als Kofaktoren Faktoren Alter, Geschlecht, Gewicht zur Aufnahme, CYP1A2 Induktoren und den CYP1A2*1D bzw. *1F Polymorphismus.

Um den Einfluss eines Interaktionseffektes zwischen Genotyp und CYP1A2 Induktoren zu untersuchen wurde oben beschriebenes Model mit den festen Faktoren CYP1A2 Induktor und *1D bzw. *1F Genotyp adjustiert auf die Kofaktoren Alter, Geschlecht und Gewicht zur Aufnahme verwendet.

Da zu erwarten ist, dass der Einfluss der identifizierten Risikofaktoren nur einen geringen Einfluss auf die Serumkonzentration von Olanzapin ausüben wird und nur relevante Unterschiede in ein verändertes Response-Verhalten resultieren, wurden die Risikofaktoren kombiniert. Für Risikomodel 1 wurde das Erhalten eines CYP1A2 Induktors als 1, die Kombination von Induktor und *1F AA-Genotyp als 2 und alle restlichen Ausprägungen als 0 kodiert. In diesem Modell wäre demnach eine erniedrigte Konzentration für Risikostufe 2 zu erwarten. Risikomodell 2 berücksichtigt zudem den CYP1A2*1D Polymorphismus. Als Risikofaktoren für erhöhte Serumkonzentrationen wurden hierbei die Abwesenheit eines Induktoren, sowie das *1D delT-Allel und das *1F C-Allel eingestuft. Da nur für 4 Patienten gleichzeitig 3 Risikofaktoren vorlagen wurden diese mit den Trägern von 2 Risikofaktoren zusammengefasst.

3.4.5 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf Serumkonzentrationen

3.4.5.1 CYP1A2*1D und *1F

Die CYP1A2*1F (rs762551) und *1D (rs35694136) Polymorphismen befinden sich innerhalb des Intron 1 des CYP1A2 Genes, welchem eine Schlüsselrolle in der Metabolisierung von Clozapin und Olanzapin zugeschrieben wird.⁵⁷ Auf Grund seltener Mutationen im Genbereich, die zudem in einem hohen Linkage Disequilibrium stehen, erscheint eine Routinediagnostik nur für diese Polymorphismen in Kaukasiern sinnvoll.⁵⁹ In vielen Studien geht der CYP1A2*1F Polymorphismus mit einer erhöhten Induzierbarkeit des CYP1A2 Enzyms in Rauchern einher,⁶⁰⁻⁶⁴ wobei die Studienlage im Kontext veränderter Olanzapin Serumkonzentration widersprüchlich ist.⁶⁵⁻⁶⁹ Für den CYP1A2*1D Polymorphismus konnte ein Einfluss auf die Olanzapin Clearance in Rauchern nachgewiesen werden.⁶⁰ Die Relevanz dieser Deletion ist auf Grund sehr weniger Studien in kleinen Populationen um 50 Patienten weiterhin unklar.^{65, 66, 69}

Sowohl für den CYP1A2*1D als auch für den CYP1A2*1F Polymorphismus zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter CYP1A2 Induktoren sowie Carbamazepin-Komedikation. Zudem waren CYP1A2 Substrate und atypische Medikation in den verschiedenen Genotypgruppen vergleichbar.

Tabelle 33: Olanzapin Serumkonzentrationen in Abhängigkeit vom untersuchten Genotyp

SNP	Dosis (mg)	Serum-konzentration (ng/ml)	C/D Ratio (ng/ml per mg)	Körpergewicht korrigierte C/D Ratio (ng/ml per mg/kg)
CYP1A2*1D Genotyp				
TT (n=89,85) *	14,5 ± 7,4	22,7 ± 16,6	1,6 ± 1,0	116,2 ± 79,8
T/delT (n=6,5)*	19,2 ± 4,9	43,5 ± 27,6	2,4 ± 1,4	204,5 ± 102,3
delT/delT (n=3)	13,3 ± 5,8	44,0 ± 22,1	3,7 ± 2,6	223,8 ± 140,4
p	0,297	0,004	0,003	0,009
CYP1A2*1F Genotyp				
CC (n=8,7)*	19,6 ± 7,8	26,1 ± 10,7	1,4 ± 0,5	98,9 ± 46,9
CA (n=36,35)*	15,1 ± 7,3	30,5 ± 20,1	2,1 ± 1,3	150,8 ± 101,5
AA (n=54,51)*	13,7 ± 7,0	20,4 ± 17,0	1,5 ± 1,1	109,9 ± 75,9
p	0,091	0,035	0,038	0,068

* die zweite Anzahl an Patienten bezieht sich auf den Parameter Körpergewicht und dosiskorrigierte Serumkonzentration. Auf Grund fehlender Gewichtsdaten für n=5 Patienten unterscheidet sich die Genotypverteilung von den anderen untersuchten Parametern

Träger des **CYP1A2*1D** delT/delT Genotyps zeigten 2,3-fach erhöhte Dosis-korrigierte ($p=0,003$; Tabelle 33) und 1,9-fach erhöhte Körpergewicht-korrigierte Serumspiegel des Olanzapins ($p=0,009$; Tabelle 33) als Wildtyp Träger. Auf Grund der geringen Anzahl an delT/delT Genotyp Trägern wurde ein Vergleich von delT-Allel Trägern zu Wildtypträgern durchgeführt, welcher in gleichsam signifikante Ergebnissen (C/D-Ratio: 1,6 vs. 2,8 ng/ml*mg; $p=0,003$) resultierte.

Für den **CYP1A2*1F** Polymorphismus konnte ein signifikanter Einfluss nur auf die Olanzapin Serum - und dosiskorrigierte Serum-Konzentration identifiziert werden, wobei heterozygote Genotyp-Träger die jeweils höchsten Olanzapin Serumspiegel zeigten (Tabelle 33). In Analogie zu CYP1A2*1D wurden für weitere statistische Auswertungen alle C-Allel Träger zusammengefasst. Hierbei zeigten C-Allel Träger ein signifikant erhöhtes C/D Verhältnis (1,98 vs. 1,49 ng/ml*mg; $p=0,039$) gegenüber AA-Genotyp Trägern.

Mit Hilfe eines ANCOVA Modelles wurde der Einfluss der beiden untersuchten Polymorphismen auf die Dosis-korrigierten Olanzapin Serumkonzentration unter Berücksichtigung der klinischen Faktoren Alter, Geschlecht, Gewicht zur Aufnahme und CYP1A2 Induktoren untersucht. Für den CYP1A2*1D Polymorphismus als festen Faktor ergeben sich mit den beschriebenen klinischen Kovariaten und dem CYP1A2*1F Genotyp vergleichbare Ergebnisse zur ANOVA (1,6 vs. 3,1 ng/ml*mg; $p<0,0001$, Abbildung 65). In Analogie ergeben sich für den CYP1A2*1F Polymorphismus als festen Faktor für C-Allel Träger eine erhöhte C/D Ratio gegenüber AA-Genotyp-Trägern (2,0 vs. 1,5 ng/ml*mg; $p=0,028$, Abbildung). Neben den beiden untersuchten Polymorphismen erreicht nur der klinische Faktor CYP1A2 Induktor ein signifikantes Niveau ($p=0,025$).

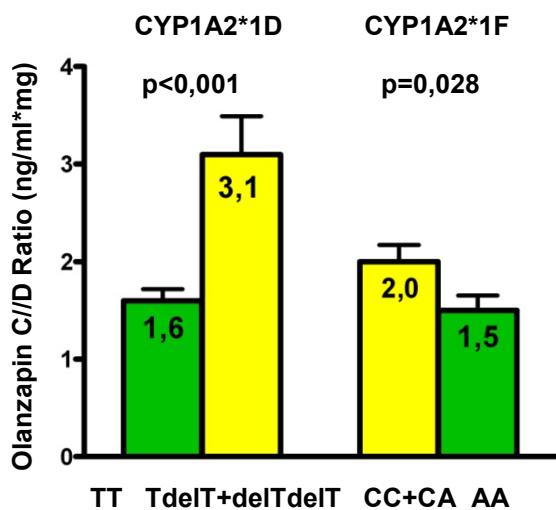


Abbildung 65: Einfluss des CYP1A2*1D bzw. *1F Genotyps auf Dosis-korrigierte Olanzapin Serumspiegel

Obwohl die beiden Marker auf dem gleichen Gen lokalisiert sind, besteht keine starke Korrelation der jeweiligen Genotyp-Gruppen ($r^2=0,024$), sodass von unabhängigen Effekten auf die Serumkonzentration auszugehen ist. Jedoch war in der untersuchten Population das Vorhandensein

eines delT-Allels an den AA-Genotyp des CYP1A2*1F Polymorphismus gebunden (8/9 Patienten), sodass eine Untersuchung des Interaktionseffektes nicht sinnvoll erscheint.

Die folgende Abbildung (Abbildung 66) gibt einen Überblick über die adjustierten Mittelwerte des CYP1A2*1D bzw. *1F Polymorphismus in Abhängigkeit von der Anwesenheit von CYP1A2 Induktoren:

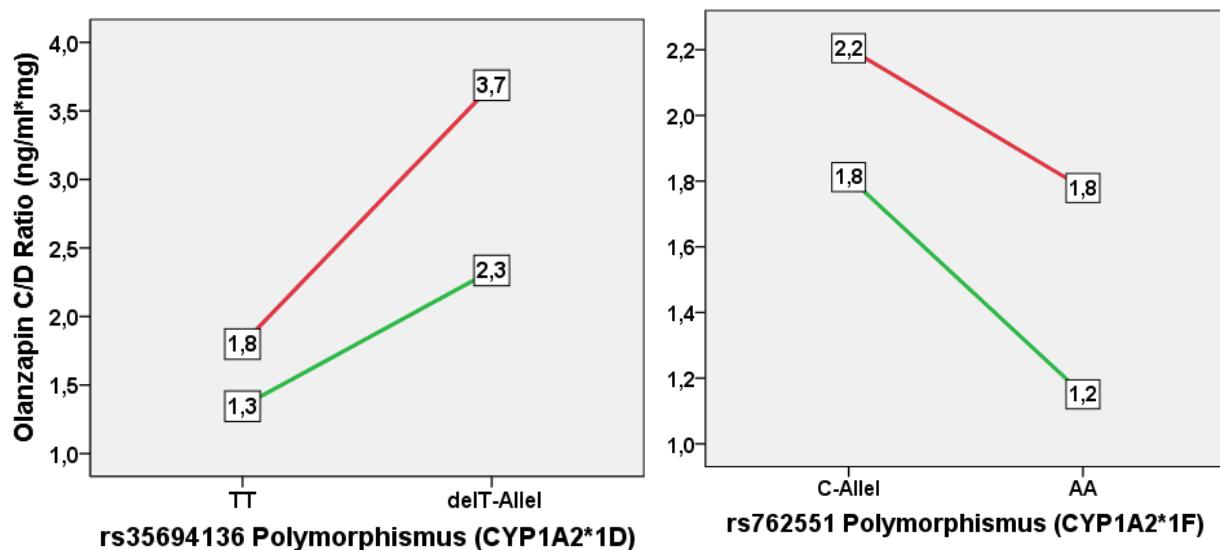


Abbildung 66: ANCOVA Interaktionsmodell CYP1A2*1D bzw. *1F Genotyp x CYP1A2 Induktoren (grün = Rauchen, Carbamazepin oder Valproinsäure vorhanden, rot = kein CYP1A2 Induktor) adjustiert auf die klinischen Faktoren Alter, Geschlecht, Gewicht zur Aufnahme

Sowohl für den CYP1A2*1D (Interaktionseffekt $p=0,276$) als auch für den CYP1A2*1F (Interaktionseffekt $p=0,613$) Polymorphismus zeigt sich ein vom CYP1A2 Induktoren Status unabhängiger Effekt des Genotyps mit jeweils höheren Serumspiegeln bei Patienten, die keine Induktoren erhalten hatten. Für AA-Genotyp Träger des CYP1A2*1F Polymorphismus zeigte sich ein nur schwach reduziertes C/D-Verhältnis bei Patienten, die zusätzlich CYP1A2 Induktoren erhalten haben.

Mit diesem linearen Modell (Tabelle 34) können 24,4 % der Varianz der Dosis-korrigierten Serumkonzentration von Olanzapin erklärt werden. Zudem stellt der CYP1A2*1D Genotyp die Variable mit dem größten Einfluss auf die korrigierten Serumspiegel dar. Bei Vernachlässigung der nicht signifikanten Faktoren Alter, Geschlecht und Gewicht zur Aufnahme entwickeln Patienten, die sowohl Träger des CYP1A2*1D (dT-Aallel) als auch des CYP1A2*1F (C-Aallel) Risiko-Allels sind und zugleich keinen CYP1A2 Induktor erhalten haben eine um 2,5-fach erhöhte C/D-Ratio.

Tabelle 34: Lineares Regressionsmodell mit der abhängige Variable Dosis-korrigierte Olanzapin Serumkonzentration (ng/ml*mg)

	B	Standardfehler	Beta	p
Konstante	2,733	0,620		<0,001
CYP1A2*1D ¹	1,542	0,411	0,365	<0,001
CYP1A2*1F ²	-0,524	0,234	-0,220	0,028
CYP1A2 Induktoren ³	-0,530	0,232	-0,222	0,025
Alter	-0,006	0,008	-0,076	0,469
Geschlecht	-0,274	0,269	-0,115	0,311
Gewicht zur Aufnahme	-0,001	0,009	0,007	0,950

¹ kodiert 0 für TT Genotyp, 1 für delT-Allel

² kodiert 0 für C-Allel, 1 für AA Genotyp

³ kodiert 0 für kein CYP1A2 induzierendes Medikament und 1 für Induktoren (Rauchen, Carbamazepin oder Valproinsäure)

3.4.5.2 rs2302429 (POR) und rs2011425 (UGT1A4)

Der **rs2302429 Polymorphismus** stellt eine Punktmutation der Guanin- zur Adenin-Base dar und befindet sich im Intron 11 des POR Genes, welches Elektronen von NADP auf das Häm-Zentrum des CYP überträgt und somit eine elementare Bedeutung für dessen Funktion darstellt.^{71, 72} Die Auswirkung des Polymorphismus auf Olanzapin Serumkonzentrationen ist unbekannt, jedoch legen sowohl in in-vitro^{74, 75} als auch in-vivo⁷⁶ Studien einen Einfluss auf die CYP1A2 Aktivität nahe.⁷¹

Der **rs2011425 Polymorphismus** ist in Exon 1 des UGT1 Genes lokalisiert, welches für das gleichnamige Phase II Enzym kodiert. Dieses katalysiert die Glukuronidierung zum Olanzapin-10-N-Glukuronid, dem Hauptmetaboliten des Olanzapinmetabolismus.⁵⁰ In zwei kürzlich publizierten Studien konnte eine verringerte Dosis-korrigierte Olanzapin Serumkonzentration in Trägern des UGT1A4*3 beobachtet werden.^{65, 80}

Für beide untersuchte Polymorphismen konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung relevanter Einflussfaktoren wie CYP1A2 Induktoren bzw. Carbamazepin, CYP1A2*1F und*1D Genotyp identifiziert werden. Zudem war die Verteilung von CYP1A2 Substraten und atypischen Medikationen in den verschiedenen Genotypgruppen vergleichbar.

Sowohl für den rs2302429 als auch für den rs2011425 Polymorphismus konnte kein signifikanter Einfluss auf die Serumspiegel identifiziert werden (Tabelle 35).

Tabelle 35: Olanzapin Serumkonzentrationen in Abhängigkeit vom untersuchten Genotyp

SNP	Dosis (mg)	Serum-konzentration (ng/ml)	C/D Ratio (ng/ml per mg)	Körpergewicht korrigierte C/D Ratio (ng/ml per mg/kg)
UGT1A4 *3 Genotyp				
TT (n=83,78)* TG (n=15) GG (n=0)	14,4 ± 7,4 16,3 ± 6,6 0,352	24,3 ± 18,2 26,4 ± 19,4 0,687	1,7 ± 1,2 1,6 ± 0,7 0,642	126,3 ± 92,2 114,8 ± 44,1 0,638
p				
POR rs2302429 Genotyp				
GG (n=64,61)* GA (n=30,28)* AA (n=4)	13,5 ± 6,9 17,4 ± 7,6 15,0 ± 7,1 0,053	22,0 ± 17,2 29,6 ± 19,7 29,0 ± 22,2 0,153	1,7 ± 1,3 1,7 ± 0,9 1,8 ± 0,8 0,971	122,2 ± 92,5 130,5 ± 77,7 116,2 ± 43,6 0,899
p				

Sowohl für den rs2302429 (GG/GA/AA: 1,7/1,8/1,7 ng/ml*mg; p=0,975) als auch für den UGT1A4*3 Polymorphismus (TT vs. TG: 1,8 vs. 1,5 ng/ml*mg; p=0,385) konnte in einem auf die Verzerrungsfaktoren Alter, Geschlecht, Basisgewicht, CYP1A2 Induktoren, sowie CYP1A2*1D und *1F Genotyp adjustierten Modell, kein signifikanter Einfluss auf die Dosis-korrigierte Olanzapin Serumkonzentration identifiziert werden. Zudem verblieb der Interaktionseffekt (CYP1A2 Induktoren x Genotyp) für die untersuchten Polymorphismen ohne signifikantes Ergebnis (p=0,090 bzw. p=0,333).

3.4.6 Einfluss von Serumkonzentrationen auf Nebenwirkungen sowie Response

Nachfolgend soll untersucht werden, ob erhöhte Olanzapin Serumkonzentrationen mit einem veränderten Ansprechen auf eine Psychopharmakotherapie sowie mit einer verstärkten Gewichtszunahme bzw. Nebenwirkungen einhergehen.

Anzumerken ist hierbei, dass es sich bei der untersuchten Population um ein heterogenes Patientenprofil mit mehrheitlich **F2 und F3 Diagnosen** handelt, welche sich signifikant in der Höhe der verabreichten Dosen und damit verbundenen Serumspiegeln unterscheiden (siehe Abschnitt 3.5.3). Zudem wiesen schizophrene Patienten (F2) eine erhöhte paranoide Symptomatik (PDS-P) vor Therapiebeginn auf (MWU; 7,0 vs. 5,0; p=0,007), wohingegen depressive Symptome signifikant niedriger auftraten als bei Patienten mit einer F3 Diagnose (MWU; 14 vs. 23; p=0,002). Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Fremdeinschätzung des Arztes konnte nicht identifiziert werden (MWU; p=0,716).

Erwartungsgemäß erhielten Patienten mit einem ausgeprägten Krankheitszustand nach CGI bzw. PDS-P auch erhöhte Olanzapindosen ($r^2=0,236$; $p=0,019$ bzw. $r^2=0,402$; $p<0,001$). Diese Beobachtung konnte nur für den PDS-P ($r^2=0,303$; $p=0,003$) auf die Olanzapin Serumkonzentrationen übertragen werden ($r^2=0,296$; $p=0,019$). Für den CGI konnte keine signifikante Korrelation mit Olanzapin Serumkonzentrationen identifiziert werden ($r^2=0,164$; $p=0,106$).

Unter den untersuchten Parametern (Tabelle 36) konnte nur für die Zustandsänderung der paranoiden Symptome (Δ PDS-P) und die Aufenthaltsdauer eine signifikante Korrelation mit Serumspiegeln des Olanzapins identifiziert werden.

Tabelle 36: Spearman Korrelation

Olanzapin Serumspiegel	Δ CGI1	Δ PDS-P	Δ PDS-D	Summe NW	Aufenthalts dauer	Δ Gewicht
r	0,025	0,226	0,146	0,036	0,256	0,029
p	0,814	0,033	0,172	0,740	0,011	0,786
n	91	89	89	88	98	89

Da ein signifikanter Zusammenhang zwischen Olanzapin Serumkonzentration und der Art der Diagnose besteht, wurden mögliche Korrelationen getrennt nach F2 bzw. F3 Diagnose betrachtet: Hierbei korrelierte nur für schizophrene Patienten (F2 Diagnose; n=40) ein verbessertes Ansprechen nach PDS-P mit erhöhten Serumkonzentrationen ($r^2=0,349$; $p=0,027$, Abbildung 67). In Analogie konnten in respondierenden Patienten (PDS-P>50 %) erhöhte Olanzapin Serumkonzentrationen identifiziert werden, wobei der Unterschied sowohl in der Gesamtpopulation als auch in schizophrenen Patienten kein signifikantes Niveau erreichte ($p=0,528$ vs. $p=0,705$). Zudem konnten keine erhöhten

Serumspiegel bei Patienten, die unter Nebenwirkungen litten identifiziert werden ($p=0,174$ bzw. $0,136$).

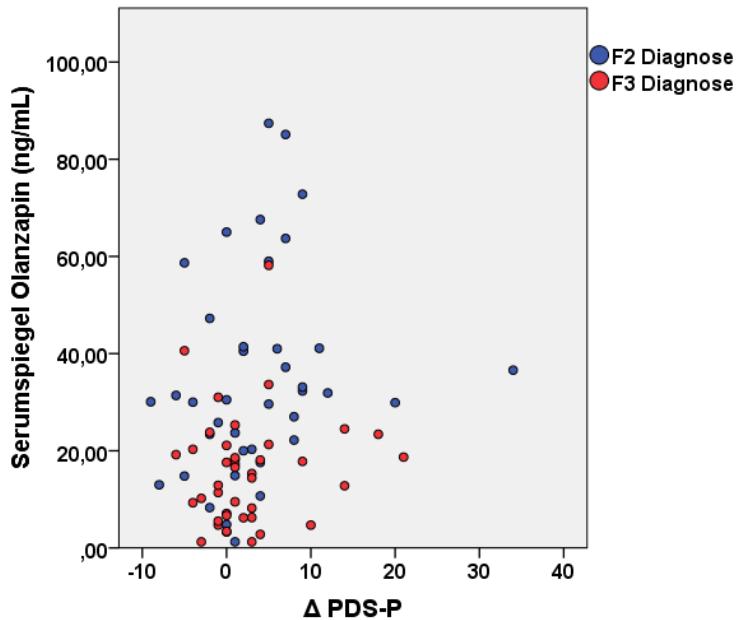


Abbildung 67: Spearman Korrelation der Olanzapin Serumspiegel mit der Zustandsänderung der paranoiden Symptomatik (Δ PDS-P)

Zwei unabhängige Studien konnten oberhalb einer Konzentrationsgrenze von 23,2 ng/ml ein verbessertes Ansprechen identifizieren.^{47, 264} Dies konnte in unserer Studienpopulation in Bezug auf den CGI nicht beobachtet werden. Für den PDS-P-Response zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied, auch wenn in der F2 Population deutlich mehr Patienten oberhalb des Schwellenwertes respondierten (39,3 % vs. 9,1 %; $p=0,122$). Die Zustandsänderung der paranoiden Symptome zeigte in Analogie hierzu eine verminderte Symptomreduktion für Patienten unterhalb des Konzentrationsbereiches von 23,2 ng/ml (F2: 1,0 vs. 5,0; $p=0,108$). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Baselineparametern des PDS-P bzw. PDS-D, sowie CGI in Respondern und Nicht-Respondern. Zudem war die Komedikation in beiden Gruppen vergleichbar.

In vorausgegangenen Studien konnte das Ansprechen einer antipsychotischen Therapie mit einer verstärkten Gewichtszunahme assoziiert werden (zusammengefasst in der Arbeit von Coccurello et al.).¹¹⁵ Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Population „Gewicht“ (siehe Abschnitt 3.6.3) zeigten PDS-P Responder (2,8 vs. 1,5 kg; $p=0,080$) und CGI- Responder (4,6 vs. 1,8 kg; $p=0,017$) eine erhöhte Gewichtszunahme gegenüber Nicht-Respondern. Eine Differenzierung in F2 bzw. F3 Diagnose konnte nur für schizophrene Patienten (F2-Diagnose), die nach PSD-P respondierten ($n=5$ vs. 32) eine signifikant erhöhte Gewichtszunahme identifizieren (5,7 vs. 1,8 kg; $p=0,007$). Darüber hinaus korrelierte eine erhöhte Gewichtszunahme mit einer verbesserten Zustandsänderung (CGI-2: $r^2=0,251$; $p=0,003$) sowie einem verbesserten Ansprechen nach CGI ($r^2=0,243$; $p=0,006$). Zwischen Respondern und Nicht-Respondern konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich verzerrender Faktoren wie Alter, Geschlecht, Gewicht zur Aufnahme und gewichtsinduzierender Komedikation identifiziert werden.

Problematisch bei der Interpretation der Ergebnisse erweist sich der Zusammenhang zwischen erhöhten PDS-P Werten vor Therapiebeginn und einigen untersuchten Parametern: Eine verstärkte paranoide Symptomatik vor Beginn der Therapie ist mit einer erhöhten Reduktion der Symptome nach 4 Wochen verbunden. Patienten mit einer erhöhten paranoiden Symptomatik erhalten jedoch auch erhöhte Olanzapindosen, welche wiederum mit der Höhe der Symptomreduktion korrelieren. Um die paranoide Ausgangs-Symptomatik als Verzerrungsfaktor hinreichend genug zu berücksichtigen, wurde die prozentuale Zustandsänderung nach PDS-P verwendet, welche die Verbesserung der Symptome ins Verhältnis zu den Symptomen vor Therapiebeginn setzt. Hierbei ergab sich sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der F2 Population keine signifikante Korrelation ($p>0,132$). Zudem wurde ein ANCOVA Modell mit der abhängigen Variable Δ PDS-P und den Covariaten Serumspiegel, PDS-P zur Aufnahme, Diagnose und Gewichtszunahme gebildet. Hierbei zeigte sich nur für den PDS-P zur Aufnahme ein signifikanter Einfluss auf die Veränderung der paranoiden Symptome ($p<0,001$).

Neben dem Response scheinen auch metabolische Nebenwirkungen positiv mit Olanzapin Serumkonzentrationen korreliert zu sein.⁴⁴ Eine Studie konnte in diesem Zusammenhang einen Grenzwert von 20,4 ng/ml identifizieren oberhalb dessen es zu einer verstärkten Gewichtszunahme kommt.²⁶⁵ Dies konnte in der untersuchten Population weder für die Gewichtszunahme (1,8 vs. 2,2 kg; $p=0,671$) noch für den Anteil an Patienten mit einer Gewichtszunahme über 7 % bestätigt werden ($p=0,302$).

3.4.7 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf Nebenwirkungen sowie Response

Von den vier untersuchten Punktmutationen konnten für den CYP1A2*1F und CYP1A2*1D Polymorphismus ein signifikanter Einfluss auf die Dosis-korrigierte Olanzapin Serumkonzentration identifiziert werden. Hierbei führte der CYP1A2*1D Polymorphismus bei gleichen Olanzapin Dosen zu erhöhten Serumkonzentrationen, wobei für den CYP1A2*1F Polymorphismus ein umgekehrter Effekt beobachtet werden konnte. Somit ist für beide Polymorphismen ein verändertes Ansprechen bzw. Nebenwirkungsrate auf Grund erhöhter oder erniedrigter Serumspiegel plausibel. Jedoch zeigte sich für die Polymorphismen CYP1A2*1D und *1F kein signifikanter Zusammenhang mit dem Ansprechen oder Nebenwirkungen. Dies könnte zu einem mit der Tatsache erklärt werden, dass sich 98 % der Patienten innerhalb der therapeutischen Breite von (20-80 ng/ml)²⁶⁶ befanden und im Rahmen des TDM eine Dosisoptimierung stattgefunden hatte. Hieraus resultiert nur eine geringe Anzahl an Patienten, die stark abweichende Serumspiegel zeigen, und bei welchen erhöhte Nebenwirkungsraten zu erwarten wären.

Um den Einfluss des CYP1A2*1D und *1F Polymorphismus in einer größeren Population auf Nebenwirkungen sowie Response zu untersuchen, wurden Patienten der Gesamtpopulation, welche mit Olanzapin und Clozapin (größtenteils über CYP1A2 verstoffwechselt) therapiert wurden, zu einer Kohorte zusammengeschlossen. Für diese 205 Patienten konnte ein signifikanter Einfluss eines CYP1A2 Induktoren auf den PDS-P-Response in schizophrenen Patienten identifiziert werden: Hierbei zeigten schizophrene Patienten (n=84), die einen Induktoren erhalten hatten, eine signifikant erhöhten Anteil an Nicht-Respondern (79,5, vs. 55,0 %; p=0,016). Einen Trend für ein vermehrtes Auftreten in Nicht-Respondern konnte zudem in Trägern des CYP1A2*1D TT-Genotyps (71,8 vs. 46,2 %; p=0,104) und des CYP1A2*1F AA-Genotyps (76,2 vs. 59,5 %, p=0,102) identifiziert werden.

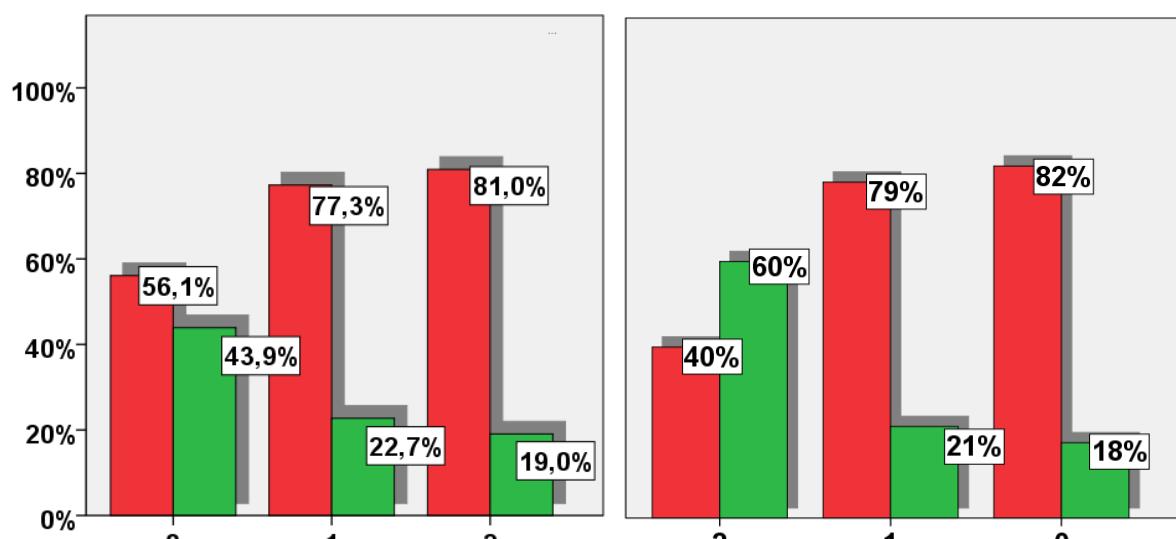


Abbildung 68: Ansprechen nach PDS-P in Abhängigkeit vom Risikofaktor; links Risikomodell 1 und rechts Risikomodell 2 adaptiert nach Czerwensky et al.⁵⁴; rot = kein Ansprechen, grün = Ansprechen.

Eine Kombination der beschriebenen Einflussgrößen konnte auch für die Risikomodelle 1 ($p=0,076$) und 2 ($p=0,002$; Erläuterung der Risikomodelle siehe Abschnitt 3.4.4) einen Zusammenhang mit dem Ansprechen nach PDS-P identifizieren (Abbildung 68). Demnach führt die Kombination von Faktoren (CYP1A2*1D delT-Allel, CYP1A2*1F C-Allels und die Nicht-Anwendung eines CYP1A2 Induktoren), welche zu erhöhten Serumkonzentration führen, zu einer verbesserten Vorhersage des Therapieansprechens (Abbildung 68 rechts). Die Rate an Patienten, die nach PDS-P auf eine Therapie ansprachen war bei 2 Faktoren deutlich höher als bei Patienten mit einem bzw. keinem Faktor (60 vs. 21,4 vs. 17,6 %; Abbildung 68 rechts). Für den CGI-Response konnte kein signifikanter Zusammenhang beobachtet werden.

In einer Korrelationsanalyse zeigte sich zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Risikomodel 2 und der prozentualen paranoiden ($n=82$; $r=0,199$; $p=0,023$) sowie dem CGI-2 ($n=193$; $r=-0,177$; $p=0,005$). Eine direkte Korrelation mit der Summe der Nebenwirkungen konnte nicht identifiziert werden. In Bezug auf das Auftreten von starken gegenüber leichten Nebenwirkungen zeigte nur der CYP1A2*1D Polymorphismus eine erhöhte Nebenwirkungsrate in delT-Trägern (54,5 vs. 31,2 %; $p=0,029$).

In Bezug auf die Verteilung möglicher Einflussfaktoren (PDS-P bzw. CGI zur Aufnahme, Alter zu Krankheitsbeginn, Erste Episode, Clozapin-Therapie) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den jeweiligen Risikogruppen des Risikomodelles 2. Als Ausnahme ist hiervon ein erhöhter Anteil an Clozapin behandelten schizophrenen Patienten für Risikostufe 2 des Risikomodells 1 zu nennen ($p=0,018$). Zudem waren die Risikogruppen hinsichtlich der Komedikation (Atypika, Typika, Moodstabilizer, Antidepressiva) vergleichbar.

In einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Modell (siehe Abschnitt) konnte in schizophrenen Patienten für das Risikomodell 2 gleichsam einen Trend für eine verstärkte Zustandsänderung nach PDS-P mit Zunahme der Risikostufe (=erhöhte Serumkonzentrationen) beobachtet werden (2,2/2,1/6,1; $p=0,053$).

3.5 Ergebnisse der Population „Response“

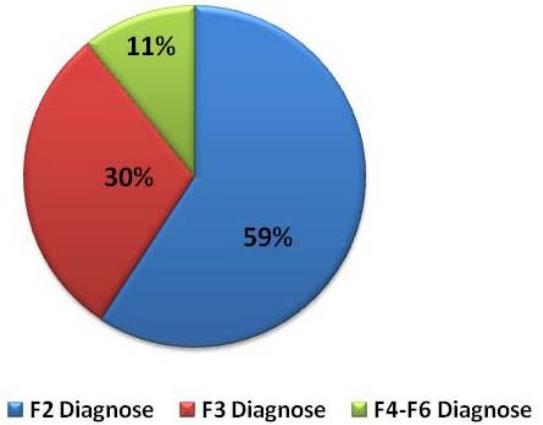
3.5.1 Demographische Beschreibung

Von den 377 Patienten der Population „Response“ waren 224 (59,4 %) weiblich und 153 (40,6 %) männlich. Der Anteil der Raucher betrug 45,5 %. Eine positive Familienanamnese bezüglich psychiatrischer Erkrankungen hatten 165 (45,6 %) von 362 Patienten, für die diese Information verfügbar war. Zudem zeigten 91 (24,6 %) von 370 Patienten eine erste Episode einer psychiatrischen Erkrankung. Für die verbleibenden 7 Patienten wurde keine Information hinsichtlich dem Auftreten einer ersten Episode hinterlegt.

Tabelle 37 und Abbildung 69 geben einen Überblick über die demographischen Daten, den Krankheitszustand der Patienten zum Aufnahmezeitpunkt und die Verteilung der Diagnosen:

Tabelle 37 und Abbildung 69

Variable	n	Mittelwert ± SD
Alter	377	40,7 ± 14,7
Gewicht Aufnahme	357	74,8 ± 16,8
Größe	376	171,2 ± 9,0
BMI Aufnahme	356	25,5 ± 5,3
Aufenthaltsdauer	377	70,7 ± 41,6
PDS-P bei Aufnahme	341	6,0 (2,0-13,0)
PDS-D bei Aufnahme	341	18,0 (10,0-26,0)
CGI-Aufnahme	373	6,0 (5,5-7,0)



Auch diese Basisparameter weichen von der in 3.6.1 beschriebenen Population „Gewicht“ nur marginal ab. Der Durchschnittspatient ist hierbei um die 40 Jahre alt und gekennzeichnet durch ein leichtes Übergewicht (BMI~25), ausgeprägte paranoide und depressive Symptome und eine F2 Diagnose in der Mehrheit der Fälle.

3.5.2. Medikation

Die Medikation der Population „Response“ wurde zusammen mit der Population „Gewicht“ beschrieben. Für nähere Informationen sei auf das Kapitel 3.6.2 verwiesen.

3.5.3. Klinische Einflussfaktoren und Wechselwirkungen

Tabelle 38 gibt einen Überblick über die Response-Skalen bei Aufnahme, nach 4 Wochen und über die Veränderung von PDS-D bzw. PDS-P differenziert nach F2 und F3 Diagnose. Innerhalb von 4 Wochen zeigten sich eine signifikante Änderung der paranoiden und depressiven Selbstbeurteilungsskalen sowie der Fremdbeurteilungsskala durch den Arzt ($p<0,0001$; Wilxocon Ranksummentest; Tabelle 38). Übereinstimmend wurde der Zustand nach 4 Wochen durch einen Arzt in 52,8 % der Fälle als besser bzw. viel besser eingestuft. Trotz einer deutlichen Senkung der Symptomatik sprachen nach Definition nur 41,1 % der Patienten in Bezug auf die PDS-P-Skala (Δ PDS-P>50 %) sowie 24,7 % in Bezug auf PDS-D(Δ PDS-P>50 %) auf die Therapie an. Das schwache Ansprechen auf den PDS-D ist unter Berücksichtigung einer antipsychotischen Therapie, bei welcher die Senkung der paranoiden Symptome im Vordergrund steht, zu vernachlässigen und wird in den weiteren Auswertungen nicht weiter berücksichtigt. Eine separate Betrachtung der Diagnosen zeigt für schizophrene Patienten gegenüber Patienten mit einer F3 Diagnose signifikant erhöhte paranoide Symptome in Verbindung mit einer erhöhten paranoiden Symptomreduktion und einer erniedrigten depressiven Symptomatik (Tabelle 38).

Tabelle 38 Überblick über die Response-Skalen und Summe der Nebenwirkungen

Variable	n ^a	Population „Response“	F2 Diagnose n=139	F3 Diagnose n=77	p
PDS-P Aufnahme	341/209/98	6,0 (2,0-13,0)	7,0 (3,0-16,0)	3,0 (0,0-7,25)	<0,001
PDS-P 4 Wochen	278/160/88	3,0 (1,0-8,0)	4,5 (2,0-10,0)	2,0 (0,0-5,0)	<0,001
PDS-D Aufnahme	341/209/98	18,0 (10,0-26,0)	15,0 (9,0-23,0)	23,0 (13,0-28,0)	<0,001
PDS-D 4 Wochen	278/160/88	13,0 (6,0-20,25)	11,0 (6,0-17,0)	15,0 (7,0-23,0)	0,005
CGI-Aufnahme	373/225/113	6,0 (5,5-7,0)	6,0 (5,0-7,0)	6,0 (6,0-7,0)	0,832
CGI-4 Wochen	338/204/104	5,0 (4,0-6,0)	5,0 (4,0-6,0)	5,0 (4,0-6,0)	0,676
Summe NW	332/196/104	2,0 (0,0-4,0)	2,0 (0,0-4,0)	2,0 (0,0-3,0)	0,084
Δ PDS-P	275/159/86	2,0 (0,0-6,0)	3,0 (0,0-7,0)	1,0 (-1,0-4,0)	0,007
Δ PDS-D	275/159/86	4,0 (-1,0,-9,0)	3,0 (-1,0-8,0)	6,0 (-1,0-12,0)	0,056

Eine Differenzierung nach **Geschlecht** zeigte sowohl in den Basisparametern des Response als auch in der Symptomreduktion der jeweiligen Response-Skalen keine signifikanten Unterschiede für Männer und Frauen ($p>0,186$).

Ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit langjähriger Symptomatik und solchen, die **zum ersten Mal eine ausgeprägte psychotische Symptomatik** entwickelten, konnte für die Zustandsbesserung durch den behandelnden Arzt (CGI-2) und die Veränderung des CGI ($p<0,001$

bzw. $p=0,001$) identifiziert werden: Hierbei zeigten zuvor unbehandelte Patienten eine ausgeprägtere Besserung der Krankheitszustandes ($1,3 \pm 1,4$ vs. $-0,9 \pm 1$) unabhängig von der Art der Diagnose. Übereinstimmend korrelierte ein früherer Krankheitsbeginn ($r=-0,173$; $p=0,002$) und eine damit verbundene längere Krankheitsdauer ($r=0,140$; $p=0,013$) mit einer schlechteren Zustandsänderung (CGI-2).

Um zu beurteilen, ob die **Medikation** einen Einfluss auf die Besserung des Krankheitszustandes hatte, wurden alle Patienten der Population „Response“, die eine Monotherapie mit den in der Studie verwendeten Antipsychotika (Olanzapin, Clozapin, Risperidon, Quetiapin, Amisulprid und Paliperidon) erhalten hatten, auf Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Antipsychotikum untersucht: Vor Beginn der Therapie zeigte sich ein signifikanter Unterschied der CGI Skala ($p=0,042$), und des PDS-P ($p=0,020$) in Abhängigkeit vom Antipsychotikum. Hierbei erhielten Patienten mit erhöhten paranoiden Symptomen und einem schweren Krankheitszustand bevorzugt das Antipsychotikum Clozapin. Eine Differenzierung nach Clozapin-Therapie und Nicht-Clozapin-Therapie resultierte in gleichsam erhöhten paranoiden Symptomen sowohl vor Therapie (16 vs. 6; $p=0,007$) als auch nach der Therapie (10,5 vs. 3; $p=0,020$). Wohlgernekt konnte kein signifikanter Unterschied in den untersuchten Antipsychotikagruppen hinsichtlich der Verbesserung des Krankheitszustandes bzw. der paranoiden und depressiven Symptome beobachtet werden.

Zudem zeigte sich kein signifikanter Einfluss einer atypischen ($p>0,146$) und einer typischen ($p>0,113$) **Komedikation** sowie einer adjuvanten Therapie mit einem Moodstabilizer ($p>0,241$) auf die Verbesserung des Symptome. Im Gegensatz hierzu konnte für Patienten ohne eine antidepressive Komedikation ein erhöhte Reduktion der paranoiden Symptome beobachtet werden (5,0 vs. 2,5; $p<0,001$), die jedoch kein signifikantes Niveau für die relative paranoide Symptomreduktion erreichte ($p=0,196$).

Responder nach CGI und PDS-P zeigten keinen signifikanten Unterschied in den Parametern Alter, Geschlecht, sowie Komedikation (atypisches bzw. typisches Antipsychotikum und Moodstabilizer). Patienten ohne depressive Komedikation zeigten sowohl nach CGI- als auch nach PDS-P (F2 Patienten) ein erhöhtes Ansprechen ($p=0,007$ bzw. 0,013). Übereinstimmend konnten in Respondern nach CGI sowie PDS-P verringerte depressive Symptome identifiziert werden (16 vs. 18; $p=0,019$ bzw. 15 vs. 20; $p=0,041$). Patienten, die nach CGI respondierten, waren zu einem erhöhten Anteil Patienten mit einer ersten Episode (44,2 % vs. 23,6 %; $p=0,004$), wobei diese Beobachtung nicht auf Patienten, die nach PDS-P respondierten, übertragen werden konnte ($p=0,451$). Die Verteilung des Antipsychotikums Clozapin zeigte keinen signifikanten Unterschied in CGI-Respondern gegenüber Non-Respondern ($p=0,769$), während ein erhöhter Anteil an Clozapin-Patienten in Non-Respondern identifiziert werden konnte (13,5 % vs. 2,8 %; $p=0,003$).

Die Beurteilung des Krankheitszustands zum Aufnahmezeitpunkt bzw. nach 4 Wochen durch den behandelnden Arzt (CGI-1) korrelierte mit der Einschätzung der Patienten, sowohl für PDS-P (0,255; $p<0,001$ bzw. 0,301; $p>0,001$) als auch für PDS-D (0,155; $p=0,004$ bzw. 0,323; $p>0,001$). Zudem gab es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Differenz des CGI1, der Beurteilung der

Zustandsänderung durch den behandelnden Arzt (CGI2; -0,548, $p<0,001$) des PDS-P (0,231; $p<0,001$) und PDS-D (0,194; $p=0,002$).

Außerdem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen hohen CGI1-Wert bzw. PDS-P und PDS-D Werten vor Therapiebeginn und einer verstärkten Reduktion der Symptomatik der jeweiligen Skala (Δ CGI und CGI1: $r^2=0,396$; $p<0,001$ / Δ PDS-P und PDS-D: $r^2=0,638$; $p<0,001$ / Δ PDS-D und PDS-D: $r^2=0,409$; $p<0,001$). Weiterhin fand sich eine signifikante Korrelation zwischen der stationären Aufenthaltsdauer und der Zeitspanne bis zum Beginn des Ansprechens ($r^2 = 0,561$; $p < 0,001$) sowie dem Δ CGI ($r^2 = -0,271$; $p < 0,001$) und Δ PDS-D ($r^2=-0,129$; $p=0,032$).

3.5.4. Exemplarisches Vorgehen

In den nachfolgenden Kapiteln werden die statistischen Ergebnisse, der unter 2.3.11.2 beschriebenen Polymorphismen aufgeführt, welche im Kontext einen verbesserten Therapievorhersage untersucht wurden.

Da für die Mehrheit der Response-Parameter keine Normalverteilung vorlag, wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht parametrische Verfahren angewendet. Die Beurteilung der paranoiden Symptome erfolgte auf Grund starker Unterschiede in Abhängigkeit von der Diagnose, differenziert nach Patienten mit schizophrenen sowie affektiven Störungen. Für den CGI und Nebenwirkungen konnten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Diagnose identifiziert werden, weshalb keine Differenzierung nach Erkrankung vorgenommen wurde.

Die Untersuchung der paranoiden Symptome (PDS-P Aufnahme und Differenz) und der Beurteilung des Krankheitszustandes durch den Arzt (CGI-1) sowie der Zustandsänderung (CGI-2) erfolgte mittels Mann-Whitney-U bzw. Kruskal-Wallis Test. Zudem wurde das Response-Verhalten in Abhängigkeit vom untersuchten Genotyp mittels Chi²-Test bzw. Fisher-Exakt-Test untersucht. Hierbei wurde auf gleichmäßige Verteilung der im Kapitel 3.5.3 beschriebenen Einflussgrößen (PDS-P Aufnahme, Alter zu Krankheitsbeginn, first Episode Patienten, Komedikation und Clozapin-Therapie) geprüft. Für den rs28656907/rs28373093 Polymorphismus im ABCB1 Gen wurde zudem auf eine homogene Verteilung von PGP-Inhibitoren getestet. Hierbei wurden bekannte PGP-Inhibitoren (Omeprazol, Calciumantagonisten, Statine) mit weiteren Medikamenten, für die ein Einfluss auf die Inhibition postuliert wird (TCA, Antidepressiva, typische Antipsychotika) ²⁶⁷⁻²⁷⁰ zu einem Faktor zusammengefasst (erhalten bzw. nicht erhalten und Anzahl der PGP-Inhibitoren in den Ausprägungen 0,1 >2) und die gleichmäßige Verteilung mit Hilfe des Chi²-Test überprüft.

Die paranoide Zustandsänderung erfüllte als einziger Parameter die Bedingungen, die eine Generierung eines ANCOVA Modelles zuließen. Dieses auf Verzerrungsfaktoren adjustierte Modell beinhaltet als Kofaktoren den PDS-P zur Aufnahme, das Alter des Krankheitsbeginnes den first Episode Status (ja bzw. nein), den Status einer antidepressiven Komedikation (Ja bzw. Nein), Status einer Clozapin-Therapie (Ja bzw. Nein). Die Ergebnisse sind hierbei nur für die Kohorte der schizophrenen Patienten beschrieben, mit Ausnahme von signifikanten Zusammenhängen in der Kohorte mit affektiven Störungen.

Zudem wurde nach oben beschriebenem Modell ein Interaktionseffekt von Genotyp und Geschlecht untersucht. Der Vergleich erfolgte an Hand eines ANCOVA Modelles mit der abhängigen Variable Δ PDS-P und den unabhängigen Faktoren Genotyp und Geschlecht, welche auf die Kovariaten PDS-P zur Aufnahme, first Episode Status, Status einer antidepressiven Komedikation bzw. einer Clozapin Therapie adjustiert wurden.

3.5.5. Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf das Ansprechen

3.5.5.1 rs1049353 (CNR1)

Der rs1049353 Polymorphismus befindet sich in Codon 453 des CNR1 Genes, welches für den G-Protein gekoppelten Cannabinoid Rezeptor 1 kodiert (CB1).¹⁷⁵ Da für das Cannabinoid-System eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie postuliert wurde,¹⁶⁷ stellt die untersuchte Punktmutation im CB1 Rezeptor einen plausiblen Marker im Kontext eines veränderten Ansprechens auf eine Psychopharmakotherapie dar und konnte bereits in einer Studie mit einer erhöhten Häufigkeit in Respondern assoziiert werden.¹⁷⁵

Für den untersuchten Polymorphismus konnte kein signifikanter Einfluss auf den PDS-P vor Therapiebeginn identifiziert werden. Zudem waren die Genotypgruppen hinsichtlich der Komedikation (Atypika, Typika, Moodstabilizer, Antidepressiva) und in der Verteilung von Patienten mit einer ersten Episode und Clozapin-Therapie vergleichbar. Das Alter zu Krankheitsbeginn zeigte einen signifikanten Unterschied in Abhängigkeit vom Genotyp ($p=0,031$), nicht jedoch in den nach Diagnosen differenzierten Kohorten.

