Institut für Naturheilkunde und klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Simmet

Klinische Pharmakologie

Leiterin: Prof. Dr. med. Julia Stingl

Lymphoblastoide Zelllinien als Modell zur Biomarkerfindung bei Depression

---

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm

Eva Ersfeld

Koblenz

2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Julia Stingl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Iris-Tatjana Kolassa

Tag der Promotion: 14. Februar 2019

Ich widme diese Arbeit meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS V

1. EINLEITUNG 1

1.1 DEPRESSION 2
1.1.1. EINTEILUNG UND DIAGNOSE DER DEPRESSION 2
1.1.2. THERAPIE DER DEPRESSION 3
1.1.3 ANTIDEPRESSIVA 4
1.2. LYMPHOBLASTOIDE ZELLLINIEN 5
1.3. POTENTIELLE BIOMARKER 6
1.3.1. IN DER PRAXIS VERWENDETE BIOMARKER 7
1.3.2. BIOMARKER DER DEPRESSION 7
1.4. BDNF (BRAIN-DERIVED-NEUROTROPHIC-FACTOR) 7
1.5. CHL1 (CELL ADHESION MOLECULE WITH HOMOLOGY TO L1CAM) 9
1.6. ZIEL DIESER STUDIE 10

2. MATERIAL UND METHODEN 12

2.1. MATERIAL 12
2.1.1. CHEMIKALIEN 12
2.1.2. VERWENDETE GERÄTE 13
2.1.3. VERBRAUCHSMATERIALIEN 15
2.1.4. LÖSUNGEN, PUFFER UND KULTURMEDIEN 15
2.1.5. PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR DEN WESTERN BLOT 16
2.1.6. VERWENDETE „KITS“ 17
2.1.7. PRIMER FÜR PCR UND REAL TIME PCR 17
2.1.8. ANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT 17
2.2. METHODEN 18
2.2.1. ZELLKULTUREN UND NÄHRMEDIEN 18
2.2.2. HERSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZEN 19
2.2.3. TOXIZITÄTSTEST MITTELS EINES XTT-ASSAYS 19
2.2.4. GENOTYPISIERUNG 25
2.2.5. GENEXPRESSIONSANALYSE 28
2.2.6. PROTEINANALYSE MITTELS ELISA UND WESTERN BLOT 32
2.2.7. STATISTISCHE AUSWERTUNG 38

3. ERGEBNISSE 39

3.1. KLINISCHE DATEN 39
3.2. XTT-ERGEBNISSE 40
3.2.1. PHÄNOTYPISIERUNG 40
3.2.2. KORRELATION DES VERHALTENS DER ZELLLINIEN ZWISCHEN DEN ANTIDEPRESSIVA 43
3.2.3. ZUSAMMENHANG DER ZELLVIABILITÄT DER LCLS AUF DIE MEDIKAMENTE UND DER KLINIK DER PATIENTEN 44
3.3. BRAIN-DERIVED-NEUROTROPHIC-FACTOR (BDNF) 45
3.3.1. BDNF VAL66MET POLYMORPHISMUS 45
3.3.2. BASALWERTE DER GENEXPRESSION VON BDNF 47
3.3.3. PROTEINANALYSE MITTELS ELISA 48
3.3.4. GENEXPRESSION: EINFLUSS AUF BDNF- UND PROBDNF-PROTEINGEHALT 50
3.3.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER IC50 MIT DEN BASALWERTEN 51
3.4. CHL1 55
3.4.1. BASALWERTE DER EXPRESSION DES *CHL1* – GENS 55
3.4.2. PROTEINBESTIMMUNG MITTELS WESTERN BLOT 56

4. DISKUSSION 58

4.1 LYMPHOBLASTOIDE ZELLLINIEN 58
4.2 BRAIN-DERIVED-NEUROTROPHIC-FACTOR (BDNF) 60
4.3 CHL1 61

5. ZUSAMMENFASSUNG 63

6. LITERATURVERZEICHNIS 65

DANKSAGUNG 71

LEBENSLAUF 72

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
APA	Amerikanische Psychiatrische Vereinigung
APS	Ammonium Persulfat 10 %
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BIS	N,N-methylenebisacrylamide
bp	Basenpaare
BPD	Bipolar Disorder
BSA	Bovines Serum Albumin
CHL1	Cell adhesion molecule with homology to L1CAM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENDOD 1	Endonuclease domain containing 1
EGCG	Epigallocatechin gallate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FA	Firma
FCS	Fetal calf serum
g	mittlere Erdbeschleunigung
GB	Gel Buffer
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HHN-System	Hypothalamus - Hypophysen - Nebennieren-rinden – System
HRP	Horseradish Peroxidase
IC 50	mittlere Inhibitorische Konzentration

ICD 10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten, 10.Revision
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
MARS	Munich Antidepressant Response Signature
MDD	Major Depression Disease
Met	Methionin
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MilliQ	Deionisiertes und aufgereinigtes Wasser
ml	Milliliter
mM	Millimolar
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMS	N-Methyl-Dibenzopyrazine-Methyl-Sulfat
proBDNF	Vorläufer des BDNF-Proteins
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Zellkulturmedium mit Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen
STAR*D	Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPRY-2	sprouty homolog 2
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq Polymerase	thermostabile DNA Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box binding protein
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris-gepufferte Saline mit 0,05% Polysorbat20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
U/µl	aktive Enzyme (units) pro Mikroliter
UV	Ultraviolett
Val	Valin

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

1. Einleitung

Die Therapie der Depression ist schwierig und umstritten. Travedi et al. zeigte in der STAR*D (Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression) Studie, dass nach 12 Wochen Erstlinientherapie mit Antidepressiva nur ein Drittel der Patienten in Remission gingen [59]. In Deutschland wird nach 3 - 4 Wochen Therapie bei nicht Ansprechen ein anderes Medikament verschrieben, die Dosis erhöht oder ein weiteres Medikament hinzugenommen. Die Auswahlkriterien für Antidepressiva aus den Stufe 3-Leitlinien (S3-Leitlinien) für Unipolare Depression basieren auf dem Nebenwirkungsprofil, der Anwendungserfahrung des Arztes, der Patientenpräferenz und anderen unspezifischen Kriterien [9]. Eine personalisierte Medizin, deren Ziel es ist, die Effektivität der Therapie zu maximieren und die unerwünschten Wirkungen zu minimieren [60], ist daher das Ziel vieler Studien. Diese versuchen Biomarker zu finden, die zur Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrollen eingesetzt werden können. So ist zum Beispiel der Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ein potentieller Biomarker für das Therapieansprechen auf Antidepressiva [15]. So zeigten zum Beispiel Lee et al. und Yoshimura et al., dass Patienten, die auf die Therapie ansprachen, einen signifikanten Anstieg der Plasma - BDNF - Konzentration im Blut aufwiesen. Non-Responder zeigten dies nicht [30; 63]. Viele Studien zur Biomarkerfindung basieren auf der Nutzung von Tiermodellen. Andere Studien untersuchen Patienten im Verlauf ihrer Erkrankungsphase. Das Problem hierbei ist, dass die circadiane Rhythmik oder auch Stress eines jeden Menschen diese Methode nicht immer reproduzierbar macht. Eine Methode, die mehr und mehr im Feld der personalisierten Medizin an Bedeutung zunimmt, ist das Benutzen von Lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) als Modell [65]. So zeigte Morag et al., dass LCLs ein klassenspezifisches Verhalten auf verschiedene Medikamente zeigen [36] und in einer anderen Studie, dass das Geschlecht der Spender der LCLs ebenso einen Einfluss auf das Verhalten der LCLs aufweisen [37]. Desweiteren konnten in einer genomweiten Assoziations-Studie (GWAS) weitere potentielle Biomarker mit Hilfe der LCLs gefunden werden, darunter das CHL1 (Cell adhesion molecule with homology to L1CAM) [38]. Diese Eigenschaften der LCLs sind ein Grund zu deren Nutzung als Modell.

1.1 Depression

Die Depression (MDD), die wie die bipolare Störung (BPD) zu den affektiven Störungen zählt, ist neben den Angststörungen weltweit die häufigste psychische Erkrankung jeden Alters [24]. Das Lebensrisiko, an einer Depression zu erkranken, wird auf etwa 17 % geschätzt. Aufgrund der immer steigenden Prävalenz der Erkrankungen steigen die sozialen und ökonomischen Kosten [62].

1.1.1. Einteilung und Diagnose der Depression

Die Einteilung und Diagnose der affektiven Störungen und somit auch der Depression werden in Deutschland mit Hilfe des ICD - 10 (international classification of diseases, injuries and causes of death) Codes, der von der WHO herausgegeben wurde, klassifiziert [11]. Dieser orientiert sich wie die DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), das Klassifikationssystem der Amerikanischen Psychiatrischen Vereinigung (APA), an klinischen Symptomen, psychosozialen Faktoren und Verlaufsformen. Durch Annäherung der beiden Klassifikationen ist die Diagnostik der psychiatrischen Erkrankungen nahezu international vergleichbar.

Tab.1: Einteilung der affektiven Störungen nach ICD -10 -GM Version 2015 [11].

F 30	Manische Episode
F 31	Bipolare affektive Störung
F 32	Depressive Episode
F 33	Rezidivierende depressive Störung
F 34	Anhaltende affektive Störung
F 38	Andere affektive Störungen
F 39	Nicht näher bezeichnete affektive Störung

Ein großes Problem der Depression ist die hohe Suizidrate, diese liegt bei rund 15 % [3]. Zudem ist die Depression die häufigste Diagnose bei Patienten, die einen Suizid versucht oder beendet haben [47]. Daher und auch aufgrund der sozialen und ökonomischen Kosten ist es nicht verwunderlich, dass der Therapie der Depression ein wachsendes Interesse in der Forschung beigemessen wird. Die STAR*D Studie zum Beispiel ist eine der größten Depressionsstudien, bei der auch das Ansprechen auf Antidepressiva untersucht wurde und

wird [23]. Die MARS (Munich Antidepressant Response Signature) - Studie in München beschäftigt sich mit Genotypen und Biomarkern, die das Ansprechen auf eine Therapie vorhersagen könnten und katalogisiert das Therapieansprechen der an Depression erkrankten Patienten [16]. Ebenso die GENDEP (Genome-based Therapeutic Drugs for Depression) - Studie untersuchte an 706 an Depression erkrankten Patienten verschiedene Expressionsraten und Genotypen zur Biomarkerfindung um das Ansprechen vorhersagen zu können [25].

1.1.2. Therapie der Depression

Die Depression kann mit einer Psychotherapie, der Schlafentzugstherapie, der Lichttherapie, einer Elektrokrampftherapie und mit Hilfe von Antidepressiva, die zur Gruppe der Psychopharmaka gehören, behandelt werden. In Deutschland wird nach den deutschen S3-Leitlinien für Unipolare Depression therapiert und nach partizipativer Entscheidungsfindung mit dem Patienten die Therapie eingeleitet.

Tab. 2: Einteilung der Depression mittels Hamilton Skala (HAM-D Score) [61] und Therapieplan der Depression nach den deutschen S3-Leitlinien [9].

Depressionsschwere	HAM-D Score	Therapie
Leichte Depression	> 10 Punkte	14 Tage abwarten; wenn keine Besserung, dann Psychotherapie ODER Pharmakotherapie
Mittelschwere Depression	> 20 Punkte	Psychotherapie ODER Pharmakotherapie
Schwere Depression	> 30 Punkte	Psychotherapie UND Pharmakotherapie

Bei schwerer Depression wird zu einer Kombinationstherapie geraten, da die Kombination von Psychotherapie und Pharmakotherapie effektiver als eine Monotherapie ist [7]. Anfangs sollte eine wöchentliche Kontrolle der Symptome der Patienten stattfinden und nach 3 - 4 Wochen eine klinische Wirkungsprüfung vollzogen werden. Kommt es zu keiner Therapieresponse nach 3 - 4 Wochen und sollte nach Serumspiegelbestimmung und therapeutischem Drug-Monitoring eine Non-Compliance ausgeschlossen werden, kann mit Hil-

fe von Augmentation, Dosiserhöhung oder Switchen der Antidepressiva weiter therapiert werden [9].

Das Therapieansprechen kann mit Hilfe von Skalen gemessen werden, so die Hamilton Skala (HAM - D). Diese beruht auf mehreren Fragen, die ein Untersuchender dem Patienten stellt. Anhand der Punkte (jede Frage wird mit null bis vier bzw. null bis zwei Punkte gewertet) kann die Schwere der Erkrankung, aber auch das Ansprechen auf die Therapie eingeschätzt werden [61]. Response bedeutet eine Halbierung der Punkte. Remission, der heutzutage eine wichtigere Rolle bei der Beurteilung des Therapieansprechens beigemessen wird [2], bedeutet in der HAM-D-Skala eine maximale Punktzahl von sieben. Patienten, die in Remission der Depression gehen zeigen eine geringere Rezidivrate, sowie ein niedrigeres Risiko einer chronischen Depression, besserer sozialer Anbindung, einer geringeren Suizidrate und weniger Nebenwirkungen auf das Antidepressivum [2; 59].

1.1.3 Antidepressiva

Die generelle Wirkung der Antidepressiva wird unterteilt in eine akute und eine längerfristige Wirkung. Die akute Wirkung basiert auf einer Erhöhung bestimmter Neurotransmitter, vor allem Serotonin, Noradrenalin oder Dopamin, im synaptischen Spalt. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Antidepressiva eine erhebliche Auswirkung auf Signalwege ausüben, die die zelluläre Plastizität des Gehirns regulieren. So zeigte Seo et al., dass Antidepressiva ein Wachstum hippocampaler dendritischer Zellen fördern [52]. So könnte das Auftreten bestimmter Neurotransmittereffekte [z.B Antriebssteigerung, UAWs (unerwünschte Arzneimittelwirkungen)] und das erst verzögerte Einsetzen der antidepressiven Wirkung erklärt werden.

Die Antidepressiva werden, je nach Wirkungsmechanismus, in verschiedene Gruppen eingeteilt. Zu den ältesten zählen die tricyclischen Antidepressiva (TCA). Der erste Wirkstoff dieser Gruppe ist das Imipramin (Tofranil®). Diese Gruppe der Antidepressiva hat viele unerwünschte Nebenwirkungen, wie anticholinerge Wirkungen, Gewichtszunahme, Schwindel und sexuelle Dysfunktion [31]. Zu einer weiteren Gruppe, die wesentlich nebenwirkungsärmer und dadurch häufiger verschrieben wird, gehören die Selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI). Hierzu zählen das Paroxetin, Citalopram, S-Citalopram, Fluoxetin, Fluvoxamin und Sertralin. Laut Cloonan et al. wirken SSRIs nicht

nur proliferativ auf dendritische Zellen, sondern antiproliferativ gegen Burkitt-Lymphoma-Zellen [6].

Das Mirtazapin, das zur Gruppe der NaSSA (Noradrenerges und spezifisch Serotonerges Antidepressivum) gehört, ist ein Alpha2-Rezeptor Antagonist. Es hemmt zentrale präsynaptische Alpha2-Rezeptoren und führt dadurch zu einer Konzentrationserhöhung von Neurotransmittern. Es ist eines der am häufigsten verwendeten Antidepressiva in der klinischen Praxis. Weitere Gruppen sind die Selektiven Serotonin Noradrenalin Wiederaufnahmehemmer (SSNRI), die Monoaminooxidase Hemmer (MAO-Hemmer), einige neue Medikamente wie z.B. das Agomelatin, sowie auf pflanzlicher Basis das Johanneskraut.

Ein weiterer natürlicher Wirkstoff, der mehr und mehr in den Fokus der antidepressiven Therapie rückt, ist das Epigallocatechingallat (EGCG). EGCG ist ein Polyphenol, das ca. ein Drittel der Trockenmasse im grünen Tee ausmacht. In einer randomisierten, Doppelblindstudie im Jahr 2013 konnte allerdings keine signifikante Besserung der depressiven Symptome gegenüber des Placebos gefunden werden [32]. Jedoch konnte Tian et al. zeigen, dass EGCG einen Einfluss auf den BDNF (brain-derived-neurothrophic-factor) hat. Er injizierte Mäusen EGCG intrathekal nach Trauma und stellte fest, dass die Konzentration des BDNF sich bei diesen Mäusen im Gegensatz zu der Kontrollgruppe erhöht hatte und hier zudem ein beschleunigtes Wachstum der Nerven zu beobachten war [58]. BDNF gilt als potentieller Biomarker der Depression (siehe Kapitel 1.4.).

1.2. Lymphoblastoide Zelllinien

Die mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisierten B-Lymphozyten sind gut wachsende Zelllinien in einer Zellsuspension (Lymphoblastoide Zelllinien). B-Lymphozyten werden aus dem Blut von Probanden isoliert und mit Hilfe des EBV immortalisiert.

Es gibt unterschiedliche Methoden der Herstellung dieser immortalen Zellen. Zum einen können Lymphoblastoide Zelllinien aus schon EBV - seropositiven Probanden gewonnen werden, so dass eine exogene Infektion nicht mehr nötig ist. Und zum anderen können B-Lymphozyten mit dem Überstand der Affenzelllinie B95-8 inkubiert werden, in dem infektiöse EBV-Partikel enthalten sind [35].

Diese Zelllinien können als In-Vitro-Modell genutzt werden, um medikamenteninduzierte Zytotoxizität, biochemische Effekte und enzymatische Reaktionen zu untersuchen. Sie finden ebenfalls Anwendung in der Pharmakogenetik. Zhang et al. zeigte, dass genetische Untersuchungen mit LCLs möglich sind, da sie weitgehend die ererbte Genmasse, sowie die individuellen epigenetischen Besonderheiten der Spender repräsentieren [66].

Es gibt Gendatenbanken, die mit Hilfe der LCLs gewonnen wurden, so z.B. das HapMap-Projekt, bei dem LCLs von Probanden aus Europa, Asien und Afrika hergestellt und untersucht wurden [57]. Es wurden unter anderem in einigen Studien zur Pharmakogenetik mit den HapMap LCLs Unterschiede in Populationen beobachtet [21]. Desweiteren wurden genomweite Assoziationsstudien (GWAS) mit Hilfe von LCLs aus dem nationalen Labor für die Genetik der israelischen Bevölkerung (NLGIP) durchgeführt [38].

Die 33 Zelllinien, mit denen die hier beschriebenen Versuche durchgeführt wurden, stammen aus der MARS-Studie. Hier wurden die Zelllinien aus den B-Lymphozyten von an Depression erkrankten Patienten gewonnen. Die Herstellung erfolgte meist aus den seropositiven Probanden.

1.3. Potentielle Biomarker

Biomarker gelten als Basis einer präventiven und personalisierten Medizin sowie als ein wichtiges Werkzeug der modernen Arzneimittelentwicklung [13]. Sie sind physikalische Marker wie Blutdruck und EKG, oder im Labor bestimmte Blutwerte oder Genotypen. Sie können zur Prognostik oder Diagnostik mit Hilfe von krankheitsspezifischen Markern eingesetzt werden und mit Hilfe von therapiespezifischen Markern eine Arzneimittelwirkung widerspiegeln [48].

Jedoch reicht der Nachweis der Assoziation eines Biomarkers mit einer Erkrankung in epidemiologischen Beobachtungsstudien nicht aus, um eine kausale Beziehung aufzustellen. Ein Biomarker muss bestimmte Anforderungen erfüllen, so zum Beispiel den Zusammenhang der Effekte in vitro, im Tiermodell und beim Menschen, sowie die Wiederholbarkeit der Auswirkungen in klinischen Studien. Des Weiteren sollte ein Biomarker genau und reproduzierbar mit standardisierten Methoden messbar sein [51].

1.3.1. In der Praxis verwendete Biomarker

In der Klinik werden bereits seit vielen Jahren etablierte und standardmäßig benutzte Biomarker verwendet. So wird beim Mammakarzinom der Her2-Status auf Protein - und Gen - Ebene bestimmt, sowie die Untersuchung, ob der Tumor Östrogen - oder Progesteronrezeptoren enthält. Dementsprechend wird die Therapie mit antihormonellen Arzneimitteln oder mit monoklonalen Antikörpern (Trastuzumab) eingeleitet [10]. Ein weiterer Biomarker ist das LDL-Cholesterin für die koronare Herzerkrankung (KHK). So zeigen epidemiologische Studien, dass Cholesterin und LDL mit dem Risiko für die Entstehung von Atherosklerose und KHK korrelieren [28]. Diese sind nur einige wenige Beispiele für die klinische Anwendung von Biomarkern.

1.3.2. Biomarker der Depression

Biomarker bei Depression, die vor allem für das Therapieansprechen und die Diagnose verwendet werden könnten, werden gesucht. So ist zum Beispiel eine Aktivierung des Hypothalamus Hypophysen Nebennierenrinden Systems (HHN-System) bei depressiven Menschen bekannt [42]. Das HHN-System scheint bei den Symptomen der akuten Depression eine entscheidende Rolle zu spielen [41]. So wurde in einer Studie von Kumamaru et al. gezeigt, dass Glukokortikoide die *BDNF*-Genexpression, ein ebenso potentieller Biomarker in der Erforschung der Depression, im Hippokampus reduzieren [26].

Wie zu Beginn der Einleitung erwähnt, konnten Morag et al. mit einer GWAS weitere potentielle Biomarker mit Hilfe der LCLs herauskristallisieren. Dazu zählen unter anderem das CHL1, ENDOD 1 (endonuclease domain containing 1), SPRY-2 (sprouty homolog 2) und noch einige mehr [38].

1.4. BDNF (Brain-derived-neurotrophic-factor)

Der „brain-derived-neurothrophic-factor“ (BDNF), ein Homodimer, gehört, wie der „nerve growth factor“ (NGF), zur Familie der Neurotrophine. Der BDNF ist ein 14 kDa schweres Protein, das aus ca. 240 Aminosäuren besteht und vor allem im Gehirn vorkommt [27]. Er wird ferner von Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten und Muskelzellen [4], den Epithelzellen des Urogenitaltraktes und des Gastrointestinaltraktes gebildet [33]. Die meisten Funktionen von Neurotrophinen werden spezifisch über die Tyrosin-Kinase-

Rezeptoren vermittelt. Die Funktion des BDNF wird über den hochaffinen Tyrosin-Kinase-B (TrkB) weitergegeben [46]. BDNF wirkt neuroprotektiv an den Nerven des zentralen und peripheren Nervensystems. Zudem spielt er eine bedeutende Rolle im Überleben, Wachstum und der Differenzierung bestimmter Neuronenpopulationen im peripheren und zentralen Nervensystem während der Entwicklung und im Erwachsenenalter [20]. Es ist mehrfach publiziert, dass der BDNF an der Langzeitpotenzierung, dem Lernen und der Erinnerung beteiligt ist [12]. Die Bedeutung des Zusammenhangs von BDNF und psychiatrischen Erkrankungen, besonders bei MDD und BPD, wird deutlich, zum einen durch die präklinischen Forschungen an Mäusen, die gezeigt haben, dass eine Infusion von BDNF ins Mittelhirn eine antidepressive Wirkung hat [54] und durch Hemmung der Tyrosin-Kinase der antidepressive Effekt des BDNFs geblockt wird [53]. Zum anderen wird der Zusammenhang deutlich durch die klinischen Studien, die gezeigt haben, dass der BDNF-Level im Blutserum bei depressiven Patienten und Patienten mit bipolaren affektiven Störungen erniedrigt ist [8] und durch Therapie mit Antidepressiva der Serum-Level wieder steigt. Dies korreliert zudem auch mit dem Gehalt des BDNFs in Leukozyten. Dieser ist bei einer akuten depressiven Phase erniedrigt und steigt bei Therapie mit Escitalopram an [29]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Response auf Paroxetin oder Milnacipran (ein Antidepressivum aus der Gruppe der Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer) besser war bei den Probanden, die eine Erhöhung der BDNF-Konzentration im Blutserum hatten [63]. Aufgrund dieser Fakten und da der BDNF für einen langfristigen neurotrophen und neuroprotektiven Effekt bekannt ist, könnte es eine mutmaßliche Rolle in der Pathophysiologie und Behandlung von Gemütsstörungen haben [34] und gilt daher als potentieller Biomarker der Depression.

