

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss genetischer Varianten in der GSK3 β -vermittelten
Signaltransduktion auf die Wirksamkeit der
Lithiumaugmentation bei therapieresistenter unipolarer
Depression

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Nina Jolanda Fodaro
aus Straubing

Datum der Promotion: 04. Juni 2021

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Tabellenverzeichnis | IV |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| Zusammenfassung | VII |
| Abstract | VIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Depression | 1 |
| 1.1.1 Depressive Störungen..... | 1 |
| 1.1.2 Therapieresistente Depression | 1 |
| 1.2 Lithium | 2 |
| 1.2.1 Lithiumaugmentation..... | 2 |
| 1.2.2 Wirkmechanismen von Lithium | 3 |
| 1.2.3 Inhibition der GSK3 β | 4 |
| 1.2.4 Wnt/ β -Catenin- und PI3K/AKT-Signalweg | 4 |
| 1.3 Responseprädiktion | 7 |
| 1.3.1 Responseprädiktion der Lithiumaugmentation | 7 |
| 1.3.2 GSK3 β -50T/C Single Nucleotide Polymorphismus | 8 |
| 1.3.3 SNPs in der GSK3 β -vermittelten Signaltransduktion | 9 |
| 1.4 Arbeitsziele | 10 |
| 2 Methoden | 12 |
| 2.1 Studie | 12 |
| 2.1.1 Studienaufbau | 12 |
| 2.1.2 Studienzentren | 12 |
| 2.1.3 Einschlusskriterien | 13 |
| 2.1.4 Ausschlusskriterien | 14 |
| 2.1.5 Studienablauf | 14 |
| 2.1.6 Messinstrumente..... | 15 |
| 2.1.7 Untersuchungsmaterial | 16 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2 | Laboranalysen | 17 |
| 2.2.1 | DNA-Extraktion | 17 |
| 2.2.2 | Genotypisierung | 19 |
| 2.3 | Literaturrecherche | 20 |
| 2.3.1 | Auflistung der Proteine | 20 |
| 2.3.2 | PubMed-Suche | 21 |
| 2.3.3 | Selektion von Publikationen | 22 |
| 2.3.4 | Auswahl priorisierter SNPs | 22 |
| 2.3.5 | Prüfung der Proxy-Beziehungen und der Microarray Bio-Chips | 22 |
| 2.4 | Statistische Analysen | 23 |
| 2.4.1 | Dropout | 23 |
| 2.4.2 | Cox-Regressionsanalyse | 24 |
| 2.4.3 | Screening | 24 |
| 2.4.4 | Multivariate Analysen | 25 |
| 2.4.5 | Interaktion | 25 |
| 3 | Ergebnisse | 26 |
| 3.1 | Stichprobe | 26 |
| 3.1.1 | Dropout | 26 |
| 3.1.2 | Alter und Geschlecht | 27 |
| 3.1.3 | Aktuelle depressive Episode | 28 |
| 3.1.4 | Aktuelle Pharmakotherapie | 29 |
| 3.1.5 | Lithiumspiegel | 30 |
| 3.1.6 | HAMD-Punktwert | 30 |
| 3.1.7 | Response und Remission | 31 |
| 3.2 | Literaturrecherche | 31 |
| 3.2.1 | Auflistung der Proteine aus Wnt- und PI3K/AKT-Signalweg | 31 |
| 3.2.2 | PubMed-Suche | 33 |
| 3.2.3 | Selektion von Publikationen | 34 |
| 3.2.4 | Auswahl priorisierter SNPs | 34 |
| 3.2.5 | Prüfung der Proxy-Beziehungen und der Microarray Bio-Chips | 36 |
| 3.3 | Statistische Analysen | 37 |
| 3.3.1 | Screening | 37 |
| 3.3.2 | Multivariate Analysen | 39 |
| 3.3.3 | Interaktion | 41 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4 | Diskussion..... | 43 |
| 4.1 | Relevante Ergebnisse | 43 |
| 4.1.1 | FRZB-SNP rs1530056 | 43 |
| 4.1.2 | CREB1-SNP rs12477677..... | 47 |
| 4.2 | Methodische Aspekte..... | 51 |
| 4.2.1 | Studienaufbau..... | 51 |
| 4.2.2 | Literaturrecherche..... | 52 |
| 4.3 | Stärken | 53 |
| 4.4 | Limitationen | 54 |
| 4.5 | Zusammenfassung und Ausblick..... | 55 |
| 5 | Anhang | 58 |
| | Literaturverzeichnis..... | 63 |
| | Eidesstattliche Versicherung..... | 76 |
| | Lebenslauf..... | 78 |
| | Danksagung | 79 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Übersicht über die Altersverteilung im PP-Sample..... | 27 |
| 2 | Übersicht über die Geschlechterverteilung im..... PP-Sample | 27 |