Nach 4 Wochen Therapie konnte eine verringerte Reduktion sowohl der absoluten als auch der relativen paranoiden Symptome für Träger des rs1049353 AA-Genotyps beobachtet werden ($p=0,010$ bzw. 0,058 Tabelle 39). Eine Differenzierung nach Diagnose resultierte in vergleichbaren Ergebnissen für schizophrene Patienten, zeigte jedoch einen gegensätzlichen Trend mit verstärkter Symptomverbesserung für AA-Genotyp Träger mit einer F3 Diagnose. Auf Grund der geringen Anzahl an homozygoten A-Allel Trägern mit affektiven Störungen sollte das Ergebnis jedoch mit Vorsicht interpretiert werden.

Tabelle 39 Kruskal-Wallis Test der PDS-P Parameter in Abhängigkeit vom rs1049353 Genotyp

Variable n*	Population „Response“				F2				F3			
	GG 194	GA 124	AA 22	P	GG 119	GA 76	AA 13	P	GG 57	GA 38	AA 3	P
PDS-P Aufnahme	6,0	7,0	6,5	0,969	7,0	8,5	5,0	0,142	5,0	2,0	7,0	0,392
PDS-P 4 Wochen	4,0	3,0	4,0	0,068	5,0	4,0	7,0	0,698	3,0	1,0	0,0	0,006
Δ PDS-P	2,0	3,5	0,0	0,010	2,0	4,0	0,0	0,007	1,0	1,0	7,0	0,174
%Δ PDS-P	39,6	58,6	14,3	0,058	38,9	50,0	-7,1	0,117	33,3	69,2	90,6	0,047

* Die Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen Genotyp bezieht sich auf den PDS-P Aufnahme, für eine bessere Übersicht ist die Genotypverteilung anderer Parameter in dieser Tabelle nicht aufgeführt und wird im Anhang A9 dargestellt

In Analogie konnte unter den schizophrenen Nicht-Respondern nach PDS-P der höchste prozentuale Anteil an AA-Genotyp Trägern identifiziert werden, wobei kein signifikantes Niveau erreicht wurde ($p=0,194$). Zudem zeigte sich kein signifikanter Unterschied des rs1049353 Polymorphismus bei Respondern und Nicht-Respondern nach CGI.

Im Gegensatz zur ANOVA konnte in einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Model kein signifikanter Einfluss des 1049353 Genotyp auf die paranoide Symptomverbesserung schizophrener Patienten beobachtet werden ($p=0,220$). Durch Einbeziehung des Geschlechtes konnte dieses ($p<0,001$) neben dem untersuchten Polymorphismus ($p=0,013$) und dem Interaktionseffekt (Geschlecht x Genotyp; $p=0,005$, Abbildung 70) jedoch als signifikante Einflussgrößen identifiziert werden.

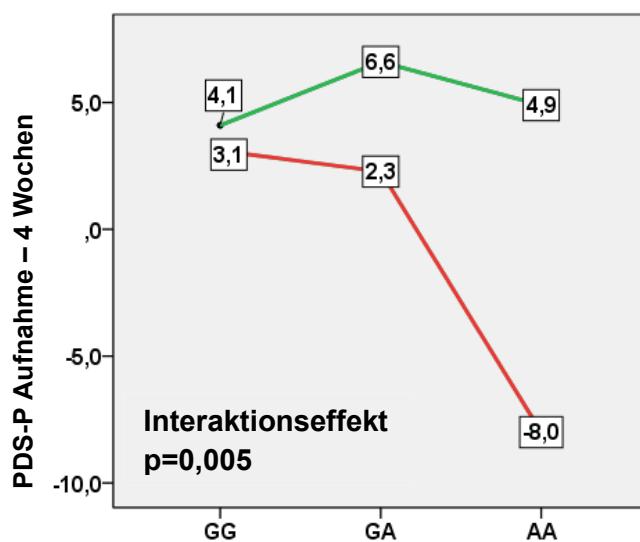


Abbildung 70: ANCOVA Interaktionsmodell rs1049353 Genotyp x Geschlecht (grün = weiblich, rot = männlich)

Patienten mit einer F3 Diagnose zeigten übereinstimmend mit den Ergebnissen der ANOVA eine Reduktion der paranoiden Symptome mit dem A-Allels (1,1/3,5/6,4; $p=0,011$). Durch Einbeziehung des Geschlechtes konnte kein signifikanter Interaktionseffekt identifiziert werden ($p=0,621$).

In Bezug auf die Nebenwirkungshäufigkeit zeigten AA-Genotyp-Träger einen Trend für ein geringeres Auftreten von mäßigen bis deutlichen Nebenwirkungen (12,5 % vs. 87,5 %; $p=0,083$).

3.5.5.2 rs3787429 und rs37874230 (HR3)

Sowohl der rs3787429 als auch der rs3787430 Polymorphismus befinden sich in Exon 3 des HR3 Genes, welches für den gleichnamigen, präsynaptischen Auto- und Heterorezeptor kodiert, der eine relevante Rolle in der Regulierung der Histaminfreisetzung⁸⁴ und in der Modulation weiterer Neurotransmitter spielt.⁸⁵ Für die untersuchten Polymorphismen konnte in einer kürzlich publizierten Studie ein signifikanter Zusammenhang mit dem Ansprechen auf eine antipsychotische Risperidon Therapie gezeigt werden.⁸⁶ Nach den Ergebnissen einer LD-Analyse der Studienpopulation stehen die beiden Marker in einem mäßigen LD ($D' = 0,759$, $r^2 = 0,155$).

Für beide untersuchten Polymorphismen konnte kein signifikanter Einfluss auf den PDS-P vor Therapiebeginn identifiziert werden. Zudem waren die Genotypgruppen hinsichtlich der Komedikation (Atypika, Typika, Moodstabilizer, Antidepressiva), des Alters zu Krankheitsbeginn und in der Verteilung von Patienten mit einer ersten Episode und Clozapin-Therapie vergleichbar.

Nach 4 Wochen konnte ein Anstieg der paranoiden Symptomatik mit dem T-Allel des **rs3787429** Polymorphismus beobachtet werden ($p = 0,042$, Tabelle 40). In Analogie zeigten TT-Genotyp Träger die schwächste relative Symptomreduktion, wobei kein signifikantes Niveau sowohl in der Gesamtpopulation als auch in den nach Diagnose differenzierten Kohorten erreicht wurde ($p < 0,084$).

Tabelle 40 Kruskal-Wallis Test der PDS-P Parameter in Abhängigkeit vom rs3787429 Genotyp

Variable n*	Population „Response“				Population „Response“				F2				F3			
	CC 116	CT 167	TT 58	P	CC 70	CT 102	TT 37	P	CC 36	CT 46	TT 16	P	CC 36	CT 46	TT 16	P
PDS-P Aufnahme	6,5	6,0	6,5	0,767	7,0	7,0	9,0	0,894	2,0	5,0	2,0	0,184				
PDS-P 4 Wochen	3,0	3,0	5,0	0,042	4,0	4,0	7,0	0,130	1,0	2,5	3,0	0,067				
Δ PDS-P	2,0	2,0	2,0	0,643	4,0	2,0	2,5	0,531	0,0	1,5	0,0	0,561				
%Δ PDS-P	57,1	40,0	33,3	0,153	57,1	35,8	33,3	0,084	50,0	44,6	69,2	0,788				

* Die Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen Genotyp bezieht sich auf den PDS-P Aufnahme, für eine bessere Übersicht ist die Genotypverteilung anderer Parameter nicht aufgeführt

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung war der Anteil an Patienten die nach PDS-P nicht auf die Therapie ansprachen für TT-Genotyp Träger höher als für TC- und CC-Genotyp Träger (73,9 % vs. 62,5 % vs. 46,3 %, $p = 0,047$), wobei dieser Effekt nur in der schizophrenen Kohorte ein signifikantes Ergebnis erzielte. Ein signifikanter Zusammenhang des rs3787429 Polymorphismus mit weiteren untersuchten Skalen (CGI) konnte nicht identifiziert werden.

In einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Model konnte kein signifikanter Einfluss des **rs3787429** Genotyp auf die paranoide Zustandsänderung in schizophrenen Patienten identifiziert werden ($p=0,212$). Zudem konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt werden (Interaktionseffekt Geschlecht x Genotyp; $p=0,654$).

Nach 4 Wochen zeigten Träger des **rs3787430** CC-Genotyps eine besseres Ansprechen gegenüber T-Allel Trägern ($p=0,022$; Tabelle 41). Auf Grund der geringen Anzahl an TT-Genotyp Trägern ($n=4$; schizophrene Kohorte) wurden in den nachfolgenden Analysen alle T-Alle Träger zusammengefasst (CT+TT).

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung war der Anteil an Patienten die nach PDS-P auf die Therapie ansprachen für CC-Genotyp Träger signifikant höher als für T-Allele Träger (81,5 % vs. 18,5 %, $p=0,012$), wobei dieser Effekt nur in der schizophrenen Kohorte ein signifikantes Ergebnis erzielte. Ein signifikanter Zusammenhang des rs3787430 Polymorphismus mit weiteren untersuchten Skalen (CGI) konnte nicht identifiziert werden.

Tabelle 41 Kruskal-Wallis Test der PDS-P Parameter in Abhängigkeit vom rs3787430 Genotyp

Variable n*	Population „Response“				Population „Response“				F2				F3			
	CC 243	CT 90	TT 8	P	CC 147	CT 58	TT 4	P	CC 77	CT 21	TT 0	P	CC 77	CT 21	TT 0	P
PDS-P Aufnahme PDS-P 4 Wochen	6,0	7,0	4,0	0,665	7,0	8,0	3,0	0,330	3,0	2,0			0,763			
PDS-P Aufnahme PDS-P 4 Wochen	3,0	4,0	6,0	0,194	4,0	5,0	5,0	0,176	2,0	2,5			0,515			
Δ PDS-P	2,0	1,0	-1,0	0,215	3,0	2,0	1,0	0,232	1,0	0,0			0,281			
%Δ PDS-P	50,0	39,4	8,0	0,064	50,0	26,7	28,6	0,022	50,0	50,0			0,391			

* Die Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen Genotyp bezieht sich auf den PDS-P Aufnahme, für eine bessere Übersicht ist die Genotypverteilung anderer Parameter nicht aufgeführt

In einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Model konnte ein Einfluss des **rs3787430** auf die paranoide Zustandsänderung in schizophrenen Patienten identifiziert werden ($p=0,056$), welcher unter Einbeziehung des Geschlechts ($p=0,002$) ein signifikantes Niveau erreichte ($p=0,025$). In Analogie zur ANOVA zeigten CC-Genotyp Träger einen erhöhte Reduktion der paranoiden Symptome (4,3 vs. 2,0). Ein Interaktionseffekt zwischen Genotyp und Geschlecht konnte hierbei nicht beobachtet werden ($p=0,469$).

3.5.5.3 rs1344706 ZNF804A Gen

Der rs1344706 Polymorphismus ist im Intron 2 des ZNF804A Genes lokalisiert und konnte im Rahmen von GWAS robust mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen assoziiert werden.^{97, 99,100,101} Zudem zeigte der untersuchte Polymorphismus veränderte Transkriptionsspiegel des ZNF804A Genes,^{98,99,102} welchem eine entscheidende Rolle in der Regulation Schizophrenie-relevanter Gene zugeschrieben wird.⁹⁸ Studien postulieren eine verminderte Verbesserung des PANSS Scores bei Vorliegen des rs1344706 AA-Genotyps.^{103, 104}

Für den untersuchten Polymorphismus konnte kein signifikanter Einfluss auf den PDS-P vor Therapiebeginn identifiziert werden. Zudem waren die Genotypgruppen hinsichtlich der Komedikation (Atypika, Typika, Moodstabilizer, Antidepressiva), des Alters zu Krankheitsbeginn und in der Verteilung von Patienten mit einer ersten Episode und Clozapin-Therapie vergleichbar.

Nach 4 Wochen zeigten Träger des rs1344706 GG-Genotyps die niedrigste prozentuale Reduktion der paranoiden Symptome ($p=0,040$; Tabelle 42), wobei dies nur in schizophrenen Patienten und nicht in Patienten mit einer affektiven Störung beobachtet werden konnte (siehe Tabelle).

Tabelle 42 Kruskal-Wallis Test der PDS-P Parameter in Abhängigkeit vom rs1344706 Genotyp

Variable n*	Population „Response“				F2				F3			
	TT 132	TG 162	GG 47	P	TT 78	TG 100	GG 31	P	TT 44	TG 45	GG 9	P
PDS-P Aufnahme	5,0	7,0	7,0	0,540	7,0	8,0	6,0	0,551	3,0	2,0	6,0	0,582
PDS-P 4 Wochen	3,0	3,0	5,0	0,076	4,0	6,0	5,0	0,140	1,0	2,5	2,0	0,656
Δ PDS-P	2,0	2,0	0,0	0,281	3,0	4,0	0,0	0,193	1,0	0,0	1,0	0,439
%Δ PDS-P	50,0	45,5	20,0	0,040	53,0	40,0	4,2	0,042	50,0	39,4	50,0	0,478

* Die Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen Genotyp bezieht sich auf den PDS-P Aufnahme, für eine bessere Übersicht ist die Genotypverteilung anderer Parameter nicht aufgeführt

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung war der Anteil an Patienten die nach PDS-P nicht auf die Therapie ansprachen für GG-Genotyp Träger deutlich höher als für TG- und TT-Genotyp Träger (74,4 % vs. 55,7 % vs. 56,9 %, $p=0,101$). Ein signifikanter Zusammenhang des rs1344706 Polymorphismus mit weiteren untersuchten Skalen (CGI) konnte nicht identifiziert werden.

In einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Model konnte kein signifikanter Einfluss des **rs1344706** Genotyp auf die paranoide Zustandsänderung in schizophrenen Patienten identifiziert werden ($p=0,415$). Zudem konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt werden (Interaktionseffekt Geschlecht x Genotyp; $p=0,157$).

3.5.5.4 rs28656907/rs28373093 (ABCB1)

Der dinukleotide Polymorphismus rs28656907/rs28373093 ist in der proximalen Promoterregion des ABCB1 Genes lokalisiert, welches für das P-GP Protein kodiert, das als Effluxtransporter eine zentrale Rolle in der Absorption, Distribution und Elimination von vielen Antipsychotika einnimmt.¹⁰⁸ Für den benannten Polymorphismus konnte in zwei unabhängigen in vitro Studien eine erhöhte ABCB1 mRNA Expression identifiziert werden.^{109, 110}

Ein möglicher Einfluss des untersuchten Polymorphismus sollte nur bei Antipsychotika auftreten, die auch ein Substrat von P-GP darstellen. Auf Grund der unwahrscheinlichen Funktion von Clozapin und Quetiapin als P-GP Substrate wurden diese von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.¹⁰⁸ Da atypische Antipsychotika auch PG-P Inhibitoren darstellen und sich somit gegenseitig inhibieren können, wurden zudem nur Patienten mit einer Monotherapie atypischer Antipsychotika berücksichtigt.
¹⁰⁸

Für den untersuchten Polymorphismus konnte kein signifikanter Einfluss auf den CGI bzw. PDS-P vor Therapiebeginn identifiziert werden. Zudem waren die Genotypgruppen hinsichtlich der Komedikation (Typika, Moodstabilizer, Antidepressiva und PGP-Inhibitoren), des Alters zu Krankheitsbeginn und in der Verteilung von Patienten mit einer ersten Episode und Clozapin-Therapie vergleichbar.

Unter Therapie mit antipsychotisch wirksamen P-GP-Substraten (Olanzapin, Risperidon, Paliperidon und Amisulprid) konnte kein signifikanter Einfluss des rs28656907/rs28373093 Polymorphismus auf den Response identifiziert werden. Auch eine Differenzierung der Patienten nach F2 bzw. F3 Diagnose führte zu keinen signifikanten Unterschieden der untersuchten Parameter in den jeweiligen Genotypgruppen. Übereinstimmend konnte in einem adjustierten Model kein signifikanter Einfluss des untersuchten Polymorphismus und kein Interaktionseffekt mit dem Geschlecht identifiziert werden.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine Abnahme der Nebenwirkungshäufigkeit für Träger des mutierten C-Allels (Abbildung 71; p=0,054). Hierbei zeigte auch das Vorhandensein eines P-PG Inhibitors einen Trend für verstärkte Nebenwirkungen (66,0 % vs. 51,2 %; p=0,086).

Eine separate Untersuchung der Verteilung von PGP-Inhibitoren in den Genotypgruppen, differenziert nach starken bzw. mäßigen Nebenwirkungen, konnte keine signifikanten Unterschiede identifizieren. Zudem zeigte sich ein Trend für eine Korrelation der Höhe des DOTES-Gesamtwertes mit dem untersuchten Genotyp ($r=-0,125$; $p=0,056$), wobei Wildtypträger die höchste Anzahl an Nebenwirkungen entwickelten (WT n=36/HT n=105/MT n=31: 2/2/0; $p=0,116$; Kruskal-Wallis-Test).

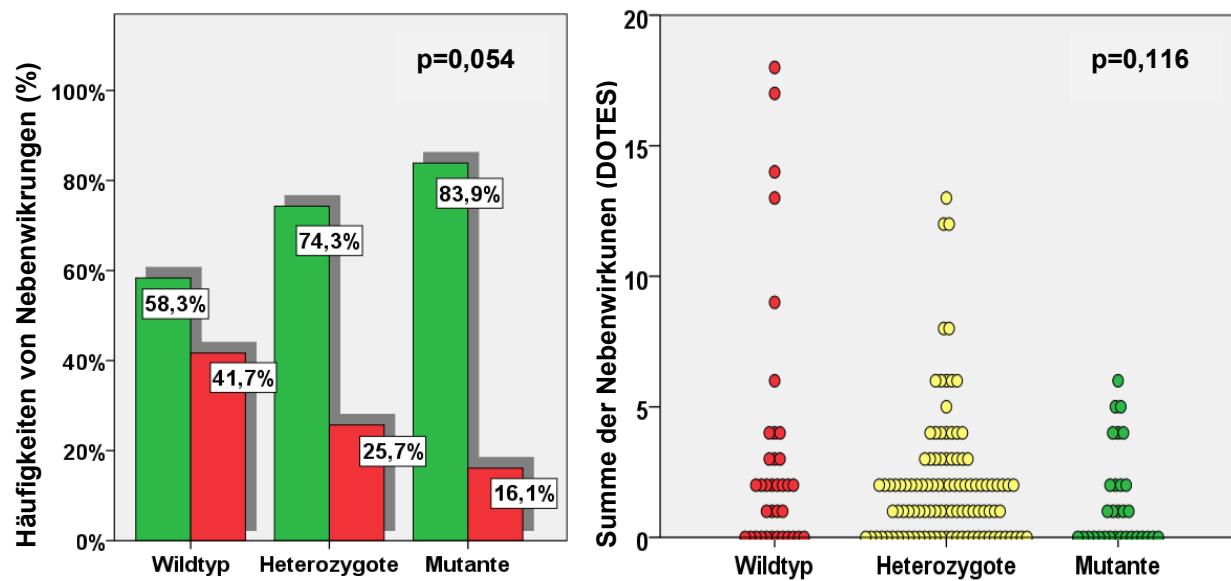


Abbildung 71 Nebenwirkungshäufigkeit (rot = mäßige bis starke NW, grün = keine bis schwache NW) bzw. Summe der Nebenwirkungen in Abhängigkeit vom rs28656907/rs28373093 Genotyp

3.6 Ergebnisse der Population „Gewicht“

3.6.1 Demographische Beschreibung

Von den 350 Patienten der Population „Gewicht“ waren 209 (59,7 %) weiblich und 141 (40,3 %) männlich. Der Anteil der Raucher betrug 43,1 %. Eine positive Familienanamnese bezüglich psychiatrischer Erkrankungen hatten 154 (45,7 %) von 337 Patienten, für die diese Information verfügbar war. Zudem zeigten 90 (26,2 %) von 343 Patienten mit dem hinterlegten Merkmal eine erste Episode einer psychiatrischen Erkrankung.

Von den 178 Patienten der adjustierten Subpopulation waren 109 (61,2 %) weiblich und 69 (38,8 %) männlich. Der Anteil der Raucher betrug 47,8 %. Eine positive Familienanamnese bezüglich psychiatrischer Erkrankungen hatten 67 (39,2 %) von 171 Patienten, für die diese Information verfügbar war. Zudem zeigten 48 (27,7 %) von 173 Patienten mit dem hinterlegten Merkmal eine erste Episode einer psychiatrischen Erkrankung.

Von den 90 Patienten der first Episode Subpopulation waren 46 (51,1 %) weiblich und 44 (48,9 %) männlich. Der Anteil der Raucher betrug 41,1 %. Eine positive Familienanamnese bezüglich psychiatrischer Erkrankungen hatten 33 (37,9 %) von 87 Patienten, für die diese Information verfügbar war. Die Population enthält alle Patienten mit einer ersten Episode aus der Gesamtpopulation.

Tabelle 43, gibt einen Überblick über die demographischen Daten und den Krankheitszustand der Patienten der untersuchten Populationen zum Aufnahmezeitpunkt:

Tabelle 43 Krankheitszustand vor Therapiebeginn

		Population „Gewicht“	Adjustierte Subpopulation	First Episode Subpopulation
Variable	n	Mittelwert \pm SD	Mittelwert \pm SD	Mittelwert \pm SD
Alter	350/178/90	41,1 \pm 15,0	39,4 \pm 15,0	37,3 \pm 13,6
Gewicht Aufnahme	350/178/90	74,7 \pm 16,5	74,1 \pm 16,3	72,6 \pm 15,9
Größe	349/177/90	171,3 \pm 9,0	171,4 \pm 8,6	173,1 \pm 9,4
BMI Aufnahme	349/177/90	25,4 \pm 5,2	25,3 \pm 5,4	24,2 \pm 4,9
Aufenthaltsdauer	350/178/90	71,2 \pm 42,0	71,3 \pm 41,7	59,8 \pm 39,4
PDS-P bei Aufnahme*	311/159/85	6,0 (2-13)	7,0 (3-15)	6,0 (2-12)
PDS-D bei Aufnahme*	311/159/85	18 (10-26)	16 (10-23,5)	17(10-25,5)
CGI-Aufnahme*	346/176/85	6,0 (6-7)	6,0 (6-7)	6,0 (5-7)

* auf Grund der Abweichung von der Normalverteilung Angabe in Median (0,25-0,75 Perzentil)

Hiernach ist der Durchschnittspatient um die 40 Jahre alt, schon vor Therapiebeginn leicht übergewichtig (BMI~25) und zeigt ausgeprägte paranoide und depressive Symptome. Zudem schätzt der Arzt den Krankheitszustand des Patienten als deutlich bis schwer krank (CGI 6 bzw. 7) ein. Bei Betrachtung der Tabelle 43 fallen keine relevanten Unterschiede der Basisparameter auf. Auch das Ansprechen nach CGI-2 (<3: 50,3 %/51,2 %/60,5 %) bzw. PDS-P(<50 %: 39,5 %/42,5 %/35,8 %) ist in den untersuchten Populationen vergleichbar.

Abbildung 72 stellt die prozentuale Verteilung der Diagnosen in den verschiedenen Populationen gegenüber. Auch hier zeigt sich eine annähernd gleichmäßige Verteilung mit einem mehrheitlichen Anteil von F2-Diagnosen. Einzige Ausnahme hiervon stellt der stark erhöhte Anteil an F2-Diagnosen in Verbindung mit einem erniedrigten Anteil der F3-Diagnose der adjustierten Subpopulation dar.

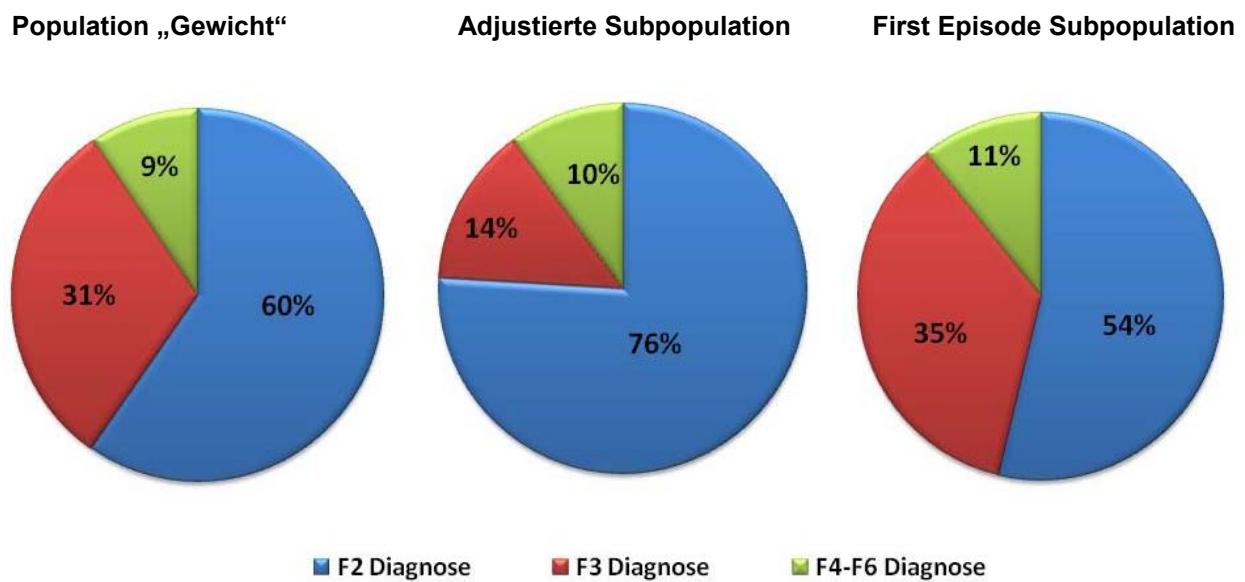


Abbildung 72: ICD10-Diagnosen im Vergleich

3.6.2 Medikation

Nachfolgend werden die Populationen „Gewicht“ und „Response“ auf Grund vergleichbarer Verteilung der Medikation zusammen beschrieben, wobei Tabelle 44 und Abbildung 73 einen Überblick über die Medikation der jeweiligen Population gibt. Die Mehrheit der Patienten (~70 %) wurde mit einem einzigen antipsychotischen Präparat behandelt. Nur die Minderheit (~20 %) erhielt eine Kombination aus atypischem und typischem Antipsychotikum. In allen drei Populationen stellte Olanzapin das am meisten verwendete Präparat dar (~45 %), gefolgt von Quetiapin (~25 %) und Risperidon (~20 %). Bei der antidepressiven Medikation stellten Mirtazapin, Citalopram und trizyklische Antidepressiva die am häufigsten verwendeten Medikamente dar. Als Komedikation der psychotischen Erkrankung erhielten die meisten Patienten der Population „Gewicht“ bzw. der „Population „Response“ Benzodiazepine (n=97 bzw. n=108), Biperiden (n=83 bzw. n=96) und Lithium (n=55 bzw. n=54). Zudem wurden als weitere Phasenprophylaktika Lamotrigin (n=21 bzw. n=23), Valproinsäure (n=20 bzw. n=22) und Carbamazepin (n=17 bzw. n=21) eingesetzt.

Tabelle 44: Medikation nach Studienpopulation

		Population „Response“	Population „Gewicht“	Adjustierte Subpopulation	First Episode Subpopulation
Therapie nur mit Atypikum		275	252	127	74
Anzahl der Atypika	1	271	259	123	79
	2	94	80	52	11
	3	11	10	3	0
	4	1	1	0	0
Therapie Atypikum + Typikum		102	98	51	16
Anzahl der Typika	1	79	76	44	14
	2	19	18	6	2
	3	4	4	1	0
Häufigste Typika Komedikation	Pipamperon	33	34	15	4
	Haloperidol	31	30	16	2
	Perazin	15	14	8	5
Häufigste Antidepressiva Komedikation	Mirtazapin	91	89	0	27
	Citalopram	90	85	45	17
	TCA	25	27	0	4

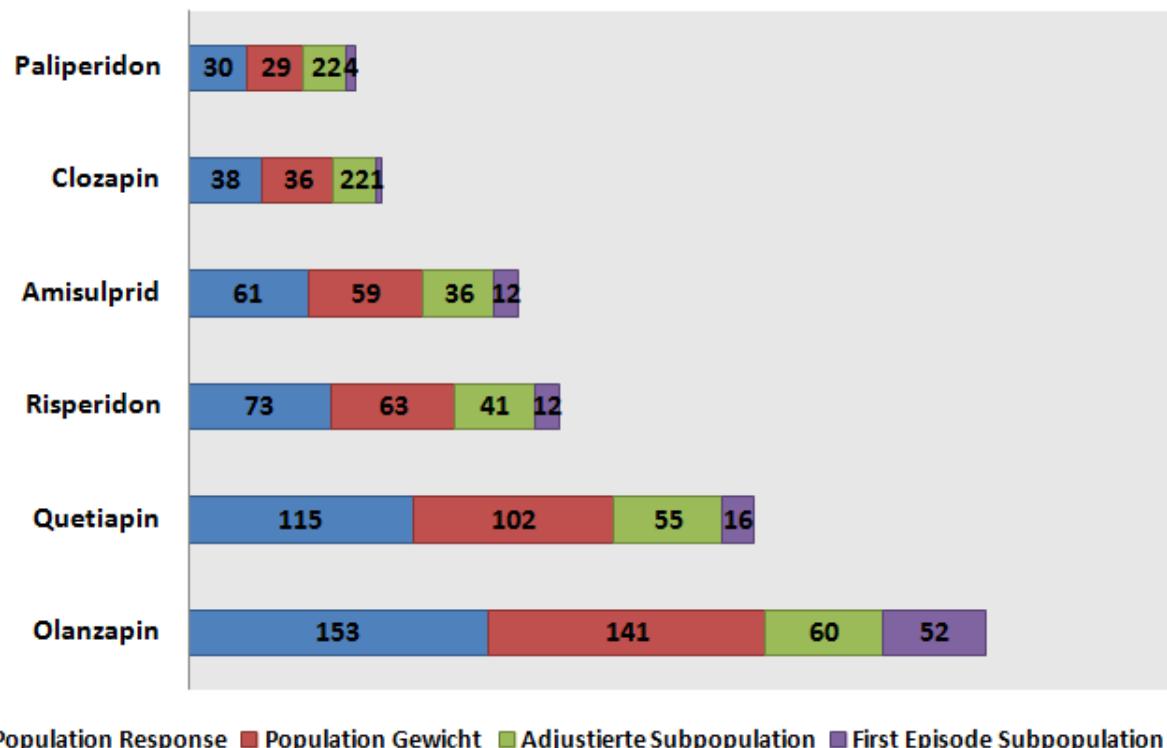


Abbildung 73: Übersicht über die atypische Medikation in den verschiedenen Subpopulationen

3.6.3 Klinische Einflussfaktoren und Wechselwirkungen

Tabelle 45 gibt einen Überblick über die Gewichtsparameter bei Aufnahme, nach 4 Wochen und über die Veränderung von Gewicht und BMI. Zudem ist für die Gesamtpopulation exemplarisch eine Differenzierung nach **Geschlecht** aufgeführt. Bei Betrachtung der Parameter fällt in allen drei untersuchten Populationen eine leichte Zunahme des Gewichtes (~ 1,5kg) und des BMI (~ 0,5kg/m²) auf, welche am stärksten in der first Episode Subpopulation ausgeprägt ist.

Eine Differenzierung nach Geschlecht ergibt für das Gewicht zur Aufnahme und nach 4 Wochen einen zu erwartenden signifikanten Unterschied mit einem höheren Gewicht von Männern (T-Test, $p<0.001$). Dieser Effekt wird durch die Größe relativiert, sodass sowohl für den Parameter BMI zu Beginn als auch nach 4 Wochen kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen feststellbar ist. In Bezug auf die Gewichtsveränderung zeigen Männer über alle Populationen hinweg eine deutlich ausgeprägtere Gewichts- und BMI-Zunahme als Frauen.

Tabelle 45: Gewichtsparameter differenziert nach Population und Geschlecht

	Population „Gewicht“		Adjustierte Subpopulation	First Episode Subpopulation
Variable	Gesamt	Männer vs. Frauen	Gesamt	Gesamt
Gewicht Aufnahme	$74,7 \pm 16,5$ (P<0,001)	$82,4 \pm 15,3$ $69,5 \pm 15,3$	$74,1 \pm 16,3$	$72,6 \pm 15,9$
Gewicht 4 Wochen	$76,1 \pm 16,1$ (P<0,001)	$84,4 \pm 14,7$ $70,5 \pm 14,5$	$75,4 \pm 16,1$	$74,6 \pm 15,5$
BMI Aufnahme	$25,4 \pm 5,2$ (P=0,336)	$25,8 \pm 4,4$ $25,2 \pm 5,7$	$25,3 \pm 5,4$	$24,2 \pm 4,9$
BMI 4 Wochen	$25,9 \pm 5,0$ (P=0,117)	$26,4 \pm 4,3$ $25,8 \pm 5,4$	$25,7 \pm 5,2$	$24,9 \pm 4,8$
Absolute Gewichtszunahme	$1,4 \pm 3,3$ (P=0,005)	$2,0 \pm 3,7$ $1,0 \pm 2,9$	$1,3 \pm 3,2$	$1,9 \pm 3,0$
Relative Gewichtszunahme	$2,2 \pm 4,6$ (P=0,051)	$2,8 \pm 4,8$ $1,8 \pm 4,5$	$2,0 \pm 4,7$	$2,9 \pm 4,4$
Absolute BMI Zunahme	$0,5 \pm 1,1$ (P=0,014)	$0,6 \pm 1,2$ $0,4 \pm 1,0$	$0,4 \pm 1,1$	$0,7 \pm 1,0$

Es besteht Einigkeit darüber, dass die Stärke der Gewichtszunahme von der **Art des Antipsychotikums** abhängt. Leucht et al. konnten in einer kürzlich publizierten Netzwerk-Metaanalyse folgende absteigende Tendenz der Gewichtszunahme feststellen:

Olanzapin>Clozapin>Quetapin,Risperidon>Paliperidon>Amisulprid>Aripiprazol>Ziprasidon.⁴¹

Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurde nur eine Differenzierung in Hoch- und Niedrig-risiko Atypika vorgenommen. Patienten mit einer Olanzapin und/oder Clozapin Medikation wurden in die Hochrisikogruppe eingeteilt, Patienten mit einer anderen atypischen Medikation wurden der Niedrigrisikogruppe zugeordnet. Tabelle 46 zeigt einen T-Test-Vergleich der beiden Gruppen in den jeweiligen Populationen: Es fällt eine signifikant stärker ausgeprägte absolute und relative Gewichtszunahme bei Patienten, die mit Olanzapin und/oder Clozapin behandelt wurden, auf. Die stärkeren Unterschiede der Medikationsgruppen in der first Episode und adjustierten Subpopulation gegenüber der Gesamtpopulation lassen auf Verzerrungseffekte durch eine antipsychotische Vorbehandlung und/oder durch gewichtsinduzierende Komedikation schließen.

Tabelle 46 Einfluss der Medikation auf die Gewichtszunahme

	Population „Gewicht“		Adjustierte Subpopulation		First Episode Subpopulation	
	Hoch vs. Niedrig	p	Hoch vs. Niedrig	p	Hoch vs. Niedrig	p
Δ Gewicht	1,8 vs. 1,1	0,054	1,9 vs. 0,8	0,023	2,7 vs. 0,9	0,006
Δ Gewicht %	2,7 vs. 1,7	0,037	2,9 vs. 1,3	0,023	4,0 vs. 1,5	0,007
Δ BMI	0,6 vs. 0,4	0,069	0,6 vs. 0,3	0,030	1,0 vs. 0,9	0,006

Neben dem Einfluss des Geschlechtes gibt es noch weitere klinische Parameter, die die Stärke der Gewichtszunahme beeinflussen können.^{44,45,188,271-274} Diese möglichen Einflussfaktoren (u.a. Alter, BMI, Serumkonzentrationen, Therapieansprechen) werden nachfolgend auf eine Korrelation mit der Gewichtszunahme überprüft und sind in Tabelle 47 bzw. Abbildung 74 für die Population „Gewicht“ dargestellt. Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurden nur Serumspiegel von Antipsychotika verwendet, die für mehr als 50 Patienten vorlagen.

Tabelle 47: Pearson Korrelation der Gewichtszunahme mit den aufgeführten Parametern

Δ Gewicht Population „Gewicht“	Gewicht Aufnahme	BMI Aufnahme	Alter	Δ CGI1	Δ PDS-P	Δ PDS-D	Ansprechen (Tagen)
r	-0,232	-0,298	-0,122	0,103	0,045	-0,046	0,041
p	0,001<	0,001<	0,022	0,069	0,476	0,470	0,440
n	350	349	350	310	253	253	350

Signifikante Korrelationen mit der absoluten Gewichtszunahme ergeben sich hierbei für den BMI zur Aufnahme ($p<0,001$) und das Alter ($p=0,022$). Als einziger stellvertretende Parameter für das Ansprechen der Pharmakotherapie erreichte die Fremdeinschätzung durch den Arzt (Δ CGI1) einen Trend ($p=0,069$). Abbildung 74 stellt in einem Streudiagramm die signifikanten Korrelationen Alter und BMI mit der Gewichtszunahme differenziert nach Geschlecht gegenüber:

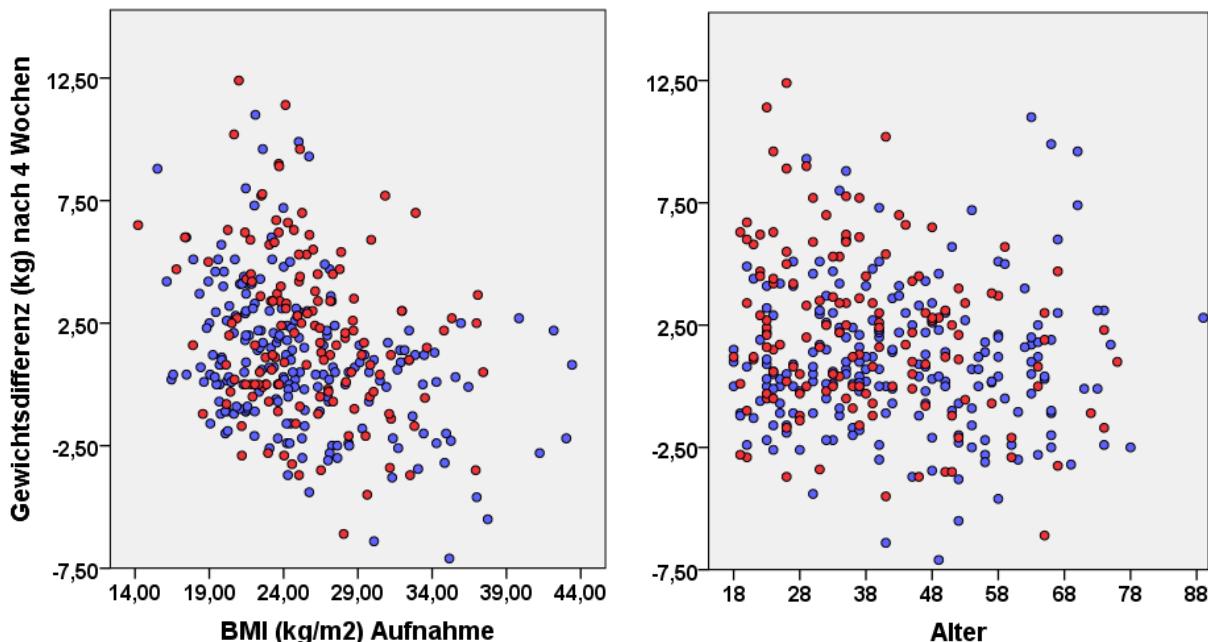


Abbildung 74: Pearson Korrelation differenziert nach Geschlecht von BMI zur Aufnahme und Alter mit der Gewichtsdifferenz nach 4 Wochen (blau=weiblich, rot=männlich)

Es zeigt sich eine schwache Korrelation ($r=-0,298$) von BMI und Gewichtszunahme mit einem stärkeren Gewichtsanstieg für Patienten mit einem niedrigen BMI. Zudem begünstigt ein junges Alter eine verstärkte Gewichtszunahme, wobei dieser Effekt sehr schwach ausgeprägt ist ($r=-0,122$).

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob first Episode Patienten eine veränderte Gewichtszunahme zeigen, wurden die Gewichtsparameter differenziert nach Patienten mit einer ersten Episode und solchen, bei denen schon länger psychotische Symptome existieren, betrachtet: Patienten mit einer ersten Episode ($n=90$) zeigten einen niedrigeren BMI zur Aufnahme ($24,2$ vs. $26,0$ kg/m²; $p=0,006$) und waren jünger ($42,4$ vs. $37,3$; $p=0,004$) als die übrigen Patienten ($n=253$). Im Kontext der Gewichtsveränderung zeigten Patienten mit einer ersten Episode einen Trend für eine stärkere Gewichts- ($2,0$ vs. $1,2$ kg; $p=0,061$) und BMI-Zunahme ($0,7$ vs. $0,4$ kg/m²; $p=0,054$).

Um den Einfluss der verschiedenen **Diagnosen** auf die Gewichtszunahme zu untersuchen, wurde eine ANOVA differenziert nach F2, F3 und F4-6 Diagnose durchgeführt. Mischdiagnosen wurden in dieser Auswertung nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigten in allen drei Populationen keinen signifikanten Einfluss der Diagnose auf die Gewichtszunahme: In der Gesamtpopulation zeigten Patienten mit einer F2 Diagnose ein erhöhtes Gewicht zur Aufnahme ($n=207$; $75,7 \pm 16,9$ kg) gegenüber Patienten mit einer F3 ($n=98$; $73,5 \pm 15,3$ kg) und F4-6 Diagnose ($n=19$; $71,5 \pm 18,6$ kg; $p=0,365$). Nach 4 Wochen zeigten Patienten mit einer F3 Diagnose ($1,6 \pm 3,6$ kg) die stärkste

Gewichtszunahme im Vergleich zu Patienten mit einer F2 ($1,2 \pm 3,6$ kg) und F4-6 Diagnose ($0,9 \pm 2,9$ kg; $p=0,511$).

Neben den beschriebenen Einflussfaktoren konnte in Studien auch ein Einfluss der **Komedikation** auf die Gewichtszunahme nachgewiesen werden.^{274, 275} Hierbei erweist sich die Interpretation auf Grund unterschiedlicher Komedikationen (Sedativa, Moodstabilizer, Antidepressiva) und damit verbundener Wechselwirkungen und gegenseitiger Beeinflussung der Gewichtsparameter als sehr schwierig. Um den Einfluss der Komedikation genauer zu untersuchen wurden alle drei Populationen in vier Gruppen unterteilt: Die erste Gruppe erhielt nur ein atypisches Antipsychotikum in der Monotherapie ohne typische, antidepressive und stimmungs-stabilisierende Komedikation. Die zweite Gruppe beinhaltet Patienten, die mit einem oder mehreren atypischen Antipsychotika und/oder einem Typikum behandelt wurden. Die dritte Gruppe erhielt zusätzlich noch eine antidepressive oder stimmungsstabilisierende Komedikation. Patienten in der vierten Gruppe wurden mit mehreren Atypika und/oder Typika behandelt und erhielten zusätzlich eine antidepressive und eine stimmungs-stabilisierende Komedikation.

In keiner Population konnte ein signifikanter Einfluss dieser Einteilung auf die Gewichtsparameter identifiziert werden: In der Gesamtpopulation zeigten Patienten mit der höchsten Anzahl an Komedikationen ($n=65$) eine schwach erhöhte Gewichtszunahme (1,6 kg) nach 4 Wochen gegenüber den Gruppen 3 ($n=174$; +1,3 kg), 2 ($n=54$; +1,5 kg) und 1 ($n=57$; +1,5 kg; $p=0,945$). Eine weitere Auswertung der Gesamtanzahl der Komedikationen konnte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Gewichtszunahme identifizieren.

Eine differenzierte Betrachtung der Gewichtszunahme in Abhängigkeit vom CGI bzw. PDS-P-**Response** resultierte in einen Trend für den CGI. Hierbei zeigten Patienten mit einem Ansprechen nach CGI ($n=42$) eine erhöhte Gewichtszunahme gegenüber Nicht-Respondern ($n=278$; 2,4 vs. 1,4 kg; $p=0,070$). Eine nach Diagnose getrennte Untersuchung konnte einen signifikanten Einfluss des Ansprechens auf die Gewichtszunahme bei Patienten mit einer F2-Diagnose identifizieren ($n=167/26$; 2,6 vs. 1,1 kg; $p=0,017$). Zwar zeigte eine Korrelation der Gewichtszunahme nach 4 Wochen mit dem CGI-1 nur eine Tendenz ($p=0,069$), eine weitere Analyse konnte jedoch eine signifikante Korrelation mit der Zustandsänderung des Patienten (CGI-2: Kendall-Tau Korrelation; $r=-0,121$; $p=0,004$) und des CGI-Response identifizieren ($r=-0,094$; $p=0,040$), welche nur auf einen Effekt in schizophrenen Patienten zurückzuführen ist.

3.6.4 Exemplarisches Vorgehen

In den nachfolgenden Kapiteln werden die statistischen Ergebnisse, der unter 2.3.11.3 beschriebenen Polymorphismen aufgeführt, welche im Kontext der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme untersucht wurden.

Die statistische Auswertung beginnt mit einer ANOVA, welche den Einfluss der Gewichtsparameter und der Gewichtszunahme in Abhängigkeit vom jeweiligen Genotyp untersucht. Der Parameter relative BMI Zunahme findet in der Literatur kaum Verwendung und wird in den nachfolgenden Tabellen nicht abgebildet. Da im vorherigen Kapitel (3.3.1.2) ein Einfluss der klinischen Parameter Alter, Geschlecht, Basisgewicht bzw. –BMI und Art der Medikation auf die Gewichtszunahme identifiziert werden konnte, wurde auf gleichmäßige Verteilung dieser Parameter in den jeweiligen Genotypgruppen geprüft (Chi-Quadrat für Alter und Geschlecht, ANOVA für Alter). Die gleiche Untersuchung erfolgte auch für die Verteilung des rs17782313 Polymorphismus in den jeweiligen Genotypgruppen, welcher über alle drei Studienpopulationen einen signifikanten Effekt auf die Gewichtsveränderung zeigte.

Um den Einfluss der unter 3.6.3 beschriebenen Einflussfaktoren auf die Gewichtszunahme in kg nach 4 Wochen zu berücksichtigen und Verzerrungseffekte zu vermeiden wurde ein adjustiertes ANCOVA Modell generiert. Dieses beinhaltet als Kofaktoren Alter, Geschlecht, Gewicht zur Aufnahme, Art des Antipsychotikums (differenziert in Hoch- und Niedrig-risiko Antipsychotikum) und den rs17782313 Genotyp. Da es nur einen marginalen Unterschied in der Korrelation von Basisgewicht bzw. BMI und der Gewichtszunahme gab und die Variable Basisgewicht für jeden Patienten zur Verfügung stand, fand diese Variable Anwendung im adjustierten ANCOVA Modell. Als abhängige Variable wurde die Veränderung des Gewichtes verwendet, da sie am häufigsten beschrieben wird und somit eine bessere Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Studien gewährleistet ist.

Da ein Großteil der Patienten schon vor Therapiebeginn eine Behandlung mit verschiedenen Antipsychotika erfahren hat, bietet diese chronische Patienten Kohorte die Möglichkeit den Einfluss eines jeweiligen Polymorphismus auf das Gewicht bzw. den BMI unter chronischer Antipsychotika Behandlung zu untersuchen. Dieser Ansatz ermöglicht auch den Vergleich mit cross-sekutionalen Studien. Grundlage hierfür stellte wiederum ein ANCOVA Modell dar, welches den BMI zu Therapiebeginn als abhängige Variable, den jeweiligen Genotyp als unabhängigen Faktor und die Kovariaten Alter, Geschlecht und rs9939609 Polymorphismus beinhaltet. Der genannte Polymorphismus im FTO Gen zeigte in allen untersuchten Populationen einen signifikanten Einfluss auf Gewichtsparameter vor Therapiebeginn und wurde daher in das Modell eingeschlossen.

In den zuvor beschriebenen ANCOVA Modellen wurden die verwendeten atypischen Antipsychotika zusammen betrachtet und nur auf den Einfluss von stark bzw. weniger stark gewichtsinduzierender Medikation adjustiert. Dies basiert auf der Hypothese, dass Polymorphismen im Regelkreis der Energiehomöostase einen vergleichbaren Einfluss auf die Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie haben. Auf Grund unterschiedlicher Rezeptoraffinitäten verschiedener Antipsychotika ist es vorstellbar, dass ein bestimmtes Antipsychotikum eine stärkere Gewichtszunahme in Folge eines Polymorphismus zeigt, während ein anderes Antipsychotikum einen schwächeren bzw. keinen Effekt

ausübt. Die Unterschiede in der Ausprägung der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme sprechen für eine differenzierte Beeinflussung relevanter Signalwege. Zudem konnte in einem physiogenomischen Untersuchungsanatz eine unterschiedliche Beteiligung von Olanzapin (Apolipoprotein) und Risperidon (Leptin und NPY) auf Gewichtsprofile identifiziert werden.²⁷⁶ Um den Einfluss verschiedener Antipsychotika auf die Gewichtszunahme überprüfen zu können, wurden aus der Gesamtpopulation nur Patienten mit einer Monotherapie mit einem atypischen Antipsychotikum berücksichtigt. Da nicht für alle Antipsychotika, die in der Studie verwendet wurden, genügend Verschreibungen vorhanden waren, wurden die verwendeten Antipsychotika differenziert nach vergleichbarer Gewichtszunahme (Olanzapin und Clozapin vs. Risperidon, Quetiapin, Paliperidon und Amisulprid)⁴¹ betrachtet. Der Vergleich erfolgte an Hand eines ANCOVA Modelles mit der abhängigen Variable Δ Gewicht und den unabhängigen Faktoren Genotyp und Art des Antipsychotikum (differenziert in zwei Gruppen; wie zuvor besprochen), welche auf die Kovariaten Gewicht zur Aufnahme, Alter, Geschlecht, rs1772313 Genotyp und gewichtsinduzierende Komedikation (Lithium, Valproinsäure, Paroxetin, TCA und Mirtazapin) adjustiert wurde. Bei Vorliegen eines signifikanten Interaktionseffektes Genotyp x Medikation ($p<0,05$) ist davon auszugehen, dass sich das Ausmaß der Gewichtszunahme in Abhängigkeit von der Art der Medikation unterscheidet.