Der BDNF wird synthetisiert aus einem Vorläufer-Protein dem PreproBDNF aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Im Golgi Apparat wird der aus dem PreproBDNF gespaltene ProBDNF entweder aus der Zelle transportiert oder von Endoproteasen oder Proprotein-Konvertasen in BDNF umgewandelt [40]. Der extrazelluläre ProBDNF kann von Proteasen, wie das Plasmin, zu BDNF umgewandelt werden. ProBDNF wurde früher als inaktiver Vorläufer beschrieben. Heute weiß man, dass es neuronale Apoptose über den niedrigaffinen p75N-Rezeptor induziert [56] und so als Gegenspieler des BDNF fungiert. Der ProBDNF ist ein 32 kDa schweres Protein aus etwa 382 Aminosäuren. Dieses Vorläufer-

protein ist intrazellulär stabiler als BDNF, wird aber nach dem Transport aus der Zelle schnell zu BDNF vom Plasmin gespalten, so dass es keine Anhäufung des Proteins im Synaptischen Spalt gibt [1]. Als direkter Kontrahent des BDNFs gilt ProBDNF ebenso als potentieller Biomarker der Depression.

Das *BDNF*-Gen liegt auf dem Chromosom 11p13. Der bekannteste Polymorphismus, 196G/A-Polymorphismus, liegt im Codon 66 in der 5´Pro Region des Gens, und es kommt zu einem Austausch des Valins zu einem Methionin. Da der Polymorphismus in der *ProBDNF*-Region liegt (siehe Abb.1), hat dieser keinen Effekt auf die Funktion des BDNFs, es hat einen eher starken Einfluss auf die intrazelluläre Verarbeitung des ProBDNFs [12].

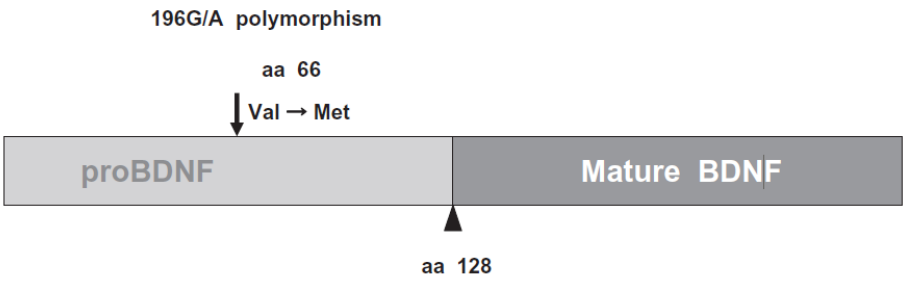

Abb.1: Struktur des Pro-brain-derived neurotrophic factor (ProBDNF) mit der Spaltstelle für den brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Pfeilspitze) und Position des Nukleotid-Polymorphismus (SNP: 196 g / A, Val66Met) des BDNF-Gens (Pfeil). Methionin (Met); Valin (Val). [15]. © 2010 The Author
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Psychiatry and Neurology

1.5. CHL1 (Cell adhesion molecule with homology to L1CAM)

Das CHL1-Protein ist ein etwa 185 kDa transmembran-ständiges Glykoprotein aus der L1 Familie, die Teil der Immunglobulin (Ig) Superfamilie ist [50]. Es ist ein Zelladhäsions-Molekül, das eine wichtige Rolle bei der Zellmigration spielt und die Proliferation und neuronale Differenzierung neuronaler Progenitorzellen negativ reguliert [22]. Zudem konnte gezeigt werden, dass CHL1 eine wichtige Rolle im Axonwachstum, der Regeneration und synaptischer Plastizität in vivo [18] und in vitro [17] eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Morellini et al. zeigte, das CHL1 knock-out Mäuse ein reduziertes soziales Verhalten bei exogenen Impulsen aufweisen [39].

Das *CHL1* Gen liegt auf Chromosom 3p26, besteht aus 26 Exons und ist etwa 90 kb lang. Einige Polymorphismen, zum Beispiel der 320C/T-Polymorphismus in Exon 1, der einen Austausch von Leucin in Phenylalanin verursacht, stehen im Zusammenhang mit Schizophrenie [50].

In einer genomweiten Assoziationsstudie von Morag et al. wurde gezeigt, dass die *CHL1* Genexpression bei Lymphoblastoiden Zelllinien, die sensitiver auf den SSRI Paroxetin reagieren, signifikant niedriger ist, als bei den LCLs, die weniger sensitiv reagieren. *CHL1*-Gen und Protein sind daher vielversprechende Kandidaten als Biomarker für das Therapieansprechen von SSRI und das Protein könnte Ziel neuer Antidepressiva sein [38].

1.6. Ziel dieser Studie

Biomarker müssen bestimmte Anforderungen erfüllen. Sie sollten den Zusammenhang der Effekte zwischen in vitro, Tiermodellen und Menschen darstellen, sowie die Reproduzierbarkeit der Versuche möglich machen. In-Vitro Diagnostik lässt sich mittels Blutzellen der Probanden einfach durchführen. Diese Zellen haben in einer Primärkultur aber meist eine eingeschränkte Lebensdauer. Die Untersuchung lässt sich nicht mehr reproduzieren. Dem Proband müsste erneut Blut entnommen werden. Dieser ist dementsprechend älter und befindet sich in einer anderen Lebenssituation. Diese und noch andere Veränderungen könnten eine Abweichung der Ergebnisse hervorrufen. Es muss daher ein In-Vitro-Modell genutzt werden, das sowohl die Eigenschaften des Probanden widerspiegelt, als auch zeitlich unabhängig ist.

Lymphoblastoide Zelllinien sind immortale B-Lymphozyten, die bekannterweise die genetischen und epigenetischen Besonderheiten der Probanden repräsentieren [66].
Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob LCLs als Modell zur Biomarkerfindung genutzt werden können. Dafür sollten LCLs ein individuelles und klassenspezifisches Verhalten bezüglich der wachstumshemmenden Effekte von Antidepressiva [6] und dem Grüntee-Extrakt Epigallocatechingallat (EGCG) aufweisen, und diese Effekte mit dem klinischen Ansprechen auf die Therapie bei Patienten korrelieren. Zudem sollte untersucht werden, inwieweit genetische Marker, wie der *BDNF*-196G/A-Polymorphismus dieses Ansprechen beeinflussen. Als Beispiele von potentiellen Biomarkern wurden Basalwerte der Proteine

BDNF, ProBDNF und CHL1 mit deren Genexpression in den LCLs untersucht und auf Korrelationen mit dem wachstumshemmenden Effekt der Antidepressiva und des EGCGs geprüft.

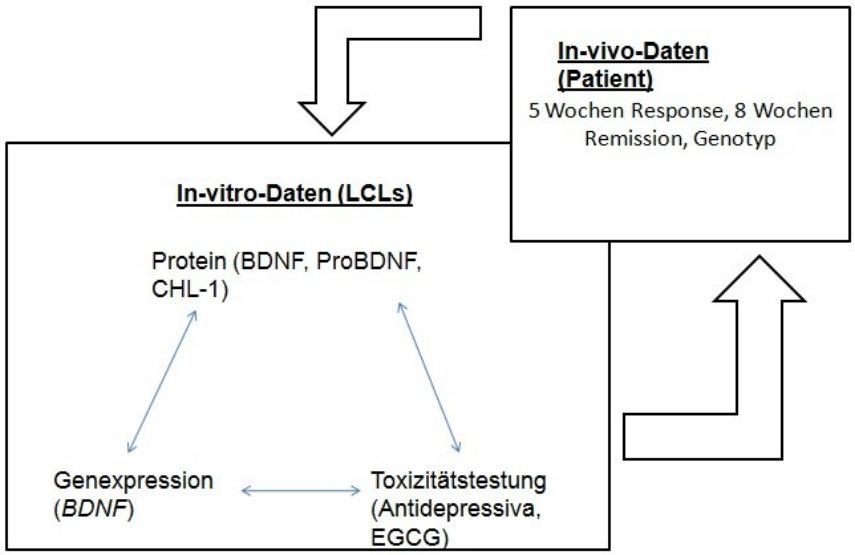

Abb.2: Bildliche Veranschaulichung eines Ziels der Doktorarbeit: Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Patientendaten und den In-vitro-Daten einerseits und gibt es einen Zusammenhang innerhalb der In-vitro-Daten andererseits? Die in-vitro-Daten beinhalten die Genexpression des Brain-derived-neurotrophic-factors (BDNF), den Toxizitätstest mit den Antidepressiva Imipramin, Paroxetin und Mirtazapin, sowie dem Grüntee-Extrakt Epigallocatechingallat (EGCG) sowie die Proteinmenge intrazellulär des BDNFs, dessen Vorläufer (ProBDNF) und des Cell adhesion molecule with homology to L1CAM (CHL1). Die Daten der an Depression erkrankten Patienten beinhalten die 5 Wochen Response, 8 Wochen Remission und den Genotyp.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

	Chemikalie	Hersteller
PCR	dNTPs 100 mM	Invitrogen, Deutschland
	MgCl2 Lösung 50 mM	Invitrogen, Deutschland
	10 x Puffer (-MgCl)	Invitrogen, Deutschland
	Ampli Taq Polymerase 5 U/µl	Invitrogen, Deutschland
	DMSO	Sigma, Deutschland
	GeneRuler 50 bp Ladder (0,5 µg/µl)	MBI Fermentas, Litauen
Elektrophorese	Agarose	SIGMA, Deutschland
	Ethidiumbromid 100 mg/ml	Fluka Bio Chemika, Schweiz
	6 x DNA Loading Dye	10 mM Tris-HCl, 0,003 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylene Cyanol FF, 60 % Glycerol, 60 mM EDTA
	5 x TBE	5 x Stammlösung 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
	50 x TAE	242 g Tris, 57,1 ml Eises-sig 96 %, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8), 1 l MilliQ Wasser
RNA und DNA	Quantiscript Reverse Transkrip-tase	QIAGEN®, Deutschland
	5 x Reverse Transkriptase Puffer/Primer Mix	QIAGEN®, Deutschland

	7 x gDNA Wipeout Puffer	QIAGEN®, Deutschland
	2 x QuantiFast® SYBR Green PCR Master Mix	QIAGEN®, Deutschland
	10 x QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN®, Deutschland
	TBP (TATA binding protein)	Applied Biosystem, USA
	10 x Puffer Tango	Fermentas, Deutschland
	Restriktionsenzym Eco72I 10 U/µl	Fermentas, Deutschland
	Albumin bovine serum (BSA)	SIGMA, Deuschland
	Polysorbat	Tween® Applichem, Deutschland
	Trypanblau	Invitrogen
Medikamente	Imipramine hydrochloride ≥98%	SIGMA ALDRICH
	Paroxetine-hydrochloride-hemihydrate ≥98%	SIGMA ALDRICH
	Mirtazapine ≥98%	SIGMA ALDRICH
	Epigallocatechin gallate (EGCG) von Grüntee ≥95%	SIGMA ALDRICH

Wenn nicht anders angegeben, dann wurden die hier verwendeten Chemikalien in der Qualität zur Analyse „reinst“, „research grade“ oder in der höchsten Reinheitsstufe verwendet.

2.1.2. Verwendete Geräte

	Geräte	**Bezeichnung**	**Hersteller**
Elektrophorese	Gelelektrophorese-Kammer	Horizontalelektrophorese, Größe: 50ml, 70ml und 120ml	Scientific Support, USA
	Elektrophorese	(Power PAC 300) Verti-	Scientific Support,

		kalelektrophorese	USA
Zentrifugen	Zentrifuge	4K15C	SIGMA
	Zentrifuge	Megafuge	Heraeus Sepatech
Waagen	Präzisionswaage		Sartorius, Deutschland
Sonstige Geräte	Tischrüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Kanada
	Thermocycler		MJ-Research, Biozym, Deutschland
	Thermomixer compact	ThermoStat plus	Eppendorf, Deutschland
	UV-Transluminator		Herolab GmbH, Deutschland
	Brutschrank	37 °C, 5 % CO2	Queue®
	Absauger		KNF Aero MAT
	Mikroskop		Olympus CH-2, Japan
	ELISA-Plate-Reader	MR7000	DYNATECH Dy
	Spektralphotometer	NanoDrop ND 1000	Thermo Scientific USA
	Sterilbank	Laminar air flow	
Pipetten	Pipetten	2 µl-200 µl Pipetten	Gilson, Deutschland
	Pipetten	100 µl-1000 µl Pipetten	Abimed HT, Deutschland
	Pipetboy		IBS Inegra Biosciences
	Suspenser-Pipette	50 - 1000µl und 100 - 5000µl	Eppendorf

Sonstiges	Zählkammer	0,1 mm Tiefe 0,0025 mm2	Neubauer Optik Labor

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Material	Größe	Hersteller
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2ml	Eppendorf
Zell-Kulturflaschen	T 25 (40 ml), T75(125 ml)	Greiner
Falcons	15 ml, 50 ml	BD, Belgien
Pipetten für Pipetboy	5ml, 10ml, 25ml	Costar Stripette, USA
Pipettenspitzen	10 -5000µl	Sarstedt
Well-Platte	96 Well Platte	BD Falcon™, Frankreich
ELISA Plate-Stripes		NUNC-Immuno Modules, Dänemark
PCR Gefäße		Sarstedt AG & CO; USA
PCR Deckel		Sarstedt AG & CO; USA
HyperfilmTM ECL		GE Healthcare, Japan

Vor der Verwendung der Verbrauchsmaterialien für die Zellen, die RNA oder die Real-Time-PCR wurden die Materialien (falls nicht steril gekauft) mit einem Autoklav sterilisiert.

2.1.4. Lösungen, Puffer und Kulturmedien

2.1.4.1. Lösungen und Puffer

Lösungen	Inhalt	Hersteller
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamt-Phosphat	PAA Österreich
FCS	Fetales Kälberserum	PAA Österreich
ECL™ Western Blotting Detection Reagents		Healthcare, UK
Electron-coupling reagent	PMS (N-Methyl-Dibenzopyrazine-Methyl-Sulfat) in PBS (0,383 mg/ml)	SIGMA; Deutschland
XTT labeling reagent	XTT in RPMI 1640 ohne Phenolrot, (1mg/ml)	Applichem;

		Deutschland
50 x TAE	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig 96 %, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8), 1 l MilliQ Wasser	

2.1.4.2. Kulturmedien

Kulturmedien	Inhalt	Herstellung
Medium farblos	RPMI farblos, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin	500 ml: 50 ml FCS, 5 ml Pen./Strep., 445 ml RPMI
Medium mit Phenolrot	RPMI, 10/15 % FCS, 1% Penicillin/Streptomycin	500 ml: 50/75 ml FCS, 5 ml Pen./Strep., 445/420 ml RPMI

2.1.5. Puffer und Lösungen für den Western Blot

Puffer und Lösungen	Inhalt	Herstellung
3 x GB	3 M Tris-HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45	250 ml: 90,8 g Tris, ~ 23 ml HCl 37 %, pH auf 8,45 einstellen, 3,75 ml SDS 20 %, auffüllen auf 250 ml mit MilliQ
Kathoden Puffer	100 mM Tris, 100 mM Tricine, 0,1 % SDS	1000 ml: 12,11 g Tris, 17,92 g Tricine, 5 ml SDS 20 %, auffüllen auf 1000 ml mit MilliQ
Anoden Puffer	100mM Tris-HCl, pH 8,9	1000 ml: 12,11 g Tris, 1,9 ml HCl 37 %, pH auf 8,9 einstellen, auf 1000 ml auffüllen mit MilliQ
10xTBS	pH 7,6, Tris und NaCl	1000 ml: 24,2 g Tris, 80 g NaCl, 13,5 ml HCl 37 %, pH auf 7,6 einstellen, auffüllen auf 1000 ml mit MilliQ
TBST	10xTBS, MilliQ, 0,05 % Tween®	1000 ml: 100 ml 10xTBS, 900 ml MilliQ, 500 µl Tween®
10xBlotting Puffer	Glycin, Tris, pH 8,3 – 8,4	1000 ml: 144 g Glycin, 30,3 g Tris, pH zwischen 8,3 – 8,4 einstellen, auf 1000 ml mit MilliQ auffüllen
1xBlotting Puffer	10 % oder 20 % Methanol	500 ml: 50 ml 10xBlotting Puffer; 10 %: 400ml MilliQ und 50 ml Methanol; 20 %: 350 ml MilliQ und 100 ml Methanol
Blocking Puffer	5 % Milch	100 ml: 5 g nicht fettige Trockenmilch,

		auf 100 ml TBST auffüllen
Wet-Blot Puffer	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, 0,1 % SDS	1100 ml: 2,66 g Tris, 12,39 g Glycin, auf 1000 ml mit MilliQ auffüllen, 100 ml Methanol, 1,1 g SDS
APS	APS 10 %	0,1 g APS Puder, 1000 µl MilliQ
SDS	SDS 20 %	100 ml: 20 g SDS, auf 100 ml mit MilliQ auffüllen

2.1.6. Verwendete „Kits“

Kits	Hersteller
RNeasy Mini Kit	QIAGEN®
ELISA-DuoSet BDNF	R&D
ELISA-DuoSet proBDNF	R&D
DNA Mini Kit	QIAGEN®
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche
QuantiTect Reverse Transkriptions Kit	QIAGEN®
QuantiTect Primer Assays	QIAGEN®
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific

2.1.7. Primer für PCR und Real Time PCR

	Primer	Hersteller
PCR	Primer BDNF 196-f: 5’-actctggagagaatgg-3’	Biomers, Deutschland
	Primer BDNF 196-r: 5’-actactgagccctgga-3’	Biomers, Deutschland
Real Time PCR	Hs_BDNF_1_SG_QuantiTect Primer Assay Hs_CHL1_1_SG_QuantiTect Primer Assay Hs_TBP_1_SG QuantiTect Primer Assay ?	QIAGEN®

2.1.8. Antikörper für Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
CHL1 (C-18) goat polyclonal IgG	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-goat IgG-Peroxidase, antibody produced in mouse Clone GT-34	1:40 000	Sigma
Anti-Actin clone C4 (mouse monoclonal)	1:500	Milipore

Anti mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked F(ab´)2 fragment (from sheep)	1:10 000	GE Healthcare, UK

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturen und Nährmedien

Alle Zellversuche wurden unter einer Sterilbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die LCLs wurden von der MARS-Studie gewonnen. Der Ethikantrag wurde der Ethikkomission der Medizinischen Fakultät der LMU München gestellt, das positive Votum unter der Projektnummer 318/00 wurde am 26.03.2001 erteilt. Die Generierung von Zelllinien wurde über ein Amendment begutachtet, für das am 29.03.2007 ein positives Votum erteilt wurde.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei den LCLs um eine Zellsuspension. Diese Zellen können nach Belieben in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut werden. Eingefroren wurden sie mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) und 10%igem Medium. Das Auftauen musste zügig im Wasserbad erfolgen. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 15 %igem Medium mit Phenolrot, ein pH-Indikator, angezüchtet, so lange bis genügend Zellen in einer Flasche vorhanden waren, um diese zu teilen und dann weiter in 10%igem Medium mit Phenolrot zu kultivieren. Die Zellen sollten in einer Zellkulturflasche mit 10%igem Medium eine Zellkonzentration zwischen 500.000 – 2.000.000 Zellen/ml aufweisen. Die besten Wachstumsbedingungen wurden in einem Inkubator mit 37°C und 5 % CO_2 in stehender Position geschaffen. Etwa alle zwei bis drei Tage musste neues 37 °C warmes Medium mit Phenolrot in der Menge von 30 % des schon vorhanden Inhaltes der Zellkulturflasche dazu pipettiert werden, um den Zellen neue Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Wenn es zu einer guten Zellproliferation kam, konnte eine rasche Gelbfärbung des mit Phenolrot angesetzten Mediums festgestellt werden. Zur Erneuerung des Mediums wurden die Zellkulturen einmal die Woche passagiert. Hierzu wurde der komplette Inhalt der Zellkulturflasche bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett verworfen, das Zellpellet wurde mit Medium resuspendiert und in die Zellkulturflasche überführt. Die Zellkonzentration in der Flasche sollte nach einer Passage zwischen 500.000 und 750.000 Zellen/ml betragen. Das Anzüchten und Kultivieren der EBV-immortalisierten B-Lymphozyten wurde bei allen individuellen Zelllinien identisch durch-

geführt, um eine Intraindividualität so gut als möglich auszuschließen und um mit den Zellen immer in einem identischen Zellzyklus zu arbeiten. Auch wenn das Alter der Zellen laut Morag et al. keinen Unterschied zu machen scheint, wurden die Zellen maximal nur 12-mal passagiert [38].

2.2.2. Herstellung der verschiedenen Konzentrationen der Substanzen

Die Medikamentenlösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt, mit einer Präzisionswaage abgewogen und mit sterilem Wasser oder DMSO -je nach Löslichkeit- zu jeweils einer Hauptkonzentration verdünnt. Die weiteren Konzentrationen der verschiedenen Substanzen wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe hergestellt.

Tab.3: Molare Massen und benutzte Verdünnungsmittel zur Herstellung der Lösungen der Medikamente die für die Durchführung der Toxizitätsversuche mit den Lymphoblastoiden Zelllinien benutzt wurden. Epigallocatechingallat (EGCG), Dimethylsulfoxid (DMSO)

Substanz	Molare Masse in g/mol	Verdünnungsmittel
Imipramin	316,87	Wasser
EGCG	458,37	Wasser
Mirtazapin	265,35	DMSO
Paroxetin	374,83	DMSO

Wir verwendeten Imipramin als Tricyclisches Antidepressivum, Paroxetin als SSRI, Mirtazapin als NaSSA und EGCG als natürliches potenzielles Antidepressivum. EGCG hat zudem eine fördernde Wirkung auf den BDNF [58].

2.2.3. Toxizitätstest mittels eines XTT-Assays

Mit Hilfe des XTT-Assays konnte die Toxizität der Antidepressiva und des EGCGs auf die Lymphoblastoiden Zelllinien getestet werden. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Reduktion des Tetrazolium-Salzes XTT ((2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5sulfophenyl)-2H-tetrazoilium-5-carboxanilid-Salz) durch die mitochondriale Dehydrogenase in metabolisch aktiven Zellen in das orangefarbige Formazan. Nach definierter Inkubation der Zellen mit dem Tetrazolium-Salz kann die Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) mittels eines Spektrophotometers gemessen werden.

2.2.3.1. Allgemeiner Versuchsaufbau

Nach dem Warmstellen von Medium A ohne Phenolrot -damit die Färbung des pH-Indikators keinen Einfluss auf die Messung hat- und den Substanzen wurde die 96-Well-Platte vorbereitet. Dazu wurde in den am oberen und unteren Rand der Platte liegenden Wells 100 µl PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) als Verdampfungsschutz und in die dazwischenliegenden Wells am seitlichen Rand 50 µl Medium A ohne Phenolrot pipettiert. Der Rand diente als Leerwert, dieser wurde von den Werten mit Zellen abgezogen. Danach wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche -nach ausreichendem Resuspendieren, um die Zellklumpen zu lösen- mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Zur kompletten Nutzung einer 96-Well-Platte wurden 1,6 Mio. Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert, diese mit 400 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit 4 ml 37 °C warmem Medium A resuspendiert. Dies entsprach in der Well Platte 20.000 Zellen pro Well [36]. Zügig wurden 50 µl des Zelllysats in die mittleren Wells der Well-Platte pipettiert. Damit die Zellen sich an die Umgebung adaptieren konnten, wurden sie 20 Minuten in den Brutschrank gestellt. Während dieser Zeit konnten die Substanzen mit dem Medium A vorbereitet werden. Dazu wurde 247,5 µl für Imipramin, Paroxetin und EGCG Medium A in die benötigte Anzahl an Reaktionsgefäßen vorgelegt und jeweils 2,5 µl aus den entsprechenden Konzentrationen der vorgenannten Substanzen hinzupipettiert. Für Mirtazapin wurden 240 µl Medium A und 10 µl aus den jeweiligen Konzentrationen benötigt. Nach kurzem Homogenisieren mit einem Laborrüttler der verdünnten Konzentrationen konnte anschließend 50 µl des Substanzgemisches in das jeweilige Well pipettiert werden. Dies erfolgte pro Konzentration viermal, am Rand der Leerwert und in der Mitte die Zellen, sodass man zur Auswertung Tripletts verwenden konnte. Jeweils in die erste Reihe und die letzte Reihe mit Zellen wurden 50 µl Gemisch aus Medium und Verdünnungsmittel (DMSO oder steriles Wasser) zu gleichen Teilen wie bei den Substanzen dazupipettiert. Diese zwei Reihen dienten später als Nullwert. Danach wurden die Platten für 72 Stunden im Inkubator bei 37°C, 5 % CO_2 inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 98 µl des licht- und wärmeempfindlichen Electron-Coupling-Reagent mit 4,9 ml XTT-Reagent gemischt und zügig innerhalb von fünf Minuten auf die komplette Platte pipettiert. Nach der Inkubationszeit konnte die Absorption wie oben beschrieben gemessen werden.

2.2.3.2. Etablierung

Einige Etablierungsversuche für die XTT-Assays mit Patienten-LCLs wurden mit einer Zelllinie eines gesunden Probanden durchgeführt. Diese wurde nicht in die Auswertung mit einbezogen. Durch mehrmaliges Wiederholen des Versuchs mit verschiedenen Konzentrationen mit der Zelllinie des gesunden Probanden konnte der ungefähre Bereich der IC50 jeder Substanz ermittelt und daraus die zu benutzenden Konzentrationen für den Phänotypisierungsversuch festgelegt werden. Hierbei mussten mindestens 3 Konzentrationen im Bereich zwischen 20 und 80 % liegen, damit die IC50 berechnet werden konnte.

Dauer der Inkubation mit XTT

Um die Absorption des orangen Formazan zu messen (und damit die Menge der lebenden Zellen), wurde eine ideale Inkubationszeit nach Auftragen des XTT-Reagenz von 6 Stunden ermittelt. (Abb. 3) Dabei lagen die höchsten Absorptionswerte zwischen 1 und 1,5. Bei allen künftigen Versuchen mit Patienten-LCLs wurde diese Zeit eingehalten.

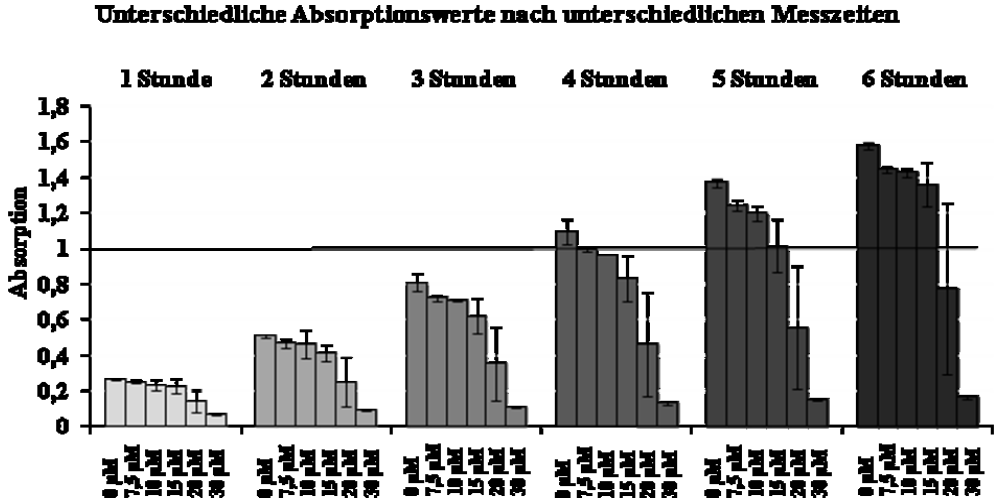

Abb.3: Ermittlung der Dauer der Inkubationszeit nach Tetrazolium-Salz-Zugabe: Unterschiedliche Absorptionswerte einer Lymphoblastoiden -Zelllinie nach unterschiedlicher Dauer der Inkubation und unterschiedlichen Konzentrationen von Paroxetin, zur Ermittlung der Inkubationsdauer nach XTT-Zugabe, ein Tetrazolium-Salz. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012)

Personenabhängige Abweichungen der Messergebnisse

Die Versuche sollten, um reproduzierbar zu sein, von verschiedenen Personen durchführbar sein und ähnliche Ergebnisse liefern. Mit sechs Patienten-Zelllinien aus der MARS Studie wurde untersucht, ob große Unterschiede bestehen, wenn verschiedene Personen diese Versuche durchführen. Dazu wurden die Versuche mit den schon etablierten Konzentrationen der Substanzen und den sechs Zelllinien durch zwei Personen jeweils dreimal durchgeführt. Die Abb. 4 zeigt die von zwei Personen durchgeführten XTT-Versuche. Es zeigen sich kleinste Abweichungen, die jedoch keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

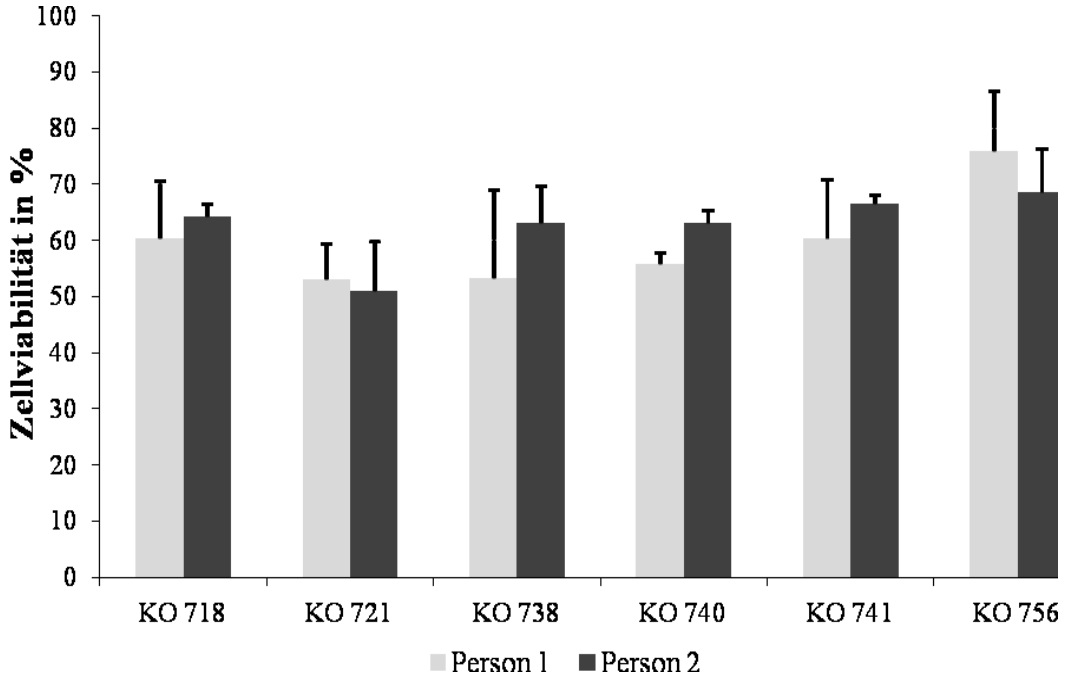

Abb.4: Ermittlung personenabhängiger Abweichungen der Messergebnisse: Die Balken zeigen die Ergebnisse der Toxizitätsversuche von sechs Lymphoblastoiden - Zelllinien mit Paroxetin - Inkubation, durchgeführt von zwei Personen. In dem Graphen werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen jeder Versuche einer Zelllinie angezeigt. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012)

Zeitabhängige Abweichungen der Messergebnisse

Um die Zelllinien der Probanden untereinander vergleichen zu können, sollte jede Zelllinie gleich behandelt werden. Die Anzahl der Tage nach einer Passage oder der Fütterung macht, wie die Abb. 5 zeigt, einen Unterschied. Mit zwei Zelllinien aus der MARS Studie

wurde untersucht, ob die Zeit nach einer Passage ausschlaggebend in Bezug auf die Stabilität des Versuchs ist. Dazu wurde jeweils ein XTT am zweiten Tag, am dritten Tag und am vierten Tag nach einer Passage durchgeführt. Bei Imipramin ließen sich die größten Schwankungen erkennen, wenn die Zellen an unterschiedlichen Tagen nach einer Passage für ein XTT verwendet wurden. Bei Paroxetin war eine Tendenz zu erkennen. Bei Mirtazapin und EGCG schien die Anzahl der Tage nach einer Passage keinen Unterschied zu machen.

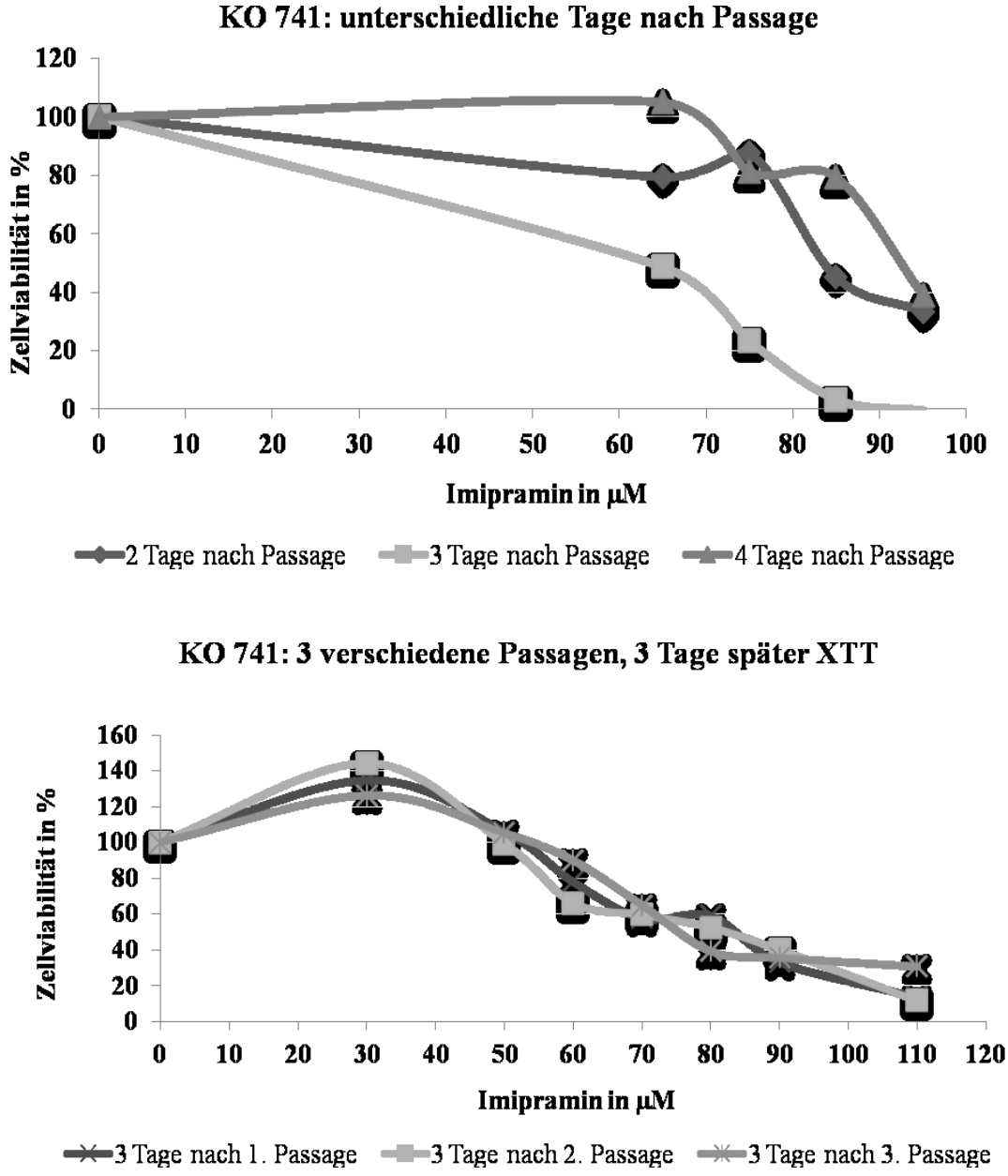

Abb.5: Abhängigkeit des Durchführungszeitpunktes des Toxizitätstests mit Imipramin nach verschiedenen Tagen nach einer Passage an einer Lymphoblastoiden-Zelllinie: An den verschiedenen Tagen der Versuche ließ sich ein Unterschied der Variabilität erkennen. So war die Variabilität an verschiedenen Tagen nach einer Passage höher (oben) als nach jeweils drei Tagen nach verschiedenen Passagen (unten). (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012)

2.2.3.3. Phänotypisierung

Um die Individualität der einzelnen Zelllinien besser zu zeigen, wurde dieser immer am dritten Tag nach einer Passage durchgeführt und jeweils dreimal wiederholt. Pro Well wurden 20.000 Zellen pipettiert. Nach 72 Stunden Inkubation der Zellen mit den Medikamenten wurde das Tetrazolium-Salz dazugegeben. Nach erneuter Inkubationszeit von 6 Stunden wurden die Absorptionen mit einem Spektrometer gemessen.

2.2.4. Genotypisierung

2.2.4.1. DNA Extraktion aus Lymphoblastoiden Zelllinien

Da die ererbte individuelle Genmasse weitgehend von den Lymphoblastoiden Zelllinien repräsentiert wird [66], wurde direkt aus ihnen die DNA extrahiert. Die DNA-Isolation erfolgte gemäß dem Protokoll des QuiAmp® DNA Mini Kits. Bei diesem Verfahren wird die Mikrosäulenzentrifugationstechnik in Kombination mit der selektiven Bindungsfähigkeit einer Silikagel-Membran ausgenutzt. Hierzu wurden fünf Mio. Zellen aus der Zellkulturflasche entnommen, bei 400 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, mit 200 µl PBS resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Unter reinen, DNA-armen Bedingungen wurden 20 µl Qiagen-Protease und 200 µl AL-Puffer hinzupipettiert, kurz mit Hilfe eines Laborrüttlers homogenisiert und für zehn Minuten bei 56 °C -zur besseren Ausbeute der DNA- inkubiert. Die Protease dient zur Denaturierung der noch vorhandenen Proteine, der AL-Puffer lysiert die LCLs. Nach kurzem Zentrifugieren konnten durch Zugabe von Ethanol (96-100 %) und 15 Sekunden Schütteln mittels Laborrüttler Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Molekülen und OH-Silikat-Atomen der Silikagel-Membran ausgebildet werden. Die DNA bindet auf diese Weise nach Überführen in eine QIAmp-Mini-spin Säule selektiv und kann so von Proteinen und RNA getrennt werden, da diese später bei der PCR stören können. Danach wurde die DNA erneut mit 500 µl AW1 Puffer gewaschen und mit einer Minute bei 6000 g zentrifugiert, um die restlichen Proteine zu entfernen. Mit 500 µl AW2 Puffer und mit drei Minuten bei 20.000 g Zentrifugieren wurde das Ethanol entfernt. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß befördert und die DNA mit 200 µl AE Puffer nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur aus der Säule gewaschen. Um eine bessere Ausbeute zu erhalten, wurde der Schritt wiederholt. Die DNA wurde bei 4 °C kühl gelagert.

2.2.4.2. Messung der Reinheit und Menge der DNA

Die Reinheit und die Menge der DNA wurden mit dem NanoDrop® ND 1000 Spektralphotometer (FA Thermo Scientific) durchgeführt, dessen Prinzip auf der Absorptionsmessung bei 260 nm zur Mengenbestimmung der DNA basiert. Zur Reinheitsmessung muss zusätzlich bei einer Absorption von 280 nm gemessen werden. Eine Absorption von eins entspricht 50 ng/µl DNA. Die Reinheit berechnet sich aus dem Quotienten der Messungen von 260 nm und 280 nm. Dieser lag bei den DNA-Proben dieser Versuche zwischen 1,92 und 2,08.

2.2.4.3. Genotypisierung des BDNF Polymorphismus Val66Met (rs6265) mittels PCR

Die Genotypisierung des BDNF-Polymorphismus wurde mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR), Verdau mit Restriktionsendonukleasen sowie Auftrennung durch Gelelektrophorese durchgeführt. Die PCR dient der Vervielfältigung von genau definierten DNA-Sequenzen. Sie setzt sich aus der Denaturierung der DNA, der Bindung der spezifischen Primer (Annealing) und der Vervielfältigung der DNA (Amplifikation) zusammen. Die unterschiedlich langen PCR-Fragmente können nach dem Verdau mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt und sichtbar gemacht werden.

Die bei -20 °C gelagerten Reagenzien wurden in einem Wärmebad aufgetaut und der PCR-Mastermix, wie in Tab. 4, für alle Proben in einem Gefäß hergestellt. Die Taq-Polymerase musste zügig zu dem Mastermix pipettiert werden, da sie bei Raumtemperatur instabil wird. Danach wurden 40 µl Mastermix pro Probe auf die PCR-Platte verteilt. Um die Kontamination der genomischen DNA zu vermeiden, wurden 2 µl der DNA kurz vor dem Cyclerstart und auf einem speziell dafür ausgestatteten Platz zugegeben. Der gesamte Vorgang wurde auf Eis pipettiert, damit es nicht zu unerwünschten Enzymreaktionen kommen konnte. Nach Homogenisierung auf einem Laborrüttler und Zentrifugieren des gesamten Reaktionsansatzes wurde die PCR-Platte in den schon auf 94 °C vorgewärmten Cycler gelegt. Dieses zügige Erhitzen verhinderte eine Kontamination durch unspezifische Amplifizierung durch die DNA-Polymerase.

Tab.4: Pipettierschema des PCR-Mastermix für die Genotypbestimmung des *BDNF*-Val66Met Polymorphismus: Die gesamte zu pipettierende Mastermix-Menge für einen Versuch-Ansatz wurde durch Multiplikation der Anzahl der Proben mit der Menge pro Probe ermittelt. Polymerasekettenreaktion (PCR), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), Valin (Val), Methionin (Met), Dimethylsulfoxid (DMSO), Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)

Reagenzien	**Menge pro Probe**
Wasser (steril)	30,6 µl
10*Puffer (Invitrogen)	4,0 µl
DMSO	2,0 µl
$MgCl_2$	1,2 µl
dNTPs (2mM)	1,0 µl
BDNF 196-f (10µM)	0,5 µl
BDNF 196-r (10µM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (Invitrogen 5 U/µl)	0,2 µl

Die drei Schritte (Denaturierung, Annealing und Amplifikation) mussten 35-mal wiederholt werden (Tab. 5). Damit stieg die Menge der DNA exponentiell an. Zur Überprüfung, ob DNA auch amplifiziert wurde, wurde die Probe auf ein 2,5 %iges Agarosegel (70 ml TAE Puffer, 1,75 g Agarose) aufgetragen und mittels einer Elektrophorese 30 Minuten bei 120 Volt aufgetrennt. Die Größe der DNA wurde mittels einer 50 bp DNA-Leiter kontrolliert. Das DNA-Fragment wies eine Größe von 171 bp auf.

Tab.5: Cyclereinstellung für die PCR zur Genotypbestimmung des *BDNF*-Val66Met Polymorphismus: Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), Valin (Val), Methionin (Met), Polymerasekettenreaktion (PCR)

Cyclerprogramm		
2 Minuten	94°C	
35 mal		
40 Sekunden	94°C	Denaturierung
40 Sekunden	58°C	Annealing
2 Minuten	72°C	Amplifikation
3 Minuten	72°C	

Anschließend wurde das DNA-Fragment mit Hilfe des Enzyms Eco 721 geschnitten. Dafür wurden 10 µl des Enzymmastermix (Tab. 6) und 10 µl des PCR-Produkts in eine PCR-Platte gemixt und für 16 Stunden bei 37 °C verdaut.

Tab.6: Pipettierschema des Enzymmastermix für den Verdau der PCR-Produkte, zur Bestimmung des *BDNF*-Val66Met Polymorphismus: Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), Valin (Val), Methionin (Met), Polymerasekettenreaktion (PCR)

Reagenzien	**Menge pro Probe**
Wasser (steril)	7,0 µl
Puffer Tango	2,0 µl
Enzym Eco 721	1,0 µl

Das so entstandene DNA-Gemisch wurde auf ein 3 %iges Agarosegel (70 ml TAE Puffer, 2,1 g Agarose) aufgetragen und bei 100 Volt 90 Minuten in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt. Für die Größenbestimmung der Fragmente lief eine 50 bp DNA-Leiter mit. Das Ergebnis wurde nach 20 Minuten Einlegen des Agarosegels in einer Ethidiumbromidlösung (Ethidiumbromid 100 mg/ml, Milli-Q, TAE-Puffer) mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht. Mittels der entstandenen unterschiedlich großen Fragmente wurden die drei Genotypen bestimmt (Tab.7).