Eine unterschiedliche Wirkung eines Antipsychotikums auf einen Polymorphismus ist zudem vor Allem zu erwarten, wenn sich dieser innerhalb einer relevanten Rezeptorstruktur befindet: So wurden im Rahmen der Doktorarbeit zwei Polymorphismen innerhalb des HR1 Rezeptors und ein Polymorphismus im 5HT_{2C} Rezeptor untersucht. Eine direkte Auswirkung des Polymorphismus sollte also für Antipsychotika mit einer höheren Rezeptoraffinität einen ausgeprägteren Effekt zeigen. Daher wurden für diese Polymorphismen die Antipsychotika nach Rezeptoraffinität differenziert und nach oben beschriebenem Interaktionseffekt untersucht. Die genaue Einteilung der Gruppen ist den jeweiligen Abschnitten zu entnehmen.

Zudem wurde nach oben beschriebenem Modell ein Interaktionseffekt von Genotyp und Geschlecht untersucht. Der Vergleich erfolgte an Hand eines ANCOVA Modelles mit der abhängigen Variable Gewicht und den unabhängigen Faktoren Genotyp und Geschlecht, welche auf die Kovariaten Gewicht zur Aufnahme, Alter, rs1772313 Genotyp, Hoch- oder Niedrig-Risiko-Therapie und gewichtsinduzierende Komedikation (Lithium, Valproinsäure, Paroxetin, TCA und Mirtazapin) adjustiert wurde. Da sich ein Einfluss des Geschlechtes unabhängig von der Menge der verschriebenen Antipsychotika verhalten sollte, wurde für dieses Modell die Population mit höchster Patientenanzahl verwendet (=Gesamtpopulation).

3.6.5 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Gewichtszunahme

3.6.5.1 rs324420 (FAAH)

Der rs324420 Polymorphismus befindet sich in der Nähe des FAAH Genes, welches auf Chromosom 15 lokalisiert ist und den größten Anteil der endogenen Cannabinoide inaktiviert. Der AA-Genotyp des untersuchten Polymorphismus konnte mit einer verringerten FAAH mRNA Expression, erhöhten Konzentrationen von endogenen Cannabinoiden und einer erhöhten Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme in Verbindung gebracht werden.^{140, 142, 143}

In allen drei Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Basisgewicht, Medikation und rs17782313 Genotyp in den verschiedenen Genotypgruppen.

Bei Therapiebeginn zeigten Patienten mit dem AA-Genotyp gegenüber C-Allel Trägern ein höheres Gewicht und einen höheren BMI. Dieser klinische Effekt erreichte aber für keinen Parameter ein signifikantes Ergebnis (Tabelle 48).

Nach 4 Wochen verloren Patienten mit dem AA-Genotyp in der Gesamt- und adjustierten Population an Gewicht, während CA-Genotyp Träger eine stärkere Gewichtszunahme als Wildtyp-Träger zeigten. Ein signifikantes Ergebnis konnte für alle Gewichtsparameter, aber nur in der Gesamtpopulation beobachtet werden (Δ BMI in kg/m²; CC:0,4; CA:0,7; AA:-0,2; p=0,038, Tabelle 48). Hierbei gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse auf Grund der stärksten Gewichtszunahme für heterozygote Allel-Träger und der geringen Anzahl an Patienten mit dem AA-Genotyp (n=6 bzw. 5; siehe Tabelle 48) als schwierig.

Tabelle 48 ANOVA rs324420 Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	CC 234	CA 110	AA 6	P	CC 117	CA 56	AA 5	P	CC 58	CA 32	AA 0	P
Gewicht Aufnahme	75,0	73,6	85,2	0,222	74,0	73,6	83,0	0,464	73,1	71,7		0,692
Gewicht 4 Wochen	76,2	75,5	84,7	0,398	75,1	75,4	82,9	0,571	74,7	74,3		0,924
BMI Aufnahme	25,6	24,9	29,6	0,074	25,3	25,0	28,5	0,377	24,5	23,6		0,428
BMI 4 Wochen	26,0	25,6	29,4	0,169	25,6	25,5	28,4	0,488	25,0	24,5		0,620
Δ Gewicht	1,2	2,0	-0,5	0,044	1,1	1,8	-0,2	0,233	1,6	2,6		0,111
$\% \Delta$ Gewicht	1,9	3,1	-0,6	0,028	1,7	2,8	-0,2	0,222	2,3	4,0		0,071
Δ BMI	0,4	0,7	-0,2	0,038	0,4	0,6	-0,1	0,240	0,5	0,9		0,125

Um eine bessere Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden, in Analogie zu den Studien von Sipe bzw. Monteleone et al.,^{140, 143} alle A-Allel-Träger (CA+AA) zusammengefasst. Dies resultierte in einen Trend für die relative Gewichtszunahme (% Δ kg in %; CC:1,9; CA+AA:2,9; p=0,056 und CC:2,3; CA+AA:4,0; p=0,071), welcher jedoch nicht in der adjustierten Subpopulation beobachtet werden konnte (% Δ kg in %; CC:1,7; CA+AA:2,5; p=0,280). An dieser Stelle bleibt jedoch fraglich, ob die beobachtete Gewichtsabnahme für AA-Genotyp Träger der geringen Anzahl an Patienten und dem Zufall oder einem tatsächlich vorliegendem Effekt geschuldet ist.

Auch unter Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren zeigten A-Allel-Träger eine stärkere Gewichtszunahme als Wildtyp-Träger, jedoch erreichte dieses Ergebnis keine Signifikanz (ANCOVA; 0,124< p<0,341). Ein signifikanter Einfluss des untersuchten Polymorphismus auf den BMI vor Therapiebeginn konnte bei chronischen Patienten nicht nachgewiesen werden (CC:26,1; CA+AA:25,7 kg/m²; p=0,535). Zudem konnte kein Interaktionseffekt zwischen dem rs324420 Genotyp und der Art des Antipsychotikums (p=0,672) bzw. dem Geschlecht (p=0,432) identifiziert werden.

3.6.5.2 rs17782313 und rs489693 (MC4R)

Die beiden untersuchten Polymorphismen befinden sich in einem 190 kb rekombinanten Intervall zwischen der kodierenden Sequenz von PMAIP1 und MC4R, wobei letzteres Gen als eines der relevantesten Gene im Zusammenhang mit monogenetischem Übergewicht bezeichnet wird. Beide Polymorphismen konnten in GWAS mit einem erhöhten BMI (rs17782313)¹⁵² bzw. mit einer erhöhten Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme (rs489693) assoziiert werden¹⁵³ und stehen nach unseren Genotypisierungs-Ergebnissen in einem starken LD (Gesamtpopulation; D'=0,923, r²=0,632).

In allen drei Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, und Medikation in den verschiedenen Genotypgruppen der beiden untersuchten Polymorphismen. Vor Therapiebeginn zeigten CC-Genotyp Träger des rs17782313 Polymorphismus und AA-Genotyp Träger des rs489693 Polymorphismus das höchste Basisgewicht bzw. den höchsten BMI, wobei ein signifikantes Niveau nur für den BMI und den rs17782313 Polymorphismus erreicht wurde (TT:25,8; TC:24,6; CC:26,9 kg/m²; p=0,040, Tabelle 49).

Nach 4 Wochen konnte über alle Studienpopulationen hinweg ein signifikanter Einfluss des **rs17782313 Polymorphismus** auf die Gewichtsveränderung identifiziert werden: Träger des CC-Genotyps zeigten einer stärkere Gewichtszunahme als TC- bzw. TT-Genotyp Träger mit einem Dosiseffekt für das C-Allel (Gesamtpopulation und Δ Gewicht in kg; TT:1,1; CT:1,8; CC:2,6; p=0,029, Tabelle 49).

Tabelle 49 ANOVA rs17782313 Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	TT 203	TC 126	CC 21	P	TT 112	TC 57	CC 9	P	TT 49	TC 32	CC 9	P
Gewicht Aufnahme	75,5	72,6	80,1	0,091	75,1	71,2	80,8	0,159	74,3	68,6	77,5	0,179
Gewicht 4 Wochen	76,6	74,4	82,6	0,078	75,8	73,2	84,7	0,124	75,6	71,5	80,1	0,268
BMI Aufnahme	25,8	24,6	26,9	0,040	25,8	24,1	25,9	0,154	24,4	23,6	25,4	0,594
BMI 4 Wochen	26,2	25,2	27,8	0,043	26,0	24,8	27,2	0,244	24,8	24,6	26,3	0,651
Δ Gewicht	1,1	1,8	2,6	0,029	0,7	2,0	3,9	0,002	1,3	2,8	2,6	0,053
%Δ Gewicht	1,6	2,9	3,5	0,025	1,1	3,3	5,5	0,001	1,9	4,4	3,5	0,035
Δ BMI	0,4	0,6	0,8	0,030	0,2	0,7	1,3	0,001	0,4	1,0	0,8	0,041

Auch Träger des A-Allels des **rs489693 Polymorphismus** zeigten in allen drei Studienpopulationen eine signifikant stärkere Gewichts- und BMI-Zunahme als CC-Genotyp Träger (Gesamtpopulation und Δ Gewicht in kg; AA:1,9; AC:1,8; CC:1,0; $p=0,043$, Tabelle 50).

Tabelle 50 ANOVA rs489693 Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	AA 37	AC 133	CC 176	P	AA 17	AC 61	CC 98	P	AA 13	AC 38	CC 38	P
Gewicht Aufnahme	78,1	73,0	75,4	0,196	78,7	71,3	75,3	0,168	77,1	70,4	73,6	0,380
Gewicht 4 Wochen	80,0	74,8	76,3	0,225	81,5	73,0	76,0	0,146	79,6	73,0	74,7	0,418
BMI Aufnahme	26,6	24,8	25,8	0,087	26,2	24,2	25,9	0,129	25,6	23,9	24,2	0,567
BMI 4 Wochen	27,2	25,4	26,1	0,121	27,1	24,8	26,1	0,162	26,4	24,8	24,5	0,470
Δ Gewicht	1,9	1,8	1,0	0,043	2,8	1,7	0,7	0,016	2,5	2,6	1,1	0,062
%Δ Gewicht	2,8	2,8	1,5	0,028	4,2	2,8	1,1	0,011	3,4	4,0	1,6	0,046
Δ BMI	0,6	0,6	0,3	0,034	0,9	0,6	0,2	0,010	0,8	0,9	0,4	0,051

Die Ergebnisse des ANCOVA Modelles (siehe Abschnitt 3.6.4) sind in Abbildung 75 dargestellt. Übereinstimmend mit der ANOVA konnten sowohl für den rs17782313 als auch für den rs489693 Polymorphismus signifikante Ergebnisse ($0,002 < p < 0,036$) bzw. ein Trend ($p=0,076$) über alle Studienpopulationen hinweg identifiziert werden (Abbildung 75).

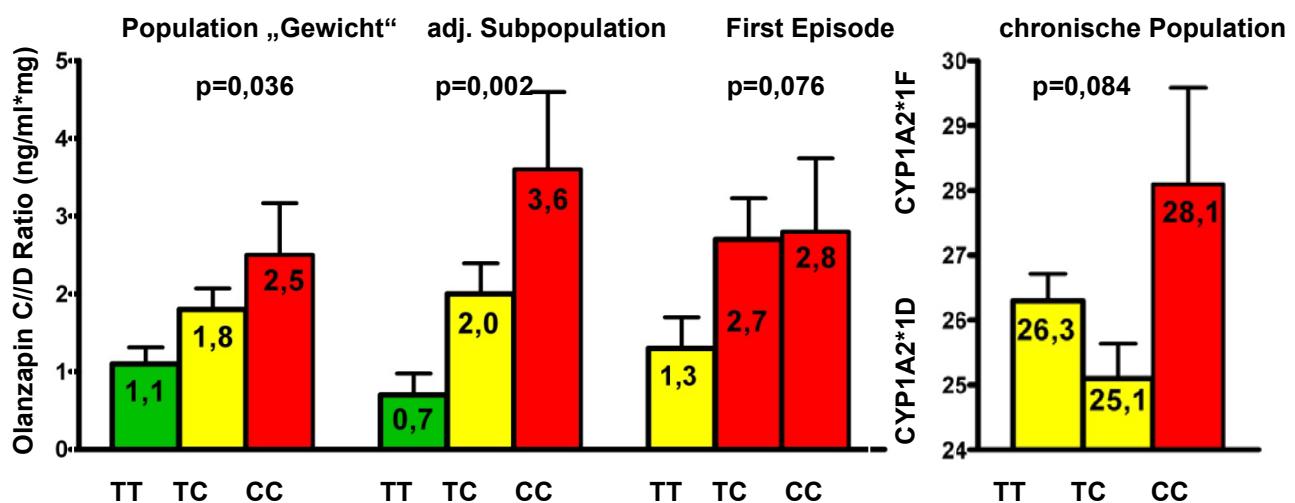


Abbildung 75: Einfluss des rs17782313 Genotyps auf die Gewichtszunahme nach 4 Wochen bzw. auf den BMI vor Therapiebeginn (ANCOVA)

Hierbei war ein Anstieg der Gewichtszunahme mit dem C-Allel des rs17782313 Polymorphismus bzw. mit dem A-Allel des rs489693 Polymorphismus zu beobachten. Auf Grund der Tatsache, dass nicht alle Proben zum Zeitpunkt der Publikation zur Verfügung standen, weichen die hier beschriebenen Ergebnisse auf Grund veränderter Patientenzahl (n~5 Patienten) marginal von den publizierten Ergebnissen ab.^{111, 151} Anhang A9 gibt hierüber einen Überblick.

Gleichsam konnte auch in chronischen Patienten der CC-Genotyp (rs17782313 Polymorphismus) und der AA-Genotyp (rs489693 Polymorphismus) mit dem höchsten BMI assoziiert werden ($p=0,084$ bzw. $p=0,066$, Abbildung 75 bzw. 76).

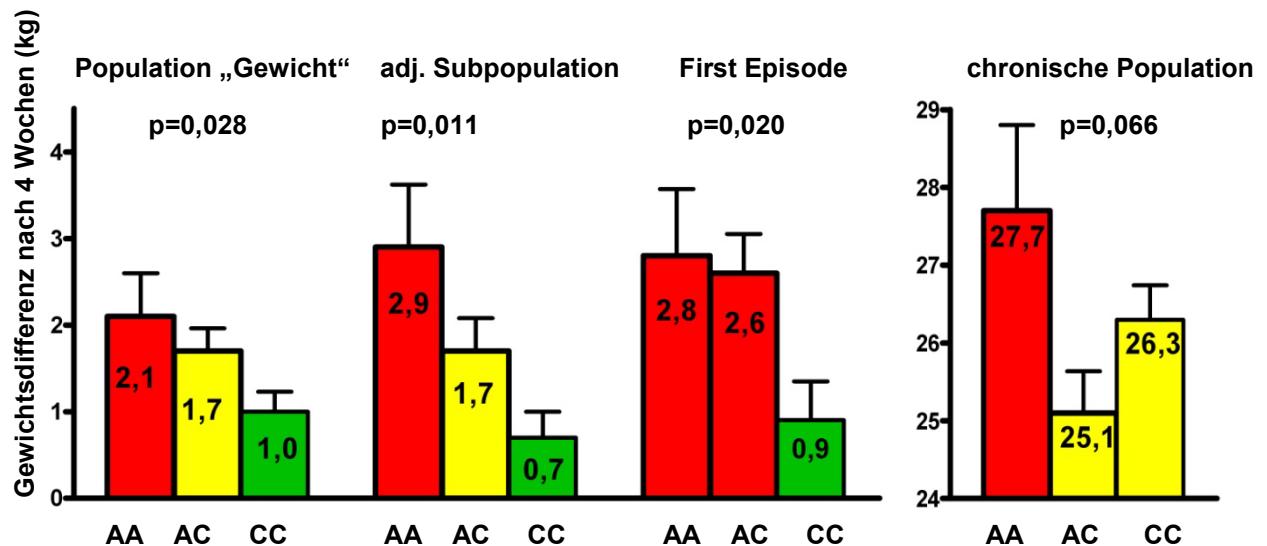


Abbildung 76: Einfluss des rs489693 Genotyps auf die Gewichtszunahme nach 4 Wochen bzw. auf den BMI vor Therapiebeginn (ANCOVA)

Unter Berücksichtigung des Interaktionseffektes (siehe Abschnitt 3.6.4) zwischen dem jeweiligen Genotyp und der Medikation zeigten Patienten, die nicht mit Olanzapin oder Clozapin therapiert wurden, eine stärkere Gewichtszunahme in Abhängigkeit vom Genotyp, wobei der Interaktionseffekt kein signifikantes Niveau ($p=0,071$ für rs17782313 und $p=0,296$ für rs489693; Abbildung 77) erreichte. Hieraus lässt sich ein leichter Trend jedoch keine zwingenden Schlüsse für eine medikationsspezifische Gewichtszunahme ableiten. In dem genannten Modell zeigte sich zudem ein signifikanter Einfluss des rs489693 Genotyp ($p=0,039$) und ein Trend für den rs17782313 Genotyp ($p=0,053$).

Zudem konnte für beide untersuchten Polymorphismen kein signifikanter Unterschied der Gewichtszunahme in den jeweiligen Genotyp-Gruppen in Abhängigkeit vom Geschlecht beobachtet werden ($p=0,948$ bzw. $p=0,103$). Im Gegensatz hierzu zeigte sich vor Therapiebeginn ein signifikanter Unterschied des BMI in Abhängigkeit vom Geschlecht (Interaktionseffekt $p=0,019$, rs17782313 Genotyp $p=0,037$): Während für Männer nur ein marginaler Unterschied in den Genotypgruppen des rs17782313 Polymorphismus identifiziert werden konnte, zeigten weibliche CC-Genotyp Träger den höchsten BMI zur Aufnahme (Abbildung 78).

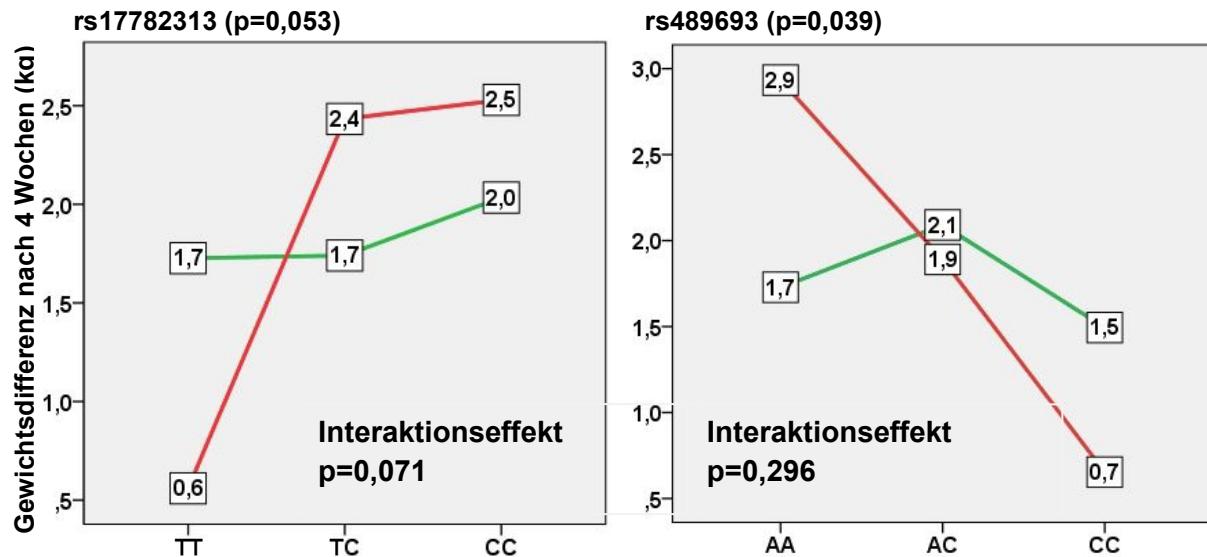


Abbildung 77: ANCOVA Interaktionsmodell MC4R Genotyp x Medikation (grün = Olanzapin, Clozapin, rot = Quetiapin, Risperidon, Amisulprid, Paliperidon)

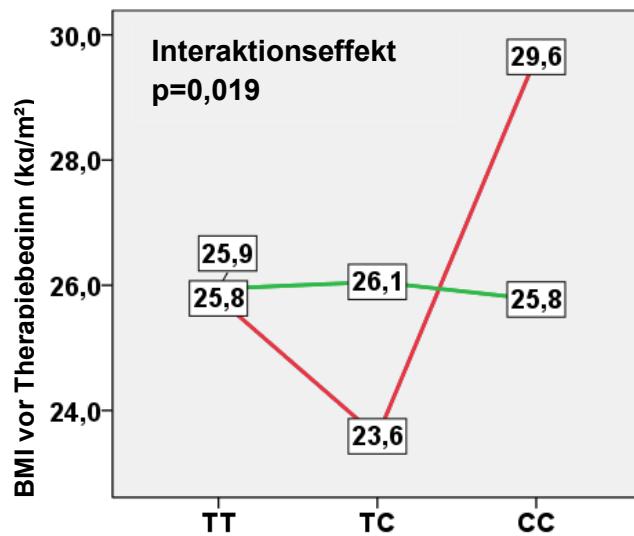


Abbildung 78: ANCOVA Interaktionsmodell rs17782313 Genotyp x Geschlecht (grün = männlich, rot= weiblich)

3.6.5.3 Weitere Polymorphismen im Promoter- bzw. Genbereich des MC4R Genes

Mittels NGS am GS Junior wurde die komplette Sequenz des MC4R-Gens (1438bp) und der von Lubrano-Berthelier bzw. Wankhade et al. vermutete Promoterbereich für Patienten der adjustierten Subpopulation im Rahmen einer betreuten Masterarbeit sequenziert.^{277, 278, 154}

Innerhalb des MC4R Genes konnten nur sehr seltene Mutationen identifiziert werden. Allein drei Polymorphismen innerhalb des Promoterbereiches (rs17066842, rs11872992 und rs8087522) erzielten eine Häufigkeit, die eine weitere statistische Auswertung erlaubten:

Für diese Polymorphismen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Basisgewicht, Medikation und rs17782313 Genotyp in den verschiedenen Genotypgruppen. Einzige Ausnahme hiervon stellten AA-Genotyp Träger des rs11872992 Polymorphismus dar, welche ein signifikant jüngeres Alter aufwiesen ($p=0,032$). Da nur vier Träger des rs11872992 AA-Genotyps in der Population enthalten waren, wurden diese im weiteren Verlauf der Auswertung zusammengefasst.

Nach 4 Wochen zeigten sowohl A-Allel Träger des rs17066842 als auch des rs11872992 Polymorphismus eine erhöhte Gewichtszunahme, ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen (Tabelle 51). Allein für den rs8087522 Polymorphismus konnte ein signifikanter Einfluss auf die relative Gewichtsveränderung identifiziert werden ($p=0,044$).

In Analogie zur ANOVA zeigten A-Allel Träger aller drei untersuchten Polymorphismen eine höhere, aber nicht signifikante, Gewichtszunahme als GG-Genotyp Träger in einem adjustierten Modell ($0,392 < p < 0,621$). Die niedrigen Gewichtsunterschiede in den Genotypgruppen des rs8087522 Polymorphismus im ANCOVA Modell der prozentualen Gewichtszunahme implizieren, dass der Effekt des AA-Genotyps durch Störfaktoren verzerrt wurde (ANCOVA; GG:1,8; GA:1,9; AA:3,8 %; $p=0,201$ vs. $p=0,044$, Tabelle 51).

Tabelle 51 ANOVA rs17066842, rs11872992 und rs8087522 Polymorphismus

Variable n	rs17066842			rs11872992				rs8087522			
	GG 167	GA+AA 10+1	P	GG 135	GA 39	AA 4	P	GG 92	GA 70	AA 16	P
Gewicht Aufnahme	74,3	70,7	0,473	74,5	73,4	67,5	0,662	73,4	76,5	67,7	0,127
Gewicht 4 Wochen	75,6	72,2	0,496	75,7	75,0	68,0	0,631	74,4	77,8	70,4	0,176
BMI Aufnahme	25,3	24,6	0,686	25,3	25,3	23,1	0,725	25,1	25,9	23,5	0,242
BMI 4 Wochen	25,7	25,1	0,734	25,7	25,8	23,4	0,689	25,4	26,3	24,4	0,326
Δ Gewicht	1,3	1,5	0,803	1,2	1,6	0,6	0,725	1,0	1,3	2,7	0,154
%Δ Gewicht	1,9	3,1	0,409	1,9	2,4	1,3	0,841	1,6	2,0	4,7	0,044
Δ BMI	0,4	0,5	0,692	0,4	0,5	0,3	0,768	0,3	0,4	0,9	0,101

Unter den identifizierten, seltenen Mutationen konnte für den rs2229616 Polymorphismus ein signifikanter Zusammenhang mit der prozentualen Gewichtszunahme identifiziert werden (ANCOVA; GG:1,9 vs. AA:6,3 %; $p=0,049$). Auf Grund der geringen Anzahl an heterozygoten Genotyp Trägern ist

das Ergebnis jedoch schwer zu interpretieren. Für weitere sehr seltene Polymorphismen sei auf die Arbeit von Frau Sun verwiesen.¹⁵⁴

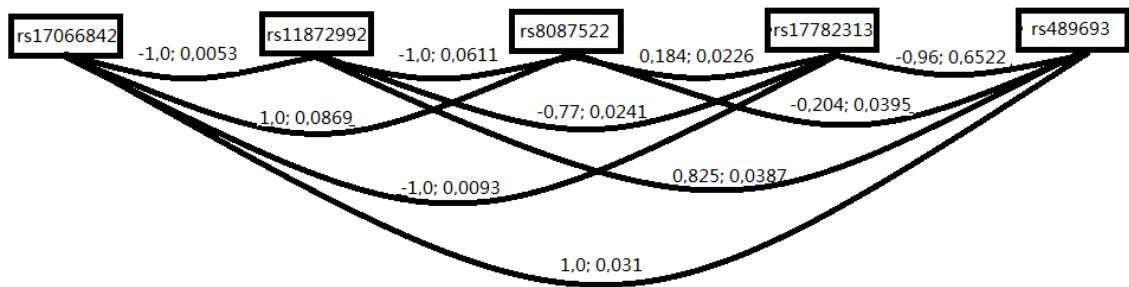


Abbildung 79: LD-Analyse im Promoter- und Genbereich des MC4R Genes nach¹⁵⁴

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass für die drei identifizierten Polymorphismen eine Kopplung der Risikoallele besteht (hohes D'), dass jedoch die Marker auf Grund der unterschiedlichen Genotypverteilung nicht den jeweils anderen Marker erklären können (niedriges r²). Nur für den rs17782313 und rs489693 Polymorphismus besteht ein starkes LD mit sowohl hohem D' als auch r²-Wert.

3.6.5.4 rs9939609 (FTO)

Der rs9939609 Polymorphismus befindet sich im ersten Intron des FTO Genes und wurde in mehreren GWAS mit Übergewicht und BMI assoziiert.¹⁶⁰ In einer kürzlich publizierten Studie konnte zudem ein Einfluss auf den BMI bei Patienten, die mit atypischen Antipsychotika behandelt wurden, nachgewiesen werden.¹⁶⁵

In allen drei Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Medikation und rs17782313 Genotyp in den verschiedenen Genotypgruppen. Die Gewichtsparameter vor Therapiebeginn deuten in allen drei Populationen auf einen Einfluss des rs9939609 Polymorphismus hin: Vor Behandlungsbeginn zeigten Träger des AA-Genotyps gegenüber T-Allel Trägern ein höheres Gewicht und einen höheren BMI in der Gesamtpopulation, jedoch nicht in der first Episode Population. Heterozygote AT-Genotyp Träger wiesen in der Gesamt- und unadjustierten Population sowohl einen erniedrigten BMI als auch ein verminderteres Gewicht gegenüber den anderen Genotypgruppen auf (Tabelle 52).

Nach 4 Wochen zeigten Patienten mit dem AT-Genotyp in allen drei Populationen die ausgeprägteste Gewichtszunahme, wobei dieses Ergebnis nur für die adjustierte Subpopulation und den Parameter relative Gewichtsveränderung ein signifikantes Niveau erreichte (AA:1,7; AT:2,8; TT:0,5 %; p=0,050, Tabelle 52).

Tabelle 52 ANOVA rs9939609 Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	AA 64	AT 167	TT 119	P	AA 32	AT 89	TT 57	P	AA 20	AT 38	TT 32	P
Gewicht Aufnahme	78,6	72,5	75,7	0,033	78,2	71,8	75,4	0,123	77,2	67,9	75,3	0,051
Gewicht 4 Wochen	79,9	74,2	76,8	0,050	79,5	73,5	76,0	0,185	78,5	70,1	77,4	0,063
BMI Aufnahme	26,8	24,7	25,8	0,013	27,0	24,2	25,9	0,025	24,6	23,0	25,4	0,103
BMI 4 Wochen	27,3	25,2	26,1	0,017	27,4	24,8	26,1	0,038	25,1	23,7	26,1	0,102
Δ Gewicht	1,3	1,7	1,1	0,312	1,3	1,7	0,5	0,083	1,4	2,2	2,1	0,613
%Δ Gewicht	1,8	2,7	1,7	0,180	1,7	2,8	0,9	0,050	1,9	3,4	3,0	0,486
Δ BMI	0,4	0,6	0,4	0,364	0,4	0,6	0,2	0,118	0,5	0,7	0,7	0,658

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ANOVA verzeichneten AT-Genotyp Träger des rs9939609 Polymorphismus in einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Modell die ausgeprägteste Gewichtszunahme in allen drei untersuchten Populationen, ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu

erreichen (ANCOVA; $0,243 < p < 0,694$). Im Gegensatz hierzu konnte ein grenzwertiger Einfluss des untersuchten Polymorphismus auf den BMI in chronischen Patienten identifiziert werden ($p=0,051$, Abbildung 80). Unter Berücksichtigung der Medikation bzw. des Geschlechtes konnte kein signifikanter Einfluss der Art des Antipsychotikums ($p=0,176$) und des Geschlechts ($p=0,572$) auf den rs9939609 Polymorphismus festgestellt werden.

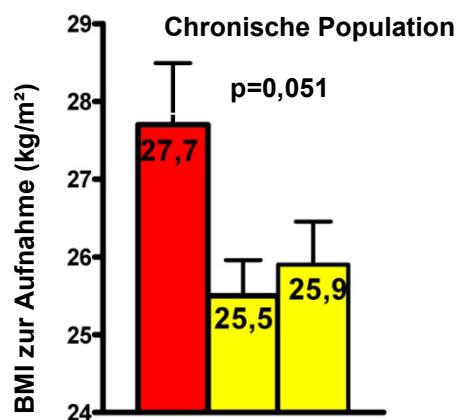


Abbildung 80: Einfluss des rs9939609 Genotyps auf den BMI vor Therapiebeginn

3.6.5.5 rs1049353 (CNR1)

Der rs1049353 Polymorphismus stellt eine stille Mutation im Codon 453 des Cannabinoid Rezeptor 1 (CB1) Genes dar,¹⁷⁵ welches auf Chromosom 6 lokalisiert ist und eine physiologische Rolle im Energiehaushalt, in der Essensaufnahme und im Suchtverhalten des Menschen spielt.^{172,173}

In allen drei Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Basisgewicht und rs17782313 Genotyp in den verschiedenen Genotypgruppen. In Bezug auf die Medikation konnte ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypgruppen in der Gesamtpopulation identifiziert werden: GG-Genotyp Träger zeigten hierbei einen leicht erhöhten Anteil (62,1 %) an stark gewichtsinduzierender Medikation (Olanzapin und/oder Clozapin; p=0,027).

In keiner der drei Studienpopulationen konnte ein signifikanter Einfluss des rs1049353 Polymorphismus auf die Gewichtsparameter vor Therapiebeginn identifiziert werden (Tabelle 53).

Nach 4 Wochen zeigten Patienten mit dem GA-Genotyp in allen drei Populationen die ausgeprägteste Gewichtszunahme, ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen (0,265< p<0,792, Tabelle 53).

Tabelle 53 ANOVA rs1049353 Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	GG 195	GA 131	AA 24	P	GG 98	GA 65	AA 15	P	GG 50	GA 36	AA 4	P
Gewicht Aufnahme	75,4	73,8	74,4	0,693	74,7	73,4	73,4	0,876	73,7	71,2	71,5	0,761
Gewicht 4 Wochen	76,7	75,4	75,5	0,745	75,8	74,9	74,8	0,927	75,3	73,6	74,8	0,883
BMI Aufnahme	25,7	25,2	25,0	0,613	25,5	25,0	24,5	0,727	24,3	24,0	24,7	0,928
BMI 4 Wochen	26,1	25,7	25,4	0,652	25,9	25,5	25,0	0,805	24,8	24,8	25,9	0,911
Δ Gewicht	1,3	1,6	1,0	0,668	1,1	1,5	1,4	0,792	1,5	2,4	3,4	0,283
%Δ Gewicht	2,0	2,5	1,9	0,570	1,6	2,5	2,2	0,516	2,3	3,5	4,8	0,312
Δ BMI	0,4	0,5	0,4	0,656	0,3	0,5	0,5	0,616	0,5	0,8	1,2	0,265

Sowohl bei Betrachtung der Gewichtsveränderung der drei Studienpopulationen (0,321< p<0,764) als auch des BMI der chronischen Patientenkollektiv (GG:26,1; GA:25,9; AA:25,5 kg/m²; p=0,877) konnte kein signifikanter Einfluss des untersuchten Genotyps in einem ANCOVA Modell festgestellt werden. Auch der Interaktionseffekt zwischen dem rs1049353 Genotyp und der Art des Antipsychotikums (p=0,516) bzw. dem Geschlecht (p=0,506) verblieb ohne signifikantes Ergebnis.

3.6.5.6 rs346070, s346074 und s346075 (HR1)

Die untersuchten Polymorphismen befinden sich in relevanten Steuerungs- und Bindungselementen des HR1 Genes, welches auf Chromosom 3 lokalisiert ist und für den gleichnamigen Rezeptor kodiert. Das HR1 Gen stellt auf Grund der zentralen Bedeutung des HR1 Rezeptors in der AMPK-vermittelten Nahrungsaufnahme ein plausibles Kandidatengen im Kontext der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme dar. Da der HR1 auch über die Modulation anderer Neurotransmitter indirekt durch Antipsychotika beeinflusst werden kann, können auch Antipsychotika, die per se keinen ausgeprägten HR1- Antagonismus zeigen, einen Effekt auf die Gewichtszunahme ausüben. Ein direkter Einfluss auf Gewichtsparameter, der über den HR1 vermittelt wird, sollte in Antipsychotika mit hohem HR1- Antagonismus einen anderen Effekt, in Abhängigkeit von den funktionalen Folgen des Polymorphismus, als in solchen mit einem schwachen HR1- Antagonismus zeigen. Der indirekte Einfluss wurde an Hand der statistischen Standarduntersuchungen (ANOVA und ANCOVA) beurteilt. Zur Untersuchung eines direkten Einflusses wurde die Studienpopulation getrennt nach Histaminaffinität untersucht. In Analogie zu der Studie von Verhof et al. wurden die Medikamente Olanzapin, Clozapin und Quetiapin einer hohen HR1-Affinität und alle anderen einer niedrigen HR1- Affinität zugeordnet.¹⁸⁹

In allen drei Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Medikation, Basisgewicht und rs17782313 Genotyp in den verschiedenen Genotypgruppen der untersuchten Polymorphismen. Die Polymorphismen rs346074 und rs346075 stehen in einem absoluten LD ($D'=1$ und $r^2=1$), weshalb nachfolgend nur der rs346075 Polymorphismus beschrieben ist. Zudem besteht eine starke Kopplung des rs346070 an den rs346074 Polymorphismus ($D'=1$ und $r^2=0,355$).

Weder für den rs346070 noch für den rs346075 Polymorphismus konnte in einer der drei Populationen ein signifikanter Einfluss auf die Gewichtsparameter vor Therapiebeginn identifiziert werden (Tabellen 54 und 55).

Nach 4 Wochen zeigten AA-Genotyp Träger des rs346075 Polymorphismus in allen drei Populationen die ausgeprägteste Gewichtszunahme, ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen ($0,110 < p < 0,866$; Tabelle 55).

Auch unter Berücksichtigung eines direkten Einflusses in den nach Histamin-Rezeptor-Affinität differenzierten Studienpopulationen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten Polymorphismen und den Gewichtsparametern vor und nach der Therapie festgestellt werden.

In einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten ANCOVA Modell (siehe Abschnitt 3.6.4) konnte für den **rs346070 Polymorphismus** kein signifikanter Einfluss auf die Gewichtsveränderung in den drei untersuchten Populationen ($0,082 < p < 0,833$) und in der chronischen Patientenkohorte (CC:26,1; CT:25,4; TT:25,7; $p=0,648$) beobachtet werden. Zudem zeigte sich kein Interaktionseffekt zwischen

untersuchtem Genotyp und Affinität zum HR1 Rezeptor ($p=0,511$) bzw. dem Geschlecht ($p=0,810$) in der Gewichtszunahme.

Tabelle 54 ANOVA rs346070 Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	CC 249	CT 88	TT 13	P	CC 128	CT 44	TT 6	CC 249	CC 58	CT 30	TT 2	CC 249
Gewicht Aufnahme	75,0	73,7	75,7	0,802	75,0	71,9	72,1	0,526	72,3	73,6	66,0	0,794
Gewicht 4 Wochen	76,4	75,2	77,1	0,800	76,2	73,2	73,2	0,531	74,1	75,5	72,2	0,906
BMI Aufnahme	25,6	25,0	24,8	0,602	25,7	24,1	23,7	0,156	24,0	24,9	19,6	0,296
BMI 4 Wochen	26,1	25,5	25,2	0,575	26,2	24,5	24,0	0,139	24,6	25,6	21,5	0,417
Δ Gewicht	1,4	1,4	1,3	0,996	1,3	1,4	1,2	0,984	1,8	2,0	6,2	0,129
%Δ Gewicht	2,2	2,3	2,2	0,973	2,0	2,1	2,0	0,980	2,7	2,8	9,3	0,114
Δ BMI	0,5	0,5	0,4	0,971	0,4	0,4	0,4	0,986	0,6	0,6	1,8	0,231

Tabelle 55 ANOVA rs346074/5 Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	AA 51	AC 146	CC 153	P	AA 28	AC 72	CC 78	P	AA 10	AC 41	CC 39	P
Gewicht Aufnahme	75,0	73,4	75,9	0,427	72,0	72,6	76,3	0,278	72,3	70,9	74,5	0,597
Gewicht 4 Wochen	76,6	74,9	77,2	0,459	74,1	73,7	77,4	0,348	75,7	73,1	75,8	0,706
BMI Aufnahme	25,3	25,1	25,8	0,454	24,4	24,6	26,2	0,144	24,5	23,8	24,6	0,783
BMI 4 Wochen	25,8	25,6	26,3	0,483	25,1	25,0	26,5	0,177	25,5	24,5	25,0	0,810
Δ Gewicht	1,6	1,5	1,3	0,817	2,2	1,2	1,0	0,273	3,4	2,2	1,3	0,128
%Δ Gewicht	2,5	2,2	2,1	0,818	3,5	1,7	1,8	0,176	5,4	3,0	2,2	0,110
Δ BMI	0,5	0,5	0,4	0,866	0,7	0,4	0,3	0,302	1,0	0,7	0,5	0,213

Träger des rs346075 AA-Genotyps zeigten übereinstimmend mit den Ergebnissen der ANOVA die ausgeprägteste Gewichtszunahme in einem adjustierten ANCOVA Modell und den höchsten BMI in chronischen Patienten, ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen ($0,102 < p < 0,963$; und AA:26,7; AC:25,9; CC:26,1 kg/m^2 ; $p=0,861$). Eine veränderte Gewichtszunahme in Abhängigkeit von der Histaminaffinität konnte im Interaktionsmodell nicht beobachtet werden ($p=0,277$). Im Gegensatz hierzu zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der nach Geschlecht differenzierten Gewichtszunahme des rs346075 Polymorphismus ($p=0,036$; Abbildung 81). Hierbei zeigten Frauen einen Anstieg der Gewichtszunahme mit dem C-Allel, während für Männer ein umgekehrter Effekt identifiziert werden konnte. Für den Genotyp allein konnte in diesem Modell kein signifikanter Einfluss identifiziert werden ($p=0,774$).

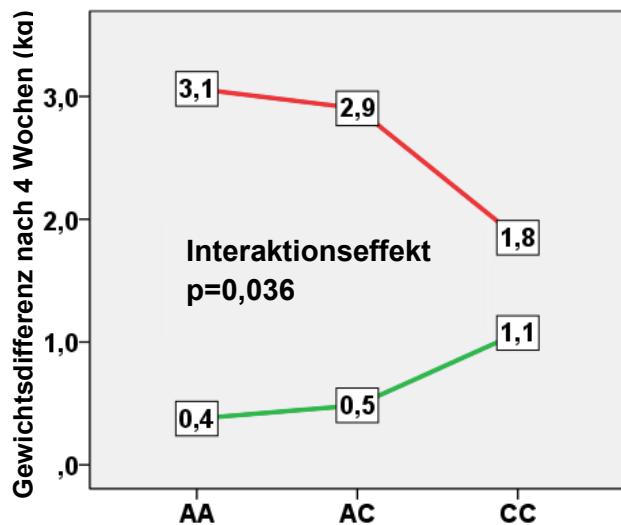


Abbildung 81: ANCOVA Interaktionsmodell rs346075 Genotyp x Geschlecht (grün = weiblich, rot = männlich)

3.6.5.7 rs7973796 (PMCH)

Der rs7973796 Polymorphismus befindet sich 4,5 kb entfernt von der 5'-Region des MCH-precursor (PMCH) Genes auf Chromosom 12, welches für das orexogene Neuropeptid Melanin-Concentrating Hormon (MCH) kodiert.^{196,197} Die bis jetzt einzige genomweite Linkage-Studie im Zusammenhang mit Übergewicht unter Antipsychotika konnte zwei Marker in der Nähe des Genes identifizieren.¹²² In einer Folgestudie konnten die Autoren den rs7973796 Polymorphismus als vielversprechendste Punktmutation im Bereich des PMCH Genes identifizieren und mit einem erhöhten BMI in Olanzapin therapierten Patienten assoziieren.¹⁹⁷

In allen drei Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Medikation, rs17782313 Genotyp und Basisgewicht in den verschiedenen Genotypgruppen des untersuchten Polymorphismus. Die einzige Ausnahme hiervon bildete die first Episode Population, in welcher GG-Genotyp Träger größtenteils (72,7 %; p=0,024) weiblichen Geschlechtes waren

In keiner der drei Studienpopulationen konnte ein signifikanter Einfluss des rs7973796 Polymorphismus auf die Gewichtsparameter vor und nach der Therapie identifiziert werden (Tabelle 56). Träger des GG-Genotyps zeigten in fast allen Parametern der drei Studienpopulationen ein höheres Basisgewicht und eine verstärkte Gewichtszunahme ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen (Tabelle 56).

Tabelle 56 ANOVA PMCH Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	AA 65	AG 182	GG 103	P	AA 30	AG 94	GG 54	P	AA 19	AG 49	GG 22	P
Gewicht Aufnahme	72,5	74,7	76,2	0,382	70,1	74,5	75,8	0,296	68,8	75,5	69,6	0,174
Gewicht 4 Wochen	74,0	76,0	77,8	0,334	71,0	75,9	77,0	0,236	70,4	77,3	72,1	0,180
BMI Aufnahme	25,1	25,3	25,8	0,626	24,7	24,9	26,2	0,330	23,5	24,5	24,1	0,772
BMI 4 Wochen	25,6	25,7	26,4	0,540	25,0	25,4	26,6	0,304	24,1	25,1	25,0	0,727
Δ Gewicht	1,5	1,3	1,6	0,634	0,9	1,4	1,3	0,768	1,6	1,8	2,5	0,588
%Δ Gewicht	2,3	2,0	2,4	0,755	1,4	2,2	2,0	0,756	2,4	2,7	3,8	0,557
Δ BMI	0,5	0,4	0,5	0,752	0,3	0,5	0,4	0,753	0,5	0,6	0,9	0,528

In einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten ANCOVA Modell (siehe Abschnitt 3.6.4) konnte sowohl in den drei untersuchten Studienpopulationen ($0,341 < p < 0,797$) als auch in der chronischen

Patientenkohorte (AA:25,7; AG:25,9; GG:26,3; $p=0,825$) kein signifikanter Einfluss des rs7973796 Genotyps auf die Gewichtszunahme bzw. den BMI identifiziert werden. Auch der Interaktionseffekt zwischen dem rs7973796 Genotyp und der Art des Antipsychotikums ($p=0,955$) bzw. dem Geschlecht ($p=0,842$) verblieb ohne signifikantes Ergebnis.

3.6.5.8 rs7799039 (LEP) und rs1137101 (LEPR)

Der untersuchte rs7799039 Polymorphismus befindet sich in der Promoterregion des LEP Genes auf Chromosom 1q31.3 und konnte in Abhängigkeit vom Genotyp in einer Studie mit einer erhöhten Leptinsekretion bzw. -transkription in Verbindung gebracht werden.²⁰⁴ Der rs1137101 Polymorphismus ist in Exon 6 des LEPR Genes lokalisiert und konnte in zwei Studien mit veränderten Gewichtsparametern unter Antipsychotika-Therapie assoziiert werden.^{130, 131} Beide Polymorphismen stellen auf Grund der Lokalisation in relevanten Steuerungselementen des Leptins und seines Rezeptors interessante Kandidaten einer Beeinflussung der Energiehomöostase und somit auch der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme dar.

In allen drei Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Medikation, rs17782313 Genotyp und Basisgewicht in den verschiedenen Genotypgruppen der beiden untersuchten Polymorphismen. Ausnahme hiervon bildete der rs7799039 Polymorphismus, welcher in der Gesamt- und adjustierten Population, für Träger des AA-Genotyps einen erhöhten Anteil an Hochrisiko-Medikation enthielt (62 vs. 38 %; p=0,047 bzw. 71 vs. 29 %; p=0,003). Zudem zeigten GG-Genotyp Träger des rs7799039 Polymorphismus einen erhöhten Anteil an weiblichen Patienten in der first Episode Population (76 vs. 24 %; p=0,014) und AA-Träger des rs1137101 Polymorphismus einen signifikant höheren Anteil an rs17782313 CC-Genotyp Träger, jedoch nur in der adjustierten Studienpopulation.

Tabelle 57 ANOVA LEP Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	GG 102	GA 177	AA 71	P	GG 30	GA 94	AA 54	P	GG 25	GA 44	AA 21	P
Gewicht Aufnahme	75,1	73,8	76,6	0,470	77,2	71,7	76,5	0,099	70,0	74,0	72,7	0,607
Gewicht 4 Wochen	76,4	75,1	78,2	0,395	77,7	73,2	78,4	0,143	71,3	76,3	74,8	0,450
BMI Aufnahme	25,5	25,0	26,3	0,226	26,6	24,4	25,6	0,074	24,6	24,0	24,2	0,901
BMI 4 Wochen	26,0	25,5	26,8	0,177	26,7	25,0	26,1	0,140	24,0	24,7	24,9	0,971
Δ Gewicht	1,4	1,4	1,6	0,841	0,5	1,5	1,9	0,079	1,3	2,2	2,2	0,450
%Δ Gewicht	2,0	2,3	2,3	0,908	0,7	2,5	2,6	0,060	2,1	3,3	3,2	0,524
Δ BMI	0,4	0,5	0,5	0,913	0,1	0,5	0,6	0,073	0,5	0,7	0,7	0,512

In keiner der drei Studienpopulationen konnte ein signifikanter Einfluss des rs7973796 und rs1137101 Polymorphismus auf die Gewichtsparameter vor und nach der Therapie identifiziert werden (Tabellen

57 und 58). Träger des G-Allels des rs7973796 Polymorphismus zeigten in allen Studienpopulationen eine verstärkte Gewichtszunahme, was jedoch nur in der adjustierten Subpopulation zu einem nicht signifikanten Trend ($0,060 < p < 0,079$; Tabelle 57) führte.