Tab.7: Auswertung der möglichen Val66Met Polymorphismen im *BDNF*-Gen: Val/Val ist die Wildtypvariante. Guanin (G); Adenosin (A); Valin (Val); Methionin (Met); Basenpaare (bp), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), Valin (Val), Methionin (Met)

Genotyp	GG	GA	AA
Phänotyp	Val/Val	Val/Met	Met/Met
Muster (bp)	- 99 72	171 99 72	171 - -

2.2.5. Genexpressionsanalyse

Die Basal-Expressionsrate von *BDNF* und *CHL1* der Lymphoblastoiden Zelllinien wurde mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt, diese Methode basiert auf dem gleichen Prinzip wie die PCR. Allerdings können durch die Echtzeit-PCR Rückschlüsse über die Menge der RNA, also die Expressionsrate, gezogen werden. Die RNA muss hierfür in

die cDNA umgewandelt werden. Nach jeder Amplifikation wurde die jetzt doppelsträngige cDNA mit Hilfe von SYBR-Green - ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff -, welches fluoresziert wenn es sich an die doppelsträngige cDNA einlagert und mit Licht angeregt wird, sichtbar gemacht und konnte so gemessen werden. Nach der Herstellung der cDNA und Vorbereitung der Platte wurden die ständigen Messungen nach jedem PCR-Zyklus von dem „LightCycler“ von Roche durchgeführt.

2.2.5.1. RNA Extraktion aus den Lymphoblastoiden Zelllinien

Die RNA wurde an dem gleichen Tag isoliert, an dem auch die XTT Versuche angesetzt wurden, um die Empfindlichkeit der LCLs auf die Wirkstoffe und RNA-Expression vergleichen zu können. Die Extraktion wurde gemäß des RNeasy-Mini-Kit-Protokolls von Qiagen durchgeführt: 5 Mio. Zellen wurden fünf Minuten bei 400 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und direkt mit 350 µl RLT-Gemisch (5 ml RLT und 50 µl 2-Mercaptoethanol) zur Zelllyse resuspendiert und auf einem Laborrüttler homogenisiert. Das entstandene Zelllysat wurde direkt auf die Säule des QIAshredder pipettiert und bei höchster Beschleunigung zentrifugiert, dadurch kam es zur Homogenisierung der Probe durch Trennung der genomischen DNA von der Probe und Reduzierung der Viskosität des Lysats. So konnte eine bessere Bindung der RNA an die Silikagel-Membran gewährleistet werden. Nachdem 350 µl 70 %iges Ethanol zu der Probe hinzugefügt und leicht mit der Pipette gemischt worden war, wurde das Gemisch auf eine RNeasy-Spin-Säule gegeben. Dort konnte die RNA mit Hilfe des Ethanols selektiv an die Membran binden. Durch 15 Sekunden bei 8000 g Zentrifugieren wurde das Ethanol verworfen. Es folgte ein Waschschritt mit 350 µl RW1-Puffer um anschließend die restliche DNA mit einer DNase abzubauen. Dafür musste 80 µl DNase Inkubationsmix aus 10 µl DNase-I-stock-solution und 70 µl RDD-Puffer hergestellt werden, der dann auf die Säule pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach weiteren drei Waschschritten mit einmal 350 µl RW1 Puffer und zweimal 500 µl RPE Puffer, bei denen Salze, Proteine und andere zelluläre Bestandteile von der Membran gewaschen wurden, wurde die RNeasy-Spin-Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch RNase freies Wasser von der Membran durch drei minütige Inkubation bei Raumtemperatur und einminütige Zentrifugierung bei 8000 g abgelöst. Um eine bessere Ausbeute der RNA zu erhalten, wurde das

Eluat erneut auf die Spin-Säule pipettiert und der letzte Schritt wiederholt. Die RNA wurde bei -70 °C gelagert.

2.2.5.2. Messung der Reinheit und Menge der RNA

Reinheit und Menge der RNA wurden wie bei der DNA mit dem NanoDrop® ND 1000 gemessen. Hierbei entspricht ein Wert von eins einer RNA-Menge von 40 ng/µl. Der Quotient zur Messung der Reinheit von 260 und 280 nm lag zwischen 1,8 und 2,1.

Zur weiteren Bestimmung der Reinheit der RNA wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. 1 µl der isolierten RNA wurde mit 10 µl sterilem Wasser verdünnt, nach Anfärbung mit 2 µl Bromphenolblau auf ein 1 %iges Agarosegel -versetzt mit 5 µl Ethidiumbromid- aufgetragen und bei 110 Volt 15 Minuten laufen gelassen. Anschließend wurden die Banden mit Hilfe einer UV-Lampe sichtbar gemacht. Es sollten auf dem Gel zwei Banden zu sehen sein. (Abb. 6). Die obere Bande zeigt die 28s RNA und die kleinere untere Bande die 18s RNA. Die 5s RNA ist meist nicht sichtbar. Unreine RNA wurde verworfen

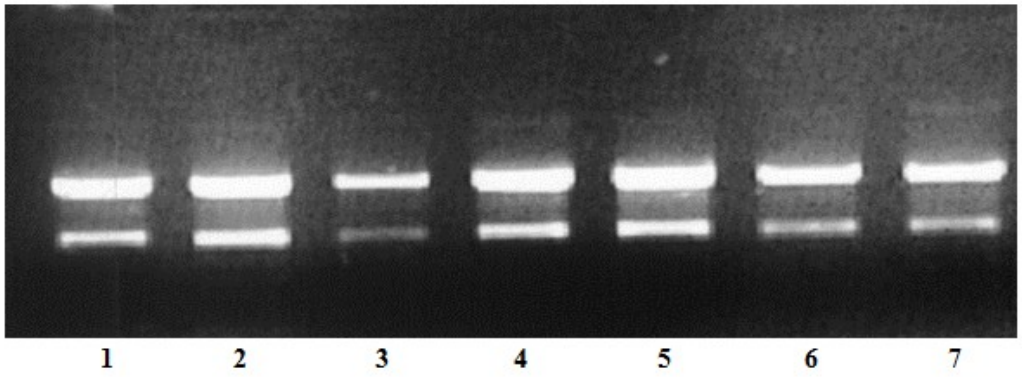

Abb.6: Reinheitsmessung der Ribonukleinsäure (RNA) mittels Gel-Elektrophorese am Beispiel von sieben Lymphoblastoiden-Zelllinien: die obere Bande zeigt die 28s RNA, die untere die 18s RNA. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012)

2.2.5.3. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zur Analyse der Genexpression mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR wurde die RNA zur komplementären DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde die Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) des QuantiTect Reverse Transkriptions-Kit der Firma Qiagen zur Katalysierung der Reaktion verwendet. Zur Bindung der Reversen Tran-

skriptase (RT) wurde der RT Primer Mix und der Transkriptase-Puffer, der dNTPs (Desoxyribunukleotidtriphosphate) enthält und die PCR optimiert, des Kits verwendet. Die Durchführung wurde permanent auf Eis durchgeführt. Zuerst wurde der Mastermix, der aus dem RT-Primer-Mix und dem Puffer in eins zu vier Verdünnung besteht, hergestellt. Von diesem Mix wurden pro Probe 5 µl in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Dazu kam pro Probe 1 µl Reverse Transkriptase. Dies wurde dann vorsichtig mit der Pipette vermischt, kurz zum besseren Vermischen geschüttelt und zentrifugiert. Da die RNA und der RNA-Mix –als Positivkontrolle- sehr instabil sind, wurden sie auf Eis gelagert. In die Wells einer PCR-Platte wurde so viel RNase-freies Wasser pipettiert, dass mit Zugabe der berechneten Menge an RNA-Probe eine RNA Konzentration von 1 µg/µl bestand und 12 µl Verdünnung pro Well entstand. Für die Eliminierung der DNA in den RNA-Proben wurden 2 µl Wipeout Puffer hinzugegeben. Dieser diente dazu, Kontaminationen von genomischer DNA, die bei der DNase-Reaktion bei der RNA-Isolation nicht vollständig entfernt wurden, zu eliminieren. Dieses Gemisch wurde jetzt bei 42 °C für zwei Minuten in den Thermocycler inkubiert, danach wurde es zügig auf 7 °C herunter gekühlt und dann auf Eis gelegt. Zu dem Produkt wurden nun 6 µl des zu Anfang gemixten Mastermix pipettiert. Für weitere 15 bis 30 Minuten wurden die Proben wieder in den Thermocycler bei 42 °C gestellt und am Ende zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase drei Minuten auf 95°C erhitzt. Danach konnten die Proben in 0,5 ml große Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert werden. Erhalten wurden 20 µl DNA mit einer Konzentration von 50 ng/µl.

2.2.5.4. Quantitative Real-Time-PCR

Die eigentliche Real-Time-PCR wurde mit dem QuantiTect-Reverse-Transcription-Kit der Firma Qiagen® durchgeführt. Um eine Kontamination zu vermeiden, arbeiteten wir unter einem Abzug. Die cDNA Proben wurden auf Eis aufgetaut, und die Primer für die zu untersuchenden Genexpressionsraten des *BDNF*- und *CHL1*-Gens und der Primer für das Housekeeping-Gen *TBP* (TATA-box binding protein) vorbereitet und bei -20°C gelagert. *TBP* ist ein konstitutiv exprimiertes Gen, das unabhängig von äußeren Einflüssen, Zelltyp und Zellstadium exprimiert wird. Für *BDNF*, *CHL1* und *TBP* wurde jeweils so viel SYBR Green Mastermix aus dem Kit und Primer in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß zusam-

menpipettiert, dass pro zu untersuchende Probe 6,25 µl Mastermix und 1,25 µl Primer entstanden. Die Menge an RNase freiem Wasser, die zusätzlich zu dem oben gemischten Mix hinzukam, wurde aus der Menge der zu untersuchenden cDNA berechnet, so dass am Ende pro Probe 12,5 µl Gesamtvolumen entstand.

Tab.8: Pipettierschema für die Real-Time-PCR in Abhängigkeit von der cDNA Menge pro Probe, Polymerasekettenreaktion (PCR)

Reagenzien	Mengen für 50 ng/µl cDNA	Mengen für 100 ng/µl cDNA
Mastermix	6,25 µl	6,25 µl
Primer	1,25 µl	1,25 µl
Wasser	4 µl	3 µl
cDNA	1 µl	2 µl
Gesamt	12,5 µl	12,5 µl

Das Gemisch für die zu untersuchende Genexpression und für das Housekeeping-Gen *TBP* wurde auf die Platte verteilt und die zu untersuchende cDNA sowie eine Negativprobe in Dubletten dazupipettiert. Danach konnte die Platte in das Gerät gelegt werden. Die Einstellungen und die Belegung der Platte wurden in den Computer eingegeben.

Tab.9: Computereinstellungen für die Real-Time-PCR, Polymerasekettenreaktion (PCR)

Schritt	Dauer	Temperatur
PCR Initiationsschritt	5 min	95 °C
Zyklen		
Denaturierung	10 sec	95 °C
Annealing/Amplifikation	30 sec	60 °C
Anzahl der Zyklen: 40 (von Menge der cDNA abhängig)		

2.2.6. Proteinanalyse mittels ELISA und Western Blot

Zum Nachweis und Messung der Proteine wurde für BDNF und ProBDNF die Sandwich-ELISA-Technik verwendet. Der Western Blot wurde für den Nachweis des CHL1 genutzt. Die ELISA - Technik beruht auf der Antiköper–Antigen–Antikörper–Bindung. An diesen Komplex bindet ein Substrat, das durch Farbumschlag den Nachweis des Antigens, hier BDNF oder ProBDNF, erbringen kann. Zuerst wurde der Nachweis aus dem Medium der

Zellen versucht. Da der Proteingehalt im Medium außerhalb der Nachweisgrenze lag, wurden die Zellen lysiert und deren intrazellulärer Gehalt gemessen.

Bei der Western Blot Methode werden die Proteine mit Hilfe einer Gelelektrophorese (Polyacrylamid Gele) durch ihre Größen in Proteinbanden aufgetrennt und später auf eine Trägermembran durch Elektrotransfer übertragen. Danach können die Banden auf einem Entwicklerfilm sichtbar gemacht werden.

2.2.6.1. Intrazelluläre Proteinextraktion aus den Lymphoblastoiden Zelllinien

Zur Bestimmung der intrazellulären Proteinwerte zu Beginn der Phänotypisierungsversuche wurden die Zellen am gleichen Tag lysiert und aus der gleichen Zellkulturflasche entnommen. Zu Anfang wurde eine RIPA-Mischung (Radioimmunoprecipitation assay), die zur Lyse der Zellen benötigt wurde, hergestellt. 500 µl RIPA enthielt 5 µl Proteaseinhibitor und 10 µl Phosphataseinhibitor. Das RIPA und der Phosphataseinhibitor wurden auf Eis, der Proteaseinhibitor bei Raumtemperatur aufgetaut. Um genügend Protein für den Western Blot, das Immunoassay und die Micro BCA zu erhalten, wurden 18 Mio. Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß entnommen, zentrifugiert mit 400 g, der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 5 ml kaltem PBS resuspendiert (phosphatgepufferte Salzlösung). Alle Zentrifugierungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach Absaugen des PBS kam 900 µl RIPA-Mischung hinzu, dies entspricht 1 Mio. Zellen in 50 µl RIPA-Mischung. Die Zellen wurden dann 30 Minuten auf Eis inkubiert, zwischendurch auf einem Laborrüttler homogenisiert und 15 Minuten im Ultraschallbad lysiert. Nach Überführen der lysierten Zelllinien in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß wurden diese bei 24 Tsd. g fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde danach auf neue 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, je drei Reaktionsgefäße mit 270 µl für die ELISA-Versuche, eines mit 80 µl für den Western Blot und ein weiteres mit mind. 10 µl für die Micro BCA. Die Proteinproben wurden bei -80°C eingefroren.

2.2.6.2. Gesamtproteinbestimmung mittels Micro BCA

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den Zellen wurde mit Hilfe des Micro BCA™ Protein Assay Kits der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Dieses Kit basiert auf der Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (Bicinchoninic acid, BCA). Der

komplette Versuch wurde auf Eis durchgeführt. Die Standardherstellung wurde mit der RIPA-Mischung, die auch als Puffer der Proben diente, in einer Verdünnungsreihe hergestellt. Die höchste Konzentration war 1 mg/ml, die niedrigste 0,031 mg/ml.

Wir führten die Micro BCA aus jeder ELISA-Probe parallel zur ELISA-Versuchsdurchführung durch, und für den Western Blot aus den dafür aliquotierten Proteinproben. Die Proben wurden mit Milli-Q-Wasser 1:5 und 1:10 verdünnt. Die BCA-Lösung wurde aus 50 Teilen von Lösung A, 48 Teilen von Lösung B und zwei Teilen von Lösung C hergestellt. Dann wurde die unsterile 96 Well Platte vorbereitet, indem 90 µl Milli-Q-Wasser in jedes gebrauchte Well pipettiert wurden. Mit jeweils 10 µl wurden die Standards und die verdünnten Proben in die Wells hineingegeben. Für den Nullwert wurden 10 µl Wasser in ein Well pipettiert. Zum Schluss wurden 100 µl der zuvor gemischten BCA-Lösung in jedes Well getan und die Platte im 37°C warmem unsterilen Brutschrank zwischen 30 Minuten und zwei Stunden inkubiert. Durch die Inkubation kam es zu einem Farbumschlag, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einem Spektrophotometer gemessen werden konnte.

2.2.6.3. Bestimmung des BDNF- und ProBDNF-Gehaltes mittels ELISA

Die quantitative Proteinbestimmung aus dem Überstand der Zellen als auch der intrazelluläre Gehalt wurden mittels ELISA Duo Set Kits für BDNF und ProBDNF der Firma R&D durchgeführt. Diese Kits enthalten Antikörper, die an die Antigene BDNF bzw. ProBDNF selektiv binden. Der Capture- und der Detection- Antikörper sowie der Standard wurden nach Protokoll vorbereitet, aliquotiert und gelagert bei -20°C. Der Versuchsaufbau war für beide Antigene identisch. Die Inkubationsschritte liefen alle bei Raumtemperatur ab.

Über Nacht wurde die ELISA Platte mit dem Capture Antikörper inkubiert, damit dieser an die feste Phase binden kann. Hierzu wurden die Aliquots mit 27,7 µl des Capture Antikörpers mit 5 ml PBS verdünnt und mit 100 µl in jedes Well verteilt. Die Platte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt.

Nach der Inkubation wurde der Antikörper ausgewaschen. Dazu wurde ein Waschpuffer verwendet, der aus 0,05 % Tween® (Polysorbat) in PBS besteht (500 ml PBS, 250 µl Tween®). Nach Ausklopfen des Antikörpers wurden die Wells dreimal mit dem Waschpuf-

fer gewaschen und auf Papier ausgeklopft. Dieser Waschschritt erfolgte nach jeder noch folgenden Inkubation. Anschließend musste jedes Well mit Hilfe von 300 µl Inkubationspuffer (1 % BSA (Bovines Serum Albumin) in PBS: 50 ml PBS, 0,5 g BSA) eine Stunde geblockt werden. Vor dem nächsten Schritt musste der Standard in einer Verdünnungsreihe hergestellt werden. Für die Proteinbestimmung im Überstand nahmen wir den Inkubationspuffer. Da bei den intrazellulären Proben RIPA als Grundlage diente, mussten wir die Standardverdünnungsreihe mit RIPA verdünnen. Um sicherzugehen, dass RIPA keinen zu großen Einfluss auf die Antikörper aufwies, führten wir einmalig einen ELISA mit Standards verdünnt mit dem Inkubationspuffer - laut Protokoll - und verdünnt mit RIPA durch.

100 µl der Standards und Dubletten der unverdünnten Proben wurden in die geblockten Wells überführt und abgeklebt und so für weitere zwei Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle benutzten wir den Inkubationspuffer oder RIPA je nach Verdünnung der Standards und der verwendeten Proben. Als nächster Schritt folgte die Verwendung des Detections-Antikörpers, der sich an die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe anheftet. Die aliquotierten 27,7 µl Detection-Antikörper wurden mit 5 ml Inkubationspuffer verdünnt, 100 µl auf jedes Well verteilt und weitere zwei Stunden inkubiert. Danach wurde die 1:200 verdünnte Streptavidin-HRP-Lösung (Horseradish Peroxidase konjugiertes Streptavidin), das die Meerrettich-Peroxidase als Reporterenzym enthält, für exakt 20 Minuten im Dunkeln in Wells getan. Nun folgte der wichtigste Waschschritt, da das Streptavidin vollständig ausgewaschen werden musste. Danach kamen 100 µl Peroxid-haltige Substrat-Lösung (1:1 Reagent A und B; 2,5 ml A + 2,5 ml B) in jedes Well hinzu. Nach 20 bis 40 minütiger Inkubation im Dunkeln konnte ein Farbumschlag beobachtet werden. Als alle Konzentrationen der Standards einen Farbumschlag aufwiesen, musste die Reaktion mittels 50 µl 2-N Schwefelsäure gestoppt werden. Dabei kam es zu einem erneuten Farbumschlag von blau zu gelb, dessen Absorption bei 450 nm mit einem Spektrophotometer (ELISA-Plate-Reader) gemessen werden konnte.

2.2.6.4. Bestimmung des CHL1 -Gehaltes mittels Western Blot

Für die Vorbereitung des Western Blots zum Nachweis der Proteine in den Lymphoblastoiden Zelllinien wurde ein Polyacrylamid-Gel gegossen, das aus zwei Komponenten besteht: Das „Stacking-Gel“, welches die Proteine einer Probe kumuliert und die verschiede-

nen Proben in eine Reihe überführt, und das „Separating-Gel“, das die Proteine in ihrer Größe auftrennt.

Tab.10: Pipettierschema der Gele für die Proteinauftrennung für den Western Blot; Gel Buffer (GB); N,N-methylenebisacrylamide (BIS); Ammonium Persulfat (APS), Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Reagenzien	**„Stacking-Gel“ 4 %ig**	**„Separating-Gel“ 6 %ig**
3 x GB	6 ml	2,67 ml
BIS 30 %	2,4 ml	1,6 ml
Glycerol 50 %	-	1,68 ml
MilliQ-Wasser	9,48 ml	2 ml
APS 10 %	112 µl	50 µl
TEMED	18 µl	6,5 µl

Die Gele wurden nach dem Pipettierschema aus Tabelle 10 hergestellt, wobei APS (Ammonium Persulfat) 10 % und TEMED (Tetramethylethylendiamin) zum Schluss zugeführt und daraufhin die Gelmischung zügig nacheinander in die Form gegossen werden musste. Zuerst wurde das „Separating-Gel“ hergestellt und darauf das „Stacking-Gel“ gegossen. Das Gel kam nach Trocknen in die Mitte der Elektrophorese-Kammer, die mit dem Kathodenpuffer soweit aufgefüllt wurde, bis dieser das Gel bedeckte. Im äußeren Anteil der Kammer wurde der Anodenpuffer zugesetzt. Die Proben wurden mit SLB-Gemisch (30 µl Mercaptoethanol zu 500 µl SLB) im Verhältnis 3:1 (70 µl Probe zu 35 µl SLB-Gemisch) verdünnt und bei 95 °C genau fünf Minuten inkubiert. In jede Tasche des Gels kam 70 µg Protein der einzelnen Proben für die CHL1-Messung. Die zu pipettierende Menge wurde aus den Micro-BCA Ergebnissen berechnet. In eine Tasche am Rand wurden 5 µl der bp-Leiter hineingegeben. Die Elektrophorese lief die ersten 30 - 45 Minuten bei 70 Volt ab, bis die Banden das „Separating-Gel“ erreichten, danach wurde die Spannung auf 100 Volt erhöht. Nach 60 Minuten stoppten wir die Elektrophorese.

Für den Proteintransfer, das Blotten, wurden das „Separating-Gel“ und die PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) auf einem Schüttler leicht mit dem Blotting-Puffer (100ml Wet-Blot-Puffer, 900 ml MilliQ-Wasser, 100 ml Methanol) gewaschen. Für die 135 kDa großen CHL1-Membranproteine musste in den Wet-Blot-Puffer 0,1 % SDS (So-

dium Dodecyl Sulfate) hineingemischt werden, um eine „Schweifbildung“ auf der Membran durch Verringerung der Proteinmenge zu vermeiden. Eine passend zugeschnittene PVDF-Membran musste anschließend zwei Minuten mit 100 %igem Methanol aktiviert werden. Das Gel mit den Proteinbanden wurde auf die PVDF-Membran luftblasenfrei gelegt, mit Filterpapier und speziellen Schwämmen ummantelt und in die Blottingmaschine gehängt. Diese wurde mit 4 °C kaltem Wet-Blot-Puffer befüllt. Die Dauer des Blottens wurde auf 90 Minuten festgelegt, bei 100V.

Nach dem Blotten durfte die Membran nicht mehr austrocknen. Bei allen weiteren Schritten wurde die Membran auf einem Schüttler bewegt. Um die unspezifischen Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran mit Milch gewaschen. Die Antikörper wurden mit Milch verdünnt.

Die Milch wurde mit Hilfe von TBST (TBS und Tween-20®) als Detergenzlösung entfernt und die Membran über Nacht bei 4 °C in den primären Antikörper CHL1 (C-18) goat polyclonal IgG von der Firma Santa Cruz Biotechnology inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Milch und die schwächer haftenden, unspezifisch gebundenen Antikörper mit TBST entfernt, damit anschließend der Sekundärantikörper (Anti-goat IgG-Peroxidase, antibody produced in mouse Clone GT-34 von Sigma) an den primären Antikörper während einer 45 minütigen Inkubation anbinden konnte. Nach weiteren Waschschritten, am Ende mit TBS, um das Tween-20® zu entfernen, konnte die Membran mittels ECL (Enhanced Chemoluminescence) entwickelt werden.

Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Dazu wurde die Membran mit TBST gewaschen und mit dem primären Antikörper Anti-Actin clone C4 (mouse monoclonal) von Milipore über zwei Stunden bei Zimmertemperatur benetzt. Dann kamen erneute Waschschritte mit TBST. Nach einer weiteren Inkubation bei Zimmertemperatur von ca. 45 Minuten mit dem Sekundärantikörper Anti mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked F(ab´)2 fragment (from sheep) von der Firma GE Healthcare, konnte nach weiteren Waschschritten die Membran erneut entwickelt werden.

2.2.7. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden mit Hilfe von SPSS 21 und einige mit Hilfe von Microsoft Excel berechnet und die Daten ausgewertet. Die Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman-Rho) errechnet, der für eine nichtparametrische Korrelation verwendet wird. Die lineare Regression wurde zur Bestimmung einer Beziehung einer abhängigen und einer unabhängigen Variable benutzt.

Zur Bestimmung der Signifikanz einer Übereinstimmung zweier Verteilungen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Der Kruskall-Wallis-Test fand zur Bestimmung der Signifikanz einer Übereinstimmung von mehr als zwei Gruppen Verwendung. Der Chi^2-Test wurde genutzt, um die Häufigkeit eines Merkmales in zwei Gruppen zu vergleichen, bei niedrigen Fallzahlen wurde der Exakte-Fisher-Test benutzt. Die Intra-Klassen-Korrelation (ICC) wurde zur Abschätzung der Reliabilität verwendet. Das Signifikanzniveau ist bei allen Berechnungen 0,05.

Die IC50 wurde mittels SigmaPlot aus den Kurven des Toxizitätstest ermittelt. Die Western Blot-Bilder und Genotyp-Bilder wurden mit ImageJ ausgewertet.

Die Berechnung der Genexpression wurde mittels der ΔCt-Methode durchgeführt. Dazu wurde der Ct-Wert des Housekeeping-Gens *TBP* von dem Ct-Wert des gesuchten Gens (*BDNF, CHL1*) abgezogen. Um die unterschiedliche Expression als n-fache Expression (Ratio) des Housekeeping-Gens darzustellen, wird diese in die Formel $2^{-\Delta Ct}$ eingesetzt. Die Bestimmung der Ct-Werte wurde mit Hilfe von Mehrfachbestimmung an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten

Die klinischen Daten der 33 Patientenzelllinien wurden im Zuge der MARS-Studie in München in den Jahren 2008 – 2010 bei Patienten, die an Depression erkrankt waren, erhoben. Sieben Patienten hatten eine diagnostizierte bipolare affektive Störung (ICD 10: F31), sechs Patienten erkrankten an einer depressiven Episode (ICD 10: F32) und 20 Patienten kamen mit rezidivierenden depressiven Störungen (ICD 10: F33). Die Patienten waren im Zeitraum der Blutentnahme für die Herstellung der LCLs zwischen 23 und 75 Jahre alt. Die Zelllinien stammten von 12 Frauen und 21 Männer. 30 Patienten kamen zu der Studie bereits anbehandelt mit Antidepressiva. Diese Patienten waren mit TCA, SSRI, SSNRI, NaSSA und anderen Antidepressiva behandelt worden. Die Schwere der Depression wurde mit Hilfe der HAM-D Skala eingeschätzt. 15 Patienten litten an einer schweren, 16 an einer mittelschweren und zwei an einer leichten Depression. Nach fünf Wochen gab es einen Drop out und 16 waren Responder. Nach acht Wochen gingen 13 in Remission, zwei Patienten erlitten einen Rückfall. Die folgende Tabelle zeigt die demographische Verteilung bezüglich Alter, Geschlecht, Ansprechen auf die Therapie und Vorgeschichte der Erkrankung.

Tab.11: Demographische Tabelle mit Alter, Geschlecht und klinischen Daten der 33 an Depression erkrankten Patienten aus München (2008-2010). Bipolare Patienten waren in einer depressiven Episode. Responder = Reduktion der HMD-Skala um 50 % nach fünf Wochen, Remission = HMD-Skala < 8 nach acht Wochen, Rückfall = keine Response oder Remission mehr nach acht Wochen.

Geschlecht		**Diagnose**		**Responder**	
männlich	Weiblich	bipolar	unipolar	ja	Nein
21	12	7	26	16	16
Alter	**Rückfälle**	**Vorepisoden**		**Remission**	
Mittelwert		ja	nein	ja	Nein
52,88 (11,22)	2	27	6	13	20

Um zu zeigen, ob Alter oder Geschlecht einen Einfluss auf das Therapieansprechen haben, wurden diese Daten miteinander korreliert. Wie Tab. 13 zeigt, gibt es keinen Zusammen-

hang zwischen Alter und Ansprechen der Therapie und zwischen Geschlecht und Ansprechen der Therapie.

Tab.12: Verteilung von Alter und Geschlecht bezüglich des Ansprechens auf die Therapie der 33 an Depression erkrankten Patienten aus München (2008-2010). Es zeigt sich eine zufällige Verteilung.

		Non-Responder	Responder	Non-Remission	Remission
Alter (Jahre)		53,81	51,06	53,74	50,54
Geschlecht	**Weiblich**	7	5	8	4
	Männlich	9	11	11	9

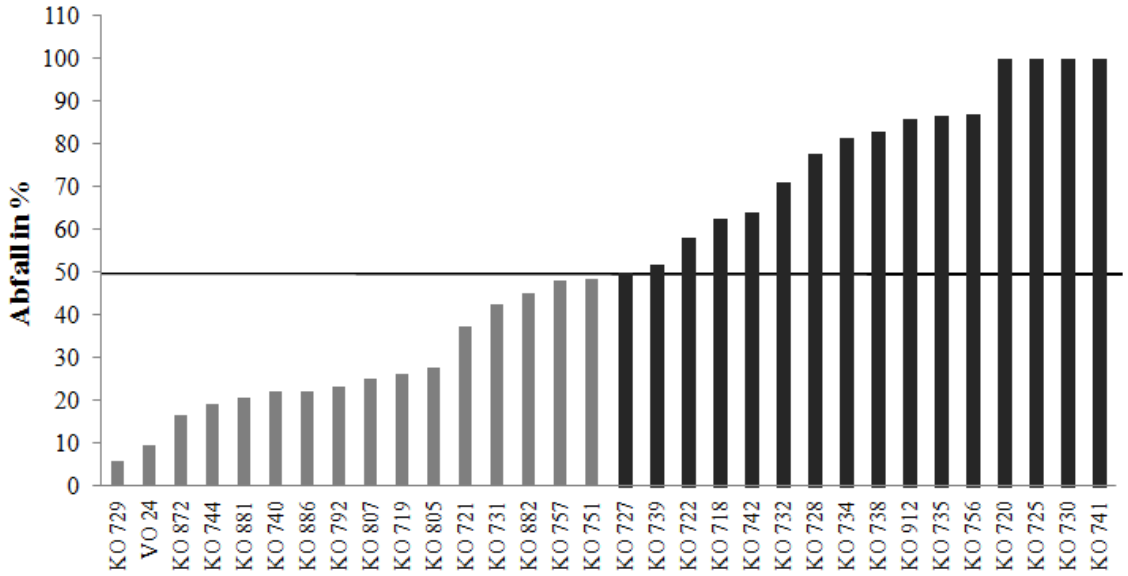

Abb. 7: prozentualer Abfall der HMD-Skala nach fünf Wochen Therapie bei 33 an Depression erkrankten Patienten aus München (2008-2010). Die Patienten oberhalb der Linie sind Responder.

In Abb. 7 sieht man den prozentualen Abfall der HMD-Skala nach fünf Wochen Therapie. Hier zeigt sich, dass 50 % der Patienten in Response gingen. Vier der Patienten hatten sogar einen Abfall von 100 %.

3.2. XTT-Ergebnisse

3.2.1. Phänotypisierung

Die Darstellung der Phänotypisierung erfolgte mittels XTT. Hier zeigten die Zelllinien bei Paroxetin, Mirtazapin sowie EGCG einen sofortigen Rückgang der Zellviabilität schon bei niedrigen Konzentrationen.

Bei Imipramin stieg bei Konzentrationen bei 30 µM jedoch die Zellviabilität bei allen Zelllinien an. In Abb. 8 werden die Zelllinien mit dem höchsten und dem niedrigsten Zellviabilitätsanstieg demonstriert. Die Zelllinie KO 731 zeigt einen nur geringen Anstieg an die Zelllinie KO 722 einen sehr hohen.

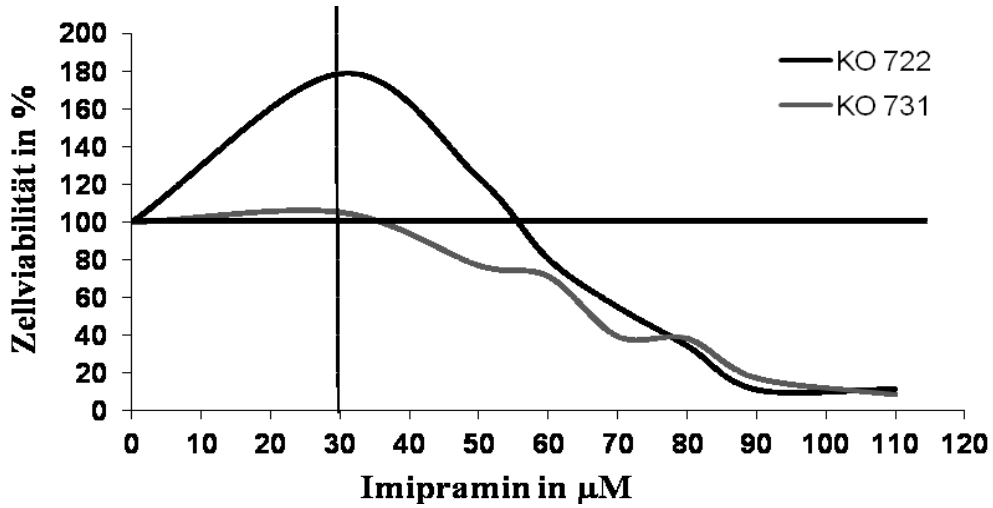

Abb. 8: Zellviabilitätsanstieg nach Durchführung des Toxizitätstests mit den Lymphoblastoiden Zelllinien mit Imipramin. Dieser zeigt sich bei einer Imipraminkonzentration von 30 µM. Hier werden die Zelllinien demonstriert (KO 722, KO 731), bei denen der höchste und der niedrigste Anstieg gezeigt werden konnte. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012)

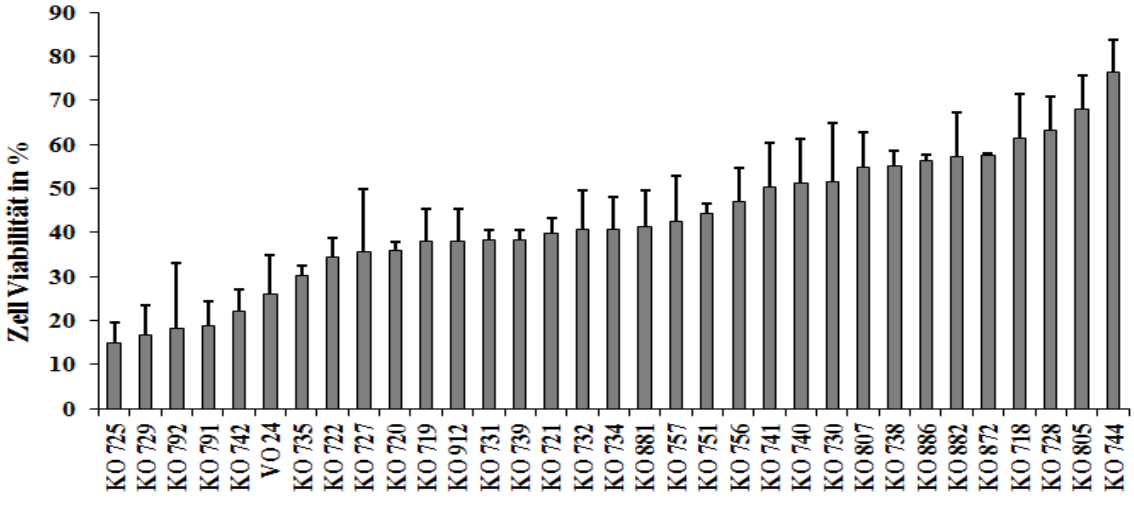

Abb. 9: Zellviabilität nach 72 h Inkubation der Lymphoblastoiden Zelllinien am Beispiel mit 80 µM Imipramin aller Zelllinien aufsteigend von der niedrigsten Zellviabilität in % bis zur höchsten mit Standardabweichung nach jeweils drei identisch durchgeführten Versuchen. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012)

Um zu zeigen, dass die Zelllinien eine individuelle Reaktion auf die Substanzen aufwiesen, musste die Interindividualität zwischen den Zelllinien größer sein, als die Intraindividualität in einer Zelllinie. Damit die Zuverlässigkeit der Messungen gezeigt werden konnte, wurde die Standardabweichung mittels Excel aus drei Versuchen einer Zelllinie ermittelt. Aus allen Standardabweichungen der 33 Zelllinien wurde der Mittelwert berechnet und mit der Standardabweichung aus dem Mittelwert aller Zellviabilitäts-Ergebnisse mittels der Intra-Klassen-Korrelation (ICC) berechnet.

Wie Abb.9 und auch Tab. 13 demonstrieren, war die Individualität zwischen den Zelllinien größer, als die Individualität in einer Zelllinie. Die Standardabweichungen zwischen den Zelllinien waren in allen Gruppen signifikant größer als zwischen den Versuchen einer Zelllinie.

Tab.13: Werte aus der Berechnung der Intra-Klassen-Korrelation zur Abschätzung der Reliabilität, der Standardabweichungen aller Lymphoblastoiden-Zelllinien gemeinsam und der Signifikanz. Interindividualität und Intraindividualität der Zelllinien bei Messung der Zellviabilität der Substanzen Imipramin mit einer Konzentration von 80 µM, Paroxetin mit einer Konzentration von 15 µM, Mirtazapin mit einer Konzentration von 300 µM und EGCG mit einer Konzentration von 15 µM mittels eines XTT – Assays; (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Standardabweichung (SA); Intra-Klassen-Korrelation (ICC); Epigallocatechingallat (EGCG).

	Imipramin	**Paroxetin**	**Mirtazapin**	**EGCG**
Interindividualität	SA 15,23	SA 10,45	SA 8,9	SA 10,17
Intraindividualität	SA 6,84	SA 6,67	SA 6,5	SA 5,7
ICC	0,71	0,92	0,94	0,67
Signifikanz	p = 0,002	p = 0,001	p = 0,001	p = 0,007

Für weitere Berechnungen wurden die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) der Zellviabilität der einzelnen Zelllinien mittels SigmaPlot berechnet.

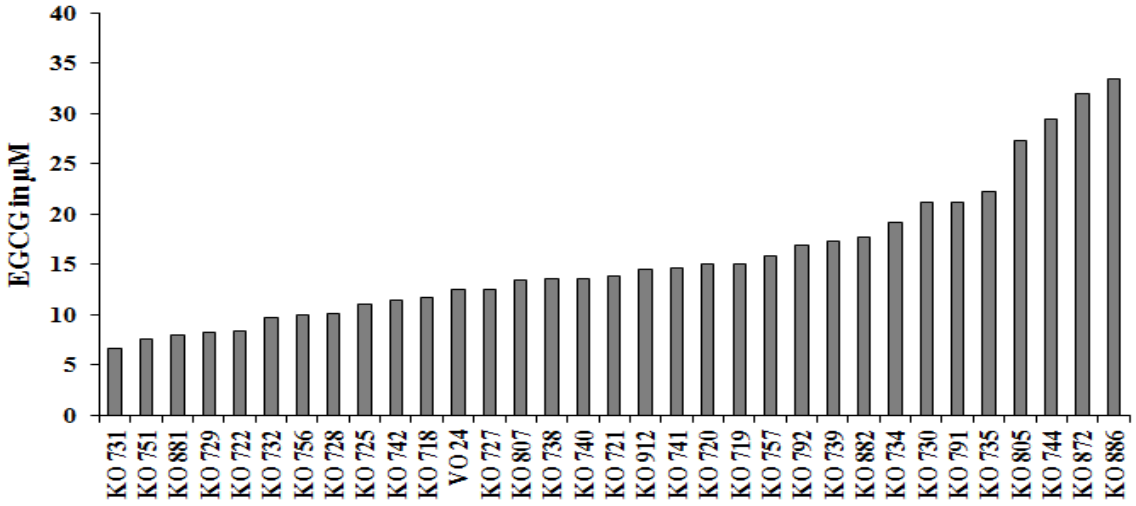

Abb. 10: IC50 nach 72 h Inkubation der Lymphoblastoiden - Zelllinien am Beispiel von Epigallocatechingallat (EGCG) aller 33 Lymphoblastoiden - Zelllinien (Y-Achse) mittels Sigma Plot berechnet aus den Zellviabilitäts-Ergebnissen aufsteigend von der niedrigsten Konzentration bis zur höchsten. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012)

3.2.2. Korrelation des Verhaltens der Zelllinien zwischen den Antidepressiva

Die signifikante Korrelation der Reaktion der Zellen auf die Antidepressiva zeigte ein klassenspezifisches Verhalten ($p < 0{,}001$). Auf Imipramin und EGCG reagierten die Zellen ähnlich ($p = 0{,}029$). Während das Verhalten der Zellen bei Paroxetin oder Mirtazapin mit EGCG nicht signifikant korrelierte.

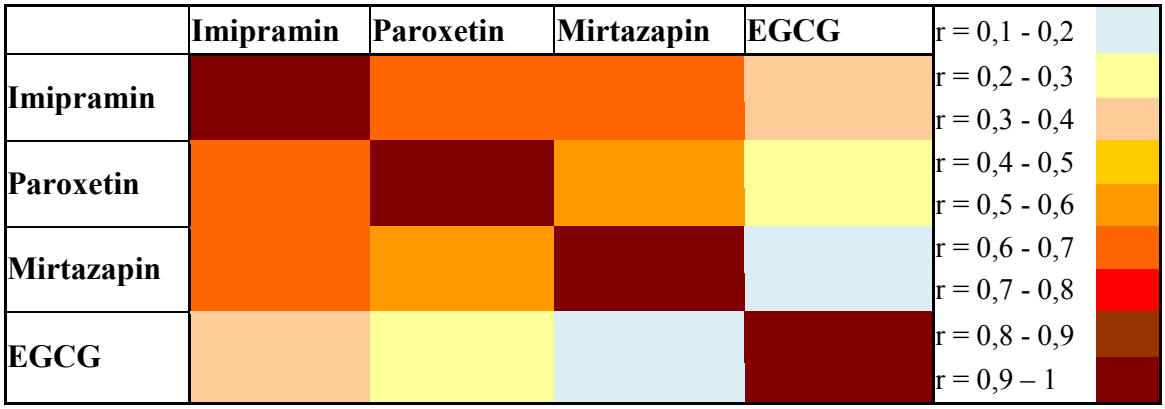

Abb. 11: Korrelation des Verhaltens der Zelllinien auf die Substanzen untereinander. EGCG (Epigallocatechingallat) als nicht-Antidepressivum zeigte eine wesentlich geringere (Imipramin) bis keine (Mirtazapin) Korrelation zu dem Verhalten der Zelllinien. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Korrelationskoeffizient (r)

3.2.3. Zusammenhang der Zellviabilität der LCLs auf die Medikamente und der Klinik der Patienten

Um zu zeigen ob die LCLs auf irgend eine Weise mit den Patienten korrelieren, wurden die klinischen Daten mit der Zellviabilität, also dem Verhalten der Zellen auf die Substanzen, verglichen und korreliert.

Es konnte kein jedoch signifikanter Zusammenhang zwischen Therapieerfolg (fünf Wochen Response und acht Wochen Remission) und Zellviabilität gefunden werden. Allerdings scheint die Klinik bezüglich fünf Wochen Response und das Verhalten der Zelllinien, wie in Abb. 12 dargestellt, bei niedriger, nicht toxischer Imipramin-Konzentration, zusammenzuhängen. Die Zelllinien der Responder wiesen eine signifikant höhere Zellviabilität auf als die Zelllinien der Non-Responder.

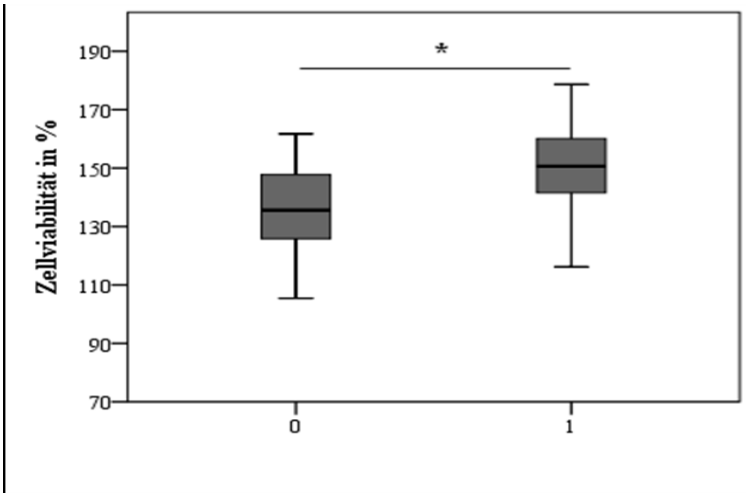

Abb.12: Box Plot über den **Zusammenhang der Klinik der Patienten bezüglich fünf Wochen Response und Verhalten der Zelllinien** bei einer Imipramin-Konzentration von 30 µM (proliferativ); 0 = Non-Responder, 1 = Responder; (p = 0,035), (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012)

Ein Zusammenhang der vorangegangenen Episoden der Patienten und des Verhaltens der Zelllinien auf die Antidepressiva zeigte sich nicht.

3.3. Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF)

3.3.1. BDNF Val66Met Polymorphismus

Mit Hilfe der PCR wurde der *BDNF*-Genotyp bestimmt. 25 der Patienten, von denen die Zelllinien hergestellt wurden, sind Wildtypträger (Val/Val), sieben sind heterozygot, und einer ist homozygot mit Met/Met. Die Genotypverteilung ist im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($\chi 2 = 0{,}324$; $df = 2$; $p = 0{,}850$).

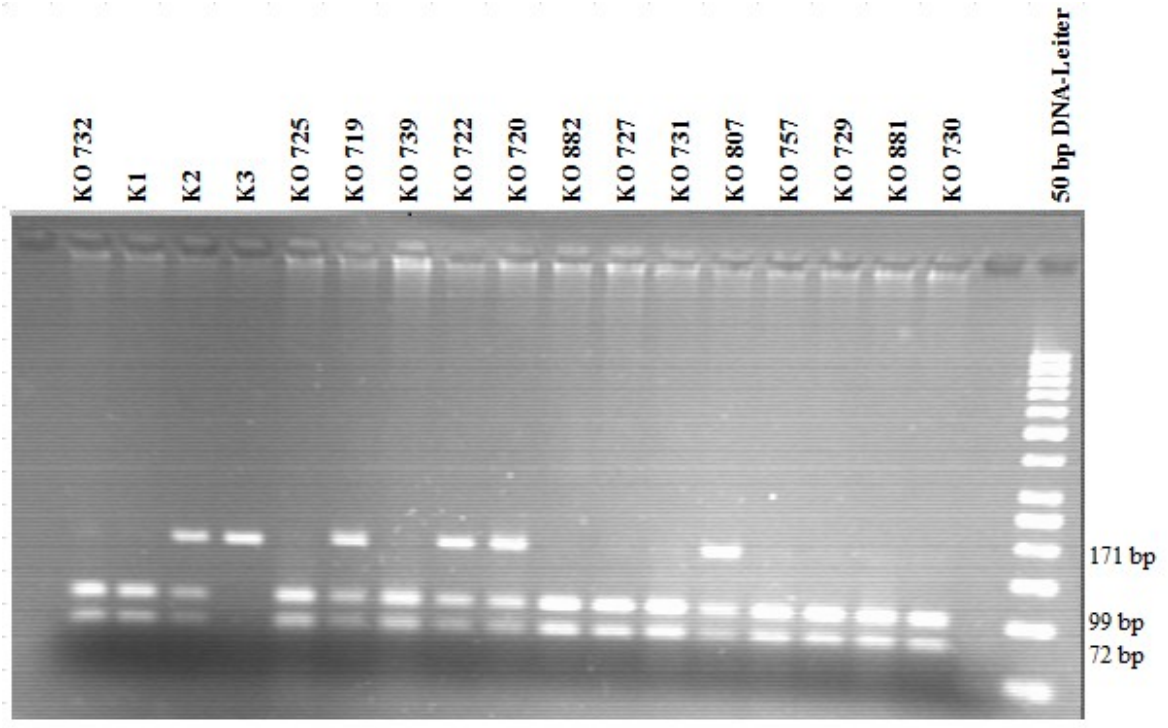

Abb.13: Ergebnis der PCR nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym Eco 721 zur Genotypbestimmung aus den Lymphoblastoiden-Zelllinien der an Depression erkrankten Patienten: K1 diente als Kontrolle der Val/Val-Variante, K2 war die Kontrolle für den heterozygoten Typ und K3 für den homozygoten Met-Träger; (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Basenpaare (bp); Methionin (Met), Valin (Val)

Da es nur einen homozygoten Methionin-Träger in unseren Proben gibt, wurde dieser zu den heterozygoten Val/Met-Trägern gezählt.

Um auszuschließen, dass keine signifikante Zufallsverteilung vom Genotyp bezüglich Alter und Geschlecht der Patienten vorhanden war, wurde mit Hilfe des Chi^2 –Tests bei dem

Geschlecht und Mann-Whitney-Test beim Alter, die Verteilung berechnet. Bei beiden Parametern konnte eine signifikante Verteilung ausgeschlossen werden.

Tab.14: Berechnung der Verteilung des Alters der 33 an Depression erkrankten Patienten aus München auf den *BDNF*-Val66Met-Polymorphismus mittels Mann-Whitney-Test; (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Standardabweichung (σ), Freiheitsgrade (df), Valin (Val); Methionin (Met)

Genotyp	**Alter**		**p-Wert**
	Mittelwert	Σ	
Val/Val	53,84	10,057	n.s.
Val/Met & Met/Met	49,88	14,672	

Tab.15: Kreuztabelle zur Bestimmung der Signifikanz der Verteilung von dem *BDNF*-Val66Met – Polymorphismus und dem Geschlecht der 33 an Depression erkrankten Patienten aus München mit Hilfe des Chi²- Tests. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), männlich (m); weiblich (w); Standardabweichung (σ), Freiheitsgrade (df), Valin (Val); Methionin (Met).

Genotyp	**Geschlecht**		**Gesamt**	**χ2 df (1)**	**p-Wert**
	m (n = 21)	w (n = 12)			
Val/Val	17	8	25	,849	n.s.
Val/Met & Met/Met	4	4	8		
Gesamt	21	12	33		

Die Korrelation von Genotyp und Verhalten der Zelllinien auf die Substanzen zeigte keinen signifikanten Zusammenhang. Der *BDNF*-Val66Met-Polymorphismus hatte somit keinen Einfluss auf die Toxizität der Medikamente Imipramin (p = 0,254), Paroxetin (p = 0,918), Mirtazapin (p = 0,853) und dem Grüntee-Extrakt EGCG (p = 1) auf die Zelllinien.

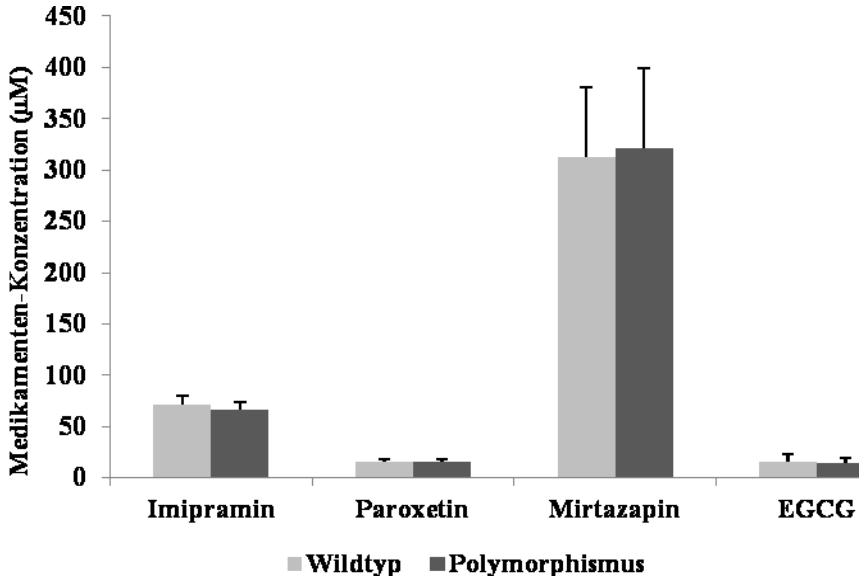

Abb.14: Verteilung der IC50 aller Medikamente in Bezug auf den *BDNF*-Genotyp der 33 an Depression erkrankten Patienten aus München. Wildtyp: Val/Val-Genotyp; Polymorphismus: Valin/ Methionin-heterozygote plus ein Methionin-homozygoter. Die Verteilung der IC50 war laut Mann-Whitney-Test bei allen Gruppen und Medikamenten gleich. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Valin (Val), Methionin (Met), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF)

Auch ein Zusammenhang zwischen dem Genotypen und der Response und Remission konnte nicht gefunden werden.

3.3.2. Basalwerte der Genexpression von BDNF

Mittels der Real-Time PCR wurde die Genexpression des *BDNF*-Gens gemessen. Von 20 Zelllinien wurde die Messung mindestens 3-mal wiederholt und daraus der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung berechnet. Es zeigte sich eine individuelle Genexpressionsrate jeder Zelllinie. Die Zelllinie mit der geringsten *BDNF*-Genexpression (KO 718) zeigte eine 21,78 fache niedrigere Expression als die Genexpression der Zelllinie KO 740.

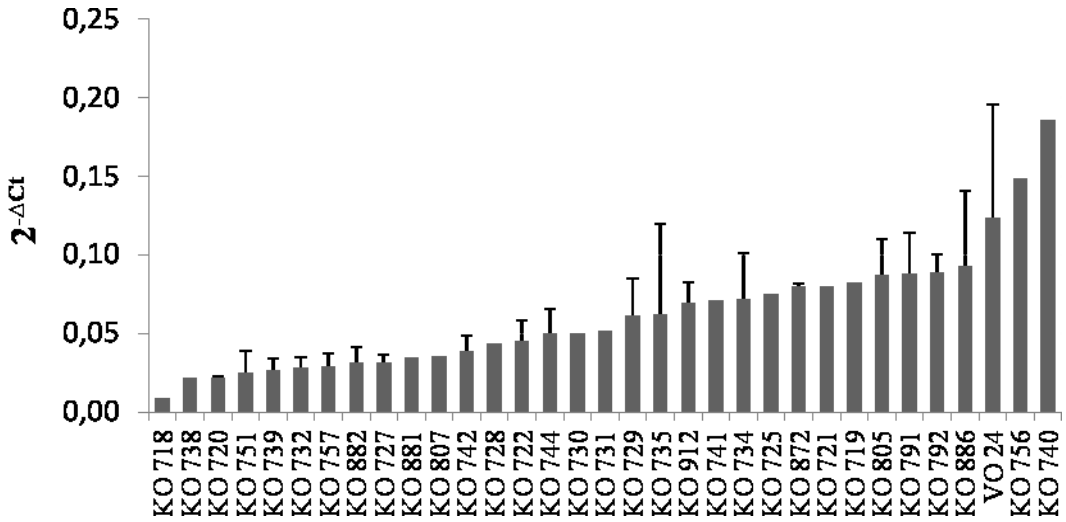

Abb. 15: Darstellung der Ratio *BDNF* von den Lymphoblastoiden-Zelllinien mit der niedrigsten Genexpression zur höchsten. Die Ratio Werte sind die n-fache Expression vom *BDNF,* bezogen auf die Genexpression des Housekeeping-Gens *TBP*. Von 20 Zelllinien wurden mindestens drei identische Versuche durchgeführt. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), TATA-Box binding Protein (TBP)

3.3.3. Proteinanalyse mittels ELISA

Der BDNF-Proteingehalt der Zelllinien zeigte große Unterschiede. Die Zelllinie mit der höchsten Konzentration wies eine 4,5fach höhere Konzentration auf als die Zelllinie mit der niedrigsten Konzentration.

Auch der ProBDNF-Proteingehalt der Zelllinien zeigte individuelle Konzentrationen. Der höchste Wert war 5,4fach höher als der niedrigste Wert.

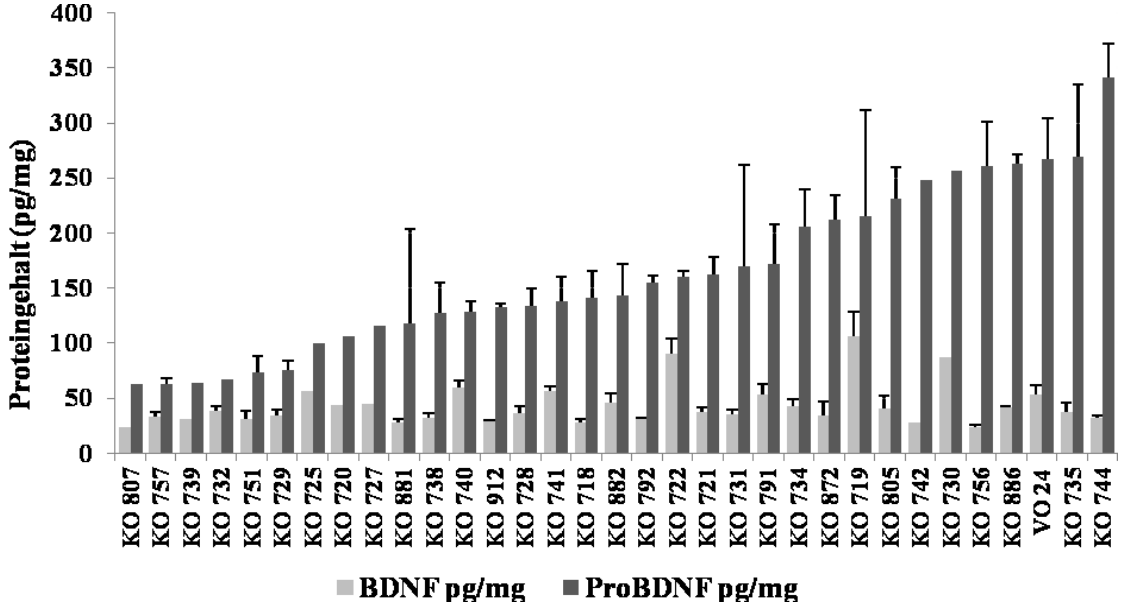

Abb. 16: intrazellulärer BDNF- und ProBDNF-Proteingehalt an 33 Lymphoblastoiden-Zelllinien: BDNF- und ProBDNF-Gehalt bezogen auf den intrazellulären Proteingesamtgehalt mit Standardabweichungen bei 26 Lymphoblastoiden-Zelllinien. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF)

Von 26 Zelllinien konnte die Standardabweichung der Proteine berechnet werden. Aus den anderen sieben Zelllinien ließen sich im Zeitraum der Versuche nicht genügend Zellen entnehmen.

In Abb. 17 wurde die intrazelluläre BDNF-Konzentration mit der intrazellulären ProBDNF-Konzentration korreliert. Hier zeigt sich kein Zusammenhang zwischen dem Vorläuferprotein ProBDNF und dem Endprotein BDNF.

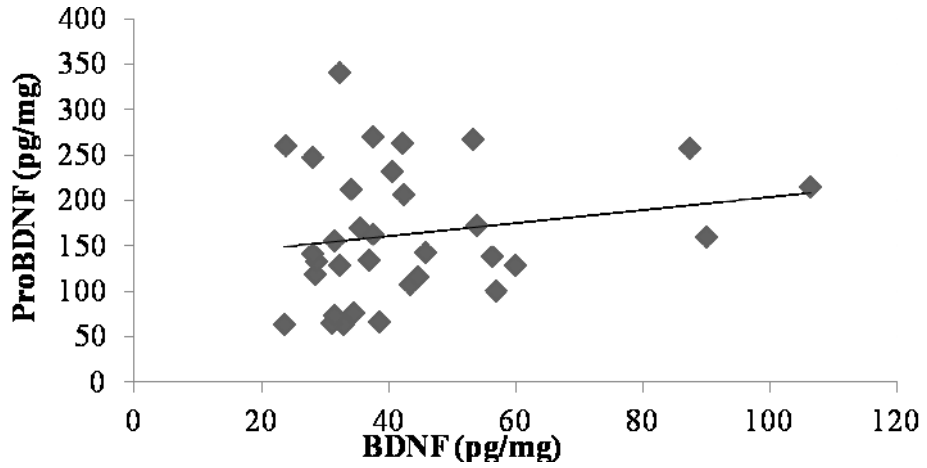

Abb.17: Streudiagramm mit Regressionsgerade zur bildlichen Darstellung des Zusammenhangs der intrazellulären BDNF- und ProBDNF-Konzentration der 33 Lymphoblastoiden-Zelllinien (r = 0,240, p = 0,186). (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF)

3.3.4. Genexpression: Einfluss auf BDNF- und ProBDNF-Proteingehalt

Die Genexpression von *BDNF* korrelierte nicht mit der intrazellulären BDNF-Konzentration (r = 0,336; p = 0,56), aber mit der intrazellulären ProBDNF-Konzentration (r = 0,571; p = 0,001) der Zellen. Je höher die Genexpression war, desto höher war der Proteingehalt intrazellulär.

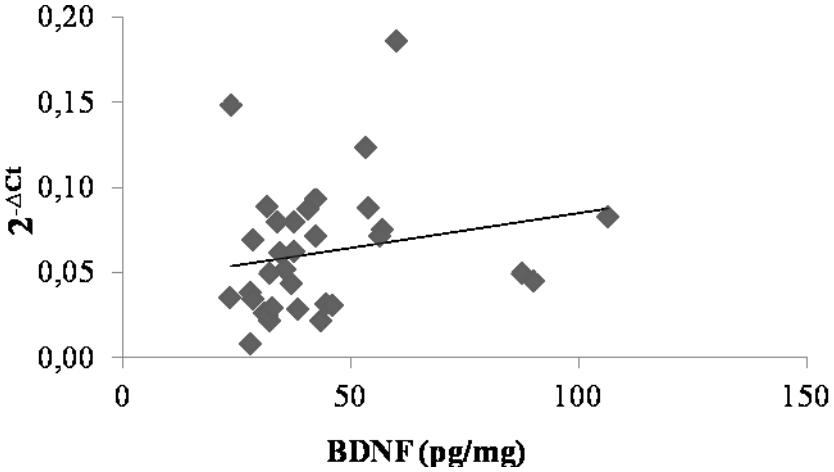

Abb.18: Streudiagramm mit Regressionsgerade zur bildlichen Darstellung des Zusammenhangs der intrazellulären BDNF-Konzentration und der *BDNF* Genexpression der 33 Lymphoblastoiden-Zelllinien (p = 0,56); (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF)

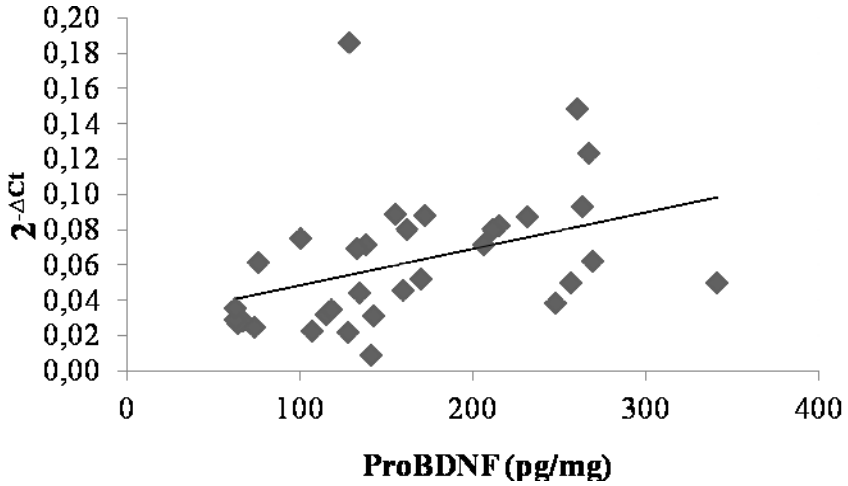

Abb.19: Streudiagramm mit Regressionsgerade zur bildlichen Darstellung des Zusammenhangs der intrazellulären ProBDNF-Konzentration und der *BDNF* Genexpression der 33 Lymphoblastoiden-Zelllinien (p = 0,001); (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF)

3.3.5. Statistische Auswertung der IC50 mit den Basalwerten

Es gab keine signifikante Korrelation zwischen der IC50 der Medikamente Imipramin, Paroxetin, Mirtazapin und dem Grüntee-Extrakt EGCG und der *BDNF* Genexpression.

Jedoch zeigte sich eine Tendenz bei EGCG. Hier wurden weitere Berechnungen durchgeführt, indem Randgruppen erzeugt wurden. Die acht Zelllinien mit den höchsten IC50-Werten und die acht Zelllinien mit den niedrigsten IC50-Werten von EGCG wurden mit der Genexpression korreliert. Hier zeigte sich eine signifikante Verteilung (p = 0,038) (Abb. 21). Die acht Zelllinien, die die höchsten IC50-Werte hatten, zeigten eine höhere Expression des *BDNF*-Gens.

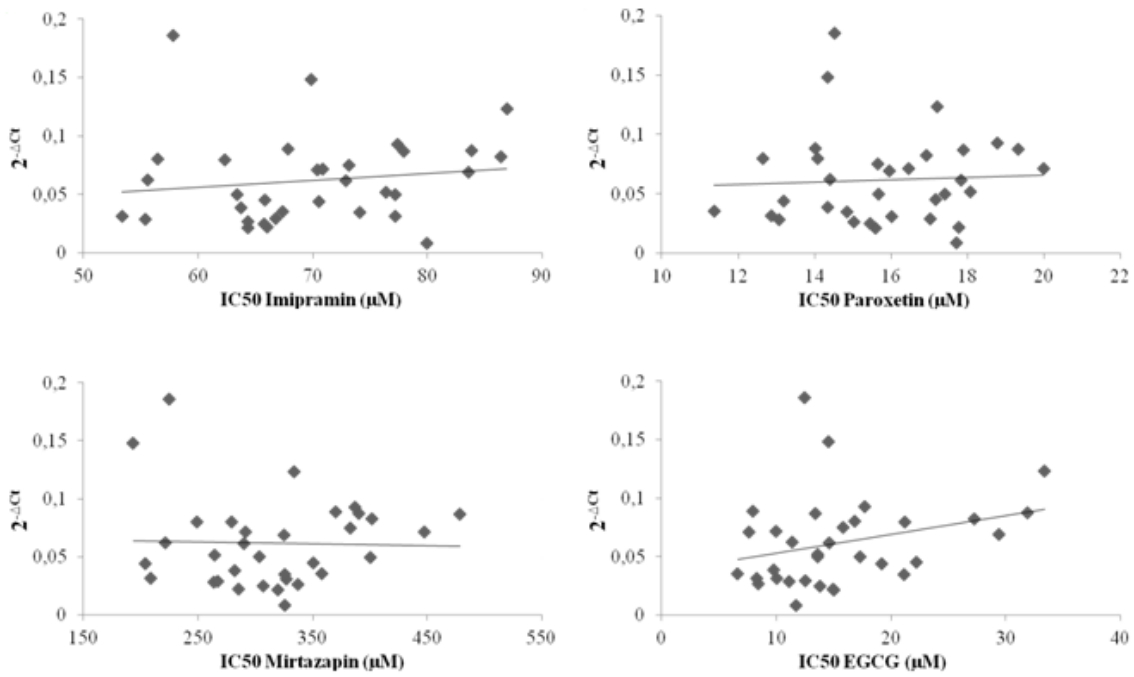

Abb. 20: Streudiagramme mit Regressionsgeraden zur bildlichen Darstellung des Zusammenhangs der IC50 der Medikamente Imipramin, Paroxetin, Mirtazapin und dem Grüntee-Extrakt EGCG und der *BDNF* Genexpression der 33 Lymphoblastoiden-Zelllinien (p = n.s.); (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), Epigallocatechingallat (EGCG)

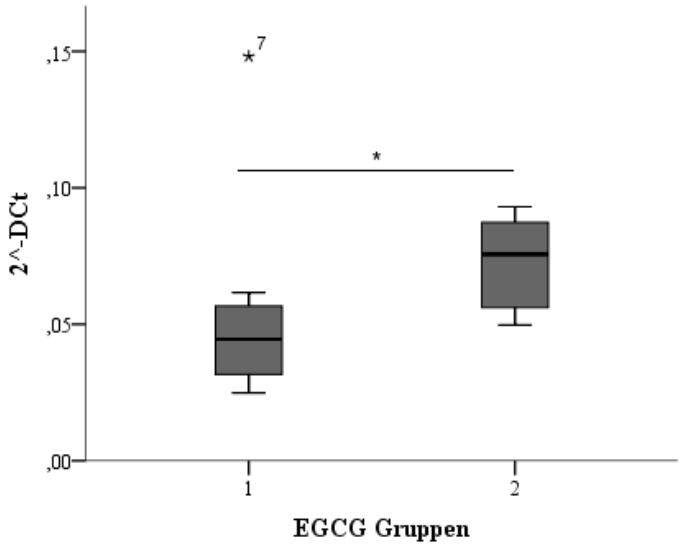

Abb.21: BoxPlot zur Darstellung der Verteilung der Genexpression des *BDNF* bei Bildung von Randgruppen: Gruppe 1 sind die acht niedrigsten IC50-Werte der Toxizitätstestung von EGCG der Lymphoblastoiden-Zelllinien der 33 an Depression erkrankten Patienten aus München; Gruppe 2 sind die acht höchsten IC50 Werte (p = 0,038). (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), Epigallocatechingallat (EGCG)

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Proteingehalt intrazellulär und der Zellviabilität der Zelllinien zu zeigen wurden diese Daten miteinander korreliert. Hier fand sich keine Korrelation zwischen den IC50 der drei Antidepressiva und der intrazellulären BDNF- und ProBDNF-Konzentration.