Tabelle 58 ANOVA LEPR Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	AA 104	AG 168	GG 78	P	AA 56	AG 86	GG 36	P	AA 25	AG 47	GG 18	P
Gewicht Aufnahme	72,9	76,1	74,1	0,276	75,0	74,4	72,1	0,697	69,3	74,0	73,6	0,473
Gewicht 4 Wochen	74,2	77,8	75,2	0,166	76,0	76,0	73,2	0,647	71,4	76,3	74,5	0,442
BMI Aufnahme	25,3	25,9	24,7	0,227	25,5	25,5	24,2	0,457	23,5	24,9	23,4	0,411
BMI 4 Wochen	25,7	26,5	25,0	0,096	25,8	26,0	24,5	0,338	24,2	25,6	23,7	0,251
Δ Gewicht	1,3	1,7	1,0	0,338	1,0	1,6	1,1	0,488	2,1	2,3	0,9	0,241
%Δ Gewicht	1,8	2,6	1,9	0,308	1,2	2,6	1,9	0,263	2,9	3,4	1,5	0,294
Δ BMI	0,4	0,6	0,3	0,248	0,3	0,5	0,3	0,271	0,7	0,8	0,3	0,187

Für den **rs7799039 Polymorphismus** konnte auch in einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten ANCOVA Modell kein signifikanter Einfluss auf die Gewichtsveränderung in den drei untersuchten Populationen ($0,162 < p < 0,858$) und in der chronischen Patientenkohorte (GG:25,7; GA:25,6; AA:27,3; $p=0,114$) beobachtet werden.

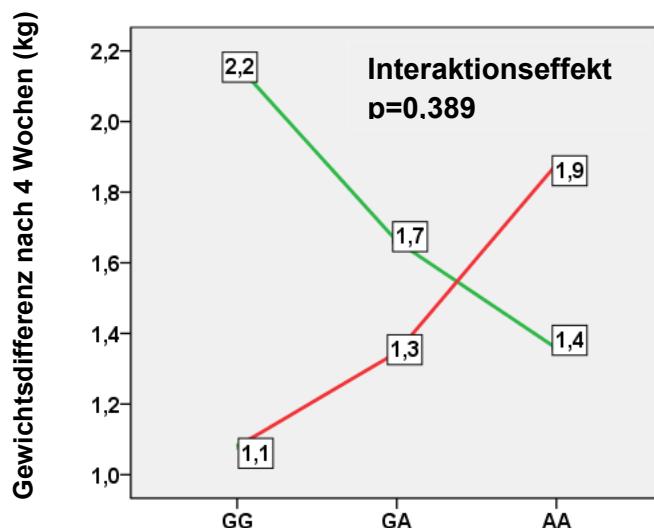


Abbildung 82: ANCOVA Interaktionsmodell rs7799039 Genotyp x Medikation (grün = Olanzapin, Clozapin, rot = Quetiapin, Risperidon, Amisulpirid, Paliperidon)

Unter Berücksichtigung der Medikation zeigte sich für Patienten, die mit Olanzapin bzw. Clozapin therapiert wurden, ein Anstieg der Gewichtszunahme mit dem G-Allel, während für Patienten mit

weniger stark gewichtsinduzierender Medikation eine Gewichtsabnahme mit dem G-Allel zu beobachten war (Abbildung 82). Sowohl der Interaktionseffekt ($p=0,389$) als auch der Genotyp allein ($p=0,959$) erreichte kein signifikantes Niveau ($p=0,389$).

Zudem konnte kein Einfluss des Geschlechts auf die Gewichtszunahme in den jeweiligen Genotypgruppen beobachtet werden ($p=0,538$).

Heterozygote Träger des **rs1137101 Polymorphismus** konnten in allen drei untersuchten Studienpopulationen (ANCOVA $0,071 < p < 0,250$) und in der Kohorte aus chronischen Patienten (AA:25,9; AG:26,5; GG:25,0 kg/m²; $p=0,218$) die stärkste Gewichtszunahme bzw. den höchsten BMI zeigen, wobei dieses Ergebnis nur einen Trend für die Gesamt- und first Episode Population zeigte. Dieser Effekt war in beiden betrachteten Therapiegruppen (Olanzapin und Clozapin vs. weitere Antipsychotika) zu beobachten, so dass kein Interaktionseffekt identifiziert werden konnte ($p=0,960$).

Bei Betrachtung der Gewichtszunahme unter Berücksichtigung des Geschlechtes zeigte sich ein starker Anstieg der Gewichtszunahme mit dem A-Allel nur in Männern (rs1137101 Genotyp: $p=0,081$; Geschlecht: $p<0,001$; Interaktionseffekt: $p=0,053$ Abbildung 83). Der geschlechtsspezifische Unterschied für den AA-Genotyp beträgt hierbei 3,0 kg (KI 1,1-4,8; $p<0,001$).

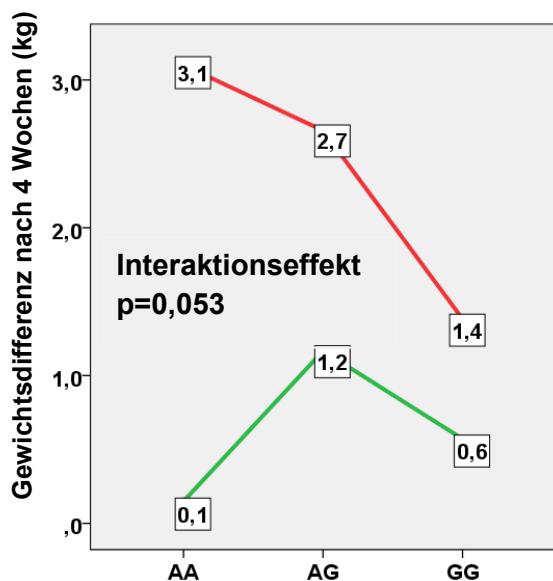


Abbildung 83: ANCOVA Interaktionsmodell rs1137101 Genotyp x Geschlecht (grün = weiblich, rot = männlich)

3.6.5.9 rs3813929 (5HT_{2C})

Der rs3813929 Polymorphismus ist auf Chromosom X in der Promotorregion des 5HT_{2C} Rezeptor Genes lokalisiert,²¹¹ welches für den gleichnamigen G-Protein gekoppelten Rezeptor kodiert, der eine relevante Rolle in der Energiehomöostase spielt.^{210,212} Für den untersuchten Polymorphismus wurde eine Änderung der Promoteraktivität beschrieben.²¹⁵ Zudem stellt der rs3813929 Polymorphismus den am besten untersuchten Marker im Kontext der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme dar und konnte in einer Metaanalyse einen signifikanten Einfluss zeigen.²¹³ In Analogie zu den Auswertungen eines anderen Markers (siehe Abschnitt 3.6.5.6) wurde, neben dem indirekten Einfluss der Mutation auf die verschiedenen Antipsychotika, auch ein direkter Einfluss auf Medikamente mit hoher bzw. niedriger 5HT_{2C}-Rezeptor Affinität untersucht (siehe nähere Erläuterungen in 3.6.4). Hierbei wurden auf Grundlage der Ki-Werte von Naber et al. die Antipsychotika Amisulprid und Quetiapin als Medikamente mit niedriger Affinität und Risperidon, Olanzapin, Clozapin und Paliperidon als hochaffine Medikamente definiert.²¹⁴

In allen drei Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter und Medikation in den verschiedenen Genotypgruppen des rs3813929 Polymorphismus. Ausnahme hiervon bildete die first Episode Population, in welcher Wildtyp Träger signifikant jünger waren ($p=0,043$). Das Geschlecht war in allen drei Population signifikant unterschiedlich verteilt, was jedoch zu erwarten war und auf der Tatsache beruht, dass der untersuchte Polymorphismus auf Chromosom X lokalisiert ist, sodass Männer (XY) keinen Heterozygoten Genotyp ausprägen können. Damit dies nicht zu Verzerrungen der Ergebnisse führt, wurden außer der ANOVA alle weitergehenden Untersuchungen mit allen T-Allel Trägern durchgeführt (CT+TT). Vor Therapiebeginn zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Gewichtsparameter in den Genotypgruppen des untersuchten Polymorphismus für die Gesamt und first Episode Population (Tabelle 59). Zudem war der CC-Risiko Genotyp des rs17782313 Polymorphismus ungleichmäßig in der adjustierten Subpopulation enthalten (100 % im Wildtyp des rs3813929 Polymorphismus; $p=0,029$).

Nach 4 Wochen konnten kein signifikanter Einfluss des rs3813929 Polymorphismus auf die Gewichtsparameter in allen untersuchten Studienpopulationen identifiziert werden (Tabelle 59). Träger des CC-Genotyps zeigten in allen Studienpopulationen eine stärkere Gewichtszunahme als T-Allel Träger, ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen (Δ Gewicht; Gesamtpopulation; 1,5 vs. 1,0 kg; $p=0,247$).

Wildtyp Träger des rs3813929 Polymorphismus zeigten in einem ANCOVA Modell eine leicht erhöhte Gewichtszunahme im Vergleich zu T-Allel Trägern ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen ($0,461 < p < 0,835$). Auch in der chronischen Patientenkohorte (CC:25,9; CT+TT:26,2 kg/m²; $p=0,648$) konnte kein signifikanter Einfluss auf den BMI vor Therapiebeginn identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der Medikation zeigte sich für Antipsychotika mit hoher bzw. niedriger (Quetiapin und Amisulprid) 5HT_{2C}-Affinität ein vergleichbarer Effekt des untersuchten Polymorphismus auf die

Gewichtszunahme ($p=0,618$). Zudem konnte sowohl für Männer als auch für Frauen eine vergleichbare Gewichtszunahme in den jeweiligen Genotypgruppen beobachtet werden ($p=0,986$).

Tabelle 59: ANOVA 5HT_{2C} Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	CC 245	CT 74	TT 31	P	CC 129	CT 39	TT 10	P	CC 63	CT 16	TT 11	P
Gewicht Aufnahme	75,6	70,4	78,5	0,024	75,1	70,6	75,4	0,311	74,2	63,9	76,3	0,047
Gewicht 4 Wochen	77,1	71,1	80,4	0,006	76,5	71,3	77,0	0,199	76,4	64,6	78,6	0,015
BMI Aufnahme	25,5	25,5	25,0	0,876	25,4	25,2	24,2	0,805	24,5	23,3	23,7	0,637
BMI 4 Wochen	26,0	25,7	25,6	0,841	25,8	25,4	24,7	0,768	25,3	23,6	24,5	0,436
Δ Gewicht	1,5	0,8	1,9	0,141	1,4	0,7	1,6	0,472	2,2	0,7	2,3	0,200
%Δ Gewicht	2,0	1,4	2,4	0,238	2,2	1,3	1,9	0,580	3,3	1,3	3,0	0,247
Δ BMI	0,5	0,2	0,6	0,115	0,5	0,2	0,5	0,319	0,7	0,3	0,8	0,217

3.6.5.10 rs2236418 (GAD)

Das rs2236418 Polymorphismus befindet sich auf Chromosom 10p11.23 in der Promotoregion des Glutamatdecarboxylase 2 (GAD2) Genes, welches die Bildung zu GABA, einem der relevantesten hemmenden Transmitter im ZNS, katalysiert^{225, 226} und unter subchronischer Olanzapininjektion verstärkt in Ratten exprimiert wird.¹²⁹ Der untersuchte Polymorphismus stellt eine Punktmutation von Guanin zu Adenin dar, wobei für G-Allel Träger eine 6-fach erhöhte transkriptionale Aktivität nachgewiesen werden konnte.²³¹

In allen drei Populationen konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, rs17782313 Genotyp und Medikation in den verschiedenen Genotypgruppen des untersuchten Polymorphismus identifiziert werden. Vor Therapiebeginn zeigte sich sowohl in der Gesamt- als auch in der adjustierten Population ein signifikanter Einfluss des rs2236418 Polymorphismus auf das Gewicht und den BMI zur Aufnahme: G-Allel Träger wiesen erhöhte Gewichtsparameter im Vergleich zu Trägern des AA-Genotyps auf (BMI in kg/m²: AA:24,8; AG:26,6; GG:26,4; p=0,009, Tabelle 60).

Nach 4 Wochen konnte in allen drei Studienpopulationen ein signifikanter Einfluss des untersuchten Polymorphismus auf die Gewichtsveränderung identifiziert werden. Hierbei zeigten Träger des AA-Genotyps die ausgeprägteste Gewichtszunahme, wobei heterozygote Allel-Träger den schwächsten Gewichtsanstieg verzeichneten (Gesamtpopulation: AA:1,7; AG:0,7; GG:1,6 kg; p=0,021, Tabelle 60).

Tabelle 60: ANOVA GAD Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Episode Subpopulation			
	AA 223	AG 109	GG 18	P	AA 121	AG 49	GG 8	P	AA 54	AG 31	GG 5	P
Gewicht Aufnahme	72,6	78,7	76,6	0,006	71,7	79,2	80,0	0,014	70,6	75,5	76,8	0,322
Gewicht 4 Wochen	74,4	79,4	78,2	0,023	73,4	79,5	80,7	0,048	73,1	76,4	78,6	0,549
BMI Aufnahme	24,8	26,6	26,4	0,009	24,5	27,0	26,4	0,018	23,7	24,7	26,8	0,346
BMI 4 Wochen	25,4	26,8	26,9	0,030	25,0	27,1	26,6	0,055	24,6	25,0	27,4	0,460
Δ Gewicht	1,7	0,7	1,6	0,021	1,7	0,3	0,7	0,033	2,6	0,9	1,8	0,039
%Δ Gewicht	2,7	1,2	2,3	0,029	2,6	0,6	1,0	0,032	3,8	1,4	2,5	0,054
Δ BMI	0,6	0,2	0,5	0,026	0,6	0,1	0,2	0,029	0,9	0,3	0,6	0,047

Da eine funktionale Auswirkung des G-Allels beschrieben wurde, wurden die wenigen Träger des GG-Genotyp mit heterozygoten G-Alle Trägern (AG+GG) zusammengefasst. Hierbei zeigten Träger des AA-Genotyps in allen drei untersuchten Studienpopulationen eine signifikant starke Gewichtszunahme als G-Allel-Träger (1,7 vs. 0,8 kg; $p=0,010$; 1,7 vs. 0,4 kg; $p=0,009$; 2,6 vs. 1,0 kg; $p=0,014$).

Die Ergebnisse des ANCOVA Modelles (siehe Abschnitt 3.6.4) sind in Abbildung 84 dargestellt. Hierbei zeigte sich in Übereinstimmung zur ANOVA bzw. zum T-Test eine stärkere Gewichtszunahme für AA Genotyp Träger in allen untersuchten Studienpopulationen, wobei in der Gesamt- und adjustierten Population ein Trend ($p=0,091$ bzw. 0,063) und in der first Episode Population ein signifikantes Ergebnis beobachtet werden konnte ($p=0,029$, Abbildung 84). Im Gegensatz hierzu zeigten langjährig behandelte AA-Genotyp Träger einen signifikant niedrigen BMI vor Therapiebeginn ($p=0,005$, Abbildung 85).

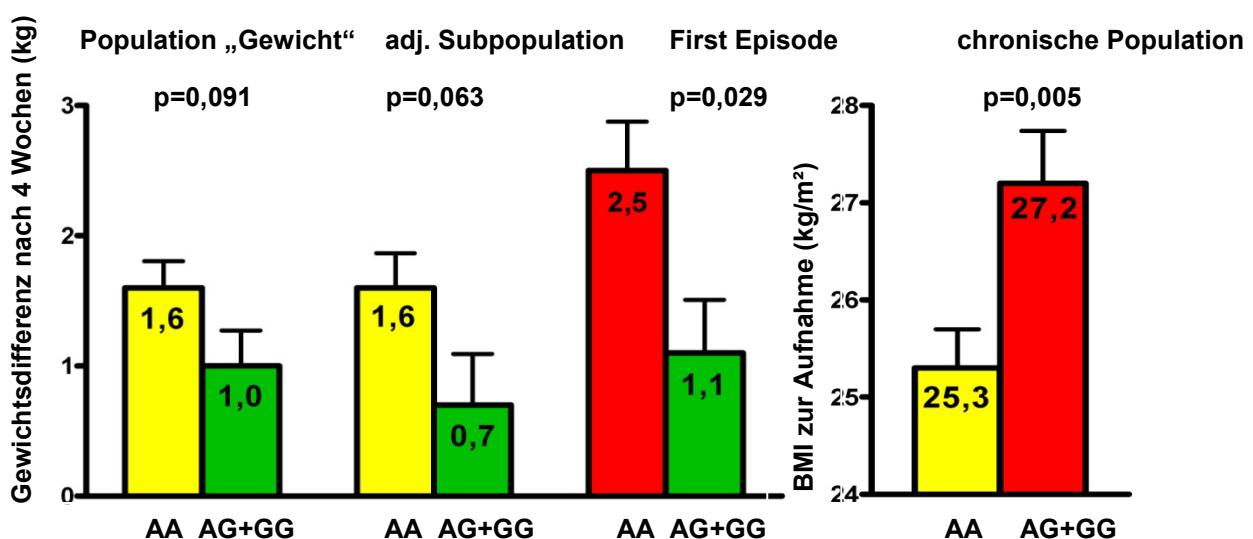


Abbildung 84: Einfluss des rs2236418 Genotyps auf die Gewichtszunahme nach 4 Wochen bzw. auf den BMI vor Therapiebeginn (ANCOVA)

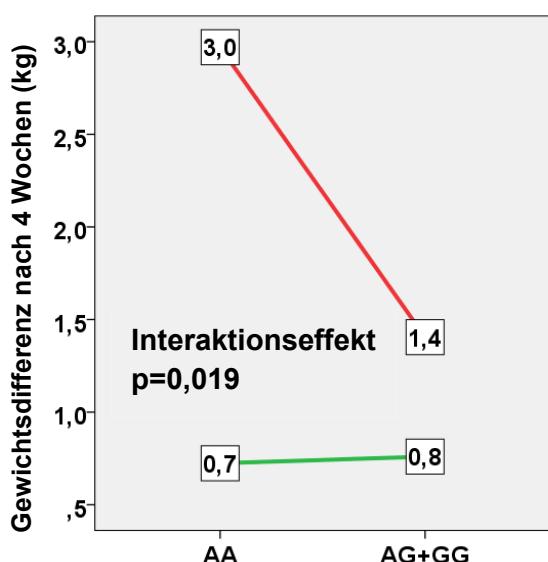


Abbildung 85: ANCOVA Interaktionsmodell rs2236418 Genotyp x Geschlecht (grün = weiblich, rot = männlich)

Sowohl mit Olanzapin und Clozapin als auch mit weiteren Antipsychotika behandelte Patienten zeigten eine stärkere Gewichtszunahme für AA Genotyp Träger, so dass kein Interaktionseffekt identifiziert werden konnte ($p=0,778$). Für Männer zeigte sich ein starker Unterschied zwischen AA und AG+GG-Genotyp Trägern, während Frauen einen unveränderten Effekt auf die Gewichtszunahme zeigten (Genotyp: $p=0,029$; Geschlecht: $p<0,0001$; Interaktionseffekt: $p=0,019$, Abbildung 85).

3.6.5.10 s16147 (NPY)

Der rs16147 Polymorphismus stellt eine Punktmutation von Thymin zu Cytosin da und befindet sich in der Promoterregion auf Chromosom 7q15.1 des NPY Genes,²¹⁷ welches für eines der potentesten orexigenen Peptide kodiert.^{218,219} Das mutierte C-Allel konnte mit einer 30 % vermindernden basalen NPY Expression in Verbindung gebracht werden²²² und wurde in einer kürzlich publizierten Studie mit einer erhöhten Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme assoziiert.²¹⁸

In allen drei Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, rs17782313 Genotyp und Medikation in den verschiedenen Genotypgruppen des untersuchten Polymorphismus.

In der Gesamt- und adjustierten Subpopulation konnte kein signifikanter Einfluss des rs16147 Polymorphismus auf Gewichtsparameter vor und nach der Therapie identifiziert werden (Tabelle 61). Zwar zeigten Träger des AA-Genotyps die ausgeprägteste Gewichtszunahme in allen Studienpopulationen, einen Trend bzw. ein signifikantes Ergebnis konnte hierbei nur in der first Episode Population verzeichnet werden (Δ Gewicht in kg: AA:3,2; AG:1,7; GG:1,2; $p=0,055$, Tabelle 61).

Tabelle: 61 ANOVA NPY Polymorphismus

Variable n	Population „Gewicht“				Adjustierte Subpopulation				First Subpopulation				Episode Subpopulation			
	AA 88	AG 176	GG 86	P	AA 43	AG 88	GG 47	P	AA 22	AG 45	GG 23	P	AA 75,3	AG 74,1	GG 75,5	P 0,758
Gewicht Aufnahme	75,3	74,1	75,5	0,758	75,2	73,9	73,4	0,863	77,1	71,2	71,2	0,321				
Gewicht 4 Wochen	77,1	75,3	76,8	0,629	76,9	74,9	74,9	0,771	80,3	72,9	72,4	0,134				
BMI Aufnahme	25,4	25,3	25,8	0,787	25,5	25,1	25,3	0,945	24,6	24,1	24,1	0,918				
BMI 4 Wochen	26,0	25,7	26,2	0,729	26,0	25,4	25,7	0,820	25,7	24,6	24,5	0,659				
Δ Gewicht	1,9	1,3	1,3	0,335	1,7	1,0	1,4	0,452	3,2	1,7	1,2	0,054				
%Δ Gewicht	2,8	2,0	1,9	0,388	2,5	1,7	2,1	0,648	4,7	2,7	1,7	0,060				
Δ BMI	0,6	0,4	0,4	0,281	0,6	0,3	0,5	0,334	1,1	0,6	0,4	0,050				

Die Ergebnisse des ANCOVA Modelles (siehe Abschnitt 3.6.4) sind in Abbildung 86 dargestellt. In Analogie zu den Ergebnissen der ANOVA zeigten AA-Genotyp Träger in allen drei untersuchten Studienpopulationen eine höhere Gewichtszunahme als G-Allel Träger, wobei ein signifikantes Niveau nur in der first Episode Population erreicht wurde ($p=0,007$, Abbildung 86). Ein signifikanter Einfluss

des untersuchten Polymorphismus auf den BMI vor Therapiebeginn konnte in chronischen Patienten nicht nachgewiesen werden (AA:25,5; AG:25,9 GG:26,7 kg/m² p=0,400).

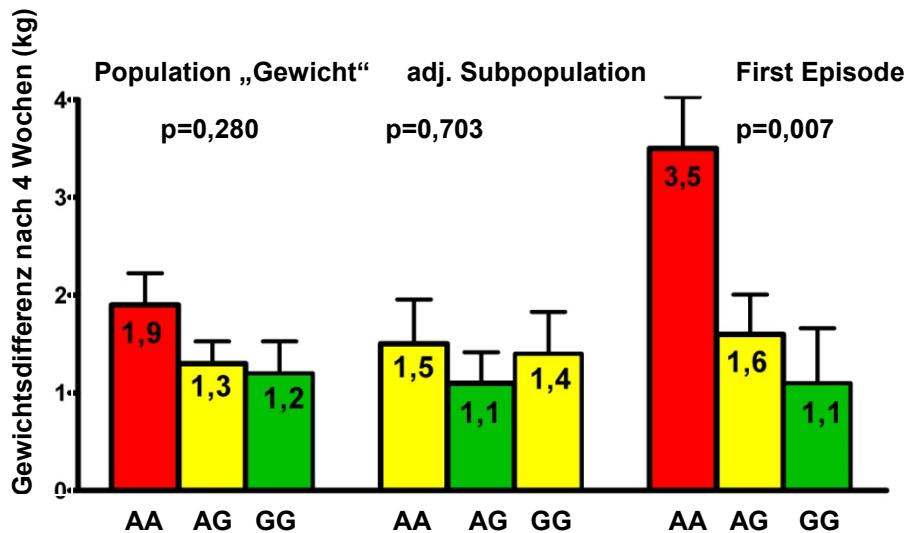


Abbildung 86: Einfluss des rs16147 Genotyps auf die Gewichtszunahme nach 4 Wochen bzw. auf den BMI vor Therapiebeginn (ANCOVA)

Unter Berücksichtigung der Medikation zeigte sich für mit Olanzapin und Clozapin behandelte Patienten ein Anstieg der Gewichtszunahme mit dem A-Allel des rs16147 Polymorphismus. Im Gegensatz hierzu zeigten Patienten, die mit Risperidon, Quetiapin, Amisulprid und Paliperidon therapiert wurde, einen vergleichbaren Gewichtszunahme in allen Genotypen (Genotyp: p=0,116; Medikation: p=0,323; Interaktionseffekt: p=0,079, Abbildung 87).

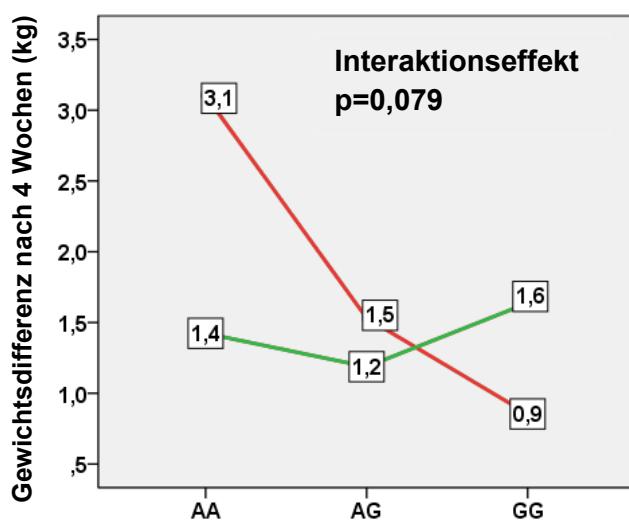


Abbildung 87: ANCOVA Interaktionsmodell rs16147 Genotyp x Medikation (rot = Olanzapin, Clozapin, grün = Quetiapin, Risperidon, Amisulprid, Paliperidon)

Ein Interaktionseffekt für den rs16147 Genotyp und das Geschlecht konnte nicht identifiziert werden (p=0,971).

3.6.6 Kombinierte Einflussfaktoren

Um die Effektstärke eines jeweiligen Genotyps auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme nach 4 Wochen zu beurteilen und mit anderen klinischen Faktoren zu vergleichen wurde ein lineares Regressionsmodell gebildet. Als relevante Polymorphismen wurden hierbei Punktmutationen (rs17782313 (MC4R), rs16147 (NPY) und rs2236418 (GAD)) einbezogen, die einen signifikanten Einfluss in der **first Episode Population** zeigten. Grundlage dieser Auswahl stellt die erhöhte Gewichtszunahme in zuvor unbehandelten Patienten dar, welche eine Identifikation von Einflussfaktoren ermöglicht, die in chronischen Patienten durch langjährige Therapie und daraus resultierenden Verzerrungsfaktoren nur schwer nachweisbar sind.²⁷⁹ Anschließend wurden die in first Episode Patienten identifizierten Polymorphismen auch in der **Population „Gewicht“** untersucht.

Zur Beurteilung der **Langzeit-Auswirkung** eines Polymorphismus wurden relevante Punktmutationen mit einem signifikanten Einfluss auf den BMI vor Therapiebeginn in ein weiteres lineares Regressionsmodell eingeschlossen. Tabelle 62 stellt die Effektstärken der relevanten Polymorphismen auf die Gewichtszunahme nach 4 Wochen für die first Episode und die Gesamtpopulation gegenüber. In Analogie gibt Tabelle 63 einen Überblick über die Effektstärken auf den BMI vor Therapiebeginn.

Tabelle 62 Lineares Regressionsmodell für first Episode und Population „Gewicht“

Modell	First Episode n=90			Population „Gewicht“ n=350		
	B	Beta	p	B	Beta	P
Konstante	6,200		0,001	4,872		0,000<
rs16147	-1,202	-0,282	0,003	0,709	0,104	0,168
rs2236418	-1,248	-0,203	0,040	-0,317	-0,013	0,084
rs17782313	1,244	0,276	0,005	-0,596	-0,049	0,008
Komedikation*	-0,514	-0,085	0,387	-0,381	0,071	0,247
Medikation	-1,296	-0,212	0,032	0,196	0,000	0,556
Alter	0,002	0,011	0,911	-0,015	-0,071	0,169
Geschlecht	1,291	0,214	0,036	1,673	0,278	0,001<
Gewicht Aufnahme	-,044	-0,230	0,033	-0,060	-0,326	0,001<
R ²	0,327			0,162		

*mit weiteren gewichtsinduzierenden Medikamenten

Für zuvor unbehandelte Patienten zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Polymorphismen rs17782313 (MC4R; p=0,005), rs16147 (NPY; p=0,003) und rs2236418 (GAD; p=0,040), sowie der klinischen Faktoren Medikation (p=0,032), Geschlecht (p=0,036) und Gewicht zur Aufnahme (p=0,033). Den größten Einfluss auf die Gewichtszunahme wiesen hierbei die Polymorphismen rs17782313 und rs16147 auf. Von diesem Modell ausgehend erweist sich der Wildtyp des rs16147

und rs2236418, sowie die Mutante des rs17782313 Polymorphismus als Risikoallel. In einem ANCOVA Modell, adjustiert auf die in der Tabelle 62 angegebenen Verzerrungsfaktoren, zeigte die Anzahl der genannten genetischen Risikofaktoren (rs16147 AA-Genotyp, rs2236418 AA-Genotyp, rs17782313 C-Allel) einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtszunahme.

Patienten mit 3 Risikofaktoren (n=4; KI (2,5-10,4); p<0,001) sowie Patienten mit 2 Risikofaktoren (n=33; KI (0,5-5,0); p=0,009) zeigten hierbei eine signifikant stärkere Gewichtszunahme gegenüber Patienten mit keinen Risikofaktor (n=6). Eine gemeinsame Betrachtung von Patienten mit 2 und 3 Risikofaktoren, resultierte in einer mittlere Gewichtszunahme von 3,0 kg, und in wiederumsignifikante Unterschiede im Vergleich zu Patienten mit keinem Risikoallel (KI (1,1-5,1); p=0,001; Abbildung 88).

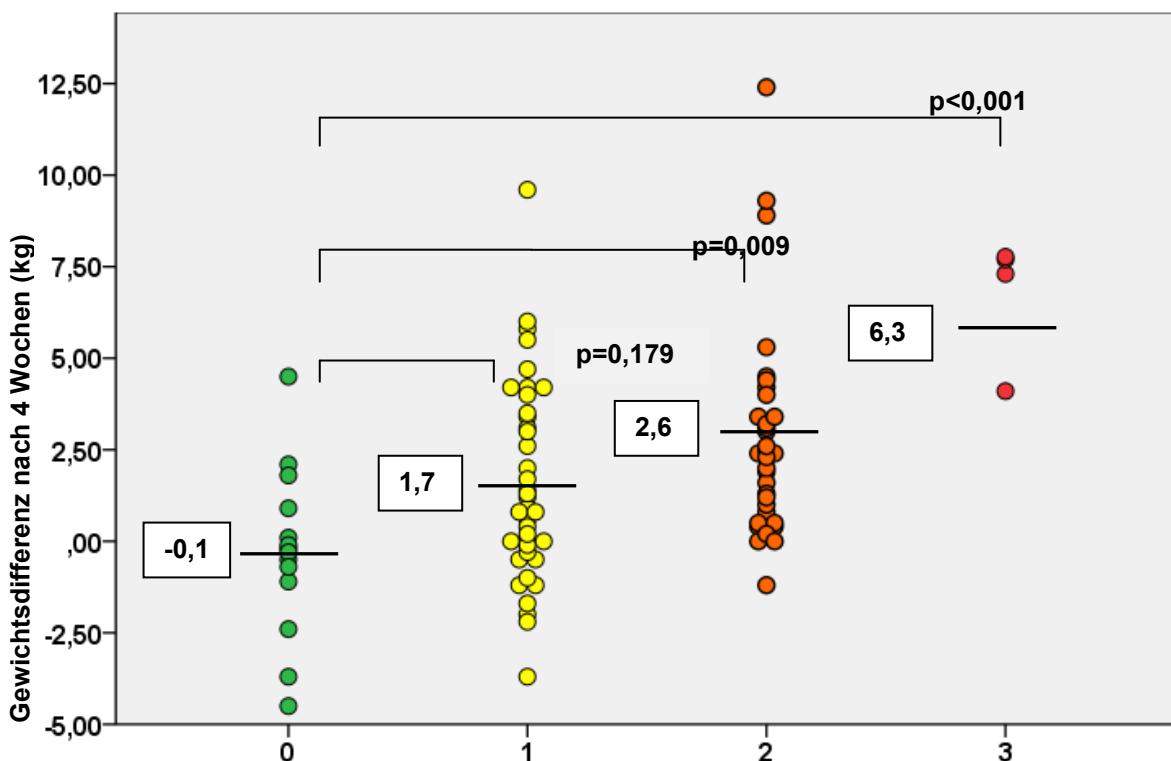


Abbildung 88: Stärke der Gewichtszunahme nach 4 Wochen in Abhängigkeit von der Anzahl der Risikoallele. Dargestellt sind die geschätzten Mittelwerte nach ANCOVA und die Signifikanz der Gruppenunterschiede nach Sidak-Korrektur

Im Gegensatz hierzu erreichten in der **Gesamtpopulation** nur der rs17782313 Polymorphismus (p=0,008) und die klinischen Faktoren Geschlecht und Gewicht zur Aufnahme ein signifikantes Niveau (p<0,001).

Unter den im vorherigen Kapitel beschriebenen klinischen Risikofaktoren erreichte sowohl in der first Episode als auch in der Population „Gewicht“ das Alter sowie das Gewicht zur Aufnahme einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtszunahme. Von diesen Faktoren stellt ein niedriges Gewicht zur Aufnahme einen robust replizierten Marker für eine verstärkte Gewichtszunahme dar. In Analogie zu vielen Studien, die eine Differenzierung über- bzw. unterhalb eines BMI von 25 vornahmen,^{272, 273, 280} sind in der nachfolgenden Abbildung 90 die Ergebnisse des Interaktionseffektes Risikomodel x BMI<25> des zuvor beschriebenen ANCOVA Modelles dargestellt.

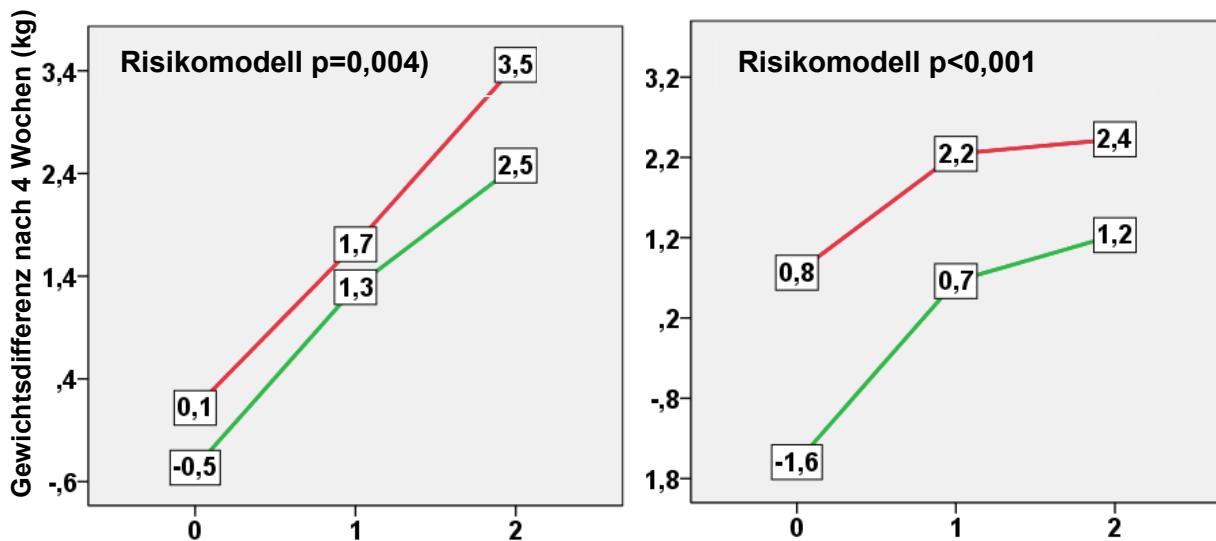


Abbildung 89: Stärke der Gewichtszunahme in Abhängigkeit vom Risikofaktor und einem **BMI <25** bzw. einem **BMI >25**. Für die Population „Gewicht“ (links) und die first Episode Population

Für beide Populationen zeigt sich ein signifikanter Einfluss des Risikomodelles ($p=0,004$ bzw. $p<0,001$) mit einer verstärkten Gewichtszunahme für Risiko-Genotyp-Träger. Patienten mit einem niedrigen BMI tragen ein erhöhtes Risiko für eine verstärkte Gewichtszunahme. Ein Anstieg der Gewichtszunahme war hierbei sowohl bei Patienten mit einem BMI unter 25 als auch über 25 zu beobachten, sodass kein Interaktionseffekt identifiziert werden konnte ($p=0,925$ bzw. $p=0,508$).

Tabelle 63: Lineares Regressionsmodell für chronische Patienten

Modell	Chronische Patienten n=252		
	B	Beta	p
Konstante	22,388		0,001<
rs17782313	-0,341	-0,038	0,534
rs2236418	1,931	0,177	0,004
rs9939609	-0,735	-0,097	0,116
Alter	0,051	0,150	0,017
Geschlecht	1,259	0,117	0,062
R ²		0,073	

Als signifikante Einflussfaktoren auf den **BMI vor Therapiebeginn** können nur der rs2236418 Polymorphismus ($p=0,004$) und das Alter ($p=0,017$) identifiziert werden (Tabelle 63). Dieses Modell erklärt nur 7,3 % der Varianz des BMI zur Aufnahme.

4. Diskussion

4.1 Population „Serum Olanzapin“

4.1.1 Klinische Interaktionen und Wechselwirkungen

In einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Modell konnte nur die Komedikation eines CYP1A2 Induktors (Rauchen, Carbamazepin oder Valproinsäure; $p=0,025$) einen signifikanten Einfluss auf die Dosis-korrigierten Olanzapin Serumkonzentration zeigen.

Übereinstimmend mit dem bekannten Einfluss des Rauchens auf die Induktion des CYP1A2 Enzyms (zusammengefasst in der Arbeit von Perera et al.),²⁵⁹ zeigten Raucher ($n=40$) einen Trend für niedrige Dosis-korrigierte Olanzapin Serumkonzentrationen gegenüber Nicht-Rauchern (1,5 vs. 1,9 ng/ml*mg; $p=0,067$). Die signifikant erhöhten Olanzapindosen in Rauchern (16,9 vs. 13,2mg; $p=0,014$) bei vergleichbaren Serumspiegeln, weisen auf eine adäquate Dosisanpassung im Rahmen eines TDM hin.

Auch der starke CYP1A2 Induktor Carbamazepin ($n=7$) führte zu einer verminderten Dosis-korrigierten Olanzapin Serumkonzentration (0,7 vs. 1,8 ng/ml*mg; $p=0,017$), wie in vielen Studien beschrieben.²⁸¹ Erwähnenswert ist hierbei, dass die Dosisanpassung nicht ausreichend war und in deutlich reduzierte Serumspiegel (12,5 vs. 25,5 ng/ml*mg; $p=0,068$) unterhalb des empfohlenen Therapiebereiches von 20 ng/ml resultierte. Dies betont die Relevanz einer adäquaten Dosisanpassung unter Komedikation von Carbamazepin.

In einer kürzlich publizierten Studie konnte ein dem Rauchen vergleichbarer Einfluss der Valproinsäure auf die Serumkonzentration des Olanzapins nachgewiesen werden.²⁶² Auf Grund der kleinen Patientenanzahl von 4 Patienten, die zudem in 2 Fällen Rauchern waren und in einem Fall Carbamazepin erhalten hatten, kann zu dieser Fragestellung keine valide Antwort gegeben werden.

Ein Einfluss des Geschlechts konnte in der untersuchten Studienpopulation nicht identifiziert werden. Dies steht im Kontrast zu einer erniedrigten CYP1A2 Aktivität und daraus postulierten verminderten CYP1A2 Clearance in Frauen (zusammengefasst in der Arbeit von Perera et al.).²⁵⁹ Jedoch konnte in Analogie hierzu ein erhöhtes C/D Verhältnis in Frauen gegenüber Männern identifiziert werden (1,9 vs. 1,6 ng/ml*mg; $p=0,222$). Zudem scheint ein signifikanter Einfluss von schwachen Einflussgrößen wie dem Geschlecht nur in ausreichend großen Studienpopulationen nachweisbar zu sein.⁷⁹

Da für ältere Patienten eine verlängerte Eliminationshalbwertzeit des Olanzapins bekannt ist,²⁵⁹ erwartet man für dieses Patientenkollektiv eine entsprechend erhöhte Dosis-korrigierte Olanzapin Serumkonzentration. Jedoch konnte nur ein gegensätzlicher, nicht signifikanter Effekt in der untersuchten Population beobachtet werden. Dies könnte durch die nur geringe Anzahl an älteren Patienten ($n=11 >60$ Jahren) und Verzerrungsfaktoren erklärt werden.

4.1.2 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf Serumkonzentrationen

„In der untersuchten Studienpopulation⁵⁴ zeigten Träger des **CYP1A2*1D** delT-Allels signifikant erhöhte Dosis-korrigierte Olanzapin Serumkonzentrationen gegenüber Wildtypträgern. Obwohl die Anzahl der delT-Allel Träger gering war (n=6 delT/T; n=3 delT/delT), stellt dies nach unserem Kenntnisstand die Studie mit der höchsten Anzahl an delT/delT-Genotyp Trägern dar, die im Zusammenhang mit der Pharmakokinetik von Olanzapin untersucht wurde. Zudem ist diese Studie die erste ihrer Art ist, die eine Assoziation des CYP1A2*1D Polymorphismus mit Dosis-korrigierten Olanzapin Serumkonzentrationen identifizieren konnte.“

Unsere Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Studie von Kootstra-Ros, welche höhere Dosis- und Körpergewicht-korrigierte Serumkonzentrationen für delT-Genotyp Träger identifizieren konnte, jedoch nur einen Patienten mit der homozygoten Mutante in der Studienpopulation beinhaltete.⁶⁶ Ghotbi et al. konnten keinen Einfluss des CYP1A2*1D Polymorphismus auf den Olanzapinmetabolismus nachweisen.⁶⁵ Jedoch zeigte sich in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ein erhöhtes C/D Verhältnis für heterozygote Allel Träger.⁶⁵ Die fehlende Signifikanz könnte durch die Studienpopulation erklärt werden, welche keinen Patienten mit dem delT/delT Genotyp beinhaltete.⁵⁴

In einer kürzlich publizierten Studie konnten erniedrigte Paraxanthin/Koffein-Quotienten in rauchenden delT-Allel Trägern beobachtet werden, was eine erniedrigte Clearance für Träger der Deletion impliziert und unsere Ergebnisse einer erhöhten Serumkonzentrationen für delT-Allel Träger stützt.⁶⁰ Im Gegensatz zu dieser Studie berichtete Pavanello et al. von einem umgekehrten Effekt mit einer erhöhten Clearance für delT-Genotyp Träger.⁶³ Zudem konnte eine Studie in einer türkischen Population keinen Einfluss des CYP1A2*1D Polymorphismus auf die CYP1A2 Aktivität identifizieren.⁶² Die Unterschiede könnten auf unterschiedliche ethnische Herkunft oder weitere Verzerrungsfaktoren zurückgeführt werden.⁶⁰

In Bezug auf den **CYP1A2*1F** Polymorphismus konnten wir die Ergebnisse aus einer bereits im Jahr 2008 publizierten Teilpopulation bestätigen.⁶⁷ Träger des CYP1A2*1F AA-Genotyps zeigten hierbei in einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Modell ein signifikant erniedrigtes C/D Verhältnis gegenüber C-Allel Trägern. Dieser Effekt war unabhängig von dem Vorhandensein von CYP1A2 Induktoren.

Eine Vielzahl an Studien konnte eine erhöhte Clearance von Markersubstanzen für Träger des CY1A2*1F AA-Genotyps, die gleichzeitig einen CYP1A2 Induktoren erhalten hatten, identifizieren.⁶⁰⁻⁶⁴ Eine erhöhte Clearance und damit verbundene erniedrigte Serumkonzentrationen für AA-Genotyp Träger stimmen mit unseren Ergebnissen überein. Der in dieser Studie identifizierte, vom CYP1A2 Induktor-Status unabhängige, Effekt des CYP1A2*1F wurde außer in einer Teilpopulation dieser Studie bisher nicht berichtet.⁶⁷ Jedoch zeigten AA-Genotyp Träger in Verbindung mit einem CYP1A2 Induktoren ein deutlich reduziertes C/D Verhältnis gegenüber Trägern, die keinen Induktoren erhalten hatten (ANCOVA ohne Induktor: 2,1 vs. 1,9 ng/ml*mg; p=0,466 und mit Induktor 1,7 vs. 1,2 ng/ml*mg; p=0,084).

Studien, welche den Einfluss des CYP1A2*1F Polymorphismus auf die Dosis-korrigierten Olanzapin Serumkonzentration untersucht haben, verfehlten eine signifikante Assoziation.^{65, 66, 68, 69} Die fehlende Signifikanz der Studien von Nozawa, Skogh bzw. Kootstra-Ros et. al könnten mit der geringen Anzahl an Patienten (um 50) und unbekannten Verzerrungseffekten durch weitere Mutationen erklärt werden. Eine kürzlich publizierte Studie mit 342 Patienten konnte jedoch auch in einer bedeutend größeren Population keinen signifikanten Einfluss des CYP1A2*1F Polymorphismus identifizieren.²⁸² Vielmehr scheint dieser Studie zur Folge eine Punktmutation (rs2472297), lokalisiert in der Region zwischen CYP1A1 und CYP1A2, die Auswirkung auf die veränderten Dosis-korrigierten Olanzapin Serumkonzentrationen zu erklären.²⁸² Hierbei ist jedoch kritisch anzumerken, dass der gebildete Haplotyp (bestehend aus 4 Polymorphismen inklusive dem CYP1A2*1F A-Allel) nur einen grenzwertig signifikanten Effekt ($p=0,05$) in Nichtrauchern zeigen konnte.²⁸² Dies steht im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen und robust replizierten Effekt, den der CYP1A2*1F AA-Genotyp auf die CYP1A2 Aktivität in Rauchern ausübt.

Die Kombination der in dieser Studie identifizierten Faktoren, welche mit einer erhöhten Serumkonzentration einhergehen (kein CYP1A2 Induktor, *1F C-Allel, *1D deT-Allel), ermöglichte die Identifikation von Patienten, die positiv auf eine Clozapin- bzw. Olanzapin-Therapie ansprachen. Hierbei zeigten schizophrene Patienten mit 2 Faktoren eine deutlich erhöhte Rate an PDS-P Respondern gegenüber Patienten mit nur einem bzw. keinem Faktor (60,0 vs. 21,4 vs. 17,6 %; $p=0,002$). Auch in einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Modell konnte eine, wenngleich nicht signifikante, Verringerung der paranoiden Symptome nach 4 Wochen für Träger mit 2 Faktoren identifiziert werden (6,1/2,1/2,1; $p=0,053$). Zudem korrelierte die Anzahl der Faktoren mit der Zustandsänderung des Patienten (CGI-2; $n=193$; $r=-0,177$; $p=0,005$). Das Vorhandensein der beschriebenen Faktoren führt demnach zu einer besseren Zustandsänderung nach 4 Wochen. Diese Ergebnisse legen eine Beteiligung sowohl des CYP1A2*1D als auch des *1F Polymorphismus am Olanzapinmetabolismus nahe. Das Vorhandensein mehrerer Faktoren resultiert in einer erhöhten Serumkonzentration, welches mit einem erhöhten Ansprechen verbunden ist. Hiermit konnte zum ersten Mal ein Nutzen der CYP1A2 Genotypisierung zur Identifikation von Respondern gezeigt werden. Es sind jedoch zwingend weitere Studien nötig, bevor eine Übertragung und Anwendung im klinischen Alltag realisierbar ist.

Für den **UGT1A4*3** und **POR rs2302429** Polymorphismus konnte kein signifikanter Einfluss auf Olanzapin Serumkonzentrationen identifiziert werden. In Analogie zu den Studien von Ghotbi bzw. Mao et al. wurden jedoch erniedrigte Serumkonzentrationen für heterozygote UGT1A4*3 Genotyp Träger beobachtet.^{65, 80} Anzumerken ist hierbei, dass kein homozygoter UGT1A4*3 Träger in unserer Studienpopulation enthalten war und die Unterschiede zwischen den Genotypen nur marginal waren. Eine kürzlich publizierte Studie konnte zudem keinen signifikanten Einfluss des UGT1A4*3 Polymorphismus auf die Olanzapin Serumkonzentrationen identifizieren²⁸³ und steht damit in Analogie zu unseren Ergebnissen und einer älteren Studie.⁶⁸ Obwohl eine veränderte Glukuronidierung für den untersuchten Polymorphismus sowohl in-vitro als auch in-vivo nachgewiesen werden konnte,⁷⁹ scheint auf Grund inkonsistenter Ergebnisse die Auswirkung des UGT1A4*3 Polymorphismus auf die Serumkonzentrationen des Olanzapins nur sehr schwach ausgeprägt zu sein. Auch für den POR

rs2302429 Polymorphismus, welcher noch nicht im Zusammenhang mit Olanzapin Serumkonzentration untersucht wurde, ist eine Auswirkung auf den Olanzapinmetabolismus unwahrscheinlich.

Das naturalistische und retrospektive Studiendesign mit einer kleinen Population (n=98) stellt eine wesentliche Limitation dieser Studie dar. Gleichwohl erlaubt dieser Ansatz die Identifizierung von relevanten Effekten in einer praxisnahen klinischen Population. Eine Verzerrung der Ergebnisse durch Komedikationen oder Nahrungsmittel kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Komedikation mit Kontrazeptiva führt beispielsweise zu einer erhöhten CYP1A2 Aktivität⁵⁸ und wurde in dieser Studie nicht dokumentiert. Jedoch impliziert eine kürzlich publizierte Studie, dass der Gebrauch von Ethinylestradiol-haltigen Kontrazeptiva zu keinen relevanten Veränderungen der Olanzapin Serumkonzentration führt.²⁸⁴ Des Weiteren wurde der Einfluss von starken CYP1A2 Induktoren wie Carbamazepin und Rauchen dokumentiert und kein starker CYP1A2 Inhibitor verabreicht. Zudem kann auf Grund standardisierter Krankenhauskost ein Verzerrungseffekt durch Lebensmittel als sehr unwahrscheinlich angesehen werden. Zuletzt sollte noch die Abweichung des HWE für den CYP1A2*1D Polymorphismus Erwähnung finden, welches auf den erhöhten Anteil an delT/delT-Genotyp Trägern zurückzuführen ist. Dies ist allein dem Zufall geschuldet und auf Grund einer vergleichbaren Häufigkeit des delT-Allels mit europäischen Studien (6,1 % vs. 3,4-11 %; zusammengefasst in der Übersichtsarbeit von Perera et al.),²⁵⁹ glauben wir, dass die Ergebnisse eine Übertragbarkeit gewährleisten.⁵⁴

Auch wenn in vorausgegangenen Studien ein Einfluss der untersuchten Polymorphismen (CYP1A2*1D,*1F und UGT1A4*3) auf die Serumkonzentration bzw. auf die CYP1A2 Aktivität (POR rs2302429) beschrieben wurde, gestaltet sich die Beurteilung auf Grund kleiner Patientenkollektive und begrenzter Studienlage als schwierig. Mit den Ergebnissen der zu Grunde liegenden Arbeit konnte erstmalig in einem größeren Patientenkollektiv ein Einfluss des CYP1A2*1D Polymorphismus auf die Olanzapin Serumkonzentration identifiziert werden, welcher in zukünftigen pharmakokinetischen Studien weiter untersucht werden sollte. In Analogie zu Studien der Enzymaktivität konnte für CYP1A2*1F AA-Genotyp Träger eine verminderte Olanzapin Serumkonzentration beobachtet werden. Auf Grund divergenter Ergebnisse einer Vielzahl anderer Studien, sollte der Einfluss des untersuchten Polymorphismus auf den Olanzapinmetabolismus unbedingt in weiteren Studien adressiert werden. Die Kombination der in dieser Studie identifizierten Faktoren einer erhöhten Serumkonzentration (kein CYP1A2 Induktor, *1F C-Allel, *1D delT-Allel) ermöglichte die Identifikation von Patienten, die besser auf eine Olanzapin- bzw. Clozapin-Therapie ansprachen. Hiermit konnte zum ersten Mal ein Nutzen der CYP1A2 Genotypisierung zur Identifikation von Respondern und ein möglicher pharmakogenetischer Therapieansatz gezeigt werden.

4.1.3 Einfluss von Serumkonzentrationen auf Response und Nebenwirkungen

In der untersuchten Studienpopulation konnte eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Serumkonzentrationen und der paranoiden Zustandsänderung sowohl in der Gesamtpopulation ($r^2=0,226$; $p=0,033$) als auch bei schizophrenen Patienten (F2 Diagnose; $r^2=0,349$; $p=0,027$) identifiziert werden. Unter Berücksichtigung des PDS-P zur Aufnahme konnte keine signifikante Korrelation mehr identifiziert werden. Dies ist mit der Tatsache zu erklären ist, dass eine erhöhte paranoide Symptomatik vor Therapiebeginn per se mit einer stärkeren Symptomreduktion verbunden ist. Übereinstimmend mit dieser Vermutung zeigte sich keine signifikante Korrelation der Olanzapin Serumkonzentrationen mit der CGI-Skala, welche eher die prozentuale Änderung der Symptomatik eines Patienten wiedergibt²⁸⁵ und somit mögliche Verzerrungen durch hohe PDS Basisparameter ausgleicht.

Trotz dieser negativen Befunde deutet die Gesamtheit der Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen Olanzapin Serumkonzentrationen und dem klinischen Ansprechen hin. In Analogie zu den unabhängigen Studien von Perry bzw. Fellows et al.^{182,276} zeigte sich oberhalb eines Grenzwertes von 23,2 ng/ml für schizophrene Patienten ein verstärktes Ansprechen (91,7 % 11/12) und eine erhöhte Reduktion der paranoiden Symptome (PDS-P-Skala; 4,8 vs. 0,8), wenn auch die Ergebnisse kein signifikantes Niveau erreichten ($p=0,122$ bzw. $p=0,127$). Zudem wiesen sowohl CGI- (4,6 vs. 1,8 kg; $p=0,017$) als auch PDS-P-Responder (5,7 vs. 1,8 kg; $p=0,007$) eine erhöhte Gewichtszunahme gegenüber Nicht-Respondern auf, welche vermehrt mit einem Ansprechen assoziiert werden konnte.¹¹⁵ Hierbei ist besonders anzumerken, dass signifikante Unterschiede in kleinen Population wie dieser nur durch starke Differenzen der jeweiligen untersuchten Merkmale detektiert werden können. Zudem befanden sich 98 % der Patienten innerhalb der therapeutischen Breite von (20-80 ng/ml),²⁶⁶ womit das Ausbleiben signifikanter Zusammenhänge in Bezug auf Nebenwirkungen erklärt werden können.

Studien, welche die Beziehung zwischen Plasmakonzentrationen und klinischer Besserung untersucht haben, konnten überzeugend einen signifikanten Zusammenhang für die Medikamente Lithium, trizyklische Antidepressiva und klassische Antipsychotika bestätigen.²⁶⁶ Für das atypische Antipsychotikum Olanzapin deutet die Mehrzahl an Studien gleichsam auf eine enge Beziehung zwischen Plasmakonzentrationen und klinischer Wirksamkeit hin (zusammengefasst in der Arbeit von Lopez et al.).²⁸⁶ Hierbei scheint nach unseren Ergebnissen ab einem Schwellenwert >23 ng/ml eine verstärkte Reduktion der paranoiden Symptome aufzutreten und eine Gewichtszunahme ein positiver Prädiktor für das Ansprechen der Therapie darzustellen. Eine direkte Korrelation von Serumkonzentrationen mit der Gewichtszunahme konnte übereinstimmend mit Citrome bzw. Kinon et al. jedoch nicht identifiziert werden.^{287, 288} Vielmehr scheint, wie in den Studien von Citrome bzw. Kinon et al. beobachtet, erst ab einer großen Differenz der Dosen (10 vs. 40 mg) bzw. Seren (16,25 ng/ml vs. 65 ng/ml; berechnet nach Hiemke et al.)²⁶⁶ eine verstärkte Gewichtszunahme in Erscheinung zu treten.^{280,281} Daher erscheint der von Perry in einer ohnehin kleinen Population von 39 Patienten postulierte Grenzwert von 20 ng/ml deutlich zu gering bemessen zu sein²⁶⁵ und konnte in unserer Population nicht bestätigt werden.

4.2 Population „Response“

4.2.1 Klinische Interaktionen und Wechselwirkungen

Bei Betrachtung möglicher klinischer Einflussfaktoren zeigte sich erwartungsgemäß ein signifikanter Unterschied der untersuchten Parameter in Abhängigkeit von der **Diagnose**. Patienten mit einer Schizophrenie zeigten gegenüber Patienten mit affektiven Störungen erhöhte paranoide und verminderte depressive Symptome bei vergleichbarem Krankheitszustand.

Das **Geschlecht** sowie das **Alter** konnten übereinstimmend mit einer Vielzahl an Studien nicht mit einem veränderten Response-Verhalten in Verbindung gebracht werden.²⁸⁹⁻²⁹¹

Die Beobachtung, dass Patienten mit einer **ersten Episode** bzw. mit einer kürzeren Krankheitsdauer vermehrt auf eine antipsychotische Therapie ansprechen ist plausibel. In Studien konnte übereinstimmend eine längere Krankheitsdauer mit einem verminderten Ansprechen assoziiert werden.²⁹² Hierbei führt eine Population aus langjährig behandelten Patienten zu einer Ansammlung an therapieresistenten Patienten, welche deutlich schlechter auf eine atypische Therapie ansprechen. Somit sind chronische Patientenkollektive mit deutlichen Verzerrungseffekten behaftet.²⁷⁹

Nach den Ergebnissen einer großen Netzwerk-Metaanalyse von Leucht et al. konnte **Clozapin** als das effektivste Antipsychotikum identifiziert werden.⁴¹ Auf Grund seines erhöhten Nebenwirkungspotentials (Agranulozytose >1 %) bleibt es jedoch besonders therapieresistenten Patienten vorbehalten. In Analogie wiesen Clozapin-therapierte Patienten deutlich erhöhte paranoide Symptome gegenüber Patienten, die mit einem anderen Antipsychotikum behandelt wurden, auf (16 vs. 6; p=0,007). Zudem wurden Non-Responder zu einem deutlich erhöhten Anteil mit Clozapin therapiert (13,5 % vs. 2,8 %; p=0,003). Es konnte kein signifikanter Unterschied der untersuchten Antipsychotikagruppen hinsichtlich der Verbesserung des Krankheitszustandes bzw. der paranoiden und depressiven Symptome beobachtet werden. Als Grund hierfür ist die sehr heterogene Population anzuführen.

Unter den verschiedenen **Komedikationen** konnte eine adjuvante antidepressive Therapie als Risikofaktor für einen schlechteren Response identifiziert werden: Patienten die nach CGI und PDS-P respondierten zeigten signifikant niedrigere depressive Symptome vor Therapiebeginn und erhielten weniger antidepressive Komedikation als Nicht-Responder. Eine antidepressive Komedikation in Verbindung mit erhöhten depressiven Symptomen deutet auf eine verstärkte negativ-Symptomatik hin, welche mit einem schlechteren Ansprechen assoziiert ist.^{292, 293}

4.2.2 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf den Response

4.2.2.1 rs1049353 (CNR1)

Der rs1049353 Polymorphismus befindet sich im Codon 453 des CNR1 Genes, welches für den G-Protein gekoppelten Cannabinoid Rezeptor 1 kodiert (CB1).¹⁷⁵ Dieser gehört zur Gruppe der präsynaptischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 6q14-q15, welcher als Prädispositionslokus für Schizophrenie von Cao et al. identifiziert wurde.⁸¹ Es wird vermutet, dass das Cannabinoid-System eine relevante Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie spielt.¹⁶⁷ Diese Vermutung basiert auf der Grundlage, dass der Gebrauch von Cannabis einen psychotischen Zustand auslösen^{168,169} und die positiven Symptome der Schizophrenie unter Antipsychotika-Therapie verschlechtern kann.^{170,167}

Eine Vielzahl an Studien konnte den rs1049353 Polymorphismus mit einem veränderten Ansprechen auf Antidepressiva¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ und Antipsychotika¹⁷⁵ in Verbindung bringen bzw. ein erhöhtes Krankheitsrisiko nachweisen.¹⁷⁹

Auch in der untersuchten Studienpopulation konnte ein signifikanter Einfluss des rs1049353 Polymorphismus auf das Ansprechen sowohl bei schizophrenen Patienten als auch bei Patienten mit einer affektiven Störung identifiziert werden. Männliche Patienten mit einer F2 Diagnose zeigten hierbei in einem auf Verzerrungsfaktoren adjustierten Modell einen Anstieg der paranoiden Symptomverbesserung mit dem A-Allel (-8/2,3/3,1; p=0,013). Im Kontrast hierzu zeigten Patienten mit affektiven Störungen einen geschlechtsunabhängigen Abfall der paranoiden Symptomverbesserung mit dem A-Allel (6,4/3,5/1,1; p=0,011).

In der einzigen vergleichbaren Studie mit schizophrenen Patienten konnte das A-Allel vermehrt in Respondern identifiziert werden. Dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen in schizophrenen Patienten.¹⁷⁵ Beim Vergleich der Studien erweisen sich die unterschiedlichen Skalen zur Beurteilung des Ansprechens als problematisch. Hamdani et al. verwendeten zur Identifikation von Respondern die May und Dencker Skala, welche den Zustand des Patienten an Hand von CGI und BPRS einstuft.²⁹⁴ Eine differenzierte Betrachtung des rs1049353 Polymorphismus nach CGI-Response konnte jedoch keinen signifikanten Einfluss in unserer schizophrenen Studienpopulation identifizieren. Zudem wurde in der zitierten Studie von Hamdani et al. keine differenzierte Betrachtung nach Geschlecht vorgenommen.¹⁷⁵ Studien in Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Antidepressiva weisen jedoch auf einen geschlechtsspezifischen Zusammenhang hin, wobei sowohl ein Einfluss in Männern¹⁷⁷ als auch in Frauen¹⁷⁶ identifiziert werden konnte.

Für Patienten mit affektiven Störungen konnte übereinstimmend mit der Studie von Domschke et al. eine verringerte paranoide Symptomverbesserung für G-Allel Träger beobachtet werden.¹⁷⁶ Hierbei ist jedoch limitierend einzubringen, dass in der zitierten Studie das Ansprechen auf eine Antidepressiva-Therapie untersucht wurde und ein verstärkter Einfluss des weiblichen Geschlechts in unserer F3-

Kohorte nicht identifiziert werden konnte. Zudem konnten Mitjans et al. männliche GG-Genotyp Träger mit einem verbesserten antidepressiven Ansprechen assoziieren.¹⁷⁷

Zusammenfassend erweist sich die Beurteilung der Ergebnisse auf Grund heterogener und schwer vergleichbarer Studienlage als sehr schwierig. Eine Vielzahl an Studien konnte den untersuchten rs1049353 Polymorphismus nicht mit Schizophrenie assoziieren.^{295,296} Vielmehr scheint jedoch ein Einfluss des untersuchten Genotyps auf das Ansprechen einer antipsychotischen¹⁷⁵ als auch antidepressiven Therapie als wahrscheinlich. Zur Identifikation des Risikoallels sind zwingend weitere nach Geschlecht differenzierte Studien nötig. Unsere Studie konnte den rs1049353 GG-Genotyp übereinstimmend mit der Arbeit von Domschke et al. mit einem verminderten Ansprechen assoziieren.¹⁷⁶ Auch eine Studie im Zusammenhang mit striatalem Response auf Bilder und Emotionen, welche in der Studie von Domschke et al. bestätigt werden konnte,¹⁷⁶ deutet auf das G-Allel als Risikoallel hin.²⁹⁷

4.2.2.2 rs3787429 und rs3787430 (HR3)

Sowohl der rs3787429 als auch der rs3787430 Polymorphismus befinden sich in Exon 3 des HR3 Genes. Das besagte Gen kodiert für den gleichnamigen, präsynaptischen Auto- und Heterorezeptor, der eine relevante Rolle in der Regulierung der Histaminfreisetzung⁸⁴ und in der Modulation weiterer Neurotransmitter spielt.⁸⁵ Für die untersuchten Polymorphismen konnte ein vom Genotyp abhängiges Ansprechen unter einer Risperidon-Therapie identifiziert werden.⁸⁶ Hierbei zeigten heterozygote CT-Genotyp Träger eine erhöhte Reduktion der BPRS Skala nach 4 (rs3787429) bzw. 4 und 8 (rs3787430) Wochen.⁸⁶

Übereinstimmend mit der Studie von Wei et al. scheint der rs3787430 Polymorphismus der relevantere Marker im Kontext eines veränderten Ansprechens zu sein: Schizophrene CC-Genotyp Träger des rs3787430 Polymorphismus zeigten in einem adjustiertem Model unter Einbeziehung des Geschlechtes eine erhöhte Reduktion der paranoiden Symptome gegenüber T-Allel Trägern (4,3 vs. 2,0; p=0,025). Dies steht im Gegensatz zu der zitierten Studie von Wei et al., welche CT-Genotyp Träger mit einer veränderten Reduktion assoziieren konnte. Im Kontrast zu dem beschriebenen Marker konnte für den rs3787429 Polymorphismus kein signifikanter Einfluss auf das Ansprechen bzw. die Nebenwirkungsrate einer Antipsychotika-Therapie identifiziert werden.

Als problematisch erweist sich die schwierige Vergleichbarkeit der beiden Studien. Wei et al. untersuchten die Polymorphismen im Kontext einer Risperidon Monotherapie und verwendeten zur Beurteilung der Zustandsänderung die BPRS-Skala. Auch in einer generierten Kohorte aus schizophrenen Risperidon-Patienten (n=44) konnten wir einen Trend eines erhöhten PDS-P Response in CC-Genotyp Träger beobachten (61,5 vs. 33,3 %; p=0,063). Auf Grund der nur schwach ausgeprägten HR3 Affinität der atypischen Antipsychotika, scheint die Wirkung des untersuchten Polymorphismus nicht an ein Zusammenspiel von Antipsychotika und Rezeptor, sondern eher an eine Beeinflussung von weiteren Neurotransmittern gebunden zu sein. So spielt der HR3 Rezeptor als Autorezeptor eine relevante Rolle in der Regulierung der neuronalen Histaminfreisetzung in-vivo⁸⁴ und ist an der Freisetzung von Dopamin, Acetylcholin und Norepinephrin beteiligt.⁸⁵ Da ein direkter Einfluss von Antipsychotika auf den HR3 Rezeptor unwahrscheinlich erscheint,²⁹⁸ sollte ein Einfluss für alle atypischen Antipsychotika gleichermaßen bestehen. Die Identifikation eines abweichenden Risikogenotyps könnte durch die verschiedenen Populationen erklärt werden. Hierbei kann es auf Grund verschiedener Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen und veränderter Korrelationen mit anderen Markern zu abweichenden Ergebnissen kommen. In der Literatur ist dies als Flip-Flop-Phänomen beschrieben und erklärt die Identifikation von gegensätzlichen Risikofaktoren in verschiedenen Populationen.²⁹⁹

Zusammenfassend stellt der rs3787430 Polymorphismus einen interessanten Marker zur möglichen Identifikation von Respondern bzw. Nicht-Respondern dar. Die relevante Rolle des HR3 Rezeptors als Autorezeptor⁸⁴ und das hohe Potential von inversen HR3 Agonisten-Antagonisten in der Behandlung der Schizophrenie und weiteren kognitiven Störungen,⁸⁹⁻⁹² unterstreichen diese Hypothese. Weitere Studien sind jedoch nötig, die sowohl die funktionelle Konsequenz als auch den Einfluss auf die Antipsychotika-Therapie untersuchen.

4.2.2.3 rs1344706 (ZNF804A)

Der rs1344706 Polymorphismus ist im Intron 2 des ZNF804A Genes lokalisiert und konnte im Rahmen von GWAS robust mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen assoziiert werden.^{97, 99,100,101} Zudem zeigte der untersuchte Polymorphismus veränderte Transkriptionsspiegel des ZNF804A Genes,^{98,99,102} welchem eine entscheidende Rolle in der Regulation Schizophrenie-relevanter Gene zugeschrieben wird.⁹⁸ Zwei unabhängige Studien konnten den rs1344706 AA-Genotyp mit einer verminderten Reduktion des PANSS Score assoziieren.^{103, 104}

In der untersuchten Population konnte für den rs1344706 Polymorphismus kein signifikanter Einfluss auf den Response nach PDS-P bzw. CGI und die Reduktion der paranoiden Symptome identifiziert werden. Die Studie von Mössner et al. beobachtete im Gegensatz eine verringerte Reduktion des PANSS Score für AA-Genotyp Träger, wobei dieser Effekt nur für die Senkung der positiven Symptome ein signifikantes Niveau erreichte und nur schwach ausgeprägt war.¹⁸⁷ In Analogie konnten Zhang et al. einen signifikanten Einfluss in einer chinesischen Population beobachten, identifizierten aber das A-Allel als Risikoallel.¹⁸⁸

Unterschiede in den beschriebenen Studien könnten auf die Verwendung unterschiedlicher Skalen zur Beurteilung der Zustandsbesserung zurückgeführt werden. Mössner et al. identifizierte eine Symptomreduktion von <10 PANSS Score Punkten, welche mit einer minimalen Zustandsbesserung nach CGI-1 gleich zu setzen ist.²⁸⁵ Die nur schwache Zustandsbesserung könnte in den Augen des Patienten weniger stark wahrgenommen werden als in der Fremdeinschätzung nach PANSS, weshalb geringe Unterschiede in den Genotypgruppen auf Grund der geringen Fallzahl nur schwer zu identifizieren sind.

Basierend auf der robusten Assoziation mit Schizophrenie und Bipolaren Störungen,^{97, 99,100,101} und der Beeinflussung des ZNF804A Genes,^{98,99,102} welches für die Regulation weiterer mit Schizophrenie assoziierter Gene (PRSS16, COMT, PDE4B und DRD2) verantwortlich gemacht wird,⁹⁷ verbleibt der rs1344706 Polymorphismus als vielversprechender Marker. Auch wenn die relevanten Effekte zu schwach sind um in einer naturalistischen Studie zu relevanten Unterschieden zu führen, könnten weitere Studien helfen, das Ansprechen auf eine antipsychotische Therapie zu erklären.

4.2.2.4 rs28656907/rs28373093 (ABCB1)

Der dinukleotide Polymorphismus rs28656907/rs28373093 ist in der proximalen Promoterregion des ABCB1 Genes lokalisiert, welches für das P-GP Protein kodiert, das als Effluxtransporter eine zentrale Rolle in der Absorption, Distribution und Elimination von vielen Antipsychotika einnimmt.¹⁰⁸ Für Träger der homozygoten Mutante des untersuchten Polymorphismus konnte in einer in vitro Studien eine 2-fach erhöhte ABCB1 mRNA Expression identifiziert werden.^{109, 110}

Aus dieser erhöhten Expression des ABCB1 Genes könnte eine vermehrte P-GP Synthese resultieren, die zu einem vermehrten Abtransport der Antipsychotika aus den Geweben und somit zu einem schwächeren Ansprechen auf die Therapie und verminderter Nebenwirkungsrate führen könnte. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigte sich ein Abfall der Nebenwirkungshäufigkeit mit dem mutierten Allel (41,7 vs. 25,7 vs. 16,1 %; p=0,054). Träger der homozygoten Mutante zeigten zudem eine verringerte Summe an Nebenwirkungen nach DOTES, wobei der Effekt kein signifikantes Niveau erreichte (p=0,116). Ein signifikanter Einfluss auf das Ansprechen konnte nicht identifiziert werden.

Unsere Ergebnisse weisen auf einen möglichen Einfluss des rs28656907/rs28373093 Polymorphismus auf die Nebenwirkungsrate einer Antipsychotika-Therapie hin, wobei ein signifikantes Niveau verfehlt wurde (p=0,054) und daher zwingend weitere Untersuchungen benötigt werden. Studien im Zusammenhang mit Nebenwirkungen und Response waren in der Vergangenheit sehr stark auf drei Marker (rs1128503, rs2032582, rs1045642) innerhalb des ABCB1 Genes fokussiert, wobei die Ergebnisse sehr heterogen¹⁰⁸ und ohne überzeugende Schlüsse waren.¹⁹⁴ Zudem konnten in-vitro Studien der beschriebenen Marker keine erhöhte ABCB1 Expression beobachten,^{193,194,108} den untersuchten Polymorphismus aber als stärkstes Assoziationssignal identifizieren.¹⁹⁴

Limitierend muss an erster Stelle angeführt werden, dass eine erhöhte ABCB1 Expression nicht zwangsläufig zu einer erhöhten P-GP Expression führen muss.³⁰⁰ Zudem müssen die aus in-vitro Studien erhaltenen Ergebnisse erst in-vivo übertragen werden. Die unzähligen möglichen Einflussfaktoren in ABCB1 Polymorphismus Studien erweisen sich außerdem als sehr problematisch. So können viele Medikamente als PGP-Inhibitoren fungieren und damit zu verzerrten Ergebnissen führen. Auch die Identifikation von relevanten P-PG Inhibitoren erweist sich auf Grund sehr heterogener Ergebnisse und Unterschieden in den verwendeten Methoden als problematisch.²⁷⁰ Trotz dieser Limitation wurde in der zu Grunde liegenden Studie ein Einfluss möglicher P-GP Inhibitoren untersucht und auf gleichmäßige Verteilung weiterer Verzerrungsfaktoren geachtet.

Zusammenfassend scheint der rs28656907/rs28373093 Polymorphismus ein interessanter Marker mit möglichem Einfluss auf die ABCB1 Expression zu sein. Valide Aussagen können jedoch erst durch weitere Studien getroffen werden.

4.3 Population „Gewicht“

4.3.1 Klinische Interaktionen und Wechselwirkungen

Das **Geschlecht** konnte in der untersuchten Population als möglicher, klinischer Einflussfaktor auf die Gewichtszunahme identifiziert werden. Hierbei zeigten Männer eine signifikant stärkere Gewichtszunahme als Frauen ($2,0 \pm 3,7$ kg vs. $1,0 \pm 2,9$ kg; $p=0,005$). Die Studienlage zu diesem Thema ist sehr heterogen: So konnte sowohl das weibliche^{115, 271} als auch das männliche Geschlecht²⁸ mit einer verstärkten Gewichtszunahme in Verbindung gebracht werden bzw. kein eindeutiger Einfluss des Geschlechts identifiziert werden.^{273, 301, 302} Dies deutet auf einen eher populations-spezifischen Effekt hin, weshalb der Befund mit Vorsicht interpretiert werden sollte. Es sind zwingend weitere Studien nötig, um eine klare Aussage über die Rolle des Geschlechts in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme zu treffen.¹¹⁵

Übereinstimmend mit dem aktuellen, wissenschaftlichen Kenntnisstand konnte eine erhöhte Gewichtszunahme von **Olanzapin** und **Clozapin** gegenüber anderen atypischen Antipsychotika beobachtet werden.⁴¹ Hierbei war der Unterschied in der first Episode Population ($2,7$ vs. $0,9$ kg; $p=0,006$) deutlich ausgeprägter als in der adjustierten Subpopulation ($1,9$ vs. $0,8$ kg; $p=0,023$) und Gesamtpopulation ($1,8$ vs. $1,1$ kg; $p=0,054$). Der geringe Unterschied der beiden Medikationsgruppen in der Gesamtpopulation lässt sich durch Komedikation verursachte Verzerrungseffekte erklären. Die Beobachtung, dass **zuvor unbehandelte Patienten** einer verstärkten Gewichtszunahme zeigten wurde in Studien vielfach beschrieben.^{45,303} An dieser Stelle ist kritisch darauf hinzuweisen, dass der Status des first Episode Patienten per se keinen Risikofaktor darstellt.⁴⁵ Vielmehr scheint der Faktor „first Episode“ durch generell jüngere Patienten mit einem niedrigeren Gewicht charakterisiert zu sein, welche Faktoren selbst mit der Gewichtszunahme korrelieren. So zeigten zuvor unbehandelte Patienten einen erniedrigten BMI ($24,2$ vs. $26,0$ kg/m 2 ; $p=0,006$), ein jüngeres Alter ($37,3$ vs. $42,4$; $p=0,004$) und eine stärkere Gewichtszunahme ($2,0$ vs. $1,2$ kg; $p=0,061$) im Vergleich zu langjährig behandelten Patienten. Zudem können in zuvor unbehandelten Patientenkollektiven Verzerrungseffekte deutlich besser ausgeschlossen werden. Dies lässt sich durch die Tatsache begründen, dass chronischen Patientenkollektive, eine hohe Anzahl an schlecht respondierenden Patienten enthalten.²⁷⁹

Als weitere klinische Risikofaktoren, die in Verbindung mit einer erhöhten Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme stehen, konnten ein niedriger **BMI** ($r=-0,298$; $p<0,001$) und junges **Alter** ($r=-0,122$; $p<0,022$) identifiziert werden. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Vielzahl an Studien,^{272-274, 304, 305} auch wenn weiterhin unklar ist, inwiefern junges Alter bzw. ein niedriger BMI auf die Gewichtszunahme einwirken könnten.²⁷² Hierbei ist auch anzumerken, dass die identifizierten Korrelationen nur schwach ausgeprägt sind und jüngere Populationen einen erhöhten Anteil an Patienten mit einer ersten Episode enthalten. Trotz dieser Limitationen spricht eine zunehmende Anzahl an Studien dafür, dass Heranwachsende im Gegensatz zu älteren Patienten eine deutlich ausgeprägtere Gewichtszunahme unter atypischen Antipsychotika zeigen.^{45,306} Die Beurteilung eines

niedrigen BMIs als Risikofaktor gestaltet sich deutlich schwieriger und bedarf weiterer Studien: Auch wenn eine Studie den Einfluss des BMI vor Therapiebeginn auf das statistische Phänomen der Regression zur Mitte zurückführen konnte,³⁰⁷ weist eine Vielzahl an Studien auf einen relevanten Einfluss des BMI auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme hin. Eine kürzlich publizierte Auswertung der EU-SOHO Studie (n=4626) konnte zudem für die untersuchten oralen Antipsychotika (Olanzapin, Clozapin, Risperidon, Quetiapin und Amisulprid) eine erhöhte Gewichtszunahme für Patienten mit einem BMI unterhalb 25 kg/m² identifizieren.²⁸⁰

Obwohl keine signifikante Korrelation der Gewichtszunahme mit der Differenz verschiedener **Response**-Skalen identifiziert werden konnte, zeigten PDS-P und CGI-Responder eine erhöhte Gewichtszunahme gegenüber Nicht-Respondern. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Vielzahl an Studien.¹¹⁵ Der nur zwischen Respondern und Nicht-Respondern identifizierbare Unterschied in der Gewichtszunahme spricht für einen nur schwach ausgeprägten Zusammenhang zwischen Response und Gewichtszunahme, welcher erst ab einer starken Symptomreduktion (PDS-P Response = >50 % Besserung) bemerkbar wird. Übereinstimmend mit dieser Vermutung konnte eine Studie im Rahmen des CATIE-Trials einen zwar signifikanten jedoch nur schwach ausgeprägten Einfluss der Gewichtszunahme auf die Symptomreduktion identifizieren.²⁸⁹

Für weitere beschriebene mögliche Risikofaktoren wie Art der Diagnose oder Polymedikation^{28, 45, 115} konnten keine signifikanten Assoziationen identifiziert werden. Problematisch beim Vergleich verschiedener Studien erweisen sich hierbei verschiedene Skalen zur Beurteilung des Response und unterschiedliche Definitionen und Möglichkeiten der Gruppenbildung für die Polymedikation.

4.3.2 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf Gewicht

4.2.3.1 rs324420 (FAAH)

Der untersuchte rs324420 Polymorphismus (C>A) befindet sich in der Nähe des FAAH Genes und führt zu einer Änderung der Aminosäurestruktur, welche für AA-Genotyp Träger mit einer Reduktion der FAAH Expression einhergeht.¹⁴² Das genannte Gen stellt ein in Säugetierzellen weit verbreitetes integrales Membranprotein dar,^{133,134} welches den Großteil der endogenen Cannabinoide inaktiviert und daher eine Schlüsselrolle im Endocannabinoid-System (ECS) einnimmt.¹³⁶ Mäuse mit einer Fehlfunktion des FAAH Genes oder solche, welche mit einem FAAH Inhibitor behandelt wurden, zeigen einen stark erschwertem Abbau der Fettsäuren. Hieraus resultieren stark erhöhte Konzentrationen an Fettsäuren, sowohl in zentralen^{137,138} als auch in peripheren Geweben.^{133, 139} Diese erhöhte Konzentration an Endocannabinoiden geht mit einer Aktivierung des ECS einher und ist sehr wahrscheinlich mit Übergewicht assoziiert.^{140,141}

Vor Beginn der Therapie konnte kein signifikanter Einfluss des rs324420 Polymorphismus auf die Gewichtsparameter festgestellt werden, wobei Patienten mit dem AA-Genotyp das höchste Basisgewicht (in kg: CC:75,0; CA:73,6; AA:85,2; p=0,222) und den höchsten BMI in der Gesamtpopulation aufwiesen (in kg/m²: CC:25,6; CA:24,9; AA:29,6; p=0,076).

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnten Sipe bzw. Monteleone et al. einen erhöhten Anteil an AA-Genotyp-Trägern in übergewichtigen Patienten identifizieren.^{144, 308} Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu einer französischen Studie, welche das C-Allel als Risiko-Allel identifizieren konnte.³⁰⁹ In einer großen dänischen Fall-Kontroll Studie konnte nach Korrektur für Multiples Testen keine Assoziation des Polymorphismus mit Übergewicht identifiziert werden.²²⁵

Nach 4 Wochen zeigte sich in der Gesamtpopulation ein signifikanter Einfluss des rs324420 Polymorphismus mit einem Gewichtsverlust für AA-Genotyp-Träger (in kg: CC:1,2; CA:2,0; AA:-0,5; p=0,044). Auf Grund der geringen Patientenzahl wurden alle A-Allel-Träger (AA+CA) zusammengefasst. In einem adjustierten ANCOVA Modell zeigten A-Allel-Träger im Gegensatz zu AA-Genotyp Trägern in allen drei Populationen eine verstärkte Gewichts- bzw. BMI-Zunahme, ohne jedoch ein signifikantes Niveau zu erreichen (Gesamtpopulation: 0,6 vs.0,4 kg/m²; p=0,115). Im Einklang mit dieser Beobachtung konnte in der einzigen vergleichbaren Studie eine erhöhte BMI-Zunahme von A-Allel-Trägern gegenüber dem Wildtyp nach 24 Wochen festgestellt werden (1,5 vs. 3,2 kg/m²; p=0,002).¹⁴³ An dieser Stelle bleibt jedoch fraglich, ob die beobachtete Gewichtsabnahme für AA-Genotyp Träger der geringen Anzahl an Patienten und dem Zufall oder einem tatsächlich vorliegendem Effekt geschuldet ist.

Die Beurteilung der Ergebnisse erweist sich auf Grund der heterogenen Studienlage und geringen Fallzahl für den AA-Genotyp als schwierig. Eine verminderte Expressionsrate des FAAH Genes deutet auf eine durch die Punktmutation entstandene Fehlfunktion des Genes hin.¹⁴² Dies resultiert in einen verminderten Abbau und führt somit zu erhöhten Konzentrationen an endogenen Cannabinoide.¹⁴⁰

Inwiefern und ob dies einen Einfluss auf eine verstärkte Gewichtszunahme bzw. einen erhöhten BMI hat, ist vom jetzigen wissenschaftlichen Kenntnisstand nicht zu beurteilen. Da erhöhte Konzentrationen an AEA den CB1 Rezeptor aktivieren und neben dem Appetit viele weitere metabolische Funktionen modulieren können,¹⁴⁰ ist eine Beeinflussung der Gewichtsparameter jedoch sehr wahrscheinlich. In Bezug auf die Gewichtszunahme unter atypischen Antipsychotika scheinen Träger des A-Allels eine erhöhte Gewichtszunahme gegenüber Wildtyp-Trägern zu zeigen, wobei die inkonsistenten Ergebnisse bezüglich heterozygoten und homozygoten A-Allel Trägern weitere Fragen aufwerfen. Hierzu sind zwingend weitere Studien nötig, welche neben der Rolle des rs324420 Polymorphismus auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme auch die zu Grunde liegenden Mechanismen untersuchen.

4.2.3.2 rs17782313, rs489693 und weitere untersuchte Polymorphismen (MC4R)

Die beiden untersuchten Polymorphismen befinden sich in einem 190 kb rekombinanten Intervall zwischen der kodierenden Sequenz von PMAIP1 und MC4R, wobei letzteres Gen als eines der relevantesten Gene im Zusammenhang mit monogenetischem Übergewicht bezeichnet wird: Es kodiert für den humanen Melanokortin Rezeptor 4, welcher den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen ist^{145, 146} und über seinen endogenen Liganden (α -MSH) zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und erhöhtem Grundumsatz führt.¹⁴⁷ Bis zu 6 % der stark adipösen Patienten weisen eine Mutation im MC4R Gen auf.¹³²

Vor Therapiebeginn zeigten CC-Genotyp Träger des rs17782313 Polymorphismus und AA-Genotyp Träger des rs489693 Polymorphismus das höchste Basisgewicht bzw. den höchsten BMI, wobei ein signifikantes Niveau nur für den BMI und den rs17782313 Polymorphismus in der Gesamtpopulation erreicht wurde. Zudem konnte gleichsam ein nicht signifikanter Trend der beiden Risiko-Allele auf den BMI in chronischen Patienten beobachtet werden ($p=0,084$ bzw. $p=0,066$).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte der rs17782313 Polymorphismus in einer GWAS eines der stärksten Assoziationssignale in Verbindung mit Übergewicht und Gewichtsregulation, wobei das C-Allel als Risiko-Allel identifiziert¹⁵² und in einer Meta-Analyse mit über 300.000 Patienten bestätigt werden konnte.³¹⁰ Den in der Literatur beschriebenen Anstieg des BMI mit dem C-Allel konnte in unserer Population nicht beobachtet werden, was durch eine relativ kleine Patientenpopulation und Verzerrungseffekte durch die antipsychotische Therapie erklärt werden könnte. In einer kürzlich publizierten Studie konnte ein Einfluss des rs17782313 CC-Genotyp auf relevante Gehirnregionen des Essverhaltens identifiziert werden, jedoch nur in weiblichen Patienten.³¹¹ Zudem konnten drei von vier Assoziationsstudien einen verstärkten Einfluss des rs17782313 Polymorphismus in weiblichen Probanden identifizieren.³¹¹ Übereinstimmend konnte auch in unserer Population ein Interaktionseffekt zwischen rs17782313 Genotyp und Geschlecht auf den BMI vor Therapiebeginn identifiziert werden ($p=0,019$), wobei weibliche CC-Genotyp-Träger einen erhöhten BMI zeigten. Für den rs489693 Polymorphismus existieren keine Studien, die einen Einfluss auf den BMI untersucht haben.

Nach 4 Wochen konnte ein signifikanter Anstieg der Gewichtszunahme mit dem C-Allel des rs17782313 Polymorphismus bzw. mit dem A-Allel des rs489693 Polymorphismus über alle Studienpopulationen hinweg in einem auf Störfaktoren korrigierten Modell beobachtet werden. Für den rs17782313 Polymorphismus stellt dies die erste Studie dar, die einen Einfluss der untersuchten Punktmutation auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme zeigen konnte.¹⁵¹ Chowhury et al. konnten ebenfalls das C-Allel mit einer erhöhten Gewichtszunahme assoziieren, wobei dies nur in einer Subpopulation mit Clozapin und Olanzapin behandelten Patienten einen Trend erreichte ($n=69$; $p=0,09$).³¹² In unserer Studienpopulation zeigte sich für den rs17782313 Polymorphismus ein verstärkter Einfluss auf die Gewichtszunahme bei Patienten, die mit Risperidon, Quetiapin, Amisulprid oder Paliperidon therapiert wurden (Interaktionseffekt Genotyp x hoch vs. niedrig-risiko Medikation;

$p=0,071$). Im Gegensatz hierzu konnte in Olanzapin und Clozapin therapierten Patienten ein deutlich schwächerer Gewichtsanstieg identifiziert werden. Dies könnte die verfehlte Signifikanz der zuvor zitierten Studie (Chowhury et al.) erklären, welche ein Patientenkollektiv mit einem erhöhten Anteil an Olanzapin- und Clozapinmedikation beinhaltete

Die erhöhte Gewichtszunahme von AA-Genotyp Trägern des rs489693 Polymorphismus stützt die Ergebnisse einer GWAS im Kontext Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme.¹⁵³ Hierbei konnte das A-Allel in einer Population aus zuvor unbehandelten Patienten als Risiko-Allel identifiziert und in drei unabhängigen Populationen bestätigt werden. Obwohl Malhotra et al. eine ausgesägtere Gewichtszunahme für jeden Genotyp beobachten konnte, ist das Verhältnis zwischen AA und CC-Genotyp (~ Faktor 2,9) in der Replikationskohorte 1 mit unseren Ergebnissen vergleichbar (~ Faktor 3,0).¹¹¹ Eine längere Studiendauer (6 vs. 4 Wochen) mit Clozapin als einziges Antipsychotikum, welches mit Olanzapin die ausgeprägteste Gewichtszunahme nach sich zieht, könnte die verstärkte Gewichtszunahme in der Malhotra Population erklären.¹¹¹

Die starke Korrelation beider Polymorphismen, welche wir identifizieren konnten, fügen die Ergebnisse der beschriebenen Studien zusammen und unterstreichen die Bedeutung dieser Punktmutationen in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass die funktionelle Bedeutung der untersuchten Polymorphismen weiterhin unklar ist. Die GWAS, welche das C-Allel des rs17782313 Polymorphismus als Risiko-Marker für einen erhöhten BMI identifizieren konnte, postulierte einen Einfluss der Punktmutation über einen entfernten Regulierungsbereich der Transkription bzw. Translation des MC4R Genes.¹⁵² Ein klarer Beweis für diese Hypothese liegt nach unserem Kenntnisstand jedoch nicht vor. Um zu klären ob die untersuchten Marker mit einem Polymorphismus im LD stehen und über diesen eine funktionelle Rolle auf das MC4R Gen ausüben, wurde das gesamte MC4R-Gen (1438 bp) und der von Lubrano-Berthelier bzw. Wankhade et al. vermutete Promoterbereich für Patienten der adjustierten Subpopulation im Rahmen einer betreuten Masterarbeit mittels Sequenzierung auf relevante Polymorphismen untersucht.^{277, 278, 154}

Hierbei konnten nur drei Polymorphismen (rs17066842, rs11872992 und rs8087522) innerhalb des Promoterbereiches identifiziert werden, deren Häufigkeit eine weitere statistische Auswertung erlaubten. Einen signifikanten Einfluss auf Gewichtsparameter vor bzw. nach der Antipsychotika-Therapie konnte nach Adjustierung keiner der untersuchten Marker erzielen. Für den rs8087522 Polymorphismus liegt in diesem Zusammenhang nur eine vergleichbare Studie vor, welche einen Trend für eine höhere, prozentuale Gewichtszunahme in einer Subpopulation ($n=76$; Clozapin behandelte Patienten) zeigen konnte.³¹² In Analogie hierzu konnten AA-Genotyp Träger auch in unserer Population eine signifikant erhöhte Gewichtszunahme gegenüber G-Allel Träger verzeichnen ($p=0,044$), wobei dieser Effekt nach Einbeziehung relevanter Einflussfaktoren kein signifikantes Niveau mehr erreichte ($p=0,201$). Die Auswirkung auf die Gewichtszunahme scheint demnach eher schwach ausgeprägt zu sein und durch den rs17782313 Polymorphismus verzerrt zu werden. Weitere Erwähnung sollte zudem der rs2229616 Polymorphismus finden, für welchen in einem adjustierten Modell ein signifikanter Einfluss auf die prozentuale Gewichtszunahme identifiziert werden konnte (GG:1,9 vs. AA:6,3 %kg; $p=0,049$). Auf Grund der geringen Anzahl an Heterozygoten-Trägern ($n=5$) und fehlender longitudinaler Studien sollten die Ergebnisse jedoch mit Vorsicht betrachtet werden.

Ergebnisse einer LD-Analyse konnten unter den identifizierten Polymorphismen im Promoter- und Genbereich des MC4R Genes keinen Marker identifizieren, der mit den zuvor beschriebenen Polymorphismen (rs17782313 und 489693) in einem relevanten Gleichgewicht steht, um die zu Grunde liegenden Effekte der untersuchten Polymorphismen hinreichend genug abdecken zu können. Daher scheint nach unseren Ergebnissen der Effekt der Risiko-Allele nicht an einen weiteren funktionellen Marker im untersuchten Bereich gebunden zu sein. In Analogie konnten Beckers et al. in einem tagSNP Ansatz keinen BMI-Risiko Marker in einer 5 kb Region um das Gen identifizieren.³¹³ Hieraus postulierten die Autoren, dass die untersuchte Region nicht in Verbindung mit dem rs17782313 Polymorphismus steht und durch andere Kandidatengene erklärt werden könnte, die bisher auf Grund der bekannten und plausiblen Rolle des MC4R Genes in der Gewichtszunahme nicht hinreichend genug untersucht wurden.³¹³ Nichtsdestotrotz könnten auch Marker außerhalb des untersuchten Bereiches einen Einfluss auf die MC4R Regulation ausüben.

Zusammenfassend scheint auf Grund der vorliegenden Studien in großen Patientenkollektiven (>300.000 Patienten) kein Zweifel an der Assoziation des rs17782313 C-Allels mit einem erhöhten BMI zu bestehen.³¹⁰ Dieser Effekt konnte auch in der untersuchten Population identifiziert werden, wobei Abweichungen auf eine Verzerrung durch atypische Antipsychotika-Therapie zurückgeführt werden könnten. Zudem weisen unsere Ergebnisse in Übereinstimmung mit weiteren Studien³¹¹ auf einen verstärkten Effekt in weiblichen Patienten hin.

Der im Rahmen dieser Arbeit erstmalig identifizierte Einfluss des rs17782313 Polymorphismus¹⁵¹ auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme scheint auch auf ein weiteres Patientenkollektiv übertragbar zu sein.³¹² Die starke Korrelation (rs17782313/rs489693) und Assoziation des rs489693 Polymorphismus mit Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie¹¹¹ und dessen Identifikation im Rahmen einer GWAS¹⁵³ stützen diese Hypothese.

Die Ergebnisse aus LD-Analysen konnten keinen Marker im Bereich des MC4R Genes identifizieren, welcher die Effekte der untersuchten Polymorphismen (rs17782313 und rs489693) erklären könnte. Daher scheint eine Beeinflussung der untersuchten Polymorphismen auf die Regulation des MC4R Genes in Analogie zur Studie von Beckers et al.³¹³ als unwahrscheinlich. Um einen Einfluss auf regulatorische Elemente außerhalb der untersuchten Bereiche auszuschließen sind dringend weitere Studien nötig.

4.2.3.3 rs9939609 (FTO)

Der rs9939609 Polymorphismus befindet sich im ersten Intron des FTO Genes, welches für eine nonheme (Fe II)-dioxygenase kodiert,^{156,157} dessen genaue Funktion weiterhin unklar ist.¹⁶⁰ Eine Vielzahl an kürzlich publizierten Studien legt jedoch eine Beteiligung des Genes an der Nahrungsaufnahme und im Bereich des Wachstumes nahe.^{159, 161, 162} Für den Polymorphismus an sich wird eine Veränderung der Appetitregulation in Schlüsselregionen des Gehirnes postuliert.¹⁵⁹

In den untersuchten Studienpopulationen konnte ein signifikanter Einfluss des Polymorphismus auf die Gewichtsparameter vor Beginn der Therapie identifiziert werden: Träger des AA-Genotyps zeigten in der Gesamtpopulation den höchsten BMI zur Aufnahme (AA:26,8; AT:24,7; TT:25,8; p=0,013), was auch in chronischen Patienten beobachtet werden konnte (AA:27,7; AT:25,5; TT:25,9; p=0,051). Diese Beobachtung ist konform mit den Ergebnissen verschiedener Studien,¹⁶⁰ die Träger des AA-Genotyps mit dem höchsten BMI assoziieren konnten. Jedoch konnte dieser Effekt weder in der first Episode Population bestätigt, noch ein BMI-Anstieg vom AT zum AA-Genotyp beobachtet werden. Diese Abweichung könnte durch ein relativ kleines Patientenkollektiv (im Vergleich zu GWAS) und Verzerrungseffekte durch andere Einflussfaktoren erklärt werden.

Nach 4 Wochen zeigten heterozygote Träger des rs9939609 Polymorphismus in allen drei Populationen die stärkste Gewichtszunahme in einem adjustierten ANCOVA Modell, welches jedoch keinen signifikanten Einfluss des untersuchten Polymorphismus auf die Gewichtszunahme identifizieren konnte (0,243< p<0,694). Eine erhöhte Gewichtszunahme für heterozygote Träger scheint in diesem Zusammenhang zudem nicht plausibel, da bei einer funktionellen Auswirkung der Punktmutation mindestens ein vergleichbarer Effekt für homozygot mutierte Allele zu erwarten wäre. Eine Studie, die mit 239 zuvor unbehandelten Patienten durchgeführt wurde, konnte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss des Genotyps auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme feststellen.¹⁶⁴ Zwar konnten Reynolds et al. diese Beobachtung in einer Population von 93 first Episode Patienten bestätigten, identifizierten jedoch einen signifikanten Einfluss des rs9939609 Polymorphismus auf den BMI in 187 chronisch behandelten schizophrenen Patienten.¹⁶⁵ Zudem beobachteten die Autoren einen erhöhten BMI in A-Affin Trägern des rs9939609 Polymorphismus, welche gleichzeitig auch Träger des T-Affin des rs3813929 Polymorphismus im 5HT_{2C} Rezeptor waren. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten Reynolds et al., dass der untersuchte Polymorphismus in chronischen Patienten einen verstärkten Effekt zeigt und mit dem rs3813929 Polymorphismus interagiert.¹⁶⁵

Diese Einschätzung können wir im Großen und Ganzen teilen: Es besteht ein signifikanter Einfluss des Polymorphismus auf den BMI in der Gesamtpopulation und ein gewichts-beeinflussender Trend in einer separaten Analyse mit nur chronisch behandelten Patienten (n=253; AA:27,7; AT:25,5; TT:25,9; p=0,051). Zudem konnte in der chronischen Patientenkollekte ein Interaktionseffekt mit höheren BMI-Werten für A-Affin Träger des rs9939609 Polymorphismus, die gleichzeitig auch Träger des dem rs3813929 Polymorphismus waren, identifiziert werden. Diese Beobachtung blieb jedoch ohne ein signifikantes Ergebnis (p=0,589). Zudem konnte der in der Literatur beschriebene Anstieg

von 0,36kg/m² bzw. der von Reynolds beobachtete Anstieg von 1,6kg/m² für jedes A-Allel,¹⁶⁵ in unserer Population nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend scheint ein Einfluss des rs9939609 Polymorphismus auf den BMI auch in einem Patientenkollektiv, das über einen langen Zeitraum mit atypischen Antipsychotika behandelt wurde, zu existieren. Wie stark dieser Effekt ausgeprägt ist und ob eine Interaktion mit dem rs3813929 Polymorphismus besteht, kann auf Grund der jetzigen Studienlage nicht beurteilt werden. Hierfür sind weitere Studien und eine Aufklärung der genauen Mechanismen der durch Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme nötig.