Es zeigte sich aber eine signifikante Korrelation zwischen dem Grüntee-Extrakt EGCG und dem intrazellulären ProBDNF-Gehalt (r = 0,438; p = 0,011) (Abb. 22). Je höher die IC50 bei einer Zelllinie ist, desto höher ist die ProBDNF-Konzentration. Eine signifikante Korrelation mit der IC50 von EGCG und der intrazellulären BDNF-Konzentration zeigte sich jedoch nicht (Abb. 23).

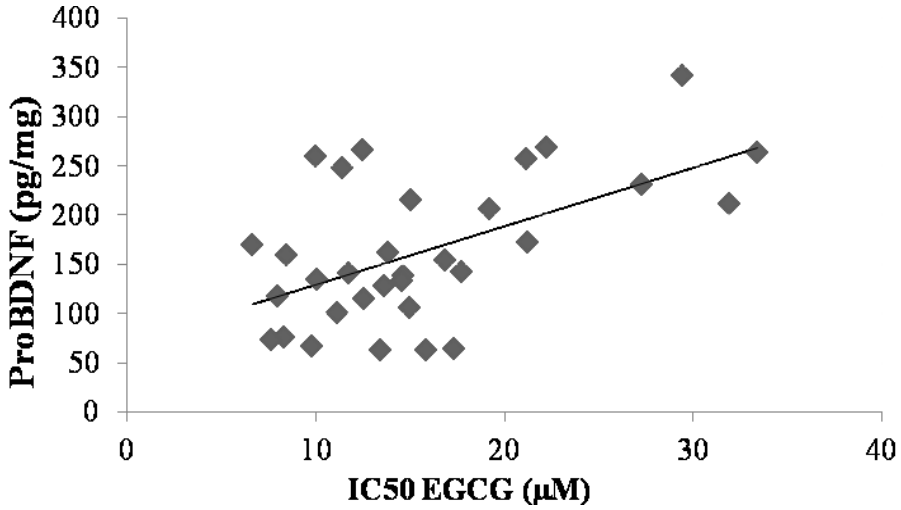

Abb.22: Streudiagramm mit Regressionsgerade zur bildlichen Darstellung des Zusammenhangs der IC50 des Grüntee-Extrakts EGCG und der intrazellulären ProBDNF-Konzentration der 33 Lymphoblastoiden-Zelllinien (r = 0,438; p = 0,011); (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), Epigallocatechingallat (EGCG)

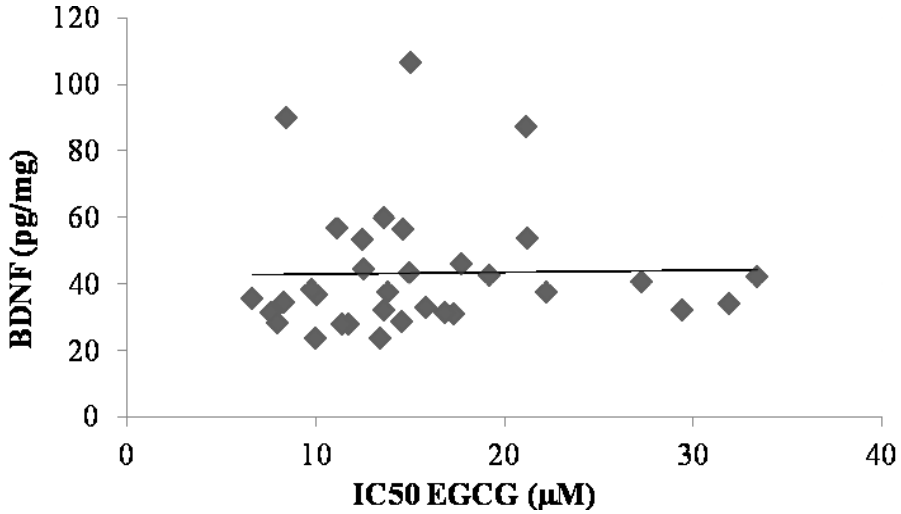

Abb.23: Streudiagramm mit Regressionsgerade zur bildlichen Darstellung des Zusammenhangs der IC50 des Grüntee-Extrakts EGCG und der intrazellulären BDNF-Konzentration der 33 Lymphoblastoiden-Zelllinien (r = 0,213; p = 0,233); (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), Epigallocatechingallat (EGCG)

3.4. CHL1

3.4.1. Basalwerte der Expression des *CHL1* – Gens

Mittels der Real-Time PCR wurde die Genexpression des *CHL1*-Gens gemessen. Von 26 Zelllinien wurde die Messung mindestens 3-mal wiederholt und daraus der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung berechnet. Es zeigten sich große individuelle Unterschiede zwischen den Zelllinien. So zeigte die Zelllinie mit der geringsten Expression eine 2,9 fach niedrigere Genexpression als die der höchsten Zelllinie.

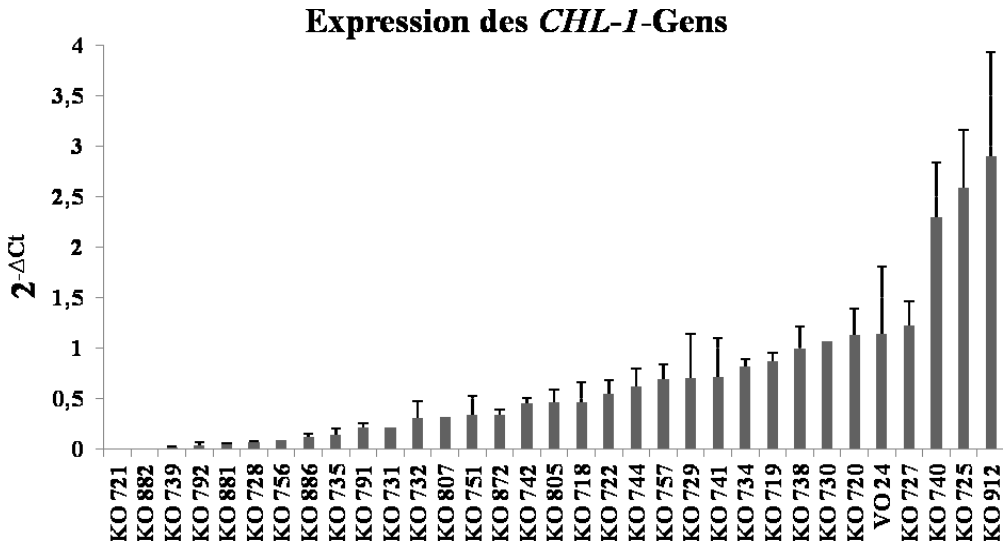

Abb.24: *CHL1*-Genexpressionsrate aller 33 Lymphoblastoiden-Zelllinien der an Depression erkrankten Patienten aus München: Die Ratio Werte ($2^{-\Delta Ct}$) sind die n-fache Expression bezogen auf das Housekeeping-Gen *TBP*. (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Cell adhesion molecule with homology to L1CAM (CHL1), TATA-Box binding Protein (TBP)

Ein Zusammenhang zwischen *CHL1*-Genexpression und den IC50 der Zelllinien von Paroxetin, Imipramin und EGCG konnte nicht gezeigt werden.

Die IC50 der Zelllinien von Mirtazapin wies jedoch eine negative Korrelation mit der *CHL1*-Genexpression auf ($r = -0{,}427$; $p = 0{,}013$).

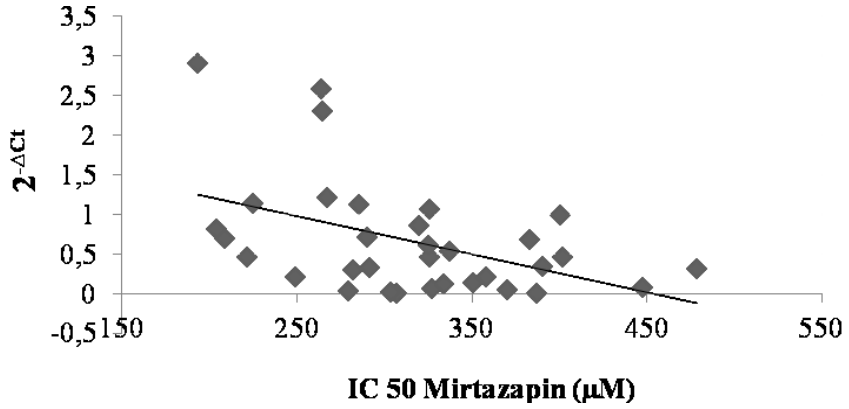

Abb.25: Streudiagramm mit Regressionsgerade zur bildlichen Darstellung des Zusammenhangs der IC50 des Mirtazapins und *CHL1*- Genexpression der 33 Lymphoblastoiden Zelllinien (r = -0,427; p = 0,013); (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Cell adhesion molecule with homology to L1CAM (CHL1)

3.4.2. Proteinbestimmung mittels Western Blot

3.4.3.1. Basalwerte der CHL1-Konzentration

Es konnte mit Hilfe des Western Blots gezeigt werden, dass CHL1 in den Lymphoblastoiden Zelllinien vorhanden ist. Dieser Versuch wurde mit 23 Proben durchgeführt, da nicht genügend Zellen von den anderen 10 Zelllinien während der Versuche entnommen werden konnten.

Die Messung des CHL1-Gehalts in den Zelllinien zeigte eine unterschiedliche Konzentration an. Zur Bestimmung des CHL1-Gehalts wurde als Referenz Aktin verwendet. Es zeigte sich ein individueller Basalwert des CHL1-Proteins. Die Zelllinie mit der niedrigsten Konzentration hatte eine 90-fach niedrigere Konzentration an CHL1 als die Zelllinie mit der höchsten Konzentration.

Einen Zusammenhang zwischen der Menge an intrazellulärem CHL1 und der *CHL1*-Genexpression konnte mit diesem Versuch nicht gezeigt werden (p = 0,989).

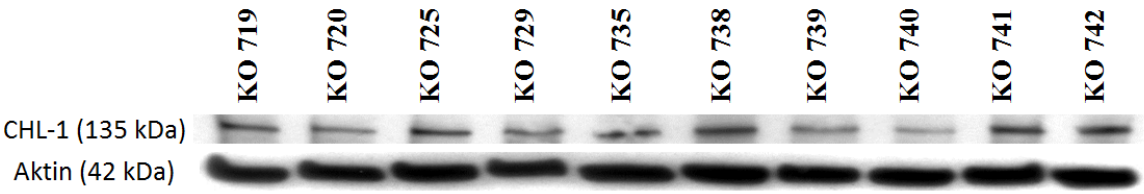

Abb.26: Western-Blot Banden des CHL1 (135 kDa) und des Aktins (42 kDa) als Referenz gewonnen aus 10 verschiedenen Lymphoblastoiden-Zelllinien. N = 1; (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012) Cell adhesion molecule with homology to L1CAM (CHL1)

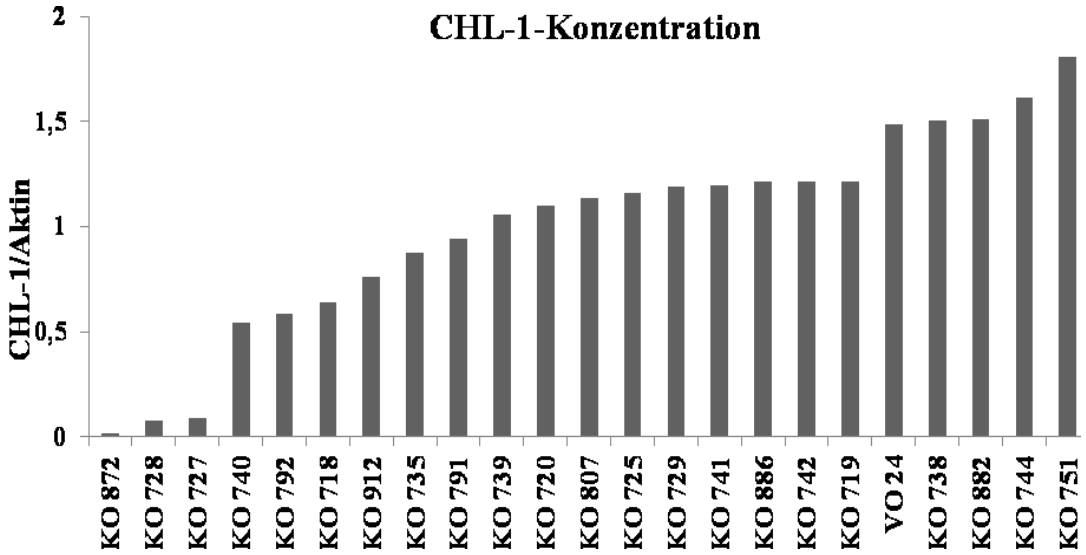

Abb.27: Ergebnisse der Messung der CHL1-Konzentration der Basalwerte von 23 Lymphoblastoiden-Zelllinien mittels Western Blot. Werte aus ImageJ: CHL1/Aktin, Semiquantitative Bestimmung mit Hilfe des Aktins. N = 1; (Universitätsklinikum Ulm, 2011-2012), Cell adhesion molecule with homology to L1CAM (CHL1)

4. Diskussion

In dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob Lymphoblastoide Zelllinien als Modell zur Biomarkerfindung am Beispiel von BDNF und CHL1 verwendet werden können. Dafür wurde nach Zusammenhängen zwischen klinischen Parametern depressiver Patienten und aus deren Blut hergestellter Lymphoblastoiden Zelllinien gesucht. Dazu wurden die Toxizität der Antidepressiva und dem Grünteeextrakt EGCG auf die LCLs mittels XTT, die intrazelluläre Konzentration von BDNF, ProBDNF und CHL1, die Genexpression von *CHL1* und *BDNF* der LCLs, sowie der Val66Met-Polymorphismus des *BDNFs* untersucht.

4.1 Lymphoblastoide Zelllinien

Lymphoblastoide Zelllinien wurden in einigen Studien in pharmakogenetischen Untersuchungen genutzt. So zeigte Peters et al. mit Hilfe des LCL-Modells, dass eine Genvariante des *TYMS* mit dem Therapieansprechen auf das Chemotherapeutikum 5-Floururacil (5-FU) assoziiert werden kann [44]. Morag et al. entdeckte, mittels LCLs einige potentielle Biomarker für das Therapieansprechen bei Depression, unter anderem das CHL1 [38].

Morag et al. zeigte ebenfalls, dass verschiedene Medikamente einen klassenspezifischen und individuell variablen Einfluss auf die Zellviabilität in LCLs aufweisen [36]. Wie in Abb. 11 präsentiert, konnten wir dieses Ergebnis mit den Antidepressiva und dem EGCG ebenfalls darstellen.

Wir konnten zeigen, dass das Verhalten der LCLs in unseren Versuchen auf die verschiedenen Substanzen eine höhere Interindividualität als eine Intraindividualität einer einzelnen Zelllinie ($p = 0{,}001$) aufwiesen. Die Interindividualität der LCLs und auch die geringe Intraindividualität sind wichtige Parameter, um diese Zellen als Modell zur Biomarkerfindung benutzen zu können und ermöglichen die Wiederholbarkeit. Wir konnten demonstrieren, dass die Versuche mit den LCLs von verschiedenen Personen durchgeführt werden können, also reproduzierbar sind.

Da die LCLs auf verschiedene Weise hergestellt werden können, wie in der Einleitung beschrieben, müssen jedoch die Auswirkungen der verschiedenen Zubereitungsmethoden und viralen Infektionen der LCLs in zukünftigen Experimenten genauer analysiert werden

[49]. In einer Studie mit verschieden alten LCLs und unterschiedlicher Herstellungsart zeigten die LCLs ein sehr ähnliches Sensitivitäts-Muster gegen verschiedene Medikamente [35]. Diese Ergebnisse scheinen eine Differenzierung der unterschiedlichen Herstellungsmethoden nicht unbedingt erforderlich zu machen. Wir konnten jedoch zeigen, dass der Umgang mit den LCLs immer gleich verlaufen sollte, da sonst deutliche Schwankungen in den Ergebnissen entstehen können. Diese Eigenschaften erlauben eher keine genaue Biomarkerbestimmung.

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Ansprechen der Patienten auf die Therapie und das Verhalten der LCLs auf den wachstumshemmenden Effekt der Antidepressiva. Also konnten wir hier keinen Zusammenhang zu dem Effekt von In-vitro und Mensch schaffen. Dieses Ergebnis muss jedoch sehr kritisch betrachtet werden. Zum einen wurde bei dieser Arbeit nur eine geringe Fallzahl verwendet, zum anderen wurden die Patienten sehr individuell behandelt. Es fand z.B. ein Medikamentenwechsel während des Beobachtungszeitraums statt oder viele Patienten erhielten auch mehrere Medikamente, unter anderem auch Medikamente, die hier nicht untersucht wurden. Eine weitere Untersuchung könnte den Zusammenhang des Verhaltens der Lymphoblastoiden Zelllinien auf den wachstumshemmenden Effekt der Antidepressiva und das Nebenwirkungsspektrum der dazugehörigen Patienten prüfen.

Einen möglichen Zusammenhang zwischen den Effekten von In-vitro und Mensch konnten wir jedoch mit folgenden Ergebnissen finden. Nicht die hemmende Wirkung des Imipramins auf die LCLs zeigte eine Korrelation mit dem Ansprechen der Patienten auf die Antidepressiva-Therapie, sondern die geringere nicht hemmende Wirkung, eher proliferative Wirkung, auf die LCLs zeigte eine Korrelation mit dem Therapieansprechen nach fünf Wochen ($p=0,035$). Dies ist interessant, da in einer Studie von Han et al. und auch in einer späteren Studie von Zhang et al. gezeigt werden konnte, dass Imipramin Nervenproliferation und -neubildung bei Mäusen/Ratten nach einer Gehirnläsion im Hippocampus fördert [14; 64]. Dies zeigt, dass nicht nur die hemmende Wirkung der Antidepressiva untersucht werden sollte, sondern auch die proliferative Wirkung.

4.2 Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF)

Als Neurotrophin ist der BDNF ein potentieller Biomarker für die Therapie, Diagnostik und den Therapieverlauf einer Depression. Dem *BDNF*-Gen - und vor allem dem Val66Met Polymorphismus - wird in vielen Studien über psychiatrischen Erkrankungen eine besondere Bedeutung zugesprochen. So zeigte eine Meta-Analyse von Pei et al., dass Met-Träger ein erhöhtes Risiko haben, an einer geriatrischen Depression zu erkranken [43]. In einer Studie in Polen fand man allerdings heraus, dass Val/Val-Träger (Wildtyp) bei Kaukasiern ein höheres Risiko haben, an einer Depression zu erkranken [55]. Eine solche Assoziation wurde jedoch in der chinesischen Population nicht gefunden [19]. Es muss daher beachtet werden, dass die ethnische Verteilung des Val66Met-Polymorphismus bei Kaukasiern und Asiaten unterschiedlich ist. So gibt es signifikant mehr Val/Val-Träger bei den Kaukasiern und mehr Val/Met-Träger bei den Asiaten [45]. Die Zellen, die von den depressiven Patienten kaukasischer Herkunft entnommen wurden, mit denen unsere Studien durchgeführt wurden, zeigten eine Zufallsverteilung nach Hardy-Weinberg ($\chi 2 = 0{,}324$; $df = 2$; $p = 0{,}850$). Eine Aussage darüber, ob dieser Polymorphismus einen Einfluss auf das Risiko an einer Depression zu erkranken hat, ist aufgrund der geringen Fallzahl in unseren Versuchen aber nicht möglich.

Eine neuere Meta-Analyse zeigte vor allem bei der asiatischen Population einen Zusammenhang zwischen dem *BDNF*-Val66Met-Polymorphismus und dem Therapieansprechen in Patienten mit Depression. Hier fand man heraus, dass heterozygote Val/Met-Träger ein besseres Therapieansprechen aufwiesen als solche mit dem Wildtyp [66]. In unserer Probandengruppe konnte kein Zusammenhang zwischen dem *BDNF*-Val66Met-Polymorphismus und dem Therapieansprechen festgestellt werden.

In unserer Testung der Zellviabilität mit den Antidepressiva und dem EGCG zeigte sich kein Einfluss des *BDNF*-Val66Met-Polymorphismus auf die LCLs und deren Reaktion auf diese Substanzen.

Da das Protein BDNF neuroprotektiv und wachstumsfördernd auf periphere und zentrale Nervenzellen wirkt [20], wurde in unserer Studie untersucht, ob der BDNF ebenso einen protektiven Einfluss auf unsere LCLs haben könnte. Da der Vorläufer des BDNF, der ProBDNF, eine entgegengesetzte Wirkung aufweist als der BDNF, wurde dieser ebenfalls

untersucht. Die Höhe der IC50 aller Substanzen war unabhängig von der Höhe des BDNF-Gehalts intrazellulär. Die Menge des intrazellulären ProBDNF korrelierte positiv mit der Toxizität des Grüntee-Extraktes ($r = 0,438$; $p = 0,011$), aber nicht mit dem des BDNFs ($r = 0,213$; $p = 0,233$). Eine Erklärung könnte sein, dass der ProBDNF der Vorläufer des BDNF ist und damit die intrazelluläre Menge an ProBDNF mit der BDNF-Menge extrazellulär korreliert. Je mehr ProBDNF produziert wird, desto mehr BDNF kann daraus produziert werden. Da BDNF eine extrazelluläre Wirkung hat, könnte davon ausgegangen werden, dass der extrazelluläre BDNF-Gehalt mit dem Verhalten der Zellen positiv korreliert. Da die extrazelluläre Konzentration nicht mit unseren Methoden messbar war, zudem Plasmin extrazellulär in-vitro fehlt, müsste ein sensiblerer Test durchgeführt werden und Plasmin zugeführt werden, um diese Hypothese zu bestätigen. Eine weitere Erklärung wäre, dass der intrazelluläre ProBDNF stabiler ist als der BDNF [1]. Warum sollte BDNF aber nur vor EGCG schützen aber nicht auch vor den Antidepressiva? Eine Möglichkeit könnte sein, dass EGCG die BDNF-Produktion steigert. Dies zeigte Tian et al. mit einer Studie, bei der Mäusen nach einer Rückenmarksverletzung EGCG intrathekal verabreicht wurde. Nach 4 Wochen konnte ein höherer Wert an BDNF intrathekal festgestellt werden als bei der Kontrollgruppe [58]. Dagegen spricht, dass die Substitution von Paroxetin in einer Studie von Yoshimura et al. die BDNF-Konzentration in vivo ebenfalls ansteigen ließ [63]. Die Korrelation mit den Basalwerten könnte daher stammen, dass die Zellen, die einen hohen Basalwert an ProBDNF hatten, auch mehr BDNF im gesamten produzieren können. Dies lässt sich auch mit unseren Genexpressionswerten erklären. Hierbei zeigte sich, dass die Menge an ProBDNF intrazellulär mit der Genexpression korreliert ($r = 0,571$; $p = 0,001$), während auch hier wieder die Menge des BDNF nicht korreliert ($r = 0,336$; $p = 0,56$). Um dies genauer zu untersuchen, müssten unsere LCLs mit EGCG inkubiert werden und daraus der BDNF-Gehalt, vor allem extrazellulär, und der intrazelluläre ProBDNF-Gehalt gemessen werden.