4.2.3.4 rs1049353 (CNR1)

Der rs1049353 Polymorphismus stellt eine stille Mutation im Codon 453 des Cannabinoid Rezeptor 1 (CB1) Genes dar, welches auf Chromosom 6 lokalisiert ist und eine physiologische Rolle im Energiehaushalt, in der Nahrungsaufnahme und im Suchtverhalten des Menschen spielt. CB1 Antagonisten führen zu einem Gewichtsverlust und verminderter Essensaufnahme,^{172,173} und wurden als Therapie für Übergewicht eingesetzt.¹⁷⁴

In den untersuchten Studienpopulationen konnte kein signifikanter Einfluss des rs1049353 Genotyps auf Gewichtsparameter vor und nach der antipsychotischen Therapie identifiziert werden. Zwar wurde der untersuchte Polymorphismus in verschiedenen Studien mit metabolischen Parametern assoziiert,¹⁸⁰⁻¹⁸³ eine Rolle in der Pathophysiologie des Übergewichts ist jedoch weiterhin strittig.³¹⁴

Zudem konnte in den drei zu diesem Thema vorliegenden Studien kein signifikanter Einfluss auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme beobachtet werden.^{143, 315, 316} Bei den erwähnten Studien handelt es sich um kleine Populationen (n=76, 83 und 183) von koreanischer, europäischer und afrikanisch-amerikanischer Herkunft, welche über einen Beobachtungszeitraum von 14-24 Wochen im Kontext Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme untersucht wurden. Die jetzige Datenlage lässt daher einen Einfluss des rs1049353 Polymorphismus auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme als sehr unwahrscheinlich erscheinen.

4.2.3.5 rs346070, rs346074 und rs346075 (HR3)

Die untersuchten Polymorphismen (rs346070(4/5)) befinden sich in relevanten Steuerungs- und Bindungselementen des HR1 Genes,¹⁸⁹ welches auf Chromosom 3 lokalisiert ist und für den gleichnamigen Rezeptor kodiert. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Histaminaffinität eines Antipsychotikums mit dem Ausmaß der Gewichtszunahme korreliert.¹⁸⁵ Zudem können Clozapin und Olanzapin die AMPK-Aktivität im Hypothalamus, einen wichtigen Regulator der Nahrungsaufnahme,¹⁸⁶ um ein Vielfaches erhöhen, jedoch nur bei Vorhandensein eines HR1 Rezeptors.¹⁸⁷ Aus diesen zentralen Beobachtungen wurde eine relevante Rolle des HR1 Rezeptors in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme abgeleitet.^{124, 188} Indirekt vermögen Antipsychotika auch durch Antagonismus und Modulation anderer Neurotransmittersysteme die Histaminfreisetzung zu beeinflussen.¹⁸⁸ Obwohl es sich bei den untersuchten Polymorphismen um stille Mutationen handelt,⁸² könnte die Lokalisation in der Exon Splicing Enhancer Region bzw. in der Transskriptionsfaktorbindestelle des HR1 Genes eine funktionale Konsequenz nach sich ziehen.¹⁸⁹

Sowohl für den rs346070 als auch für den rs346075 Polymorphismus konnte kein signifikanter Einfluss auf Gewichtsparameter vor und nach der antipsychotischen Therapie identifiziert werden. Einzige Ausnahme hiervon stellte die nach Geschlecht differenzierte Betrachtung der Gewichtszunahme des rs346075 Polymorphismus dar: Hierbei zeigten Frauen eine Zunahme mit dem C-Allel, während für Männer ein Gewichtsverlust beobachtet werden konnte (Interaktionseffekt $p=0,036$). Leider liegen in Bezug auf die Gewichtsveränderung keine vergleichbaren Studien vor.

Verhof et al. konnten zwar eine signifikante Assoziation des Geschlechts mit einem höheren BMI in Frauen identifizieren ($p<0,001$), untersuchten die zu Grunde liegende Population jedoch nicht differenziert nach Geschlecht.¹⁸⁹ Zudem konnte in der von Verhof et al. publizierten cross-sektionalen Studie ein Einfluss der beiden untersuchten Polymorphismen auf den BMI in Abhängigkeit von der Histaminaffinität beobachtet werden, was im Gegensatz zu unseren Ergebnissen in chronischen Patienten steht. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass für den rs346070 Polymorphismus zwar kein signifikanter Interaktionseffekt beobachtet werden konnte ($p=0,199$), jedoch übereinstimmend mit Verhof et al. ein Unterschied zwischen TT-Genotyp Trägern mit einer atypischen Medikation mit hoher und niedriger Histamin Affinität bestand.

Zusammenfassend sind zwingend weitere Studien nötig, um den Einfluss der beiden untersuchten Polymorphismen auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme hinreichend genug beurteilen zu können. Im Gegensatz zu vorausgegangenen Studien, welche keinen Zusammenhang mit Polymorphismen im Bereich der HR1 und der Gewichtszunahme herstellen konnten,³¹⁷⁻³¹⁹ stellen die beschriebenen Ergebnisse jedoch erste Anhaltspunkte für relevante Polymorphismen in einem Gen dar, für welches eine zentrale Rolle in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme postuliert wird.¹²⁴

4.2.3.6 rs7973796 (PMCH)

Der rs7973796 Polymorphismus befindet sich 4,5 kb entfernt von der 5'-Region des MCH-precursor (PMCH) Genes auf Chromosom 12, welches für das orexogene Neuropeptid Melanin-Concentrating Hormon (MCH) kodiert.^{196,197} das sich als kritischer Säugetiereffektor der Energiehomöostase in verschiedenen genetischen und pharmakologischen Studien erwiesen hat.^{191,192,193-195} Die bis jetzt einzige genomweite Linkage-Studie der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme konnte zwei Marker in der Nähe des Genes identifizieren,¹²² von denen der untersuchte Polymorphismus als vielversprechendster bezeichnet wird. In einer Folgestudie konnte der rs7973796 Polymorphismus zudem mit einem erhöhten BMI assoziiert werden.¹⁹⁷

In den untersuchten Studienpopulationen konnte kein signifikanter Einfluss des rs7973796 Genotyps auf Gewichtsparameter vor und nach der antipsychotischen Therapie identifiziert werden. Zwar zeigten GG-Träger übereinstimmend mit der Publikation von Chagnon et al.¹⁹⁷ einen erhöhten BMI – ein signifikantes Niveau konnte jedoch in keiner statistischen Analyse erhalten werden.

Chagnon et al. konnten einen signifikanten Effekt des rs7973796 Genotyps auf den BMI nur in Olanzapin therapierten Patienten unter 50 Jahren identifizieren. Wieso der untersuchte Polymorphismus nur einen Einfluss auf Patienten unter 50 Jahren haben sollte, geht aus der Publikation nicht hervor. Zudem erscheint eine Differenzierung nach Alter (>50< Jahre) auf Grund „visueller Inspektion“ und der relativ kleinen Population (n=72 für Olanzapin) als sehr fraglich.

Auch wenn das PMCH Gen keine häufig vorkommende Mutationen enthält, stellt es auf Grund der orexigenen Wirkung des MCH Neuropeptides ein interessantes Kandidatengen dar. In einer Studie mit männlichen Ratten konnte durch Olanzapin-Injektion eine erhöhte mRNA Expression des MCHR1 Rezeptors nachgewiesen werden.²²⁰ Die Nähe des Genes lässt jedoch nicht zwingend auf einen Zusammenhang mit dem in der genomweiten Linkage-Studie identifizierten Marker schließen.¹⁹⁸ Die erwähnte Studie stellt zudem die einzige vergleichbare Untersuchung des rs7973796 Polymorphismus dar, welche die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme adressiert hat. Daher kann die Frage nach dem Einfluss des rs7973796 Genotyps bzw. des PMCH Genes auf Gewichtsparameter nur mit Hilfe weiterer Studien beantwortet werden.

4.2.3.7 rs7799039 (LEP) und rs1137101 (LEPR)

Die untersuchten Polymorphismen befinden sich in zentralen Regelstellen des Leptin-Melanocortinsystems, welches eine zentrale Rolle in der Regulation der Energiehomöostase einnimmt (siehe Abbildung 3). Der **rs7799039** Polymorphismus befindet sich in der Promoterregion des LEP Genes und konnte mit einer erhöhten Leptinsekretion und -transkription assoziiert werden.²⁰⁴ Leptin entfaltet seine hemmende Wirkung auf die Appetit stimulierenden Hormone (NPY, Agouti-related Peptid)²⁰² über seinen Rezeptor (LEPR).²⁰² Der rs1137101 Polymorphismus ist in Exon 6 des LEPR Genes lokalisiert, welches für den zuvor genannten Leptinrezeptor kodiert.

Der rs7799039 bzw. der rs3813929 Polymorphismus gehört basierend auf der zentralen Bedeutung der zu Grunde liegenden Gene (LEP bzw. 5HT_{2C}) in der Energiehomöostase zu den am besten untersuchten Punktmutationen im Kontext der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme. Das G-Allel des rs7799039 Polymorphismus konnte in der Mehrzahl der Studien (zusammengefasst in den Arbeiten von Lee bzw. Kao et al.)^{127, 320} mit erhöhter Gewichts- bzw. BMI-Zunahme assoziiert werden, wobei die Studienlage nicht gänzlich einheitlich ist. Da ein Einfluss des G-Allels größtenteils bei Olanzapin und Clozapin behandelten Patienten identifiziert werden konnte und sich ein abweichender Effekt unter Risperidon-Therapie zeigte, schlussfolgerten Lee et al., dass der Einfluss des rs7799039 Polymorphismus von der Art des Antipsychotikums abhängig ist. Diese Hypothese wird durch Studien gestärkt, welche für Olanzapin und Clozapin einen verstärkten Einfluss auf Serumleptinspiegel identifizieren konnten.³²¹

Übereinstimmend mit dieser Vermutung zeigten sich in der untersuchten Studienpopulation für G-Allel Träger, die mit Olanzapin und Clozapin behandelt wurden, eine Gewichtszunahme, während für Patienten, die mit anderen Antipsychotika therapiert wurden ein umgekehrter Effekt zu beobachten war. Die Wechselwirkung zwischen Art der Medikation und rs7799039 Genotyp erreichte zwar kein signifikantes Niveau, könnte aber erklären, wieso über alle drei Studienpopulationen kein signifikanter Einfluss identifiziert werden konnte.

Neben der zuvor beschriebenen Wechselwirkung (Medikation x Genotyp) weisen zwei unabhängige Studien auf einen möglichen Interaktionseffekt zwischen dem untersuchten rs7799039 und dem rs3813929 Polymorphismus hin: Träger der Risikoallele G (rs7799039) und C (rs3813929) zeigten hierbei ein erhöhten BMI bzw. Anteil an Übergewicht.^{322, 323} In chronischen Patienten unserer Arbeit konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden ($p=0,299$).

Im Gegensatz zum rs7799039 Polymorphismus existiert für den **rs1137101 Polymorphismus** eine deutlich limitierte Anzahl an Studien (zusammengefasst in den Arbeiten von Lee bzw. Kao et al.),^{127, 320} welche durch sehr heterogene Ergebnisse geprägt sind. Ein signifikanter Einfluss konnte bisher nur in zwei Studien, die eine Stratifizierung nach Geschlecht vornahmen^{209, 324} bzw. unter Berücksichtigung des rs7799039 Polymorphismus,¹³¹ nachgewiesen werden.

In allen drei Studienpopulationen konnte kein signifikanter Einfluss des untersuchten Polymorphismus auf die Gewichtszunahme identifiziert werden, wobei ein möglicher Interaktionseffekt zwischen rs1137101 Genotyp und Geschlecht zu beobachten war, welcher jedoch kein signifikantes Niveau erreichte ($p=0,053$). Hierbei zeigte sich für männliche Patienten ein deutlicher Anstieg der Gewichtszunahme mit dem A-Allel, während für weibliche AA-Genotyp Träger nahezu keine Gewichtsveränderung beobachtet werden konnte ($\Delta \text{kg}=3,0$ [1,1-4,8]; $p<0,001$). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied ist zumindest plausibel, da Frauen erhöhte Leptinspiegel aufweisen und wahrscheinlich auch sensitiver auf das Hormon reagieren.²⁰⁹ Im Kontext bereits publizierter Arbeiten scheint der rs1137101 Polymorphismus jedoch nur einer untergeordnete Rolle in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme einzunehmen: Ein signifikanter Einfluss auf die Gewichtszunahme konnte in keiner longitudinalen Studie identifiziert werden.^{164, 324, 325} Darüber hinaus konnten signifikante Zusammenhänge nur in weiblichen Probanden beobachtet werden,^{209, 324} wobei der Einfluss des Geschlechtes in Vergleich zu unseren Ergebnissen ein divergentes Resultat lieferte.

Zusammenfassend bleibt der rs7799039 Polymorphismus trotz ausbleibender signifikanter Ergebnisse in der betrachteten Studienpopulation ein vielversprechender Marker in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme. Studien weisen übereinstimmend mit unseren Ergebnissen auf einen substratspezifischen Effekt hin, welcher auf Grundlage der heterogenen Rezeptorprofile verschiedener Antipsychotika und starken Unterschieden in der Ausprägung der Gewichtszunahme als sehr plausibel erscheint. Weitere nach Medikament stratifizierte Untersuchungen könnten helfen die individuellen Unterschiede in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme aufzuklären. Obwohl für den rs1137101 Genotyp ein Interaktionseffekt zwischen Geschlecht und Genotyp identifiziert werden konnte, scheint der untersuchte Marker im Kontext bereits publizierter Arbeiten nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Weitere nach Geschlecht differenzierte Studien sind nötig um eine valide Aussage treffen zu können.

4.2.3.8 rs3813929 (5HT_{2c})

Der rs3813929 Polymorphismus ist auf Chromosom X in der Promotorregion des 5HTR2C Rezeptor Genes lokalisiert,²¹¹ welches für den gleichnamigen G-Protein gekoppelten Rezeptor kodiert. Für den untersuchten Polymorphismus wurde eine Änderung der Promoteraktivität beschrieben, wobei auf Grund divergenter Ergebnisse die genaue funktionelle Rolle weiterhin unklar ist.^{213,215} Aufgrund der Tatsache, dass 5HTR2C Rezeptor Agonisten den Appetit reduzieren³²⁶ und die Mehrheit der Antipsychotika einen ausgeprägten Antagonismus zum 5HTR2C Rezeptor zeigen, stellt der -759C/T Polymorphismus die am besten untersuchte Punktmutation in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme dar.

Die Mehrheit der Studien konnte hierbei einen protektiven Effekt des T-Allels identifizieren.³²⁰ Träger des Risiko C-Allels zeigten in einer Meta-Analyse ein um über dreifach erhöhtes Risiko einer Gewichtszunahme über 7 %.²¹³ Auch in den untersuchten Studienpopulationen wiesen in einem auf Störfaktoren korrigiertem Modell CC-Genotyp Träger eine erhöhte Gewichtszunahme auf. Die Unterschiede zwischen den Genotypgruppen waren jedoch schwach ausgeprägt, so dass kein signifikantes Niveau erreicht wurde. Auch eine zusätzliche Betrachtung der Gewichtszunahme über bzw. unter 7 % konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen dem CC-Genotyp und T-Allel Trägern identifizieren. Trotz vieler positiver Studienergebnisse konnte in einigen Studien kein Zusammenhang zwischen dem -759C/T Polymorphismus und der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme identifiziert werden.^{215, 326} Als Gründe für die abweichenden Ergebnisse können Unterschiede in der Länge der Studie bzw. Behandlungsdauer, Art der Patienten (first Episode vs. chronisch) bzw. des Antipsychotikums und weitere Faktoren (Ethnizität, Umgebung) genannt werden.²¹⁵ Zudem konnte eine Studie eines chronischen Patientenkollektives keinen Einfluss des untersuchten Polymorphismus allein, sondern nur in Kombination mit weiteren Polymorphismen innerhalb des 5HTR_{2c} Genes identifizieren.²¹³ Daher könnte eine unterschiedliche Verteilung dieser Marker die abweichenden Ergebnisse erklären. Eine Wechselwirkung des rs3813929 mit dem rs7799039 Polymorphismus im Leptin Gen, wie in den Studien von Gregor bzw. Yevtushenko et al. postuliert,^{322, 323} konnte in unserer Population nicht bestätigt werden. Weitere Studien über die funktionalen Hintergründe sind daher unabdingbar.

Trotz robuster Replikation des rs3813929 Polymorphismus weisen unsere Ergebnisse auf eine eher untergeordnete Bedeutung in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme hin, in der andere Marker eine relevantere Rolle spielen.

4.2.3.9 rs2236418 (GAD)

Der rs2236418 Polymorphismus befindet sich auf Chromosom 10p11.23 in der Promotorregion des Glutamatdecarboxylase 2 (GAD2) Genes, welches die Bildung zu GABA, einer der relevantesten hemmenden Transmitter im ZNS, katalysiert^{225, 226} und unter subchronischer Olanzapinjektion verstärkt in Ratten exprimiert wird.¹²⁹

In allen untersuchten Studienpopulationen konnte ein signifikanter Einfluss des rs2236418 Polymorphismus auf die Gewichtszunahme identifiziert werden. Hierbei zeigten AA-Genotyp Träger eine stärkere Gewichtszunahme als G-Allel Träger, wobei eine Interaktionsanalyse zwischen Geschlecht und Genotyp auf einen verstärkten Effekt in Männern hinweist (Interaktionseffekt p=0,019). Zudem scheint eine unterschiedliche Auswirkung des Polymorphismus in Abhängigkeit von der Therapiedauer zu existieren. Im Gegensatz zu zuvor unbehandelten Patienten konnte in chronischen Patienten ein niedriger BMI für AA-Genotyp Träger identifiziert werden (p=0,009).

Dies stellt nach unserem Kenntnisstand die erste Studie dar, die das A-Allel des rs2236418 Polymorphismus mit einer verstärkten Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme assoziieren konnte. Der untersuchte Polymorphismus stellt eine Punktmutation von Guanin zu Adenin dar, wobei für den AA-Genotyp eine 6-fach erhöhte transkriptionale Aktivität gegenüber dem Wildtyp nachgewiesen werden konnte.²³¹ Zudem wurde das G-Allel des rs2236418 Polymorphismus in gleichnamiger Fall-Kontroll Studie mit einem erhöhten Risiko für starke Fettleibigkeit assoziiert²³¹ und konnte in einer weiteren Studie einen Trend für eine höhere Kalorienaufnahme in Frauen zeigen.³²⁷ Trotz dieser positiven Befunde ist die Studienlage nicht einheitlich. So konnten Swabrick et al. weder die Assoziation des rs2236418 Polymorphismus mit starker Fettleibigkeit, noch eine unterschiedlich ausgeprägte transkriptionale Aktivität des gleichnamigen Polymorphismus nachweisen.²²⁵ Boesgaard et al. konnten in einer großen Studienpopulation aus 5857 Dänen das G-Allel mit einem verminderten BMI assoziieren.³²⁸

Auch wenn die Beteiligung des Genes an Übergewicht kontrovers diskutiert wird²³², sprechen die Ergebnisse einer Studie an weiblichen Ratten, die eine erhöhte GAD65 mRNA Expression unter subchronischer Olanzapinjektion zeigen konnte, für die Beteiligung des Genes im Regelkreis des Energiehaushaltes¹²⁹ und machen das GAD Gen ebenfalls zu einem interessanten Kandidatengen in Bezug auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme. Unsere Ergebnisse sollten Anreize für weitere Studien setzen, um den Einfluss des Genes bzw. des Polymorphismus in der Regulation der Energiehomöostase aufzuklären.

4.2.3.10 rs16147 (NPY)

Der rs16147 Polymorphismus stellt eine Punktmutation von Thymin zu Cytosin dar und befindet sich in der Promoterregion auf Chromosom 7q15.1 des NPY Genes, welches für eines der potentesten orexigenen Peptide kodiert. Über die nachgeschalteten Transmitter Orexin und MCH führt NPY zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme. Das mutierte C-Allel konnte mit einer 30 % verminderten basalen NPY Expression in Verbindung gebracht werden²²² und wurde in einer kürzlich publizierten Studie mit einer erhöhten Gewichtszunahme unter Antipsychotika assoziiert.²¹⁸

In allen drei untersuchten Studienpopulationen konnte eine erhöhte Gewichtszunahme für AA-Genotyp Träger beobachtet werden, wobei in einem auf Störfaktoren korrigierten Modell nur Patienten der first Episode Population ein signifikantes Niveau erreichten (AA:3,5; AG:1,6 GG:1,1 p=0,007). Zudem existiert möglicherweise ein Interaktionseffekt zwischen Genotyp und der Art der Medikation: Hierbei zeigte sich eine verstärkte Gewichtszunahme nur bei Patienten, die mit Olanzapin und Clozapin therapiert wurden, wobei der Interaktionseffekt kein signifikantes Niveau erreichte (Interaktionseffekt Genotyp x Medikation: p=0,079).

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der von Tiwari et al. publizierten Studie (Olanzapin und Clozapin; n=89), in welcher G-Allel Träger eine verstärkte Gewichtszunahme zeigten.²¹⁸ Die Abweichung könnte durch die relativ kleine Studienpopulation erklärt werden. Zudem konnte in der Gesamtpopulation der zitierten Studie in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ein nicht signifikanter Anstieg (p=0,310) der Gewichtszunahme mit dem A-Allel beobachtet werden.²¹⁸

Trotz dieser divergenten Ergebnisse sollte der rs16147 Polymorphismus in weiteren Studien im Kontext Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme berücksichtigt werden. Erhöhte Expressionsraten des MCH Rezeptors²²⁰ und des NPY²²¹ nach Olanzapin-Injektion weisen zudem auf eine relevante Rolle des Neuropeptides hin. Ak et al. konnten in diesem Zusammenhang auch einen signifikanten Anstieg von NPY-Spiegeln in first Episode Patienten identifizieren.¹³⁰ Die beschriebenen Assoziation des untersuchten Markers mit Übergewicht^{223, 329} und Leptinspiegeln²²⁴ unterstützen diese Hypothese. Auch in Bezug auf die funktionale Konsequenz des rs16147 Polymorphismus sind auf Grund heterogener Ergebnisse aus Expressionstudien zwingend weitere Studien nötig.^{218,330,331}

4.3.3 Kombinierte Einflussfaktoren

Als relevante Einflussfaktoren auf die Gewichtszunahme nach 4 Wochen konnten in der first Episode Population die Punktmutationen rs17782313 (MC4R), rs16147 (NPY) und rs2236418 (GAD) identifiziert werden. Die Einbeziehung und Kombination dieser Polymorphismen mit klinischen Einflussfaktoren führte in Abhängigkeit von der Population (first Episode, Population „Gewicht“ bzw. chronische Population) zu divergenten Ergebnissen:

In **zuvor unbehandelten** Patienten zeigte sich in einem linearen Regressionsmodell ein signifikanter Einfluss der Polymorphismen (MC4R; $p=0,005$), rs16147 (NPY; $p=0,003$) und rs2236418 (GAD; $p=0,040$), sowie der klinischen Faktoren Medikation ($p=0,032$), Geschlecht ($p=0,036$) und Gewicht zur Aufnahme ($p=0,033$).

Im Gegensatz hierzu erreichten in der **Gesamtpopulation** nur der rs17782313 Polymorphismus ($p=0,008$) und die klinischen Faktoren Geschlecht und Gewicht zur Aufnahme ein signifikantes Niveau ($p<0,001$).

In **chronischen Patienten** konnten nur der rs2236418 Polymorphismus ($p=0,004$) und das Alter ($p=0,017$) als signifikante Einflussfaktoren auf den BMI vor Therapiebeginn identifiziert werden.

Die Betrachtung der erklärten Varianz der jeweiligen Regressionsmodelle verdeutlicht die bessere Vorhersagekraft des first Episode Modelles ($r^2=0,327>r^2=0,162$ (Population „Gewicht“) $>r^2=0,073$ (chronische Patienten)). Hieraus leitet sich eine deutlich erschwerte Identifikation von Risikofaktoren in chronischen Patienten ab, welche größtenteils durch eine vorausgegangene Behandlung mit verschiedenen Antipsychotika erklärt werden kann: Hierbei zeigt die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme einen starken Anstieg innerhalb der ersten 6-12 Monate^{114, 332} und führt über einen Zeitraum von 36-38 Monaten zu einer Plateaubildung^{272, 333} bzw. zu einer nur noch sehr schwach ausgeprägten Gewichtszunahme.¹¹⁴ Daher erweist sich die Identifikation von relevanten Risikofaktoren chronischer Patienten auf Grund der nur schwach ausgeprägten Gewichtszunahme als schwierig. Zudem enthalten chronische Patientenkollektive einen erhöhten Anteil an schlecht respondierenden Patienten, die mit weiteren Medikamenten behandelt werden und somit zu erheblichen Verzerrungseffekten führen können.²⁷⁹

Des Weiteren verdeutlichen die divergenten Ergebnisse, dass Polymorphismen einen unterschiedlichen Effekt in first Episode und chronischen Patienten haben können und betonen die Relevanz einer separaten Betrachtung der Patientenkollektive. Unterschiedliche Auswirkungen könnten hierbei über zeitlich-differenzierte Veränderung in der Energiehomöostase, wie es beispielsweise für den hypothalamischen AMPK Signalweg postuliert wird,¹²⁴ erklärt werden.

Ein aus dem Regressionsmodell abgeleitetes Risikomodell erlaubte die Differenzierung von Patienten mit einer verstärkten Gewichtszunahme (6,3kg, 3 Risikofaktoren) gegenüber Patienten mit einer verminderten Gewichtszunahme (-0,1kg; kein Risikofaktor; KI (2,5-10,4); $p<0,001$). Die Übertragung dieses Modells unter Einbeziehung des klinischen Parameters BMI (differenziert in BMI $>25<$) zeigte

einen signifikanten Einfluss sowohl in der first Episode ($p<0,001$) als auch in der Population „Gewicht“ ($p=0,004$). Hierbei ist ein Anstieg der Gewichtszunahme mit Zunahme der Risikofaktoren zu beobachten, wobei ein BMI unter 25 das Risiko unabhängig vom zugrunde liegenden Polymorphismus erhöht. Dies stimmt mit einer Vielzahl von Studien^{263-265,271,272,280} überein und betont, dass auch klinische Faktoren zur Abwägung des Risikos einer Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme berücksichtigt werden müssen.

Auch wenn es sich bei dem zuvor beschriebenen Risikomodell um ein sehr vereinfachtes Modell handelt, welches die unterschiedlichen Einflüsse der jeweiligen Polymorphismen vernachlässigt und in größeren Populationen bestätigt werden muss, veranschaulicht es doch sehr einfach die Bedeutung relevanter Polymorphismen auf die durch Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme.

Die Kombination relevanter Risikofaktoren ist in vorausgegangenen Studien bisher nicht hinreichend adressiert worden. Eine japanische Studie untersuchte 21 Kandidatengene im Kontext Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme und konnte 4 relevante Polymorphismen identifizieren.³³⁴ Patienten mit zwei oder drei genetischen Risikofaktoren zeigten hierbei in Analogie zu unseren Ergebnissen eine signifikant stärkere Gewichtszunahme als Probanden mit einem bzw. keinem Risikofaktor.³³⁴

Qi et al. untersuchten den Zusammenhang von genetischen Prädispositionsmarkern und einer BMI-Zunahme in Abhängigkeit von der Einnahme zuckergesüßter Getränke.³³⁵ Hierbei wurden 4 Risikogruppen auf Basis der Anzahl der zugrunden liegenden genetischen Risikofaktoren gebildet. In allen drei untersuchten Kohorten (Nurses Health Study $n=6934$; Health Professional Follow-up Study $n=4423$ und Women's Genome Health Study $n=21740$) zeigte sich in Probanden, die ein zuckergesüßtes Getränk erhalten hatten, eine verstärkte Gewichtszunahme in Abhängigkeit vom genetischen Prädispositionsscore: Studienteilnehmer mit einer erhöhten Anzahl an Risikofaktoren zeigten auch eine verstärkte BMI-Zunahme.³³⁵

Die Kombination verschiedener Risikofaktoren scheint demnach eine bessere Vorhersagekraft einer Gewichtszunahme zu ermöglichen. Im Kontext der durch Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme erlaubt dieses Vorgehen eine präzisere Identifizierung von Patientenkollektiven, die verstärkte metabolische Nebenwirkungen zu erwarten haben. An erster Stelle sollte jedoch die Validierung möglicher Marker in großen Patientenkollektiven stehen, bevor eine Risikostratifizierung in der klinischen Praxis Anwendung finden kann.

Zusammenfassend können aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen in Verbindung mit der aktuellen Studienlage folgende Schlüsse abgeleitet werden:

- 1) Studienpopulationen mit zuvor unbehandelten Patienten ermöglichen auf Grund erhöhter Effektstärken und verringriger Verzerrungsfaktoren eine deutlich bessere Identifikation von genetischen Risikofaktoren gegenüber chronischen Population. Dies sollte in der Studienplanung neben geschlechts- und medikations-spezifischen Effekten berücksichtigt werden.
- 2) Polymorphismen in zentralen Regelstellen der Energiehomöostase üben einen relevanten Einfluss auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme aus.

- 3) Neben genetischen Risikofaktoren spielen klinische Parameter eine entscheidende Rolle in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme. Ein junges Alter und ein $BMI < 25$ stellen weitere Risikofaktoren dar, die vor Therapiebeginn berücksichtigt werden sollten.
- 4) Die Kombination verschiedener klinischer und genetischer Risikofaktoren ermöglicht die Stratifizierung von Patienten in Hochrisikogruppen

5. Zusammenfassung

Pharmakogenetische Therapieansätze zielen darauf ab Nebenwirkungen eines Arzneimittels zu minimieren und gleichzeitig den Therapieerfolg zu maximieren. Eine gezielte prätherapeutische Genotypisierung könnte helfen Hochrisikopatienten schon vor Therapiebeginn zu identifizieren und durch Auswahl geeigneter Medikamente zu einer erheblichen Verbesserung der Arzneimitteltherapie und Einsparungen im Gesundheitswesen beizutragen.

Eine stratifizierte bzw. adaptierte Antipsychotika-Therapie existiert zurzeit nicht. Pharmakogenetische Therapieansätze in diesem Bereich scheinen besonders im Hinblick auf große interindividuelle Unterschiede im Ansprechen auf eine Antipsychotika-Therapie als sinnvoll und zielführend. Beachtliche 78 % der Patienten brechen eine antipsychotische Therapie vor Ablauf von 18 Monaten auf Grund fehlender Effektivität ab.²³ Der häufig vorgenommene Wechsel zu einem effektiveren Antipsychotikum gestaltet sich hierbei als schwierig, langwierig und ist mit verschiedenen Medikationsversuchen verbunden.²⁴ Unter den Nebenwirkungen einer atypischen Antipsychotika-Therapie ist die Gewichtszunahme als bedeutendste Therapieeinschränkung zu nennen, welche mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Diabetes²⁵ und einer gesteigerten Noncompliance einhergeht.^{26, 27} Ein hoher Anteil interindividueller Unterschiede sowohl im Ansprechen als auch in Bezug auf die Gewichtszunahme können auf genetische Faktoren zurückgeführt werden und unterstreichen die Bedeutung pharmakogenetischer Therapieansätze in der Antipsychotika-Therapie, die allein im Hauptindikationsgebiet der Schizophrenie 1 % der Weltbevölkerung betrifft.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation und Prüfung relevanter genetischer Marker im Hinblick auf eine stratifizierte Antipsychotika-Therapie. Hiermit sollte die Frage beantwortet werden, ob bestimmte Polymorphismen eine Vorhersage eines veränderten Ansprechens bzw. des Auftretens von Nebenwirkungen ermöglichen. Im Rahmen der Arbeit wurden schnelle, effiziente und verlässliche Genotypisierungsmethoden für 21 Polymorphismen in 17 Kandidatengenen entwickelt, die auch eine praxisorientierte Anwendung im klinischen Alltag gewährleisten.

Genetische Unterschiede in relevanten metabolisierenden Enzymen können trotz identischer Dosierung zu erheblichen, interindividuellen Schwankungen der Wirkstoffkonzentration und somit zu veränderten Nebenwirkungen und Ansprechen führen. Für die untersuchten Polymorphismen im CYP1A2 (*1D und *1F) und im UGT1A4 (*3) Gen konnte in vorausgegangenen Studien ein Einfluss auf die Serumkonzentration bzw. auf die CYP1A2 Aktivität (POR rs2302429) identifiziert werden, wobei die Auswirkung der genannten Polymorphismen auf das Ansprechen einer Antipsychotika-Therapie weitestgehend unbekannt ist. Von den 4 untersuchten pharmakokinetischen Polymorphismen im Olanzapinmetabolismus zeigten nur die Marker CYP1A2*1F und *1D einen signifikanten Einfluss auf die Olanzapin Serumkonzentration. Hierbei resultierte das Fehlen eines CYP1A2 Induktors bzw. das Vorhandensein des *1F C-Allels und *1D deT-Allels in erhöhte Serumkonzentrationen. Die Kombination dieser Faktoren ermöglichte die Identifikation von Patienten, die besser auf eine Olanzapin- bzw. Clozapin-Therapie ansprachen.⁵⁴ Hiermit konnte zum ersten Mal

ein Nutzen der CYP1A2 Genotypisierung zur Identifikation von Respondern und ein möglicher pharmakogenetischer Therapieansatz gezeigt werden.⁵⁴

Das unzureichende Ansprechen vieler Patienten auf die primäre antipsychotische Behandlung stellt ein schwerwiegendes Problem in der Antipsychotika-Therapie dar. Sowohl für den rs1049353 Polymorphismus im Cannabinoid Rezeptor 1 Gen als auch für den rs3787430 Polymorphismus im Histamin Rezeptor 3 Gen wurde in vorausgegangen Studien ein vom Genotyp abhängiges Response Verhalten beschrieben. In Analogie konnte auch in der untersuchten Population ein signifikanter Einfluss auf die Zustandsänderung der paranoiden Symptome beobachtet werden. Auf Grund heterogener und schwer vergleichbarer Studienlage bedarf es jedoch zwingend weiterer Studien, bevor eine Implementierung in den klinischen Alltag umgesetzt werden kann. Für den dinukleotiden Polymorphismus rs28656907/rs28373093 des „ATP-binding cassette 1“ (ABCB1) Genes scheint möglicherweise eine Assoziation mit einer erhöhten Nebenwirkungsrate zu existieren, welche bisher noch nicht beschrieben wurde. Auf Grund der starken Fokussierung vieler Studien auf nur drei Marker (rs1128503, rs2032582, rs1045642) des ABCB1 Genes, welche zudem zu inkonsistenten Ergebnissen führten,¹⁰⁸ sollte dieser Befund Anreize für weitere Untersuchungen schaffen.

Schizophrene Patienten weisen eine um 20 % verringerte Lebenserwartung auf,^{111, 112} was zu einem erheblichen Anteil auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme und die damit verbundenen metabolischen Konsequenzen zurückzuführen ist. Da es unter den meisten atypischen Antipsychotika zu einem gesteigerten Appetit und/oder einem verzögerten Sättigungsgefühl kommt,^{45, 115} stellen Neuropeptide, die einen Einfluss auf die Energiehomöostase haben, einen vielversprechenden Untersuchungsansatz dar. Die im Rahmen der Arbeit veröffentlichte Publikation konnte als erste einen Einfluss des rs17782313 Polymorphismus auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme identifizieren.¹⁵¹ Zudem konnte ein weiterer Marker in der Nähe des Melanokortin Rezeptors (rs489693) mit Gewichtszunahme assoziiert¹¹¹ und damit die Ergebnisse einer genomweiten Assoziationsstudie der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme gestützt werden.¹⁵³ Die starke Korrelation beider Polymorphismen fügt die Ergebnisse der beschriebenen Studien zusammen und legt eine relevante Bedeutung dieser Punktmutationen in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme nahe. Als weiterer bisher nicht im Kontext der Gewichtszunahme beschriebener Marker, konnte der rs2236418 Polymorphismus (Promotorregion des Glutamatdecarboxylase 2 Genes) identifiziert und in allen Studienpopulationen robust mit Antipsychotika vermittelter Gewichtszunahme assoziiert werden. Des Weiteren konnte der rs16147 Polymorphismus, welcher sich in der Promoterregion des Neuropeptid Y Genes befindet und für eines der potentesten orexigenen Peptide kodiert, in der Subpopulation von zuvor unbehandelten Patienten einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtszunahme zeigen.

Die Kombination der identifizierten genetischen Risikofaktoren (rs17782313, rs2236418 und rs16147) ermöglichte eine Differenzierung von Patienten mit einer erheblichen Gewichtszunahme nach 4 Wochen (3 Risikofaktoren, 6,3 kg) zu Patienten, die keine Gewichtszunahme zeigten (kein Risikofaktor; -0,1 kg KI (2,5-10,4); p<0,001, zuvor unbehandeltes Patientenkollektiv). Dies deutet darauf hin, dass die genannten Polymorphismen in zentralen Regelstellen der Energiehomöostase einen relevanten Einfluss auf die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme ausüben und eine

Identifizierung von Hochrisikopatienten ermöglichen. Neben genetischen Risikofaktoren scheinen klinische Parameter eine bedeutende Rolle in der Antipsychotika vermittelten Gewichtszunahme zu spielen. In einem linearen Regressionsmodell von zuvor unbehandelten Patienten konnten als klinische Einflussgrößen das Geschlecht, die Art der Medikation und das Gewicht vor Therapiebeginn identifiziert werden. Diese Faktoren sollten in zukünftigen Modellen zur Abschätzung des individuellen Gewichtsrisikos neben genetischen Komponenten Verwendung finden. Die Übertragbarkeit des beschriebenen Regressionsmodells auf langjährig therapierte Patienten erwies sich als schwierig und resultierte in eine deutlich erschwerete Identifikation von Hochrisikopatienten. Dies ist auf eine schwächere Gewichtszunahme in Verbindung mit ausgeprägteren Verzerrungsfaktoren in einem langjährig therapierten Patientenkollektiv zurückzuführen, weshalb zur Identifikation von genetischen und klinischen Risikofaktoren unbehandelte Patientenkollektive vorrangig berücksichtigt werden sollten.

Zusammenfassend konnten durch die vorliegende Arbeit einige vielversprechende Polymorphismen, die einen relevanten Einfluss auf die Pharmakokinetik, das Ansprechen sowie die Antipsychotika vermittelte Gewichtszunahme haben, identifiziert werden. Die beobachteten Effekte wurden trotz einer heterogenen Population mit unterschiedlicher Komedikation gewonnen, so dass die Ergebnisse relevant genug erscheinen, um auch im klinischen Alltag Anwendung finden zu können. Auch wenn es sich bei den verwendeten Risikomodellen um sehr vereinfachte Modelle handelt und die identifizierten Risikofaktoren in größeren Populationen bestätigt werden müssen, konnten doch Erfolg verprechende Schritte in Richtung stratifizierter Antipsychotika-Therapie getan werden.

Bereits zum jetzigen Zeitpunkt ist eine Vielzahl an pharmakogenetischen Testsystemen erhältlich (zusammengefasst in der Arbeit von Drozda et al.³³⁶), welche neben den bekannten pharmakokinetischen Polymorphismen in den Genen von CYP2D6 und CYP2C19 auch zunehmend pharmakodynamische Kandidatengene abdecken. Als Beispiel sei an dieser Stelle der GeneSightRx Test erwähnt, der auf Grundlage verschiedener Polymorphismen in den Genen von CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2, SLC6A4 und HTR_{2A} dem Arzt eine Praxisempfehlung im Sinne eines Ampelschemas („Use as directed“, „Use with caution“, „Use with increased caution“) zur Verfügung stellt. Bereits drei publizierte Studien, wenn auch in kleinen und bisher nur in antidepressiven Patientenkollektiven durchgeführt, weisen auf einen Vorteil dieser Anwendung hin.³³⁷⁻³³⁹ Zudem stellt das aufgeführte Testsystem ein hervorragendes Beispiel der Kombination verschiedener genetischer Risikofaktoren dar, und verdeutlicht wie pharmakogenetische Erkenntnisse im klinischen Alltag Anwendung finden können. Aufgabe in der Zukunft wird es sein weitere robust replizierte Marker in einem Algorithmus zu kombinieren, um eine optimale Therapie zu ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

1. Kalow W. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and pharmacobiology. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2001 Jul;70(1):1-4.
2. Kirchheimer J, Seeringer A, Brockmoller J. [State of the art of pharmacogenetic diagnostics in drug therapy]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2006 Oct;49(10):995-1003.
3. Kalow W, Tang BK, Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 1998 Aug;8(4):283-289.
4. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K. *Taschenlehrbuch der Humangenetik*. Thieme; 2011.
5. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet* 2011 Oct;12(10):683-691.
6. Steimer W, Potter JM. Pharmacogenetic screening and therapeutic drugs. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2002 Jan;315(1-2):137-155.
7. Steimer W. Pharmacogenetics and psychoactive drug therapy: ready for the patient? *Ther Drug Monit* 2010 Aug;32(4):381-386.
8. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Ruth P, M S-K. *Mutschler Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* 2008.
9. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1998 Apr 15;279(15):1200-1205.
10. Ma Q, Lu AY. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacological reviews* 2011 Jun;63(2):437-459.
11. Preskorn SH, Burke MJ, Fast GA. Therapeutic drug monitoring. Principles and practice. *The Psychiatric clinics of North America* 1993 Sep;16(3):611-645.
12. Dingermann T, Zündorf ISD. Personalized tumor therapy. *Pharmakon* 2013;1:12-20.
13. Human genome at ten: The sequence explosion. *Nature* 2010 Apr 1;464(7289):670-671.
14. Baggio G, Corsini A, Floreani A, Giannini S, Zagonel V. Gender medicine: a task for the third millennium. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2013 Apr;51(4):713-727.
15. Dingermann T, Zündorf I. Genetic biomarkers in personalized medicine. *Pharmakon* 2013;1:12-20.
16. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1996 Mar;14(3):737-744.
17. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2008 Oct 23;359(17):1757-1765.
18. EMEA Informationen zu Kalydeco. [cited 2014 18.02.]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR - Product_Information/human/002494/WC500130696.pdf
19. Arzneimittelkommisionsmitteilung zu Codein. *Pharmazeutische Zeitung* 2013 29.08.2013;158(35).
20. Bühring P. Zunahme psychischer Erkrankungen: Gegensteuern erforderlich. *Deutsches Ärzteblatt für psychologische Psychotherapeuten* 2010 September 2010;Heft 9:385.
21. Freedman R. Schizophrenia. *The New England journal of medicine* 2003 Oct 30;349(18):1738-1749.
22. Gründer G. *Handbuch der Psychopharmakotherapie*. Springer Verlag Berlin-Heidelberg; 2012.
23. Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *The New England journal of medicine* 2005 Sep 22;353(12):1209-1223.
24. Nnadi CU, Malhotra AK. Individualizing antipsychotic drug therapy in schizophrenia: the promise of pharmacogenetics. *Current psychiatry reports* 2007 Aug;9(4):313-318.
25. Kurzthaler I, Fleischhacker WW. The clinical implications of weight gain in schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2001;62 Suppl 7:32-37.

26. Hugenholtz GW, Heerdink ER, Meijer WE, Stolker JJ, Egberts AC, Nolen WA. Reasons for switching between antipsychotics in daily clinical practice. *Pharmacopsychiatry* 2005 May;38(3):122-124.
27. Weiden PJ, Mackell JA, McDonnell DD. Obesity as a risk factor for antipsychotic noncompliance. *Schizophr Res* 2004 Jan 1;66(1):51-57.
28. Muller DJ, Kennedy JL. Genetics of antipsychotic treatment emergent weight gain in schizophrenia. *Pharmacogenomics* 2006 Sep;7(6):863-887.
29. Moeller H, Laux G, Diester A. *Duale Reihe Psychiatrie und Psychotherapie*. Thieme 2009.
30. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of general psychiatry* 2003 Dec;60(12):1187-1192.
31. Girard SL, Xiong L, Dion PA, Rouleau GA. Where are the missing pieces of the schizophrenia genetics puzzle? *Current opinion in genetics & development* 2011 Jun;21(3):310-316.
32. Wellcome Trust Case Control C, Craddock N, Hurles ME, et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2010 Apr 1;464(7289):713-720.
33. Schwab SG, Wildenauer DB. Genetics of psychiatric disorders in the GWAS era: an update on schizophrenia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 2013 Sep 27.
34. Jia P, Sun J, Guo AY, Zhao Z. SZGR: a comprehensive schizophrenia gene resource. *Molecular psychiatry* 2010 May;15(5):453-462.
35. Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, et al. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nature genetics* 2013 Oct;45(10):1150-1159.
36. Seeman P, Lee T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 1975 Jun 20;188(4194):1217-1219.
37. Breier A, Su TP, Saunders R, et al. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997 Mar 18;94(6):2569-2574.
38. Muller N. Inflammation and the glutamate system in schizophrenia: implications for therapeutic targets and drug development. *Expert opinion on therapeutic targets* 2008 Dec;12(12):1497-1507.
39. Alex KD, Pehek EA. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacology & therapeutics* 2007 Feb;113(2):296-320.
40. Rapoport JL, Giedd JN, Gogtay N. Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Molecular psychiatry* 2012 Dec;17(12):1228-1238.
41. Leucht S, Cipriani A, Spinelli L, et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet* 2013 Jun 26.
42. Meltzer HY, Huang M. In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. *Progress in brain research* 2008;172:177-197.
43. Melkersson K, Dahl ML. Adverse metabolic effects associated with atypical antipsychotics: literature review and clinical implications. *Drugs* 2004;64(7):701-723.
44. Simon V, van Winkel R, De Hert M. Are weight gain and metabolic side effects of atypical antipsychotics dose dependent? A literature review. *J Clin Psychiatry* 2009 Jul;70(7):1041-1050.
45. Correll CU, Lencz T, Malhotra AK. Antipsychotic drugs and obesity. *Trends in molecular medicine* 2011 Feb;17(2):97-107.
46. Mauri MC, Steinhilber CP, Marino R, et al. Clinical outcome and olanzapine plasma levels in acute schizophrenia. *Eur Psychiatry* 2005 Jan;20(1):55-60.
47. Perry PJ, Lund BC, Sanger T, Beasley C. Olanzapine plasma concentrations and clinical response: acute phase results of the North American Olanzapine Trial. *Journal of clinical psychopharmacology* 2001 Feb;21(1):14-20.
48. Skogh E, Reis M, Dahl ML, Lundmark J, Bengtsson F. Therapeutic drug monitoring data on olanzapine and its N-demethyl metabolite in the naturalistic clinical setting. *Ther Drug Monit* 2002 Aug;24(4):518-526.
49. Rao ML, Hiemke C, Grasmader K, Baumann P, AGNP TDMAD. [Olanzapine: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2001 Nov;69(11):510-517.
50. Kassahun K, Mattiuz E, Franklin R, Gillespie T. Olanzapine 10-N-glucuronide. A tertiary N-glucuronide unique to humans. *Drug Metab Dispos* 1998 Sep;26(9):848-855.
51. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. *Clin Pharmacokinet* 1999 Sep;37(3):177-193.
52. Ring BJ, Catlow J, Lindsay TJ, et al. Identification of the human cytochromes P450 responsible for the in vitro formation of the major oxidative metabolites of the antipsychotic

- agent olanzapine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1996 Feb;276(2):658-666.
53. Patel MX, Bowskill S, Couchman L, et al. Plasma olanzapine in relation to prescribed dose and other factors: data from a therapeutic drug monitoring service, 1999-2009. *Journal of clinical psychopharmacology* 2011 Aug;31(4):411-417.
54. Czerwensky F, Leucht S, Steimer W. The CYP1A2*1D and *1F polymorphisms have a significant impact on olanzapine serum concentrations. *Ther Drug Monit* 2014 Aug 1.
55. Zhou SF, Yang LP, Zhou ZW, Liu YH, Chan E. Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2. *Aaps J* 2009 Sep;11(3):481-494.
56. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annual review of medicine* 2006;57:119-137.
57. Gesteira A, Barros F, Martin A, et al. Pharmacogenetic studies on the antipsychotic treatment. Current status and perspectives. *Actas espanolas de psiquiatria* 2010 Sep-Oct;38(5):301-316.
58. Gunes A, Dahl ML. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2008 May;9(5):625-637.
59. Sachse C, Bhambra U, Smith G, et al. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2003 Jan;55(1):68-76.
60. Dobrinas M, Cornuz J, Oneda B, Kohler Serra M, Puhl M, Eap CB. Impact of smoking, smoking cessation, and genetic polymorphisms on CYP1A2 activity and inducibility. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2011 Jul;90(1):117-125.
61. Ghotbi R, Christensen M, Roh HK, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E, Bertilsson L. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol* 2007 Jun;63(6):537-546.
62. Gunes A, Ozbey G, Vural EH, et al. Influence of genetic polymorphisms, smoking, gender and age on CYP1A2 activity in a Turkish population. *Pharmacogenomics* 2009 May;10(5):769-778.
63. Pavanello S, Pulliero A, Lupi S, Gregorio P, Clonfero E. Influence of the genetic polymorphism in the 5'-noncoding region of the CYP1A2 gene on CYP1A2 phenotype and urinary mutagenicity in smokers. *Mutat Res* 2005 Nov 10;587(1-2):59-66.
64. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C-->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1999 Apr;47(4):445-449.
65. Ghotbi R, Mannheimer B, Aklillu E, et al. Carriers of the UGT1A4 142T>G gene variant are predisposed to reduced olanzapine exposure--an impact similar to male gender or smoking in schizophrenic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010 May;66(5):465-474.
66. Kootstra-Ros JE, Smallegoor W, van der Weide J. The cytochrome P450 CYP1A2 genetic polymorphisms *1F and *1D do not affect clozapine clearance in a group of schizophrenic patients. *Ann Clin Biochem* 2005 May;42(Pt 3):216-219.
67. Laika B, Leucht S, Heres S, Schneider H, Steimer W. Pharmacogenetics and olanzapine treatment: CYP1A2*1F and serotonergic polymorphisms influence therapeutic outcome. *Pharmacogenomics J* 2010 Feb;10(1):20-29.
68. Nozawa M, Ohnuma T, Matsubara Y, et al. The relationship between the response of clinical symptoms and plasma olanzapine concentration, based on pharmacogenetics: Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP). *Ther Drug Monit* 2008 Feb;30(1):35-40.
69. Skogh E, Sjodin I, Josefsson M, Dahl ML. High correlation between serum and cerebrospinal fluid olanzapine concentrations in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder medicating with oral olanzapine as the only antipsychotic drug. *Journal of clinical psychopharmacology* 2011 Feb;31(1):4-9.
70. Scott RR, Gomes LG, Huang N, Van Vliet G, Miller WL. Apparent manifesting heterozygosity in P450 oxidoreductase deficiency and its effect on coexisting 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2007 Jun;92(6):2318-2322.
71. Dobrinas M, Cornuz J, Pedrido L, Eap CB. Influence of cytochrome P450 oxidoreductase genetic polymorphisms on CYP1A2 activity and inducibility by smoking. *Pharmacogenetics and genomics* 2012 Feb;22(2):143-151.
72. Hubbard PA, Shen AL, Paschke R, Kasper CB, Kim JJ. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Structural basis for hydride and electron transfer. *The Journal of biological chemistry* 2001 Aug 3;276(31):29163-29170.