4.3 CHL1

Das CHL1 (Cell adhesion molecule with homology to L1CAM) ist ein membranständiges Protein, das im Zusammenhang mit Schizophrenie und Verhalten steht. Es wurde beschrieben, dass CHL1 eine wichtige Rolle bei der Zellmigration zu spielen scheint und zudem einen negativen Einfluss auf die Proliferation und neuronale Differenzierung

neuronaler Progenitorzellen hat. Einen direkten Zusammenhang mit der Depression oder deren Therapie ist bis heute noch nicht bekannt. Morag et al. konnte jedoch zeigen, dass die *CHL1* Genexpression den wachstumshemmenden Effekt von Paroxetin zu verstärken scheint. Denn die Zellen, die eine niedrigere IC50 aufwiesen, hatten eine 6,3 fache niedrigere Genexpression als die Zellen, die eine höhere IC50 aufwiesen [38]. Dies konnten wir mit unseren Daten nicht belegen. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen *CHL1* Genexpression und IC50 des Paroxetins. Wir konnten darstellen, dass die Zelllinien, die eine hohe IC50 bei Mirtazapin hatten, also nicht sensitiv darauf reagierten, eine niedrige *CHL1* Genexpression aufwiesen ($r = -0{,}427$; $p = 0{,}013$).

Die Proteinkonzentration in den LCLs des Zelladhäsions-Moleküls CHL1 wurde bis heute nicht untersucht. Wir konnten individuelle CHL1 Proteinkonzentrationen mittels Western Blot in den LCLs nachweisen. Diese korrelierten nicht mit der Genexpression der mRNA des *CHL1*-Gens. Eine wirkliche Aussage lässt sich diesbezüglich nicht treffen, da zum einen die Fallzahl mit 23 Zelllinien zu wenig ist, zum anderen ist der Western Blot nur eine semiquantitative Messmethode. Um hier eine Aussage treffen zu können, müssten mehr Zelllinien untersucht und besser auch ein ELISA oder eine andere quantitative Bestimmung genutzt werden.

5. Zusammenfassung

Depression ist heutzutage weltweit eine der häufigsten psychischen Erkrankungen. Daher gewinnt die Therapie dieser Erkrankung mehr und mehr an Bedeutung. Aber nur jeder dritte der mit Antidepressiva behandelten Patienten geht laut der Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression Studie (STAR*D) in Remission. Die Auswahlkriterien zur Antidepressiva - Wahl basieren zurzeit nur auf dem Nebenwirkungsspektrum, der Anwendungserfahrung des Arztes, der Patientenpräferenz und anderen unspezifischen Kriterien. Eine personalisierte Therapie mit Biomarkern wird daher immer mehr angestrebt. Biomarker müssen einige Kriterien erfüllen, so auch den Zusammenhang der Effekte in vitro, im Tiermodell und beim Menschen. Biomarker sollten in klinischen Studien zudem reproduzierbar sein. Das periphere Blut eines Probanden ist leicht zu erhalten, jedoch lassen sich Versuche aufgrund der kurzen Lebensdauer einer Primärkultur aus diesen Zellen nicht so einfach wiederholen. Der Versuchsperson müsste erneut Blut abgenommen werden. Dies kann aber aufgrund von tagesabhängigen Schwankungen und Stressveränderungen des Probanden zu Veränderungen der Testergebnisse führen. Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) sind mit Hilfe von Ebstein-Barr-Virus immortalisierte B-Lymphozyten. Sie spiegeln die genetischen und epigenetischen Eigenschaften der Testpersonen wieder. Ein Ergebnis unserer Studie zeigte, dass LCLs ein individuelles und klassenspezifisches Verhalten auf die wachstumshemmenden Effekte von Imipramin, Paroxetin, Mirtazapin und dem Grüntee-Extrakt Epigallocatechingallat (EGCG) haben. Dazu wurden LCLs von 33 depressiven Patienten aus der Munich Antidepressant Response Signature -Studie (MARS) verwendet, deren klinische Daten dort katalogisiert worden waren. Diese LCLs wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Imipramin, Paroxetin, Mirtazapin und EGCG inkubiert. Die noch verbliebenen Zellen (Zellviabilität) wurden gemessen. Aus allen LCLs wurden zudem Proteinbasalwerte von potentiellen Biomarkern (Cell adhesion molecule with homology to L1CAM (CHL1), Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), dessen Vorläufer ProBDNF) und Basalwerte der dazugehörigen Genexpression bestimmt. Von den Probanden wurden der *BDNF* Genotyp bezüglich Val66Met-Polymorphismus erhoben. Mit diesen Daten wurde eine Korrelation zwischen klinischen Daten, z.B. fünf Wochen Response und acht Wochen Remission, untersucht.

Es zeigte sich, dass es keinen Zusammenhang zwischen den klinischen Daten und den wachstumshemmenden Effekten der Antidepressiva gibt. Imipramin zeigte bei niedriger Konzentration eine Förderung der Zellproliferation. Diese Ergebnisse korrelieren mit der fünf Wochen-Response ($p = 0,035$). Der zellproliferative Effekt zeigte also einen Zusammenhang mit dem Ansprechen der Antidepressiva, aber der entgegengesetzte Effekt nicht.

Ein Beleg, dass der Genotyp des *BDNF*s einen Einfluss auf das Verhalten der Zellen auf die Substanzen hat, konnte bei der geringen Fallzahl nicht gefunden werden. Die Genexpression der *BDNF* - mRNA und die intrazelluläre ProBDNF - Konzentration korrelierten positiv miteinander ($p = 0,001$). BDNF ist instabiler als ProBDNF und ist ein extrazellulär wirkendes Protein. Diese Eigenschaften des BDNFs könnten erklären, warum in unseren Tests die Genexpression und auch die ProBDNF - Konzentration nicht mit der intrazellulären BDNF - Konzentration korrelierten. Obwohl in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass das Serum - BDNF bei depressiven Testpersonen während einer Therapie mit Paroxetin ansteigt, konnten wir mit den LCLs keinen Zusammenhang zwischen wachstumshemmenden Effekten von Paroxetin und anderen Antidepressiva und einem Anstieg der BDNF - oder ProBDNF - Konzentration nachweisen.

Wir konnten demonstrieren, dass eine erhöhte ProBDNF - Basalwertkonzentration ($p = 0,011$) und auch die *BDNF* - Genexpression ($p = 0,038$) eine erhöhte IC50 beim EGCG aufwies. EGCG steigert laut einer Studie bei Mäusen mit Rückenmarksverletzungen intrathekal die BDNF - Konzentration. Das CHL1, ein membranständiges Adhäsionsmolekül, konnten wir mittels Western Blot in den LCLs messen. Eine Korrelation zwischen der CHL1 Konzentration und den wachstumshemmenden Effekten der Antidepressiva und der *CHL1* Genexpression konnte nicht gezeigt werden. Wir konnten aber einen Zusammenhang zwischen der Genexpression und der IC50 von Mirtazapin darstellen: Je höher die IC50 desto niedriger die Genexpression ($p = 0,013$). Mit diesen Versuchen und den klinischen Daten konnte gezeigt werden, dass Lymphoblastoide Zelllinien ein mögliches Modell zur Biomarkerfindung darstellen. Es müssen jedoch noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, u.a. sollten mehr Zelllinien verwendet und andere klinische Daten, wie das Nebenwirkungsspektrum, analysiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Barker P A: Whither proBDNF? Nat.Neurosci 12: 105-106 (2009)

2. Berger M, Brakemeier E L, Klesse C, Schramm E: Affective disorders. The significance of psychotherapeutic approaches. Nervenarzt 80: 540-546 (2009)

3. Bolton J M, Pagura J, Enns M W, Grant B, Sareen J: A Population-Based Longitudinal Study of Risk Factors for Suicide Attempts in Major Depressive Disorder. J Psychiatr Res 44: 817-826 (2010)

4. Cartwright M, Mikheev A M, Heinrich G: Expression of neurotrophin genes in human fibroblasts: differential regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. Int.J.Dev.Neurosci 12: 685-693 (1994)

5. Cattaneo A, Bocchio-Chiavetto L, Zanardini R, Milanesi E, Placentino A, Gennarelli M: Reduced peripheral brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are normalized by antidepressant treatment. Int.J.Neuropsychopharmacol 13: 103-108 (2010)

6. Cloonan S M, Drozgowska A, Fayne D, Williams D C: The antidepressants maprotiline and fluoxetine have potent selective antiproliferative effects against Burkitt lymphoma independently of the norepinephrine and serotonin transporters. Leuk.Lymphoma 51: 523-539 (2010)

7. Cujipers P, Sijbrandij M, Koole S L, Andersson G, Beekman A T, Reynolds C F 3rd: Adding psychotherapy to antidepressant medication in depression and anxiety disorders: a meta-analysis. World Psychiatry 13: 56-67 (2014)

8. Cunha A B, Frey B N, Andreazza A C, Goi J D, Rosa A R, Goncalves C A, Santin A, Kapczinski F: Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. Neurosci.Lett 398: 215-219 (2006)

9. DGPPN, BÄK, KBV, AWMF, AkdÄ, BPtK, BApK, DAGSHG, DEGAM, DGPM, DGPs, DGRW: S3-Leitlinie/Nationale VersorgungsLeitlinie Unipolare Depression - Langfassung ÄZQ, Berlin 2. Aufl, Vers 1, S43-169 (2015).

10. Diebold J: Biomarker in der klinischen Onkopathologie. In: Schmitz G, Endres S Götte D (Hrsg) Biomarker - Bedeutung für medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung, Bd 1, 1. Aufl., Schattauer, Stuttgart, S. 119-130 (2008)

11. Dilling H, Mombour W, Schmidt M, Coltart I (WHO): Internationale Klassifikation psychischer Störungen ICD-10 Kap. V (F) -Klinisch–diagnostische Leitlinien, 10. Aufl., Hogrefe , Lübeck München Mannheim, S.156-186 (2015)

12. Egan M F, Kojima M, Callicott J H, Goldberg T E, Kolachana B S, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger D R: The BDNF val66met

polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell 112: 257-269 (2003)

13. Götte D, Bertsch K: Arzneimittelentwicklung, -zulassung und Kosten-Nutzen-Bewertung. In: Schmitz G, Endres S, Götte D (Hrsg) Biomarker - Bedeutung für medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung. Bd. 1, 1. Aufl. Schattauer, Stuttgart, S. VIII-X (2008)

14. Han X, Tong J, Zhang J, Farahvar A, Wang E, Yang J, Samadani U, Smith D H, Huang J H: Imipramine treatment improves cognitive outcome associated with enhanced hippocampal neurogenesis after traumatic brain injury in mice. J.Neurotrauma 28: 995-1007 (2011)

15. Hashimoto K: Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions. Psychiatry Clin.Neurosci 64: 341-357 (2010)

16. Hennings J M, Owashi T, Binder E B, Horstmann S, Menke A, Kloiber S, Dose T, Wollweber B, Spieler D, Messer T, Lutz R, Kunzel H, Bierner T, Pollmacher T, Pfister H, Nickel T, Sonntag A, Uhr M, Ising M, Holsboer F, Lucae S: Clinical characteristics and treatment outcome in a representative sample of depressed inpatients - findings from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) project. J.Psychiatr.Res 43: 215-229 (2009)

17. Hillenbrand R, Molthagen M, Montag D, Schachner M: The close homologue of the neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions. Eur.J.Neurosci 11: 813-826 (1999)

18. Holm J, Hillenbrand R, Steuber V, Bartsch U, Moos M, Lubbert H, Montag D, Schachner M: Structural features of a close homologue of L1 (CHL1) in the mouse: a new member of the L1 family of neural recognition molecules. Eur.J.Neurosci 8: 1613-1629 (1996)

19. Hong C J, Huo S J, Yen F C, Tung C L, Pan G M, Tsai S J: Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and mood disorders, age of onset and suicidal behavior. Neuropsychobiology 48: 186-189 (2003)

20. Huang EJ R L: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci 24: 677-736 (2001)

21. Huang R S, Duan S, Kistner E O, Zhang W, Bleibel W K, Cox N J, Dolan M E: Identification of genetic variants and gene expression relationships associated with pharmacogenes in humans. Pharmacogenet Genomics 18: 545-549 (2008)

22. Huang X, Zhu L L, Zhao T, Wu L Y, Wu K W, Schachner M, Xiao Z C, Fan M: CHL1 negatively regulates the proliferation and neuronal differentiation of neural

progenitor cells through activation of the ERK1/2 MAPK pathway. Mol.Cell.Neurosci 46: 296-307 (2011)

23. Insel T R: Beyond efficacy: the STAR*D trial. Am.J.Psychiatry 163: 5-7 (2006)

24. Kessler R C, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Chatterji S, Lee S, Ormel J, Ustun T B, Wang P S: The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. Epidemiol.Psichiatr.Soc 18: 23-33 (2009)

25. Kovacs D; Gonda X; Petschner P; Edes A; Eszlari N; Bagdy G; Juhasz G: Antidepressant treatment response is modulated by genetic and environmental factors and their interactions. Annals of general psychiatry 13: 13-17 (2014).

26. Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Niyaz M, Kudo M, Kunugi H: Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase. Mol.Endocrinol 22: 546-558 (2008)

27. Laske C, Eschweiler G W: Brain-derived neurotrophic factor: from nerve growth factor to modulator of brain plasticity in cognitive processes and psychiatric diseases. Nervenarzt 77: 523-537 (2006)

28. Law M, Wald N, Thompson S: By how much and how quickly does reduction in serum cholesterin concentration lower risk of ischaemic heart disease? BMJ 308: 367-372 (1994)

29. Lee BH, Park YM, Um TH, Kim S: Lower serum brain-derived neurotrophic factor levels are associated with failure to achieve remission in patients with major depression after escitalopram treatment. Neuropsychiatr Dis Treat 10: 1393-1398 (2014)

30. Lee H Y, Kim Y K: Plasma brain-derived neurotrophic factor as a peripheral marker for the action mechanism of antidepressants. Neuropsychobiology 57: 194-199 (2008)

31. Leucht C, Huhn M, Leucht S: Amitriptyline versus placebo for major depressive disorder. Cochrane Database Syst.Rev 12: CD009138 (2012)

32. Loftis J M, Wilhelm C J, Huckans M: Effect of epigallocatechin gallate supplementation in schizophrenia and bipolar disorder: an 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. Ther.Adv.Psychopharmacol 3: 21-27 (2013)

33. Lommatzsch M, Braun A, Mannsfeldt A, Botchkarev V A, Botchkareva N V, Paus R, Fischer A, Lewin G R, Renz H: Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions. Am.J.Pathol 155: 1183-1193 (1999)

34. Manji H K, Quiroz J A, Sporn J, Payne J L, Denicoff K, A Gray N, Zarate C A Jr, Charney D S: Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. Biol.Psychiatry 53: 707-742 (2003)

35. Markasz L, Stuber G, Flaberg E, Jernberg A G, Eksborg S, Olah E, Skribek H, Szekely L: Cytotoxic drug sensitivity of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B-cells. BMC Cancer 6: 265-276 (2006)

36. Morag A, Kirchheiner J, Rehavi M, Gurwitz D: Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways. Pharmacogenomics 11: 327-340 (2010)

37. Morag A, Oved K, Gurwitz D: Sex Differences in Human Lymphoblastoid Cells Sensitivities to Antipsychotic Drugs. J.Mol.Neurosci 49: 554-558 (2013)

38. Morag A, Pasmanik-Chor M, Oron-Karni V, Rehavi M, Stingl J C, Gurwitz D: Genome-wide expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies CHL1 as a putative SSRI antidepressant response biomarker. Pharmacogenomics 12: 171-184 (2011)

39. Morellini F, Lepsveridze E, Kahler B, Dityatev A, Schachner M: Reduced reactivity to novelty, impaired social behavior, and enhanced basal synaptic excitatory activity in perforant path projections to the dentate gyrus in young adult mice deficient in the neural cell adhesion molecule CHL1. Mol.Cell.Neurosci 34: 121-136 (2007)

40. Mowla S J, Farhadi H F, Pareek S, Atwal J K, Morris S J, Seidah N G, Murphy R A: Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. J.Biol.Chem 276: 12660-12666 (2001)

41. Nemeroff C B: The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. Mol.Psychiatry 1: 336-342 (1996)

42. Pariante C M, Thomas S A, Lovestone S, Makoff A, Kerwin R W: Do antidepressants regulate how cortisol affects the brain? Psychoneuroendocrinology 29: 423-447 (2004)

43. Pei Y, Smith A K, Wang Y, Pan Y, Yang J, Chen Q, Pan W, Bao F, Zhao L, Tie C, Wang Y, Wang J, Zhen W, Zhou J, Ma X: The brain-derived neurotrophic-factor (BDNF) val66met polymorphism is associated with geriatric depression: a meta-analysis. Am.J.Med.Genet.B.Neuropsychiatr.Genet 159: 560-566 (2012)

44. Peters E J, Kraja A T, Lin S J, Yen-Revollo J L, Marsh S, Province M A, McLeod H L: Association of thymidylate synthase variants with 5-fluorouracil cytotoxicity. Pharmacogenet Genomics 19: 399-401 (2009)

45. Pivac N, Kim B, Nedic G, Joo Y H, Kozaric-Kovacic D, Hong J P, Muck-Seler D: Ethnic differences in brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in Croatian and Korean healthy participants. Croat.Med.J 50: 43-48 (2009)

46. Reichardt L F: Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci 361: 1545-1564 (2006)

47. Rihmer Z, Dome P, Gonda X: The role of general practitioners in prevention of depression-related suicides. Neuropsychopharmacol.Hung 14: 245-251 (2012)

48. Rolan P, Atkinson A J,Jr, Lesko L J, Scientific Organizing Committee, Conference Report Committee: Use of biomarkers from drug discovery through clinical practice: report of the Ninth European Federation of Pharmaceutical Sciences Conference on Optimizing Drug Development. Clin.Pharmacol.Ther 73: 284-291 (2003)

49. Rollins B, Martin M V, Morgan L, Vawter M P: Analysis of whole genome biomarker expression in blood and brain. Am.J.M ed.Genet.B.Neuropsychiatr.Genet 153: 919-936 (2010)

50. Sakurai K, Migita O, Toru M, Arinami T: An association between a missense polymorphism in the close homologue of L1 (CHL1, CALL) gene and schizophrenia. Mol.Psychiatry 7: 412-415 (2002)

51. Scharnagl H, Stojakovic T, März W: Biomarker in Forschung und Diagnostik. In: Schmitz G, Endres S Götte D (Hrsg) Biomarker - Bedeutung für medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung, Bd 1, 1. Aufl., Schattauer, Stuttgart, S. 15-37 (2008)

52. Seo M K, Lee C H, Cho H Y, Lee J G, Lee B J, Kim J E, Seol W, Kim Y H, Park S W: Effects of Antidepressant Drugs on Synaptic Protein Levels and Dendritic Outgrowth in Hippocampal Neuronal Cultures. Neuropharmacology 79: 222-233 (2014)

53. Shirayama Y, Chen A C, Nakagawa S, Russell D S, Duman R S: Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. J.Neurosci 22: 3251-3261 (2002)

54. Siuciak J A, Lewis D R, Wiegand S J, Lindsay R M: Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Pharmacol.Biochem.Behav 56: 131-137 (1997)

55. Suchanek R, Owczarek A, Kowalczyk M, Kucia K, Kowalski J: Association between C-281A and val66met functional polymorphisms of BDNF gene and risk of recurrent major depressive disorder in Polish population. J.Mol.Neurosci 43: 524-530 (2011)

56. Teng H K, Teng K K, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida R D, Kermani P, Torkin R, Chen Z Y, Lee F S, Kraemer R T, Nykjaer A, Hempstead B L: ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. J.Neurosci 25: 5455-5463 (2005)

57. The International HapMap Consortium: A haplotype map of the human genome. Nature 437: 1299-1320 (2005)

58. Tian W, Han X G, Liu Y J, Tang G Q, Liu B, Wang Y Q, Xiao B, Xu Y F: Intrathecal Epigallocatechin Gallate Treatment Improves Functional Recovery After Spinal Cord Injury by Upregulating the Expression of BDNF and GDNF. Neurochem.Res 38: 772-779 (2013)

59. Trivedi M H, Rush A J, Wisniewski S R, Nierenberg A A, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland R H, Lebowitz B, McGrath P J, Shores-Wilson K, Biggs M M, Balasubramani G K, Fava M, STAR*D Study Team: Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. Am.J.Psychiatry 163: 28-40 (2006)

60. Wheeler H E, Dolan M E: Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomic discovery and clinical translation. Pharmacogenomics 13: 55-70 (2012)

61. Williams J: A structured interview guide for the Hamilton Depression Rating Scale. Arch Gen Psychiatry 45: 742-747 (1988)

62. Wittchen H U, Pittrow D: Prevalence, recognition and management of depression in primary care in Germany: the Depression 2000 study. Hum.Psychopharmacol 17: 1-11 (2002)

63. Yoshimura R, Mitoma M, Sugita A, Hori H, Okamoto T, Umene W, Ueda N, Nakamura J: Effects of paroxetine or milnacipran on serum brain-derived neurotrophic factor in depressed patients. Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry 31: 1034-1037 (2007)

64. Zhang J, Groff R F, Dayawansa S: Imipramine treatment increases cell proliferation following fluid percussion brain injury in rats. Neurol.Res 35: 247-254 (2013)

65. Zhang W, Dolan M E: Use of cell lines in the investigation of pharmacogenetic loci. Curr.Pharm.Des 15: 3782-3795 (2009)

66. Zou Y F, Ye D Q, Feng X L, Su H, Pan F M, Liao F F: Meta-analysis of BDNF Val66Met polymorphism association with treatment response in patients with major depressive disorder. Eur.Neuropsychopharmacol 20: 535-544 (2010)

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Veröffentlichungen:

1. Poster für den CINP World Congress 2012 in Schweden mit dem Thema:
„Lymphoblastoid Cell Lines as Models for Pharmacogenomics in psychopharmacology“
Eva Ersfeld[a], Kristina Stiebel[a], Susanne Lucae[b], Marcus Ising[b], Julia Stingl[a][a] *Institute of Pharmacology of Natural Products & Clinical Pharmacology, University of Ulm, Germany*[b] *Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany*

2. Poster für den CINP World Congress 2012 in Schweden mit dem Thema:
„Lymphoblastoid Cell Lines as Models for Pharmacogenomics“
Kristina Stiebel [a], Eva Ersfeld [a], Susanne Lucae [b], Marcus Ising [b], Julia Stingl [a]
[a] *Institute of Pharmacology of Natural Products & Clinical Pharmacology, University of Ulm, Germany*
[b] *Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany*

3. Paper:
Probst-Schendzielorz K, Scholl C, Efimkina O, Ersfeld E, Viviani R, Serretti A, Fabbri C, Gurwitz D, Lucae S, Ising M, Paul A M, Lehmann M L, Steffens M, Crisafulli C, Calabrò M, Holsboer F, Stingl J: HL1, ITGB3 and SLC6A4 gene expression and antidepressant drug response: results from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) study. Pharmacogenomics, 16/7: 689-701 (2015)