73. Henderson CJ, Otto DM, Carrie D, et al. Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase. *The Journal of biological chemistry* 2003 Apr 11;278(15):13480-13486.
74. Agrawal V, Huang N, Miller WL. Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19. *Pharmacogenetics and genomics* 2008 Jul;18(7):569-576.
75. Gomes AM, Winter S, Klein K, et al. Pharmacogenomics of human liver cytochrome P450 oxidoreductase: multifactorial analysis and impact on microsomal drug oxidation. *Pharmacogenomics* 2009 Apr;10(4):579-599.
76. Oneda B, Crettol S, Jaquenoud Sirot E, Bochud M, Ansermet N, Eap CB. The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test. *Pharmacogenetics and genomics* 2009 Nov;19(11):877-883.
77. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999 Oct 15;286(5439):487-491.
78. Zhou J, Argikar UA, Remmel RP. Functional analysis of UGT1A4(P24T) and UGT1A4(L48V) variant enzymes. *Pharmacogenomics* 2011 Dec;12(12):1671-1679.
79. Soderberg MM, Dahl ML. Pharmacogenetics of olanzapine metabolism. *Pharmacogenomics* 2013 Aug;14(11):1319-1336.
80. Mao M, Skogh E, Scordo MG, Dahl ML. Interindividual variation in olanzapine concentration influenced by UGT1A4 L48V polymorphism in serum and upstream FMO polymorphisms in cerebrospinal fluid. *Journal of clinical psychopharmacology* 2012 Apr;32(2):287-289.
81. Cao Q, Martinez M, Zhang J, et al. Suggestive evidence for a schizophrenia susceptibility locus on chromosome 6q and a confirmation in an independent series of pedigrees. *Genomics* 1997 Jul 1;43(1):1-8.
82. Garcia-Martin E, Ayuso P, Martinez C, Blanca M, Agundez JA. Histamine pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2009 May;10(5):867-883.
83. Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJ. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nature reviews Drug discovery* 2005 Feb;4(2):107-120.
84. Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, et al. High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 2000 Dec 14;408(6814):860-864.
85. Esbenshade TA, Browman KE, Bitner RS, Strakhova M, Cowart MD, Brioni JD. The histamine H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *British journal of pharmacology* 2008 Jul;154(6):1166-1181.
86. Wei Z, Wang L, Zhang M, et al. A pharmacogenetic study of risperidone on histamine H3 receptor gene (HRH3) in Chinese Han schizophrenia patients. *Journal of psychopharmacology* 2012 Jun;26(6):813-818.
87. Ferrada C, Ferre S, Casado V, et al. Interactions between histamine H3 and dopamine D2 receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology* 2008 Aug;55(2):190-197.
88. Arrang JM. Histamine and schizophrenia. *International review of neurobiology* 2007;78:247-287.
89. Arrang JM. [The histamine H3 receptor: a new target for the treatment of arousal and cognitive disorders]. *Annales pharmaceutiques francaises* 2007 Jul;65(4):275-284.
90. Ito C. Histamine H3-receptor inverse agonists as novel antipsychotics. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 2009 Jun;9(2):132-136.
91. Tiligada E, Kyriakidis K, Chazot PL, Passani MB. Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS neuroscience & therapeutics* 2011 Dec;17(6):620-628.
92. Vohora D, Bhowmik M. Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia, and drug abuse. *Frontiers in systems neuroscience* 2012;6:72.
93. Hough LB. Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Molecular pharmacology* 2001 Mar;59(3):415-419.
94. Humbert-Claude M, Davenas E, Gbahou F, Vincent L, Arrang JM. Involvement of histamine receptors in the atypical antipsychotic profile of clozapine: a reassessment in vitro and in vivo. *Psychopharmacology* 2012 Mar;220(1):225-241.
95. Donohoe G, Morris DW, Corvin A. The psychosis susceptibility gene ZNF804A: associations, functions, and phenotypes. *Schizophrenia bulletin* 2010 Sep;36(5):904-909.
96. O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, et al. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nature genetics* 2008 Sep;40(9):1053-1055.
97. Gireggi MJ, LoTurco JJ, Maher BJ. ZNF804a regulates expression of the schizophrenia-associated genes PRSS16, COMT, PDE4B, and DRD2. *PloS one* 2012;7(2):e32404.

98. Hess JL, Glatt SJ. How might ZNF804A variants influence risk for schizophrenia and bipolar disorder? A literature review, synthesis, and bioinformatic analysis. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 2014 Jan;165(1):28-40.
99. Riley B, Thiselton D, Maher BS, et al. Replication of association between schizophrenia and ZNF804A in the Irish Case-Control Study of Schizophrenia sample. *Molecular psychiatry* 2010 Jan;15(1):29-37.
100. Steinberg S, Mors O, Borglum AD, et al. Expanding the range of ZNF804A variants conferring risk of psychosis. *Molecular psychiatry* 2011 Jan;16(1):59-66.
101. Zhang R, Lu SM, Qiu C, et al. Population-based and family-based association studies of ZNF804A locus and schizophrenia. *Molecular psychiatry* 2011 Apr;16(4):360-361.
102. Williams HJ, Norton N, Dwyer S, et al. Fine mapping of ZNF804A and genome-wide significant evidence for its involvement in schizophrenia and bipolar disorder. *Molecular psychiatry* 2011 Apr;16(4):429-441.
103. Mossner R, Schuhmacher A, Wagner M, et al. The schizophrenia risk gene ZNF804A influences the antipsychotic response of positive schizophrenia symptoms. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 2012 Apr;262(3):193-197.
104. Zhang J, Wu X, Diao F, et al. Association analysis of ZNF804A (zinc finger protein 804A) rs1344706 with therapeutic response to atypical antipsychotics in first-episode Chinese patients with schizophrenia. *Comprehensive psychiatry* 2012 Oct;53(7):1044-1048.
105. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2004 Jan;75(1):13-33.
106. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987 Nov;84(21):7735-7738.
107. Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F. P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reproductive toxicology* 2006 Oct;22(3):400-410.
108. Moons T, de Roo M, Claes S, Dom G. Relationship between P-glycoprotein and second-generation antipsychotics. *Pharmacogenomics* 2011 Aug;12(8):1193-1211.
109. Loeillet C, Weale M, Deutsch S, et al. Promoter polymorphisms and allelic imbalance in ABCB1 expression. *Pharmacogenetics and genomics* 2007 Nov;17(11):951-959.
110. Shou W, Wang D, Zhang K, et al. Gene-wide characterization of common quantitative trait loci for ABCB1 mRNA expression in normal liver tissues in the Chinese population. *PloS one* 2012;7(9):e46295.
111. Czerwensky F, Leucht S, Steimer W. MC4R rs489693: a clinical risk factor for second generation antipsychotic-related weight gain? *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 2013 Aug 7:1-7.
112. Newcomer JW. Metabolic considerations in the use of antipsychotic medications: a review of recent evidence. *J Clin Psychiatry* 2007;68 Suppl 1:20-27.
113. Foley DL, Morley KI. Systematic review of early cardiometabolic outcomes of the first treated episode of psychosis. *Archives of general psychiatry* 2011 Jun;68(6):609-616.
114. Bushe CJ, Slooff CJ, Haddad PM, Karagianis JL. Weight change from 3-year observational data: findings from the worldwide schizophrenia outpatient health outcomes database. *J Clin Psychiatry* 2012 Jun;73(6):e749-755.
115. Coccurello R, Moles A. Potential mechanisms of atypical antipsychotic-induced metabolic derangement: clues for understanding obesity and novel drug design. *Pharmacology & therapeutics* 2010 Sep;127(3):210-251.
116. Reynolds GP, Kirk SL. Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment--pharmacological mechanisms. *Pharmacology & therapeutics* 2010 Jan;125(1):169-179.
117. Pi-Sunyer FX, Laferrere B. Metabolic abnormalities and the role of leptin in human obesity. *J Clin Endocrinol Metabolics* 1999;84(1):3-7.
118. Sentissi O, Epelbaum J, Olie JP, Poirier MF. Leptin and ghrelin levels in patients with schizophrenia during different antipsychotics treatment: a review. *Schizophrenia bulletin* 2008 Nov;34(6):1189-1199.
119. Lett TA, Wallace TJ, Chowdhury NI, Tiwari AK, Kennedy JL, Muller DJ. Pharmacogenetics of antipsychotic-induced weight gain: review and clinical implications. *Molecular psychiatry* 2012 Mar;17(3):242-266.

120. Balt SL, Galloway GP, Baggott MJ, Schwartz Z, Mendelson J. Mechanisms and genetics of antipsychotic-associated weight gain. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2011 Jul;90(1):179-183.
121. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 Dec 9;402(6762):656-660.
122. Williams KW, Scott MM, Elmquist JK. Modulation of the central melanocortin system by leptin, insulin, and serotonin: co-ordinated actions in a dispersed neuronal network. *European journal of pharmacology* 2011 Jun 11;660(1):2-12.
123. Xu Y, Jones JE, Kohno D, et al. 5-HT2CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron* 2008 Nov 26;60(4):582-589.
124. He M, Deng C, Huang XF. The role of hypothalamic H1 receptor antagonism in antipsychotic-induced weight gain. *CNS drugs* 2013 Jun;27(6):423-434.
125. Konturek PC, Konturek JW, Czesnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sito E, Konturek SJ. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 2005 Dec;56 Suppl 6:5-25.
126. Esen-Danaci A, Sarandol A, Taneli F, Yurtsever F, Ozlen N. Effects of second generation antipsychotics on leptin and ghrelin. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2008 Aug 1;32(6):1434-1438.
127. Lee AK, Bishop JR. Pharmacogenetics of leptin in antipsychotic-associated weight gain and obesity-related complications. *Pharmacogenomics* 2011 Jul;12(7):999-1016.
128. Ferno J, Varela L, Skrede S, et al. Olanzapine-induced hyperphagia and weight gain associate with orexigenic hypothalamic neuropeptide signaling without concomitant AMPK phosphorylation. *PloS one* 2011;6(6):e20571.
129. Weston-Green K, Huang XF, Deng C. Alterations to melanocortinergic, GABAergic and cannabinoid neurotransmission associated with olanzapine-induced weight gain. *PloS one* 2012;7(3):e33548.
130. Ak M, Sezlev D, Sutçigil L, Akarsu S, Ozgen F, Yanik T. The investigation of leptin and hypothalamic neuropeptides role in first attack psychotic male patients: olanzapine monotherapy. *Psychoneuroendocrinology* 2013 Mar;38(3):341-347.
131. Kirk SL, Glazebrook J, Grayson B, Neill JC, Reynolds GP. Olanzapine-induced weight gain in the rat: role of 5-HT2C and histamine H1 receptors. *Psychopharmacology* 2009 Nov;207(1):119-125.
132. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *The New England journal of medicine* 2003 Mar 20;348(12):1085-1095.
133. Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *The Journal of biological chemistry* 2006 Dec 1;281(48):36569-36578.
134. McKinney MK, Cravatt BF. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual review of biochemistry* 2005;74:411-432.
135. Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 2002 Feb-Mar;66(2-3):201-210.
136. Ueda N, Puffenbarger RA, Yamamoto S, Deutsch DG. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chemistry and physics of lipids* 2000 Nov;108(1-2):107-121.
137. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001 Jul 31;98(16):9371-9376.
138. Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, et al. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nature medicine* 2003 Jan;9(1):76-81.
139. Cravatt BF, Saghatelyan A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH, Lichtman AH. Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004 Jul 20;101(29):10821-10826.
140. Sipe JC, Scott TM, Murray S, et al. Biomarkers of endocannabinoid system activation in severe obesity. *PloS one* 2010;5(1):e8792.
141. Engeli S. Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *Journal of neuroendocrinology* 2008 May;20 Suppl 1:110-115.
142. Chiang KP, Gerber AL, Sipe JC, Cravatt BF. Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the

- endocannabinoid system and problem drug use. *Human molecular genetics* 2004 Sep 15;13(18):2113-2119.
143. Monteleone P, Milano W, Petrella C, Canestrelli B, Maj M. Endocannabinoid Pro129Thr FAAH functional polymorphism but not 1359G/A CNR1 polymorphism is associated with antipsychotic-induced weight gain. *Journal of clinical psychopharmacology* 2010 Aug;30(4):441-445.
144. Sipe JC, Waalen J, Gerber A, Beutler E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *International journal of obesity* 2005 Jul;29(7):755-759.
145. Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet* 2005 Mar;6(3):221-234.
146. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 1994 Oct;8(10):1298-1308.
147. Horvath TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 2005 May;8(5):561-565.
148. Fan ZC, Tao YX. Functional characterization and pharmacological rescue of melanocortin-4 receptor mutations identified from obese patients. *J Cell Mol Med* 2009 Sep;13(9B):3268-3282.
149. Tao YX, Segaloff DL. Functional characterization of melanocortin-4 receptor mutations associated with childhood obesity. *Endocrinology* 2003 Oct;144(10):4544-4551.
150. Tao YX. Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2005 Jul 15;239(1-2):1-14.
151. Czerwensky F, Leucht S, Steimer W. Association of the Common MC4R rs17782313 Polymorphism With Antipsychotic-Related Weight Gain. *Journal of clinical psychopharmacology* 2013 Feb;33(1):74-79.
152. Loos RJ, Lindgren CM, Li S, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nature genetics* 2008 Jun;40(6):768-775.
153. Malhotra AK, Correll CU, Chowdhury NI, et al. Association between common variants near the melanocortin 4 receptor gene and severe antipsychotic drug-induced weight gain. *Archives of general psychiatry* 2012 Sep;69(9):904-912.
154. Sun R. Association of MC4R polymorphisms with SGA-induced weight gain. Master Thesis, TU München; 2014.
155. Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARgamma. Approaches for personalized nutrition. *Molecular nutrition & food research* 2011 Jan;55(1):136-149.
156. Gerken T, Girard CA, Tung YC, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007 Nov 30;318(5855):1469-1472.
157. Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC biochemistry* 2007;8:23.
158. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007 May 11;316(5826):889-894.
159. Gulati P, Yeo GS. The biology of FTO: from nucleic acid demethylase to amino acid sensor. *Diabetologia* 2013 Oct;56(10):2113-2121.
160. Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends in genetics : TIG* 2010 Jun;26(6):266-274.
161. Frayling TM, Ong K. Piecing together the FTO jigsaw. *Genome biology* 2011;12(2):104.
162. Loos RJ, Yeo GS. The bigger picture of FTO-the first GWAS-identified obesity gene. *Nature reviews Endocrinology* 2014 Jan;10(1):51-61.
163. Church C, Lee S, Bagg EA, et al. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS genetics* 2009 Aug;5(8):e1000599.
164. Perez-Iglesias R, Mata I, Amado JA, et al. Effect of FTO, SH2B1, LEP, and LEPR polymorphisms on weight gain associated with antipsychotic treatment. *Journal of clinical psychopharmacology* 2010 Dec;30(6):661-666.
165. Reynolds GP, Yevtushenko OO, Gordon S, Arranz B, San L, Cooper SJ. The obesity risk gene FTO influences body mass in chronic schizophrenia but not initial antipsychotic drug-induced weight gain in first-episode patients. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 2013 Jul;16(6):1421-1425.

166. Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology* 1988 Nov;34(5):605-613.
167. Ujike H, Takaki M, Nakata K, et al. CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Molecular psychiatry* 2002;7(5):515-518.
168. Halikas JA, Goodwin DW, Guze SB. Marijuana use and psychiatric illness. *Archives of general psychiatry* 1972 Aug;27(2):162-165.
169. Johns A. Psychiatric effects of cannabis. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 2001 Feb;178:116-122.
170. Treffert DA. Marijuana use in schizophrenia: a clear hazard. *The American journal of psychiatry* 1978 Oct;135(10):1213-1215.
171. Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annual review of pharmacology and toxicology* 1998;38:179-200.
172. Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J, Group RI-NAS. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2006 Feb 15;295(7):761-775.
173. Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF, Group RI-DS. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* 2006 Nov 11;368(9548):1660-1672.
174. Benzinou M, Chevre JC, Ward KJ, et al. Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations. *Human molecular genetics* 2008 Jul 1;17(13):1916-1921.
175. Hamdani N, Tabeze JP, Ramoz N, et al. The CNR1 gene as a pharmacogenetic factor for antipsychotics rather than a susceptibility gene for schizophrenia. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2008 Jan;18(1):34-40.
176. Domschke K, Dannlowski U, Ohrmann P, et al. Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2008 Oct;18(10):751-759.
177. Mitjans M, Gasto C, Catalan R, Fananas L, Arias B. Genetic variability in the endocannabinoid system and 12-week clinical response to citalopram treatment: the role of the CNR1, CNR2 and FAAH genes. *Journal of psychopharmacology* 2012 Oct;26(10):1391-1398.
178. Mitjans M, Serretti A, Fabbri C, et al. Screening genetic variability at the CNR1 gene in both major depression etiology and clinical response to citalopram treatment. *Psychopharmacology* 2013 Jun;227(3):509-519.
179. Monteleone P, Bifulco M, Maina G, et al. Investigation of CNR1 and FAAH endocannabinoid gene polymorphisms in bipolar disorder and major depression. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2010 May;61(5):400-404.
180. de Luis DA, Aller R, Gonzalez Sagrado M, Conde R, Izaola O, de la Fuente B. Genetic variation in the cannabinoid receptor gene (CNR1) (G1359A polymorphism) and their influence on anthropometric parameters and metabolic parameters under a high monounsaturated vs. high polyunsaturated fat hypocaloric diets. *The Journal of nutritional biochemistry* 2013 Aug;24(8):1431-1435.
181. Frost M, Nielsen TL, Wraae K, et al. Polymorphisms in the endocannabinoid receptor 1 in relation to fat mass distribution. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2010 Sep;163(3):407-412.
182. Gazzero P, Caruso MG, Notarnicola M, et al. Association between cannabinoid type-1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population. *International journal of obesity* 2007 Jun;31(6):908-912.
183. Peeters A, Beckers S, Mertens I, Van Hul W, Van Gaal L. The G1422A variant of the cannabinoid receptor gene (CNR1) is associated with abdominal adiposity in obese men. *Endocrine* 2007 Apr;31(2):138-141.
184. Hill SJ. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacological reviews* 1990 Mar;42(1):45-83.
185. Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, et al. H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2003 Mar;28(3):519-526.
186. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004 Apr 1;428(6982):569-574.

187. Kim SF, Huang AS, Snowman AM, Teuscher C, Snyder SH. From the Cover: Antipsychotic drug-induced weight gain mediated by histamine H1 receptor-linked activation of hypothalamic AMP-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 Feb 27;104(9):3456-3459.
188. Veselinovic T, Himmerich H. [Antihistaminergic antipsychotics cause weight gain]. *Der Nervenarzt* 2010 Mar;81(3):329-334.
189. Vehof J, Risselada AJ, Al Hadithy AF, et al. Association of genetic variants of the histamine H1 and muscarinic M3 receptors with BMI and HbA1c values in patients on antipsychotic medication. *Psychopharmacology* 2011 Jul;216(2):257-265.
190. Nahon JL, Presse F, Bittencourt JC, Sawchenko PE, Vale W. The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. *Endocrinology* 1989 Oct;125(4):2056-2065.
191. Mul JD, Yi CX, van den Berg SA, et al. Pmch expression during early development is critical for normal energy homeostasis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2010 Mar;298(3):E477-488.
192. Pissios P, Bradley RL, Maratos-Flier E. Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. *Endocrine reviews* 2006 Oct;27(6):606-620.
193. Kokkotou E, Jeon JY, Wang X, et al. Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2005 Jul;289(1):R117-124.
194. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 1996 Mar 21;380(6571):243-247.
195. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 1998 Dec 17;396(6712):670-674.
196. Macneil DJ. The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. *Frontiers in endocrinology* 2013;4:49.
197. Chagnon YC, Bureau A, Gendron D, et al. Possible association of the pro-melanin-concentrating hormone gene with a greater body mass index as a side effect of the antipsychotic olanzapine. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 2007 Dec 5;144B(8):1063-1069.
198. Chagnon YC, Merette C, Bouchard RH, Emond C, Roy MA, Maziade M. A genome wide linkage study of obesity as secondary effect of antipsychotics in multigenerational families of eastern Quebec affected by psychoses. *Molecular psychiatry* 2004 Dec;9(12):1067-1074.
199. Isse N, Ogawa Y, Tamura N, et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *The Journal of biological chemistry* 1995 Nov 17;270(46):27728-27733.
200. Baumann H, Morella KK, White DW, et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996 Aug 6;93(16):8374-8378.
201. Thompson DB, Ravussin E, Bennett PH, Bogardus C. Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. *Human molecular genetics* 1997 May;6(5):675-679.
202. Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annual review of psychology* 2000;51:255-277.
203. Jin H, Meyer JM, Mudaliar S, Jeste DV. Impact of atypical antipsychotic therapy on leptin, ghrelin, and adiponectin. *Schizophr Res* 2008 Mar;100(1-3):70-85.
204. Hoffstedt J, Eriksson P, Mottagui-Tabar S, Arner P. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2002 Jul;34(7):355-359.
205. Templeman LA, Reynolds GP, Arranz B, San L. Polymorphisms of the 5-HT2C receptor and leptin genes are associated with antipsychotic drug-induced weight gain in Caucasian subjects with a first-episode psychosis. *Pharmacogenetics and genomics* 2005 Apr;15(4):195-200.
206. Calarge CA, Ellingrod VL, Zimmerman B, Acion L, Sivitz WI, Schlechte JA. Leptin gene -2548G/A variants predict risperidone-associated weight gain in children and adolescents. *Psychiatric genetics* 2009 Dec;19(6):320-327.
207. Stratigopoulos G, LeDuc CA, Matsuoka N, et al. Functional consequences of the human leptin receptor (LEPR) Q223R transversion. *Obesity* 2009 Jan;17(1):126-135.

208. Ellingrod VL, Bishop JR, Moline J, Lin YC, Miller DD. Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and increases in body mass index (BMI) from olanzapine treatment in persons with schizophrenia. *Psychopharmacology bulletin* 2007;40(1):57-62.
209. Gregoor JG, van der Weide J, Mulder H, et al. Polymorphisms of the LEP- and LEPR gene and obesity in patients using antipsychotic medication. *Journal of clinical psychopharmacology* 2009 Feb;29(1):21-25.
210. Kaufman MJ, Hartig PR, Hoffman BJ. Serotonin 5-HT2C receptor stimulates cyclic GMP formation in choroid plexus. *Journal of neurochemistry* 1995 Jan;64(1):199-205.
211. Reynolds GP, Templeman LA, Zhang ZJ. The role of 5-HT2C receptor polymorphisms in the pharmacogenetics of antipsychotic drug treatment. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2005 Jul;29(6):1021-1028.
212. Zhang Q, Zhu Y, Zhou W, Gao L, Yuan L, Han X. Serotonin receptor 2C and insulin secretion. *PloS one* 2013;8(1):e54250.
213. Sicard MN, Zai CC, Tiwari AK, et al. Polymorphisms of the HTR2C gene and antipsychotic-induced weight gain: an update and meta-analysis. *Pharmacogenomics* 2010 Nov;11(11):1561-1571.
214. Naber D LM, Krausz M, Haasen C, Pickar D. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenic patients. Bremen: Unimed-Science 2002;1. Auflage:25.
215. Wallace TJ, Zai CC, Brandl EJ, Muller DJ. Role of 5-HT(2C) receptor gene variants in antipsychotic-induced weight gain. *Pharmacogenomics and personalized medicine* 2011;4:83-93.
216. Laika B. TU München; 2009.
217. Ding B, Kull B, Liu Z, et al. Human neuropeptide Y signal peptide gain-of-function polymorphism is associated with increased body mass index: possible mode of function. *Regulatory peptides* 2005 Apr 15;127(1-3):45-53.
218. Tiwari AK, Brandl EJ, Weber C, et al. Association of a functional polymorphism in neuropeptide Y with antipsychotic-induced weight gain in schizophrenia patients. *Journal of clinical psychopharmacology* 2013 Feb;33(1):11-17.
219. Zhang L, Bijker MS, Herzog H. The neuropeptide Y system: pathophysiological and therapeutic implications in obesity and cancer. *Pharmacology & therapeutics* 2011 Jul;131(1):91-113.
220. Guesdon B, Denis RG, Richard D. Additive effects of olanzapine and melanin-concentrating hormone agonism on energy balance. *Behavioural brain research* 2010 Feb 11;207(1):14-20.
221. Kirk SL, Cahir M, Reynolds GP. Clozapine, but not haloperidol, increases neuropeptide Y neuronal expression in the rat hypothalamus. *Journal of psychopharmacology* 2006 Jul;20(4):577-579.
222. Zhou Z, Zhu G, Hariri AR, et al. Genetic variation in human NPY expression affects stress response and emotion. *Nature* 2008 Apr 24;452(7190):997-1001.
223. Olza J, Gil-Campos M, Leis R, et al. Influence of variants in the NPY gene on obesity and metabolic syndrome features in Spanish children. *Peptides* 2013 Jul;45:22-27.
224. Mutschler J, Abbruzzese E, Wiedemann K, et al. Functional polymorphism in the neuropeptide Y gene promoter (rs16147) is associated with serum leptin levels and waist-hip ratio in women. *Annals of nutrition & metabolism* 2013;62(4):271-276.
225. Swarbrick MM, Waldenmaier B, Pennacchio LA, et al. Lack of support for the association between GAD2 polymorphisms and severe human obesity. *PLoS biology* 2005 Sep;3(9):e315.
226. Pan ZZ. Transcriptional control of Gad2. *Transcription* 2012 Mar-Apr;3(2):68-72.
227. Boutin P, Froguel P. GAD2: a polygenic contribution to genetic susceptibility for common obesity? *Pathologie-biologie* 2005 Jul;53(6):305-307.
228. Hager J, Dina C, Francke S, et al. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nature genetics* 1998 Nov;20(3):304-308.
229. Price RA, Li WD, Bernstein A, et al. A locus affecting obesity in human chromosome region 10p12. *Diabetologia* 2001 Mar;44(3):363-366.
230. Saar K, Geller F, Ruschendorf F, et al. Genome scan for childhood and adolescent obesity in German families. *Pediatrics* 2003 Feb;111(2):321-327.
231. Boutin P, Dina C, Vasseur F, et al. GAD2 on chromosome 10p12 is a candidate gene for human obesity. *PLoS biology* 2003 Dec;1(3):E68.
232. Tiwari HK, Bouchard L, Perusse L, Allison DB. Is GAD2 on chromosome 10p12 a potential candidate gene for morbid obesity? *Nutrition reviews* 2005 Sep;63(9):315-319.
233. Zerssen D. Paranoid-Depressivitäts-Skala: Collegium Internationale Psychiatrae Scalarum (CIPS): Internationale Skalen der Psychiatrie; 1996.
234. Health NIoM. Clinical Global Impression: Collegium Internationale

- Psychiatriae Scalarum: Internationale Skalen für Psychiatrie; 1996.
235. Guy W. Dosage Record and Treatment Emergent Symptoms Scale (DOTES): Rockville, MD, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration, NIMH Psychopharmacology research Branch, Division of Extramural Research Programs: ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology-Revised DHEW 1976.
236. Agid O, Siu CO, Potkin SG, et al. Meta-regression analysis of placebo response in antipsychotic trials, 1970-2010. *The American journal of psychiatry* 2013 Nov 1;170(11):1335-1344.
237. Witte B, Harrer G, Kaptan T, Podzuweit H, Schmidt U. [Treatment of depressive symptoms with a high concentration hypericum preparation. A multicenter placebo-controlled double-blind study]. *Fortschritte der Medizin* 1995 Oct 10;113(28):404-408.
238. Nguyen DL, Staeker J, Laika B, Steimer W. TaqMan real-time PCR quantification strategy of CYP2D6 gene copy number for the LightCycler 2.0. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2009 May;403(1-2):207-211.
239. Bender R, Lange S, Ziegler A. Multiples Testen. *Deutsche Medizinische Wochenzeitschrift* 2007(132):e26-e29.
240. Bender R, Lange S, Ziegler A. Varianzanalyse. *Deutsche Medizinische Wochenzeitschrift* 2007(132):e57-e60.
241. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *American journal of epidemiology* 2009 Feb 15;169(4):505-514.
242. Gaunt TR, Rodriguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC bioinformatics* 2007;8:428.
243. van Pelt-Verkuil E, A. vB, JP H. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification: Springer Sciene and Media; 2008.
244. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBCutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic acids research* 2003 Jul 1;31(13):3688-3691.
245. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic acids research* 1989 Apr 11;17(7):2503-2516.
246. Bui M, Liu Z. Simple allele-discriminating PCR for cost-effective and rapid genotyping and mapping. *Plant Methods* 2009;5:1.
247. Wangkumhang P, Chaichoompu K, Ngamphiw C, et al. WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC genomics* 2007;8:275.
248. Rücker G, Neugebauer M, Willems G. Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2008.
249. Roche Applied Science, Technical Note No. LC20/2004. Developing Multicolor Applications for the LightCycler 20 System 2004.
250. Roche Applied Science, LightCycler Probe Design Software 2.0 Manual Version 1.0. 2004.
251. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research* 2001 Jan 1;29(1):308-311.
252. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research* 2007 Jul;35(Web Server issue):W71-74.
253. [cited; Available from: <http://www.genelink.com/tools/gl-downloads.asp>
254. Ye J, McGinnis S, Madden TL. BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic acids research* 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W6-9.
255. Bernard P, Reiser A, Pritham G. Mutation detection by fluorescent hybridization probe melting curves. In: Rapid cycle real-time PCR. Meurer S, Wittwer C, Nakagawara KI (Eds.). Springer Verlag; 2001.
256. Roche Applied Science, Technical Note No. LC19/2004. Color Compensation 2004.
257. Popp J. TU München; 2006.
258. Chida M, Yokoi T, Fukui T, Kinoshita M, Yokota J, Kamataki T. Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron 1 of human CYP1A2 in the Japanese population. *Jpn J Cancer Res* 1999 Sep;90(9):899-902.
259. Perera V, Gross AS, Polasek TM, et al. Considering CYP1A2 phenotype and genotype for optimizing the dose of olanzapine in the management of schizophrenia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013 Sep;9(9):1115-1137.
260. J. S. TU München. 2014.

261. Drieling T, Biedermann NC, Scharer LO, Strobl N, Langosch JM. [Psychotropic drug-induced change of weight: a review]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2007 Feb;75(2):65-80.
262. Haslemo T, Olsen K, Lunde H, Molden E. Valproic Acid significantly lowers serum concentrations of olanzapine-an interaction effect comparable with smoking. *Ther Drug Monit* 2012 Oct;34(5):512-517.
263. Flockhart D. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. 2014 [cited; Available from: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table/#>]
264. Fellows L, Ahmad F, Castle DJ, Dusci LJ, Bulsara MK, Ilett KF. Investigation of target plasma concentration-effect relationships for olanzapine in schizophrenia. *Ther Drug Monit* 2003 Dec;25(6):682-689.
265. Perry PJ, Argo TR, Carnahan RM, et al. The association of weight gain and olanzapine plasma concentrations. *Journal of clinical psychopharmacology* 2005 Jun;25(3):250-254.
266. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, et al. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011 Sep;44(6):195-235.
267. Boulton DW, DeVane CL, Liston HL, Markowitz JS. In vitro P-glycoprotein affinity for atypical and conventional antipsychotics. *Life sciences* 2002 May 31;71(2):163-169.
268. Greiner C. P-Glycoprotein – Bedeutung für den Arzneistoffmetabolismus. *Neurotransmitter* 2010(09):40-42.
269. Iwaki K, Sakaeda T, Kakimoto M, et al. Haloperidol is an inhibitor but not substrate for MDR1/P-glycoprotein. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2006 Dec;58(12):1617-1622.
270. O'Brien FE, Dinan TG, Griffin BT, Cryan JF. Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood-brain barrier: clinical significance of in vitro and in vivo findings. *British journal of pharmacology* 2012 Jan;165(2):289-312.
271. Gebhardt S, Haberhausen M, Heinzel-Gutenbrunner M, et al. Antipsychotic-induced body weight gain: predictors and a systematic categorization of the long-term weight course. *J Psychiatr Res* 2009 Mar;43(6):620-626.
272. Kinon BJ, Kaiser CJ, Ahmed S, Rotelli MD, Kollack-Walker S. Association between early and rapid weight gain and change in weight over one year of olanzapine therapy in patients with schizophrenia and related disorders. *Journal of clinical psychopharmacology* 2005 Jun;25(3):255-258.
273. Lee SY, Park MH, Patkar AA, Pae CU. A retrospective comparison of BMI changes and the potential risk factors among schizophrenic inpatients treated with aripiprazole, olanzapine, quetiapine or risperidone. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2011 Mar 30;35(2):490-496.
274. Strassnig M, Miewald J, Keshavan M, Ganguli R. Weight gain in newly diagnosed first-episode psychosis patients and healthy comparisons: one-year analysis. *Schizophr Res* 2007 Jul;93(1-3):90-98.
275. McIntyre RS, Jerrell JM. Metabolic and cardiovascular adverse events associated with antipsychotic treatment in children and adolescents. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 2008 Oct;162(10):929-935.
276. Ruano G, Goethe JW, Caley C, et al. Physiogenomic comparison of weight profiles of olanzapine- and risperidone-treated patients. *Molecular psychiatry* 2007 May;12(5):474-482.
277. Lubrano-Berthelier C, Cavazos M, Le Stunff C, et al. The human MC4R promoter: characterization and role in obesity. *Diabetes* 2003 Dec;52(12):2996-3000.
278. Wankhade UD, Good DJ. Melanocortin 4 receptor is a transcriptional target of nescient helix-loop-helix-2. *Mol Cell Endocrinol* 2011 Jul 20;341(1-2):39-47.
279. Zhang JP, Malhotra AK. Pharmacogenetics of antipsychotics: recent progress and methodological issues. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013 Feb;9(2):183-191.
280. Bushe CJ, Slooff CJ, Haddad PM, Karagianis JL. Weight change by baseline BMI from three-year observational data: findings from the Worldwide Schizophrenia Outpatient Health Outcomes Database. *Journal of psychopharmacology* 2013 Apr;27(4):358-365.
281. Linnet K, Olesen OV. Free and glucuronidated olanzapine serum concentrations in psychiatric patients: influence of carbamazepine comedication. *Ther Drug Monit* 2002 Aug;24(4):512-517.
282. Soderberg MM, Haslemo T, Molden E, Dahl ML. Influence of CYP1A1/CYP1A2 and AHR polymorphisms on systemic olanzapine exposure. *Pharmacogenetics and genomics* 2013 May;23(5):279-285.
283. Haslemo T, Loryan I, Ueda N, et al. UGT1A4*3 encodes significantly increased glucuronidation of olanzapine in patients on maintenance treatment and in recombinant systems. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2012 Aug;92(2):221-227.

284. Haslemo T, Refsum H, Molden E. The effect of ethinylestradiol-containing contraceptives on the serum concentration of olanzapine and N-desmethyl olanzapine. *Br J Clin Pharmacol* 2011 Apr;71(4):611-615.
285. Leucht S, Kane JM, Etschel E, Kissling W, Hamann J, Engel RR. Linking the PANSS, BPRS, and CGI: clinical implications. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2006 Oct;31(10):2318-2325.
286. Lopez LV, Kane JM. Plasma levels of second-generation antipsychotics and clinical response in acute psychosis: a review of the literature. *Schizophr Res* 2013 Jul;147(2-3):368-374.
287. Citrome L, Stauffer VL, Chen L, et al. Olanzapine plasma concentrations after treatment with 10, 20, and 40 mg/d in patients with schizophrenia: an analysis of correlations with efficacy, weight gain, and prolactin concentration. *Journal of clinical psychopharmacology* 2009 Jun;29(3):278-283.
288. Kinon BJ, Volavka J, Stauffer V, et al. Standard and higher dose of olanzapine in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder: a randomized, double-blind, fixed-dose study. *Journal of clinical psychopharmacology* 2008 Aug;28(4):392-400.
289. Hermes E, Nasrallah H, Davis V, et al. The association between weight change and symptom reduction in the CATIE schizophrenia trial. *Schizophr Res* 2011 May;128(1-3):166-170.
290. Lambert M, Schimmelmann BG, Naber D, et al. Early- and delayed antipsychotic response and prediction of outcome in 528 severely impaired patients with schizophrenia treated with amisulpride. *Pharmacopsychiatry* 2009 Nov;42(6):277-283.
291. Naber D, Kollack-Walker S, Chen J, et al. Predicting a 'combined treatment outcome' in chronic schizophrenia: the role of demographics, symptomatology, functioning and subjective well-being. *Pharmacopsychiatry* 2013 May;46(3):114-119.
292. Buoli M, Caldiroli A, Panza G, Altamura AC. Prominent clinical dimension, duration of illness and treatment response in schizophrenia: a naturalistic study. *Psychiatry investigation* 2012 Dec;9(4):354-360.
293. Malla A, Payne J. First-episode psychosis: psychopathology, quality of life, and functional outcome. *Schizophrenia bulletin* 2005 Jul;31(3):650-671.
294. Brenner HD, Dencker SJ, Goldstein MJ, et al. Defining treatment refractoriness in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 1990;16(4):551-561.
295. Seifert J, Ossege S, Emrich HM, Schneider U, Stuhrmann M. No association of CNR1 gene variations with susceptibility to schizophrenia. *Neuroscience letters* 2007 Oct 9;426(1):29-33.
296. Hillard CJ, Weinlander KM, Stuhr KL. Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. *Neuroscience* 2012 Mar 1;204:207-229.
297. Chakrabarti B, Kent L, Suckling J, Bullmore E, Baron-Cohen S. Variations in the human cannabinoid receptor (CNR1) gene modulate striatal responses to happy faces. *The European journal of neuroscience* 2006 Apr;23(7):1944-1948.
298. Appl H, Holzammer T, Dove S, Haen E, Strasser A, Seifert R. Interactions of recombinant human histamine H(1)R, H(2)R, H(3)R, and H(4)R receptors with 34 antidepressants and antipsychotics. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2012 Feb;385(2):145-170.
299. Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA, Martin ER. No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *American journal of human genetics* 2007 Mar;80(3):531-538.
300. Randle RA, Raguz S, Higgins CF, Yague E. Role of the highly structured 5'-end region of MDR1 mRNA in P-glycoprotein expression. *The Biochemical journal* 2007 Sep 15;406(3):445-455.
301. Ascher-Svanum H, Stensland M, Zhao Z, Kinon BJ. Acute weight gain, gender, and therapeutic response to antipsychotics in the treatment of patients with schizophrenia. *BMC Psychiatry* 2005;5:3.
302. Bai YM, Lin CC, Chen JY, Lin CY, Su TP, Chou P. Association of initial antipsychotic response to clozapine and long-term weight gain. *The American journal of psychiatry* 2006 Jul;163(7):1276-1279.
303. Alvarez-Jimenez M, Gonzalez-Blanch C, Crespo-Facorro B, et al. Antipsychotic-induced weight gain in chronic and first-episode psychotic disorders: a systematic critical reappraisal. *CNS drugs* 2008;22(7):547-562.
304. Saddichha S, Ameen S, Akhtar S. Predictors of antipsychotic-induced weight gain in first-episode psychosis: conclusions from a randomized, double-blind, controlled prospective study of olanzapine, risperidone, and haloperidol. *Journal of clinical psychopharmacology* 2008 Feb;28(1):27-31.
305. Wetterling T, Mussigbrodt HE. Weight gain: side effect of atypical neuroleptics? *Journal of clinical psychopharmacology* 1999 Aug;19(4):316-321.

306. Ghate SR, Porucznik CA, Said Q, Hashibe M, Joy E, Brixner DI. Association between second-generation antipsychotics and changes in body mass index in adolescents. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine* 2013 Mar;52(3):336-343.
307. Allison DB, Loebel AD, Lombardo I, Romano SJ, Siu CO. Understanding the relationship between baseline BMI and subsequent weight change in antipsychotic trials: effect modification or regression to the mean? *Psychiatry research* 2009 Dec 30;170(2-3):172-176.
308. Monteleone P, Tortorella A, Martiadis V, Di Filippo C, Canestrelli B, Maj M. The cDNA 385C to A missense polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is associated with overweight/obesity but not with binge eating disorder in overweight/obese women. *Psychoneuroendocrinology* 2008 May;33(4):546-550.
309. Durand E, Lecoeur C, Delplanque J, et al. Evaluating the association of FAAH common gene variation with childhood, adult severe obesity and type 2 diabetes in the French population. *Obesity facts* 2008;1(6):305-309.
310. Xi B, Chandak GR, Shen Y, Wang Q, Zhou D. Association between Common Polymorphism near the MC4R Gene and Obesity Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one* 2012;7(9):e45731.
311. Horstmann A, Kovacs P, Kabisch S, et al. Common genetic variation near MC4R has a sex-specific impact on human brain structure and eating behavior. *PloS one* 2013;8(9):e74362.
312. Chowdhury NI, Tiwari AK, Souza RP, et al. Genetic association study between antipsychotic-induced weight gain and the melanocortin-4 receptor gene. *Pharmacogenomics J* 2013 Jun;13(3):272-279.
313. Beckers S, Zegers D, de Freitas F, Mertens IL, Van Gaal LF, Van Hul W. Association study of MC4R with complex obesity and replication of the rs17782313 association signal. *Mol Genet Metab* 2011 May;103(1):71-75.
314. Schleinitz D, Carmienke S, Bottcher Y, et al. Role of genetic variation in the cannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) in the pathophysiology of human obesity. *Pharmacogenomics* 2010 May;11(5):693-702.
315. Park YM, Choi JE, Kang SG, et al. Cannabinoid type 1 receptor gene polymorphisms are not associated with olanzapine-induced weight gain. *Human psychopharmacology* 2011 Jun-Jul;26(4-5):332-337.
316. Tiwari AK, Zai CC, Likhodi O, et al. A common polymorphism in the cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene is associated with antipsychotic-induced weight gain in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2010 May;35(6):1315-1324.
317. Basile VS, Masellis M, McIntyre RS, Meltzer HY, Lieberman JA, Kennedy JL. Genetic dissection of atypical antipsychotic-induced weight gain: novel preliminary data on the pharmacogenetic puzzle. *J Clin Psychiatry* 2001;62 Suppl 23:45-66.
318. Godlewska BR, Olajossy-Hilkesberger L, Olajossy M, Limon J, Landowski J. Polymorphisms of the histamine receptor (H1HR) gene are not associated with olanzapine-induced weight gain. *Journal of clinical psychopharmacology* 2013 Jun;33(3):436-437.
319. Hong CJ, Lin CH, Yu YW, Chang SC, Wang SY, Tsai SJ. Genetic variant of the histamine-1 receptor (glu349asp) and body weight change during clozapine treatment. *Psychiatric genetics* 2002 Sep;12(3):169-171.
320. Kao AC, Muller DJ. Genetics of antipsychotic-induced weight gain: update and current perspectives. *Pharmacogenomics* 2013 Dec;14(16):2067-2083.
321. Panariello F, Polzinelli G, Borlido C, Monda M, De Luca V. The role of leptin in antipsychotic-induced weight gain: genetic and non-genetic factors. *Journal of obesity* 2012;2012:572848.
322. Gregoor JG, Mulder H, Cohen D, et al. Combined HTR2C-LEP genotype as a determinant of obesity in patients using antipsychotic medication. *Journal of clinical psychopharmacology* 2010 Dec;30(6):702-705.
323. Yevtushenko OO, Cooper SJ, O'Neill R, Doherty JK, Woodside JV, Reynolds GP. Influence of 5-HT2C receptor and leptin gene polymorphisms, smoking and drug treatment on metabolic disturbances in patients with schizophrenia. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 2008 Jun;192(6):424-428.
324. Gregoor JG, van der Weide J, Loovers HM, van Megen HJ, Egberts TC, Heerdink ER. Polymorphisms of the LEP, LEPR and HTR2C gene: obesity and BMI change in patients using antipsychotic medication in a naturalistic setting. *Pharmacogenomics* 2011 Jun;12(6):919-923.
325. Brandl EJ, Frydrychowicz C, Tiwari AK, et al. Association study of polymorphisms in leptin and leptin receptor genes with antipsychotic-induced body weight gain. *Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry* 2012 Aug 7;38(2):134-141.

326. Risselada AJ, Mulder H, Heerdink ER, Egberts TC. Pharmacogenetic testing to predict antipsychotic-induced weight gain: a systematic review. *Pharmacogenomics* 2011 Aug;12(8):1213-1227.
327. Choquette AC, Lemieux S, Tremblay A, et al. GAD2 gene sequence variations are associated with eating behaviors and weight gain in women from the Quebec family study. *Physiology & behavior* 2009 Oct 19;98(4):505-510.
328. Boesgaard TW, Castella SI, Andersen G, et al. A -243A-->G polymorphism upstream of the gene encoding GAD65 associates with lower levels of body mass index and glycaemia in a population-based sample of 5857 middle-aged White subjects. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2007 Jul;24(7):702-706.
329. Yeung EH, Zhang C, Chen J, et al. Polymorphisms in the neuropeptide Y gene and the risk of obesity: findings from two prospective cohorts. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2011 Dec;96(12):E2055-2062.
330. Buckland PR, Hoogendoorn B, Guy CA, et al. A high proportion of polymorphisms in the promoters of brain expressed genes influences transcriptional activity. *Biochimica et biophysica acta* 2004 Nov 5;1690(3):238-249.
331. Sommer WH, Lidstrom J, Sun H, et al. Human NPY promoter variation rs16147:T>C as a moderator of prefrontal NPY gene expression and negative affect. *Human mutation* 2010 Aug;31(8):E1594-1608.
332. Millen BA, Campbell GM, Beasley CM. Weight changes over time in adults treated with the oral or depot formulations of olanzapine: a pooled analysis of 86 clinical trials. *Journal of psychopharmacology* 2011 May;25(5):639-645.
333. Novick D, Haro JM, Perrin E, Suarez D, Texeira JM. Tolerability of outpatient antipsychotic treatment: 36-month results from the European Schizophrenia Outpatient Health Outcomes (SOHO) study. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2009 Aug;19(8):542-550.
334. Ujike H, Nomura A, Morita Y, et al. Multiple genetic factors in olanzapine-induced weight gain in schizophrenia patients: a cohort study. *J Clin Psychiatry* 2008 Sep;69(9):1416-1422.
335. Qi Q, Chu AY, Kang JH, et al. Sugar-sweetened beverages and genetic risk of obesity. *The New England journal of medicine* 2012 Oct 11;367(15):1387-1396.
336. Drozda K, Muller DJ, Bishop JR. Pharmacogenomic testing for neuropsychiatric drugs: current status of drug labeling, guidelines for using genetic information, and test options. *Pharmacotherapy* 2014 Feb;34(2):166-184.
337. Hall-Flavin DK, Winner JG, Allen JD, et al. Utility of integrated pharmacogenomic testing to support the treatment of major depressive disorder in a psychiatric outpatient setting. *Pharmacogenetics and genomics* 2013 Oct;23(10):535-548.
338. Hall-Flavin DK, Winner JG, Allen JD, et al. Using a pharmacogenomic algorithm to guide the treatment of depression. *Translational psychiatry* 2012;2:e172.
339. Winner JG, Carhart JM, Altar CA, Allen JD, Dechairo BM. A prospective, randomized, double-blind study assessing the clinical impact of integrated pharmacogenomic testing for major depressive disorder. *Discovery medicine* 2013 Nov;16(89):219-227.

7. Anhang

Anhang A1: Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Geräte und Software

Übersicht über die verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Agarose PeqGold Universal	PeqLab – Biotechnologie GmbH, Erlangen
Aqua DeltaSelect Spüllösung (steril)	Delta Select GmbH, Dreieich
Bovine Serum Albumine (für PCR) 20 mg/ml	Roche, Mannheim
Bovine Serum Albumine (für enzymat. Verdau) 10mg/ml	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
DNA-Leiter Quantitas (50 bp - 2 kbp) und (25 bp - 500 bp)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PeqLab – Biotechnologie GmbH, Erlangen
dNTP-Mix	PeqLab – Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 1 %-ig (wässrige Lösung)	Merck KGaA, Darmstadt
FastStart High Fidelity PCR System (Polymerase, Reaction Buffer, MgCl ₂ ,DMSO)	Roche, Mannheim
Gel-Ladepuffer 6x Konzentrat, Typ1	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
GS Junior Titanium emPCR Kit	Roche, Mannheim
GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit	Roche, Mannheim
GS Junior Titanium Sequencing Kit	Roche, Mannheim
Hybridisierungssonden	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LightCycler-DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler-FastStart DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Metaphoragarose	Cambrex, Wiesbaden
MgCl ₂ (25mM)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mineralöl	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
NEB-Puffer 3 und 4 für Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden
Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
Taq DNA Polymerase	Qbiogene (Vertrieb: MP Biomedicals, Heidelberg)

TBE-Puffer 10x UltraPure™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TE-Puffer 10x	Fisher Scientific, Schwerte
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega GmbH, Mannheim

Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Circomix-Vortexer	Braun, Melsungen
Dynal Magnetic Particle Concentrator-E	Life Technologies, Darmstadt
GeneAmp PCR System 9700 PE	Applied Biosystems, Weiterstadt
GS Junior: 454 Sequencing	Roche, Mannheim
LightCycler 2.0 und 1.5	Roche, Mannheim
LightCycler-Karussellzentrifuge	Roche, Mannheim
Mupid-2 Mini Gel Migration Trough	Cosmo Bio Co, LTD, Offenbach
Photoprint OO-IP-010.SD	LTF Labortechnik, Wasserburg
SpeedCycler ²	Analytikjena, Jena
Rollenschüttler	GreinerLabortechnik, Frickenhausen
Rotary Mixer	Cenco Instrumenten, Chicago
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments GmbH, Neu-Isenburg
Thermomixer 5433	Eppendorf, Hamburg
Thermostat 5310	Eppendorf, Hamburg
Thermoblock UNITEK™-Hub 130	PeqLab, Erlangen
Ultra Turrax Tube Disperser	IKA, Staufen
Video Copy Processor P91	Mitsubishi Digital Elektronics, Ratingen
Waage 1702 MP 8	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg

Übersicht über die verwendete Software

Gerät	Hersteller
BLAST	National Center for Biotechnology Information
CubeX (LD-Calculator)	www.oege.org/software/cubex
HWE-Calculator	http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml
LightCycler® Software 3.5 und 4.05	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NEBCutter	New England Biolabs Inc.
Oligo Analyzer 1.2	Gene Link, Hawthorne, NY, USA
Primer 3 Plus Software	Whitehead Institute for Biomedical Research
GS Amplicon Variant Analyzer 2.7	Roche, Mannheim
GS Junior Sequencer 2.7	Roche, Mannheim
GS Run Browser 2.7	Roche, Mannheim
HapMap Database	hapmap.ncbi.nlm.nih.gov
NCBI Variation Database (dbSNP)	www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP
SNP500Cancer	http://snp500cancer.nci.nih.gov/cgfseq/pages/snp500.do
SPSS Statistics 21	IBM, Ehningen
WASP Tool (ALS PCR)	http://bioinfo.biotec.or.th/WASP

Anhang A2 Übersicht der verwendeten Primer bei Durchführung einer ALS-PCR

Gen	Polymorphismus	Bezeichnung	Sequenz	bp	Amplikon -größe	T _M [*]
MC4R⁺	rs17782313	ALS F-Wildtyp MC4R	TAAAGCAGGAGAGATTGTAT <u>CAT</u>	23	119bp	57.4
		ALS F-Mutante MC4R	TAAAGCAGGAGAGATTGTAT <u>CAC</u>	23		56.1
		ALS R-Primer MC4R	AAGCTACCTCAAT <u>CCCAGAT</u>	20		58.8
FTO	rs9939609	ALS Forward FTO	GCAAAT GGCAACACACACT	20	236bp	57.2
		ALS R-Wildtyp FTO	AGACTAT <u>CCAAGTGCATCAGT</u>	21		58.3
		ALS R-Mutante FTO	AGACTAT <u>CCAAGTGCATCAGA</u>	21		58.0
CNR1	rs1049353	ALS F-Wildtyp 1359 G/A	GAAAGCTGCATCAAGAGCA <u>AG</u>	21	200bp	58.3
		ALS F-Mutante 1359 G/A	GAAAGCTGCATCAAGAG <u>CAA</u>	21		57.0
		ALS R-Primer 1359 G/A	CACCTTTCAT <u>TGAGCATGGTA</u>	22		57.2
HRH1	rs346074	ALS FW rs346074	GAGCTATTAA <u>TCAAGATAGTACAGTAAGA</u>	28	231bp	58.7
		ALS FM rs346074	AGCTATTAA <u>TCAAGATAGTACAGTAAGG</u>	27		59.0
		ALS Reverse rs346074	ACATATGCAC <u>GGAGGGCAG</u>	18		59.5
HRH3	rs3787429	F W rs3787429	ATCTTCAT <u>GCCTCTCCACC</u>	21	113bp	62.1
		F M rs3787429	ATCTTCAT <u>GCCTCTCCACT</u>	21		62.0
		Reverse rs3787429	TTCACCCAC <u>CTCCAGCTC</u>	18		61.1
HRH3	rs3787430	ALS Forward rs3787430	AGGAGCCAGA <u>AGGGAGGTTTC</u>	20	242bp	62.7
		ALS Reverse W rs3787430	AAGAGGGG <u>CTCCAAGCAG</u>	18		63.2
		ALS Reverse M rs3787430	CAAGAGGGG <u>CTCCAAGCAA</u>	19		62.8
ZNF804A	rs1344706	ALS F ZNF804A	GCACATGAGTAG <u>TGAGGTT</u>	19	157bp	56.6
		ALS RW ZNF804A	ATAT <u>CCAAGAAGTTGATTCTGACA</u>	21		56.3
		ALS RM ZNF804A	T <u>CCAAGAAGTTGATTCTGACC</u>	24		55.7

* Die Schmelztemperatur der Primer wurde mittels Primer3Plus Tool²⁵² ermittelt, die Schmelztemperatur der Sonden mittels Oligo Analyzer 1.5²⁵³ und der nearest-neighbour Methode (T_M NN)

⁺ genau genommen befindet sich der rs17782313 Polymorphismus in einem rekombinanten Intervall zwischen der kodierenden Sequenz von PMAIP1 und MC4R

Die unterstrichene Base markiert die Lokalisation der Punktmutation innerhalb des jeweiligen Primers

Anhang A3 Übersicht über die verwendeten Primer zur Sequenzierung mittels GS Junior

Gen	Bezeichnung	Sequenz	bp*	Amplikon-größe [#]	T _M *
FTO	FTO-Forward MID23	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG TACTCTCGTG GGTGGTACGCTGCTATGGTT	20	421bp	60,0 59,8
	FTO-Reverse MID23	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG TACTCTCGTG TGCTCTCCACTCCATTCT	20		
	FTO-Forward MID24	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG TAGAGACGAG GGTGGTACGCTGCTATGGTT			
	FTO-Reverse MID24	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG TAGAGACGAG TGCTCTCCACTCCATTCT			
	FTO-Forward MID25	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG TCGTCGCTCG GGTGGTACGCTGCTATGGTT			
	FTO-Reverse MID25	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG TCGTCGCTCG TGCTCTCCACTCCATTCT			
	FTO-Forward MID26	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG ACATACGCGT GGTGGTACGCTGCTATGGTT			
	FTO-Reverse MID26	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG ACATACGCGT TGCTCTCCACTCCATTCT			
	FTO-Forward MID27	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG ACGCGAGTAT GGTGGTACGCTGCTATGGTT			
	FTO-Reverse MID27	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG ACGCGAGTAT TGCTCTCCACTCCATTCT			
LEP	LEP-Forward MID23	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG TACTCTCGTG AGAAGCGATGGATGCACAGT	20	441bp	60,1 60,8
	LEP-Reverse MID23	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG TACTCTCGTG CTTCTGCAACATCTCAGCA	20		
	LEP-Forward MID24	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG TAGAGACGAG AGAAGCGATGGATGCACAGT			
	LEP-Reverse MID24	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG TAGAGACGAG CTTCTGCAACATCTCAGCA			
	LEP-Forward MID25	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG TCGTCGCTCG AGAAGCGATGGATGCACAGT			
	LEP-Reverse MID25	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG TCGTCGCTCG CTTCTGCAACATCTCAGCA			
	LEP-Forward MID26	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG ACATACGCGT AGAAGCGATGGATGCACAGT			
	LEP-Reverse MID26	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG ACATACGCGT CTTCTGCAACATCTCAGCA			
	LEP-Forward MID27	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG ACGCGAGTAT AGAAGCGATGGATGCACAGT			
	LEP-Reverse MID27	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG ACGCGAGTAT CTTCTGCAACATCTCAGCA			
	LEP-Forward MID28	CGTATGCCCTCCCTCGGCCATCAG ACTACTATGT AGAAGCGATGGATGCACAGT			
	LEP-Reverse MID28	CTATGCCCTTGCCAGCCCCCTCAG ACTACTATGT CTTCTGCAACATCTCAGCA			

* Die Schmelztemperatur der Primer wurde mittels Primer3Plus Tool²⁵² ermittelt und bezieht sich wie die Basenlänge nur auf die Primer ohne MIDs und Adaptoren

Angegeben ist die Gesamtamplikongröße inklusive MIDs und Adaptoren

Anhang A4 Übersicht der verwendeten Primer und Soden

Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden zur Untersuchung von Polymorphismen im Zusammenhang mit der Pharmakokinetik von Olanzapin

Gen	Polymorphismus	Bezeichnung	Sequenz	bp	Amplikon -größe	T _M *
CYP1A2*1D	rs35694136	F-Primer CYP1A2*1D	GCCCCTCCAGTCTAAATCAA	22	398bp	60,5
		R-Primer CYP1A2*1D	AGGACAAGCCTTAAATTGGATG	22		59,5
		Sen CYP1A2*1D	LCRED705-TGATTGTGGCACAT <u>G</u> AACCCC-Phosphat	21		62,5
		Anc CYP1A2*1D	GAGGTCGAGGCTGCAGTGAGC-Fluorescein	21		68,2
CYP1A2*1D	rs35694136	CYP1A2*1D RFLP F	TGAGCCATGATTGTGGCATA	20	167bp	58,4
		CYP1A2*1D RFLP R	AGGAGTCTTAATATGGACCCAG	23		60,5
UGT1A4*3	rs2011425	F-Primer UGT1A4*3	TAAGGGCGAAGGAAACAAATG	20	365bp	57,9
		3 R-Primer UGT1A4*	TTGAGTGTAGCCCAGCGTAA	20		59,5
		Sen rs2011425	LCRED640-AGCATGCGGGAGGCC <u>T</u> GCG-Phosphat	20		71,0
		Anc rs2011425	GCCCCTGATGGCAGCCCCTGGC-Fluorescein	23		76,2
POR:	rs2302429	Forward Por	GCTCACAGCAGGCAGAGTG	19	380bp	60,9
		Reverse POR	AGCCTTGGTCTCGTACTCCA	20		59,9
		Sen rs2302429	TGAGGTTGGAT <u>G</u> CCAGGTGG-Fluorescein	21		67,9
		Anc rs2302429	LCRed610-TGGAAGAGGCCCTGGGTGAGTGG-Phosphat	23		71,7

* Die Schmelztemperatur der Primer wurde mittels Primer3Plus Tool²⁵² ermittelt, die Schmelztemperatur der Sonden mittels Oligo Analyzer 1,5²⁵³ und der nearest-neighbour Methode (T_M NN)

Die unterstrichene Base markiert die Lokalisation der Punktmutation innerhalb der Sensorsonde

Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden zur Untersuchung von Polymorphismen im Zusammenhang mit Response

Gen	Polymorphismus	Bezeichnung	Sequenz	bp	Amplikon -größe	T _M *
HRH3	rs3787429 rs3787430	F monoplex HRH3	ATCATCAGCAGCGTGTATGG	20	319bp	59,7
		R monoplex HRH3	ACAGGTATGGGTGGGTGA	19		61,1
		Sen rs3787429	LCRED640-CATGCGCTCTCCAG <u>C</u> GAGG-Phosphat	19		65,7
		Anc rs3787429	CTGGGTGAAGCTCTGGGACACCATC-Fluorescein	24		69,7
		Sen2 rs3787430	GGACGCCG <u>A</u> CGGCTTCCA-Fluorescein	18		67,3
		Anc2 rs3787430	LCRED705-CCCTCTTGAGTGAGCGCGGCCT	22		72,0
ZNF804A	rs1344706	Forward ZNF804A	CCTTGGTGGAAATGGAAGAG	20	202bp	59,5
		Reverse ZNF804A	GGATTGGGACGAGGAGAAA	19		60,0
		Sen rs1344706	CAAAA <u>A</u> CTATCAGAATCAACTTCTTGA-Fluorescein	28		57,5
		Anc rs1344706	LCRED640-TCTATCTGGAAAGTAATCAAAGGTTACAGG-Phosphat	31		62,7
ABCB1	rs2865690 rs28373093	Forward ABCB1	ATAGGACGTGAAGATAGACA <u>A</u> CTGG	25	446bp	60,0
		R ABCB1	TGAAAGGAATAGAGAAAGATGTAGGG	26		60,3
		Sen ABCB1	GCTCTTCTAC <u>A</u> CCCTTTAGGGTT-Fluorescein	24		63,2
		ANC ABCB1	LCRED640-GGCATACTCCTTCTGAGAATTCTCGTCT-Phosphat	30		65,7

* Die Schmelztemperatur der Primer wurde mittels Primer3Plus Tool²⁵² ermittelt, die Schmelztemperatur der Sonden mittels Oligo Analyzer 1,5²⁵³ und der nearest-neighbour Methode (T_M NN)

Die unterstrichene Base markiert die Lokalisation der Punktmutation innerhalb der Sensorsonde

Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden zur Untersuchung von Polymorphismen im Zusammenhang mit der Gewichtszunahme unter Antipsychotika

Gen	Polymorphismus	Bezeichnung	Sequenz	bp	Amplikon -größe	T _M *
FAAH	rs324420	FA Pro129Thr	GGAAGTGAACAAAGGGACCA	20	204bp	59,9
		RA Pro129Thr	AATGACCCAAAGATGCAGAGC	20		60,2
		Sen Pro 129Thr	GCTGTCTCAGGCC <u>CC</u> AAGGCAGLCRed640	22		71,5
		Anc Pro 129Thr	Fluorescein-CCTGCTCTATGGCGTCCCTGTGAGCCTC	28		75,0
MC4R*	rs17782313	Forward MC4R	TTGTGTGCCAGAGGAAACAG	20	320bp	59,9
		Reverse MC4R	ACCTCAATCCCAGATGCTAA	21		59,2
		Sen MC4R	GAGATTGTATCCC <u>G</u> ATGGAAATGACAAGAA-Fluorescein	30		63,6
		Anc MC4R	LCRed640-GCTTCAGGGGG AAGGTGACATTAAAGTTGG-P	30		69,7
MC4R*	rs489693	F rs489694	TTTCTCTACAGAACATGCCACA	22	277bp	59,9
		R rs489694	TCTGCTGAAACTGTGCTTGG	20		60,2
		Sen rs489693	LCRed705-CTGTTGTCAATTAGT <u>CCCG</u> TTGTT-Phosphat	25		59,7
		Anc rs489693	CCAGATTGGTCAATACAGGTATGTCTAA-Fluorescein	31		64,1
FTO	rs9939609	Forward FTO	GGTGGTACGCTGCTATGGTT	20	353bp	60,0
		Reverse FTO	TGCTCTCCC <u>ACTCC</u> ATTCT	20		59,8
		simple FTO	CTTGC <u>GACTGCTGTGAATX</u> [#] TTAGTGATGC-Phosphat	28		65,1
CNR1	rs1049353	Forward 1359 G/A	GCTCATTAAAGACGGTGTTC	21	313bp	59,8
		Reverse 1359 G/A	GAGGCATCAGGCTCACAGA	19		60,1
		Sen 1359 G/A	LCRed640- ATCAAGAGCAC <u>G</u> TCAGATTGCCAAGGT-Phosphat	29		67,2
		Anc 1359 G/A	CAGTGTTCACAGGGCCGCAGAAAGCT-Fluorescein	27		71,4
HRH1	rs346070	F kombi rs346070	GCCATACCTGGTAAGCAAAAA	21	339bp	59,1
		R kombi rs346070	CCAAAGAGAAAGCCC <u>ATATCA</u>	21		59,2
		Sen3 rs346070	GCTAAACCACAATATGTATAGCACATG-Fluorescein	27		60,2
		Anc3 rs346070	LCRed610-GTGCCTGTACAAGCTGATGTTTGATTTGTG-P	33		65,4
HRH1	rs346074 rs346075	F monoplex	CAAGCCCA <u>ATTTCC</u> ATTG	20	542bp	60,3
		rs346074(5)	CCTGTAATTGAAGGTCTTCTCA	23		59,6
		R monoplex	CAGTAAT <u>G</u> ATTAA <u>TGATGC</u> CTCTGGG-Fluorescein	30		63,7
		rs346074(5)	LCRed640-TGTCCATTAGCAGAGGGCAGCCA-Phosphat	23		68,8
		Sen1,2 rs346074	AGCTTCTCAACCC <u>ATGTCTTAC</u> ATTTTC-Fluorescein	29		62,6
		Anc1,2 rs346074	LCRed705-TGGG ATGAAGGGTTAACGGCCTC-Phosphat	23		67,6
		Sen2,2 rs346075				
		Sen2,2 rs346075				

PMCH	rs7973796	F,2 PMCH R PMCH PMCH rs7973796	GTCTAAGAGCAGAGTTGGAATGAC CACTTCACCTAGCGTTACCA CCAGTXT ¹ AATGATA <u>AC</u> GTATGTTGAAGTATTTC	24 22 31	384bp	58,6 59,3 57,9
LEP	rs7799039	F-Primer LEP R1-Primer LEP Sen rs7799039 Anc s7799039	AGAACGATGGATGCACAGT CTTCCTGCAACATCTCAGCA CGACAGGGTTGC <u>ACT</u> GATCC-Fluorescein LCRed640-CCGC <u>CT</u> CAGTCTCCCTAAGTGC-Phosphat	20 20 20 22	371bp	60,8 60,1 63,1 68,7
LEPR	rs1137101	F-Primer LEPR R-Primer LEPR Sen rs1137101 Anc rs1137101	ACCTCTGGTTCCCCAAAAAG GCCACTCTTAATACCCCCAGT LCRed-705-TAATTTCC <u>AGT</u> CACCTCTAATGTCAG-Phosphat CCTTATGTGTTGAAAATCACATCTGGTGG-Fluorescein	20 21 27 30	338bp	60,3 59,4 60,0 63,1
NPY	rs16147	F-Primer NPY R-Primer NPY Sen NPY Anc NPY	CCCTGCTTCCCTTCTTC GCAGCTTGGGACCCTCTA LCRed640-CAACAGGACTACCA <u>ACCC</u> ACTG-Phosphat AGCAGCCCAGACGATTCTGTCTCCT-Fluorescein	20 19 22 26	295bp	59,8 60,3 63,7 69,4
NPY	rs16147	NPY Verdau F-Primer NPY Verdau R-Primer	CCCAGACGATTCTGTCTCC AGTTGCCTCACTCCAACAGC	20 20	151bp	59,7 60,5
GAD	rs2236418	F-Primer GAD R-Primer GAD Sen GAD Anc GAD	CCTTCCCTCAAATGCTCTG AGAAAACGTGCGTGTCTGTG LCRed705-CGGTCTTTAA <u>AG</u> GCTCCCC-Phosphat GGCTCCGAGGACCCTAGGTAGT-Fluorescein	20 20 21 23	169bp	59,8 59,9 61,4 70,5

* Die Schmelztemperatur der Primer wurde mittels Primer3Plus Tool²⁵² ermittelt, die Schmelztemperatur der Sonden mittels Oligo Analyzer 1,5²⁵³ und der nearest-neighbour Methode (T_m NN)

⁺ genau genommen befindet sich der rs17782313 Polymorphismus in einem rekombinanten Intervall zwischen der kodierenden Sequenz von PMAIP1 und MC4R

[#] markiert ist die modifizierte Thymidin Base im Rahmen des SimpleProbe Designs

Die unterstrichene Base markiert die Lokalisation der Punktmutation innerhalb des Sensorsonde

Anhang A5 PDS Skala

Prüfungsnummer	Testcode	Patient/Proband laufende Nr.	Prüftag Nr.	Nr. der Messung	Prüfungsstelle	Prüfer-Nr.
Code des Patienten/Probanden	Datum Tag	Monat	Jahr	Tagesszeit Stunde	Medikation	
1 2 3 4 5 6 7	8 9 10 11 12 13 14	15 16 17 18 19 20 21	22 23 24 25 26 27 28	29 30 31 32 33 34 35	36 37 38 39 40 41 42	
1 2 3 4 5 6 7	8 9 10 11 12 13 14	15 16 17 18 19 20 21	22 23 24 25 26 27 28	29 30 31 32 33 34 35	36 37 38 39 40 41 42	
1 2 3 4 5 6 7	8 9 10 11 12 13 14	15 16 17 18 19 20 21	22 23 24 25 26 27 28	29 30 31 32 33 34 35	36 37 38 39 40 41 42	
1 2 3 4 5 6 7	8 9 10 11 12 13 14	15 16 17 18 19 20 21	22 23 24 25 26 27 28	29 30 31 32 33 34 35	36 37 38 39 40 41 42	

Initialen des Probanden (Patienten)

Unterschrift des Untersuchers

CIPS

PD-S

Anleitung
Lesen Sie bitte die folgenden Sätze. Entscheiden Sie bei jeder Feststellung, ob sie für Sie zutrifft oder nicht. Machen Sie ein Kreuz in eines der vier Kästchen rechts entsprechend der Stärke Ihrer Zustimmung bzw. Ablehnung. Füllen Sie den Bogen sorgfältig und möglichst schnell selbstständig aus. Lassen Sie keinen Satz aus!

Bitte hier anfangen (1.–13.)	trifft ausgesprochen zu	trifft überwiegend zu	trifft etwas zu	trifft gar nicht zu	hier fortsetzen (14.–26.)	trifft ausgesprochen zu	trifft überwiegend zu	trifft etwas zu	trifft gar nicht zu
1. Ich habe die Anweisung verstanden	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	14. Ich fühle mich niedergeschlagen und schwermüdig	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Ich bin bereit, jede Frage so wahrheitsgetreu wie möglich zu beantworten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	15. Man will mich geistig vernichten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Ich habe Freude an den verschiedenen Spielen und Freizeitbeschäftigungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	16. Ich kann das, was ich lese, nicht mehr so gut verstehen wie früher	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Kritik verletzt mich stärker als früher	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	17. Am liebsten würde ich mir das Leben nehmen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. In letzter Zeit bin ich sehr angstlich und schreckhaft	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	18. Ich war schon mal so aufgereggt, daß ich nur schwer einschlafen konnte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Ich war hin und wieder erkältet	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	19. An manchen Tagen kann ich mich schlechter konzentrieren als gewöhnlich	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Ich werde gegen meinen Willen von anderen Menschen beeinflußt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	20. Ich werde dauernd von anderen beobachtet oder kontrolliert	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Ich weine leicht	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	21. Morgens fühle ich mich besonders schlecht	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Ich hatte schon mal das Gefühl, den Weltuntergang zu erleben	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	22. Ich leide unter fremdartigen Veränderungen am oder im Körper	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Gelegentlich fühle ich mich müde	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	23. Es gibt Leute, die meine Gedanken und Ideen zu stehlen versuchen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Ich werde von anderen zu Unrecht für krank gehalten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	24. Ich habe zu anderen Menschen keine innere Beziehung mehr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. Manchmal kommen mir Körperbewegungen wie von selbst	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	25. Zu allen meinen Handlungen und Gedanken werden Bemerkungen gemacht	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. Ich habe Angst, den Verstand zu verlieren	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	26. Ich habe manchmal im Leben Angst gehabt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Anhang A6 CGI Skala

Prüfungsnummer	Testcode	Patient/Proband laufende Nr.	Prüftag Nr.	Nr. der Messung	Prüf- stelle	Prüfer-Nr.
1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6	10 11 12 13 14 15	16 17 18 19 20 21	22 23 24 25 26 27	28 29 30 31 32 33	34 35 36 37 38 39
Code des Patienten / Probanden		Datum	Tageszeit			Initiatien des Probanden (Patienten)
		Tag	Monat	Jahr	Stunde	Medikation
		16 17 18	21 22 23	28 29 30	20 21 22	15 16 17 18
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15						
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31						

CIPS

Collegium
Internationale
Psychiatriæ Scalarum

CGI
Clinical Global Impressions

Arbeitung

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

1. Schweregrad der Krankheit

1. Schweregrad der Krankheit
Ziehen Sie Ihren gesamten Erfahrungsschatz an dieser Art von Kranken in Betracht, und geben Sie an, wie hoch Sie den jetzigen Grad der seelischen Erkrankung des Patienten einschätzen.

2. Gesamtheurteilung der Zustandsänderung

2. Gesamtbewertung der Zustandsänderung
Bitte vergleichen Sie den jetzigen Zustand des Patienten mit dem zu Beginn der Studie, und geben Sie an, inwieweit sich das Krankheitsbild des Patienten geändert hat. Beurteilen Sie dabei die Zustandsänderung insgesamt, also nicht nur das Ergebnis der Medikamentenbehandlung. Diese Frage muß bei Erstbewertungen ausgestrichen werden, indem man die Rubrik 1 („...nicht beurteilbar“) ankreuzt.

Nicht beurteilbar	1	Nicht beurteilbar	1
Patient ist überhaupt nicht krank	2	Zustand ist sehr viel besser	2
Patient ist ein Grenzfall psychiatrischer Erkrankung	3	Zustand ist viel besser	3
Patient ist nur leicht krank	4	Zustand ist nur wenig besser	4
Patient ist mäßig krank	5	Zustand ist unverändert	5
Patient ist deutlich krank	6	Zustand ist etwas schlechter	6
Patient ist schwer krank	7	Zustand ist viel schlechter	7
Patient gehört zu den extrem schwer kranken	8	Zustand ist sehr viel schlechter	8

3. Wirksamkeits-Index

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

Equipment

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

Es ist anzukreuzen.

THERAPEUTISCHE WIRKSAMKEIT (gewünschte Arznei-wirkungen)	THERAPIE-RISIKEN (unerwünschte Arznei-wirkungen)			
	Keine Beeinträchti- gungen den Pa- tienten nicht wesentlich	Beeinträchti- gungen den Pa- tienten wesentlich	Beeinträchti- gungen den Patienten wesentlich	Überwieg- tigt die the- rapeutische Wirksamkeit
Sehr gut – Umfassende Besserung. Vollständige oder fast vollständige Remission aller Symptome	2 1	2 2	2 3	2 4
Meßig – Deutliche Besserung. Teilweise Remission der Symptome	3 1	3 2	3 3	3 4
Gering – Leichte Besserung. Eine weitere Behandlung des Patienten ist dennoch nötig	4 1	4 2	4 3	4 4
Unverän- dert oder schlechter	5 1	5 2	5 3	5 4
Nicht beurtei- lbar	1 1			

Anhang A7 DOTES Skala

Pharmakogenetische Untersuchung bei psychiatrischen Patienten - DOTES

Betr.NN-4Wo.....

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

		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> gar nicht sehr wenig mäßig deutlich	ggf. Zusammenhang zu welchem Medikament?	ggf. Absetzgrund?
a. Verhalten	Toxischer Verwirrtheitszustand	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Erregung/ Agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Depressive Stimmung	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Gesteigerte mot. Aktivität	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Verminderte mot. Aktivität	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Schlaflosigkeit	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Schlaftrigkeit, Somnolenz, Dösigkeit	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
b. Neurologisch	Rigor	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Tremor	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Dystonische Symptome	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Akathisie	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Spätdyskinesien	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
c. Vegetativ	Mundtrockenheit	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Behinderte Nasenatmung	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Verschwommenes Sehen	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Obstipation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Vermehrter Speichelfluß	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Schwitzen	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Übelkeit/ Erbrechen	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Diarrhoe	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
d. Kardiovaskulär	Hypotonie	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Ohnmacht/ Schwindelgefühl	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Tachykardie	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Hypertonie	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Abnormes EKG	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
e. Andere	Dermatologische Symptome	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Gewichtszunahme	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Gewichtsverlust	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Anorexie/ Appetitverlust	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	Kopfschmerzen	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
f. Sonstige	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		

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

gar nicht
sehr wenig
mäßig
deutlich

nicht beurteilbar

Anhang A8 Häufigkeiten der untersuchten Polymorphismen

Polymorphismus	Vergleich der Genotyphäufigkeit			HWE	
Population „Gewicht“					
rs324420	Population	CC 234 66,9 %	CA 110 31,4 %	AA 6 1,7 %	$\chi^2=2,96$ $p=0,085$
	HapMap-CEU	62,8 %	32,7 %	4,4 %	
rs17782313	Population	TT 203 58 %	TC 126 36 %	CC 21 6 %	$\chi^2=0,06$ $p=0,806$
	HapMap-CEU	49,2 %	45,8 %	5,1 %	
rs489693	Population	AA 37 10,7 %	AC 133 38,3 %	CC 176 50,7 %	$\chi^2=2,4$ $p=0,121$
	HapMap-CEU	16,7 %	48,3 %	35 %	
rs9939609	Population	AA 64 18,3 %	AT 167 47,7 %	TT 119 34 %	$\chi^2=0,16$ $p=0,687$
	HapMap-CEU	11,9 %	66,1 %	22 %	
rs1049353	Population	GG 195 55,7 %	GA 131 37,4 %	AA 24 6,9 %	$\chi^2=0,1$ $p=0,755$
	HapMap-CEU	45 %	40 %	5 %	
rs346070	Population	CC 249 71,1 %	CT 88 25,1 %	TT 13 3,7 %	$\chi^2=2,12$ $p=0,145$
	HapMap-CEU	63,7 %	31 %	5,3 %	
rs346075	Population	AA 51	AC 146	CC 153	$\chi^2=2,73$

		14,6 % 41,7 % 43,7 %	p=0,099
	HapMap-CEU	8,3 % 48,3 % 43,3 %	
rs7973796	Population	AA AG GG 65 182 103 18,6 % 52 % 29,4 %	X ² =0,96 p=0,327
	HapMap-CEU	27,7 % 44,6 % 27,7 %	
rs7799039	Population	GG GA AA 102 177 71 29,1 % 50,6 % 20,3 %	X ² =0,13 p=0,716
	HapMap-CEU	20,5 % 53,6 % 25,9 %	
rs1137101	Population	AA AG GG 104 168 78 29,7 % 48 % 22,3 %	X ² =0,42 p=0,517
	HapMap-CEU	24,8 % 47,8 % 27,4 %	
rs2236418	Population	AA AG GG 223 109 18 63,7 % 31,1 % 5,1 %	X ² =0,94 p=0,332
	HapMap-CEU	70,8 % 25,7 % 3,5 %	
rs16147	Population	AA AG GG 88 176 86 25,1 % 50,3 % 24,6 %	X ² =0,01 p=0,914
	HapMap-CEU	28,3 % 41,6 % 30,1 %	
Population „Response“			
rs1049353	Population	GG GA AA 194 124 22 57,1 % 36,5 % 6,5 %	X ² =0,13 p=0,716
	HapMap-CEU	55 % 40 % 5 %	
rs3787429*	Population	CC CT TT 116 167 58 34 % 49 % 17 %	X ² =0,03 p=0,873

	HapMap-CEU	32,7 %	51,3 %	15,9 %	
rs3787430*	Population	CC 243	CT 90	TT 8	$\chi^2=0,01$ p=0,922
		71,3 %	26,4 %	2,3 %	
rs1344706*	HapMap-CEU	71,7 %	27,4 %	0,9 %	$\chi^2=0,06$ p=0,809
	Population	TT 132	TG 162	GG 47	
		38,7 %	47,5 %	13,8 %	
	HapMap-CEU	34,2 %	52,3 %	13,5 %	
rs2865690/ rs28373093	Population	35	114	46	$\chi^2=5,83$ p=0,016
		17,9 %	58,5 %	23,6 %	
	EGP-CEPH-Panel	13,6 %	54,5 %	34,8 %	
Population Pharmakokinetik					
CYP1A2*1F (rs762551)	Population	CC 8	CA 36	AA 54	$\chi^2=0,33$ p=0,568
		8,2 %	36,7 %	55,1 %	
CYP1A2*1D (rs35694136)	HapMap-CEU	8,8 %	38,1 %	53,1 %	
	Population	TT 89	T/delT 6	delT/delT 3	$\chi^2=21,41$ P<0,001
		90,8 %	6,1 %	3,1 %	
	Koostra-Ros et al. ⁶⁶	89,7 %	8,6 %	1,7 %	
rs2302429 (POR)	Population	GG 64	GA 30	AA 4	$\chi^2=0,04$ p=0,838
		65,3 %	30,6 %	4,1 %	
rs2011425 (UGT1A4)	EGP_CEP-Panel	77,3 %	18,2 %	4,5 %	
	Population	TT 83	TG 15	GG 0	
		84,7 %	15,3 %	0 %	
	Ghotbi et al. ⁶⁵	71,1 %	29,9 %	0 %	

Anhang A9 Ergänzung der Übersichtstabellen mit der Patientenanzahl der Population „Response“

	Population „Response“			F2			F3		
rs1049353	GG	GA	AA	GG	GA	AA	GG	GA	AA
PDS-P 4 Wochen	156	102	19	90	58	11	50	35	3
Δ PDS-P	153	102	19	89	58	11	48	35	3
%Δ PDS-P	144	88	17	88	56	10	41	23	2
rs3787429	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
PDS-P 4 Wochen	99	136	43	55	81	24	35	38	15
Δ PDS-P	98	134	43	54	81	24	35	36	15
%Δ PDS-P	86	127	37	52	80	23	25	30	11
rs3787430	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
PDS-P 4 Wochen	199	72	7	114	43	3	68	20	88
Δ PDS-P	197	71	7	113	43	3	67	19	86
%Δ PDS-P	178	66	6	109	43	3	52	14	66
rs1344707	TT	TG	GG	TT	TG	GG	TT	TG	GG
PDS-P 4 Wochen	107	130	41	61	74	25	37	42	9
Δ PDS-P	106	128	41	60	74	25	37	40	9
%Δ PDS-P	96	117	37	58	73	24	29	30	7

Anhang A10 Gegenüberstellung Ergebnisse rs17782313 und rs489693 Dissertation und Publikation

ANOVA rs17782313	Publikation				Dissertation			
Population "Gewicht"	TT N=198	TC N=126	CC N=21	P Value	TT N=203	TC N=126	CC N=21	P
Baseline weight (kg)	75.6(73.3-77.9)	72.6(69.7-75.5)	80.1(72.7-87.4)	0.086	75.5(73.2-77.8)	72.6(69.7-75.5)	80.1(72.7-87.4)	0.091
Weight after 4 weeks (kg)	76.7(74.5-78.9)	74.4(71.5-77.2)	82.6(75.4-89.9)	0.073	76.6(74.3-78.8)	74.4(71.5-77.2)	82.6(75.4-89.9)	0.078
Absolute weight gain	1.1(0.7-1.5)	1.8(1.2-2.4)	2.6(1.4-3.7)	0.041	1.1(0.6-1.5)	1.8(1.2-2.4)	2.6(1.4-3.7)	0.029
Relative weight gain after 4	1.7(1.1-2.4)	2.9(2.0-3.8)	3.5(1.7-5.4)	0.045	1.6(1.0-2.4)	2.9(2.0-3.8)	3.5(1.7-5.4)	0.025
Baseline BMI	25.9(25.2-26.7)	24.5(23.7-25.4)	26.9(24.1-29.7)	0.031	25.8(25.1-26.6)	24.5(23.7-25.4)	26.9(24.1-29.7)	0.040
BMI after 4 weeks	26.3(25.6-27.0)	25.2(24.3-26.0)	27.8(25.0-30.5)	0.034	26.2(25.5-26.9)	25.2(24.3-26.0)	27.8(25.0-30.5)	0.043
Absolute BMI gain	0.4(0.2-0.5)	0.6(0.4-0.8)	0.8(0.5-1.2)	0.047	0.3(0.2-0.5)	0.6(0.4-0.8)	0.8(0.5-1.2)	0.030
Adjustierte Subpopulation	TT N=107	TC N=57	CC N=9	P Value	TT N=112	TC N=57	CC N=9	P
Baseline weight (kg)	75.1(71.9-78.3)	71.2(67.0-75.4)	80.8(67.5-94.1)	0.168	75.1(72.0-78.1)	71.2(67.0-75.4)	80.8(67.5-94.1)	0.159
Weight after 4 weeks (kg)	75.8(72.6-79.0)	73.2(69.2-77.2)	84.7(72.2-97.3)	0.127	75.8(72.7-78.8)	73.2(69.2-77.2)	84.7(72.2-97.3)	0.124
Absolute weight gain	0.75(0.2-1.3)	2.0(1.0-3.0)	3.9(2.5-5.3)	0.003	0.71(0.2-1.2)	2.0(1.0-3.0)	3.9(2.5-5.3)	0.002
Relative weight gain after 4	1.2(0.4-2.0)	3.3(1.8-4.8)	5.5(2.4-8.6)	0.003	1.1(0.3-1.8)	3.3(1.8-4.8)	5.5(2.4-8.6)	0.001
Baseline BMI	25.9(24.8-26.9)	24.1(22.8-25.4)	25.9(21.3-30.6)	0.143	25.8(24.7-26.8)	24.1(22.8-25.4)	25.9(21.3-30.6)	0.154
BMI after 4 weeks	26.1(25.0-27.1)	24.8(23.5-26.0)	27.2(22.8-31.6)	0.224	26.0(25.0-27.0)	24.8(23.5-26.0)	27.2(22.8-31.6)	0.244
Absolute BMI gain	0.2(0.0-0.4)	0.7(0.4-1.0)	1.3(0.8-1.7)	0.002	0.2(0.0-0.4)	0.7(0.4-1.0)	1.3(0.8-1.7)	0.001

ANOVA rs489393	Publikation				Dissertation			
Population "Gewicht"	AA N=35	AC N=130	CC N=176	p Value	TT N=37	TC N=133	CC N=176	P
Baseline weight (kg)	79.5(73.1-85.9)	73.0(70.2-75.8)	75.6(73.2-78.0)	0.093	78.1(71.8-84.5)	73.0(70.2-75.8)	75.4(73.0-77.8)	0.196
Weight after 4 weeks (kg)	81.4(75.1-87.7)	74.9(72.1-77.6)	76.6(74.3-78.9)	0.103	80.0(73.7-86.2)	74.8(72.1-77.5)	76.3(74.0-78.7)	0.225
Absolute weight gain	1.8(0.7-3.0)	1.9(1.3-2.5)	1.0(0.6-1.5)	0.056	1.8(0.8-3.0)	1.8(1.2-2.4)	1.0(0.5-1.4)	0.043
Relative weight gain after 4	2.7(1.1-4.4)	2.9(2.1-3.8)	1.6(1.0-2.3)	0.046	2.8(1.2-4.4)	2.8(2.0-3.7)	1.5(0.9-2.1)	0.028
Baseline BMI	27.1(24.7-29.3)	24.7(24.0-25.5)	25.8(25.0-26.6)	0.040	26.6(24.4-28.9)	24.8(24.0-25.5)	25.8(25.0-26.6)	0.087
BMI after 4 weeks	27.6(25.4-29.8)	25.4(24.6-26.1)	26.1(25.4-26.9)	0.052	27.2(25.1-29.4)	25.4(24.6-26.1)	26.1(25.3-26.8)	0.121
Absolute BMI gain	0.6(0.2-1.0)	0.7(0.5-0.8)	0.3(0.2-0.5)	0.047	0.6(0.2-1.0)	0.6(0.4-0.8)	0.3(0.2-0.5)	0.034
Adjustierte Subpopulation	AA N=16	AC N=59	CC N=94	p Value	AA N=17	AC N=61	CC N=98	P
Baseline weight (kg)	80.3(69.7-91.0)	71.3(67.6-75.0)	75.3(71.8-78.7)	0.106	78.7(68.2-89.3)	71.3(67.7-74.9)	75.2(71.9-78.6)	0.168
Weight after 4 weeks (kg)	83.1(72.9-93.3)	73.1(69.5-76.7)	76.2(72.8-79.6)	0.082	81.5(71.4-91.6)	73.0(69.6-76.5)	76.0(72.6-79.3)	0.146
Absolute weight gain	2.7(1.2-4.2)	1.8(0.8-2.8)	0.9(0.3-1.5)	0.060	2.8(1.4-4.2)	1.7(0.8-2.7)	0.7(0.2-1.2)	0.016
Relative weight gain after 4	4.0(1.6-6.4)	2.9(1.4-4.4)	1.4(0.6-2.3)	0.057	4.2(1.9-6.4)	2.8(1.3-4.2)	1.1(0.3-1.8)	0.011
Baseline BMI	26.7(22.9-30.5)	24.2(23.1-25.4)	25.8(24.7-27.0)	0.113	26.2(22.5-29.9)	24.2(23.1-25.3)	25.9(24.7-27.0)	0.129
BMI after 4 weeks	27.6(23.9-31.2)	24.8(23.7-26.0)	26.1(25.0-27.2)	0.117	27.1(23.5-30.6)	24.8(23.7-25.8)	26.1(25.0-27.2)	0.162
Absolute BMI gain	0.9(0.4-1.4)	0.6(0.3-0.9)	0.3(0.1-0.5)	0.045	0.9(0.4-1.4)	0.6(0.3-0.9)	0.2(0.0-0.4)	0.010

ANCOVA rs177822313		Whole Study Population	Adjusted Subpopulation	First Episode Population
Publikation	Estimated marginal means	1.1 – 1.7 – 2.5	0.8 – 2.0 – 3.5	1.4 – 2.6 – 2.7
	Anzahl der Patienten (TT-TC-CC)	198 – 126 - 21	107 – 57 - 9	46 – 32 - 9
	P	P=0.060	P=0.005	P=0.124
Dissertation	Estimated marginal means	1.1 – 1.8 – 2.5	0.7 – 2.0 – 3.6	1.3 – 2.7 – 2.8
	Anzahl der Patienten (TT-TC-CC)	203 – 126 - 21	112 – 59 - 9	49 – 32 - 9
	P	P=0.036	P=0.002	P=0.076

ANCOVA rs489693		Whole Study Population	Adjusted Subpopulation	First Episode Population
Publikation	Estimated marginal means	1.0 – 1.8 – 2.2	0.9 – 1.7 – 2.8	1.0 – 2.7 – 2.7
	Anzahl der Patienten (CC-AC-AA)	176 – 130 - 35	94 – 59 - 16	37 – 36 - 13
	P	P=0.039	P=0.044	P=0.017
Dissertation	Estimated marginal means	1.0 – 1.7 – 2.1	0.7 – 1.7 – 2.9	0.9 – 2.6 – 2.8
	Anzahl der Patienten (CC-AC-AA)	176 – 133 - 37	198 – 61 - 17	38 – 38 - 13
	P	P=0.028	P=0.011	P=0.020

8. Kongressbeiträge, Auszeichnungen und Publikationen

F. Czerwensky, S. Leucht, W. Steimer. The human melanocortin four receptor gene: A new candidate gene for second generation antipsychotic-related weight gain? *Clin Chem* 2012, 58 (S10): A-141

Molecular Pathology Division Award

Dieser Kongress-Beitrag wurde anlässlich des „AACC Annual Meetings 2012“ in Los Angeles mit dem „Molecular Pathology Division Award for Outstanding Contributions to the Field of Molecular Pathology or Pharmacogenetics“ ausgezeichnet.

NACB Distinguished Abstract Award und Oral Presentation

Auf der gleichen Veranstaltung wurde der Abstract von der „National Academy of Clinical Biochemistry“ (NACB) mit einem „Distinguished Abstract Award“ ausgezeichnet. Nur 32 von 888 akzeptierten Abstracts erhielten diese Auszeichnung.

Zudem wurden der Abstract und das Poster als einer von 6 Beiträgen für eine Präsentation aus 888 akzeptierten Abstracts ausgewählt.

F. Czerwensky, S. Leucht, W. Steimer. Association of the common MC4R rs17782313 polymorphism with antipsychotic-related weight gain *J Clin Psychopharmacology* 2013, Feb;33(1):74-79

F. Czerwensky, S. Leucht, W. Steimer. The CYP1A2*1D polymorphism has a significant impact of olanzapine serum concentrations. *Clin Chem* 2013, 59 (S10): A-98

NACB Distinguished Abstract Award und Oral Presentation

Auf dem „AACC Annual Meeting 2013“ in Houston wurde der Abstract von der „National Academy of Clinical Biochemistry“ (NACB) mit einem „Distinguished Abstract Award“ ausgezeichnet. Nur 38 von 903 akzeptierten Abstracts erhielten diese Auszeichnung.

Zudem wurden der Abstract und das Poster für eine Präsentation ausgewählt.

F. Czerwensky, S. Leucht, W. Steimer. MC4R rs489693 polymorphism: A clinical risk factor for second generation antipsychotic-related weight gain

Auswahl des akzeptierten Abstracts als Vortrag auf dem International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Kongress (IATDMCT) 2013 in Salt Lake City

F. Czerwensky, S. Leucht, W. Steimer. MC4R rs489693 polymorphism influences antipsychotic-related weight gain. *Pharmacopsychiatry* 2013, Sept; 46(6)

F. Czerwensky, S. Leucht, W. Steimer. Influence of polymorphism in the CYP1A2, the UGT1A4 and the POR gene on olanzapine serum concentrations and clinical outcome. *Pharmacopsychiatry* 2013, Sept; 46(6)

Auswahl der akzeptierten Abstracts als Vorträge auf der Tagung der Arbeitsgruppe für Neuro-psychiatry 2013 in München

F. Czerwensky, S. Leucht, W. Steimer. MC4R rs489693: A clinical risk factor for second generation antipsychotic-related weight gain? *Int J Neuropsychopharmacology* 2013, Okt; 16(9):2103-9

F. Czerwensky, S. Leucht, W. Steimer. The CYP1A2*1D and *1F polymorphisms have a significant impact on olanzapine serum concentrations. *Ther Drug Monitoring* 2014, Aug; 1 Epub.

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Steimer angefertigt.

Für die Betreuung und Überlassung des interessanten Themas, die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge sowie die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn Prof. Dr. Steimer recht herzlich.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Neumeier bzw. Herrn Prof. Dr. Ruland für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation an dem von ihm geleiteten Institut.

Besonderem Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Biel für die Bereitschaft diese Promotion zu betreuen und zu begutachten und der damit diese Arbeit erst ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. Leucht sowie allen an der Datengenerierung beteiligten Ärzten danke ich für die Betreuung der Studie an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar, sowie die Bereitstellung der Studiendaten. Für die Hilfestellung und Rückfragen bei LC-MS/MS Messungen danke ich Frau Dr. Schneider und dem Laborteam aus der Drug Monitoring Labor des Instituts für Klinische Chemie.

Für die Einarbeitung und die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanke ich mich bei meiner Doktoranden-Kollegin Julia Stäker. Zudem möchte ich mich bei Christine Grubmüller, bei Caroline Wallner und Anita Schreiegg für die ausgezeichnete Unterstützung und die nette Arbeitsatmosphäre im PCR-Labor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie danken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Freundin Ina und meinen Eltern bedanken, die mich während meiner gesamten Doktorandenzzeit mit viel Verständnis unterstützten und mir bei allen Schwierigkeiten mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderen Dank gilt meiner Freundin, die mit viel Liebe und Engagement dafür sorgte, dass ich die Welt neben der Promotion nicht aus dem Auge verloren habe.