| 3 | Parameter zur aktuellen depressiven Episode im..... PP-Sample | 28 |
| 4 | Verteilung der antidepressiven Medikation und der..... Komedikation im PP-Sample | 29 |
| 5 | Daten zum LS im Studienverlauf im PP-Sample..... | 30 |
| 6 | Veränderung des HAMD-Punktwertes unter LA im..... PP-Sample | 30 |
| 7 | Häufigkeit des Erreichens von Response und Remission..... im PP-Sample | 31 |
| 8 | Anzahl der Ergebnisse der PubMed-Suche zu Genen..... des Wnt- und PI3K/AKT-Signalwegs | 33 |
| 9 | Übersicht über die priorisierten SNPs aus den..... selektierten Publikationen mit zugehörigen p-Werten und Assoziationen | 35 |
| 10 | Übersicht über die SNP-Auswahl für die statistischen..... Analysen | 36 |
| 11 | Ergebnisse des univariaten Screenings für Remission..... unter LA mit Allel-Variablen | 37 |
| 12 | Ergebnisse des multivariaten Regressionsmodells für..... Remission unter LA mit Allel-Variablen | 40 |
| 13 | Ergebnisse des multivariaten Regressionsmodells für..... Remission unter LA mit Genotyp-Variablen | 41 |
| 14 | Ergebnisse des Regressionsmodells zur Prüfung der..... Interaktion zwischen den SNPs mit Allel-Variablen | 41 |
| 15 | Ergebnisse des Regressionsmodells zur Prüfung der..... Interaktion zwischen den Genotypen mit Genotyp-Variablen | 42 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Wnt/ β -Catenin- und PI3K/AKT-Signalweg..... | 6 |
| 2 | Studienablauf am Beispiel der ALIA-Studie..... | 15 |
| 3 | Schritte der Literaturrecherche..... | 21 |
| 4 | Patientenselektion nach Dropout-Kriterien..... | 27 |
| 5 | Schritte der Literaturrecherche mit Ergebnissen..... | 32 |
| 6 | Behandlungsdauer bis zur Remission unter LA für rs1530056..... | 38 |
| 7 | Behandlungsdauer bis zur Remission unter LA für rs12477677..... | 39 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| AD | Antidepressiva |
| AKT | Proteinkinase B |
| ALIA | Antidepressiva und Lithiumaugmentation |
| APC | Adenomatous Polyposis Coli |
| BCL2 | B-cell CLL /lymphoma 2 protein |
| BDNF | Brain-derived neurotrophic factor |
| CLOCK | Circadian locomotor output cycles kaput protein |
| CREB | Cyclic AMP-responsive element-binding protein |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSM | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELIA | Escitalopram und Lithiumaugmentation |
| FKBP5 | FK506-binding protein 5 |
| FRZB | Secreted frizzled-related protein 3 |
| GSK3 β | Glykogen-Synthase-Kinase-3 β |
| HAMD | Hamilton Depression Rating Skala |
| HR | Hazard Ratio |
| KEGG | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes |
| KI | Konfidenzintervall |
| LA | Lithiumaugmentation |
| LD | Linkage disequilibrium |
| LS | Lithiumspiegel |
| MAO | Monoaminoxidase |
| M.I.N.I. | Mini International Neuropsychiatric Interview |
| MSM | Magnetic Separation Module |
| MW | Mittelwert |
| N | Anzahl |
| ncRNA | Nicht-proteinkodierende RNA |
| p | p-Wert |
| PIP3 | Phosphatidylinositol (3,4,5) Triphosphat |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PP | Per protocol |
| SD | Standardabweichung |
| SNAP | SNP Annotation and Proxy Search System |
| SNP | Single Nucleotide Polimorphismus |
| SNRI | Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer |
| SPSS | Statistical Package for Social Science |
| SSRI | Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer |
| TCA | Trizyklische Antidepressiva |
| TRD | Therapieresistente Depression |
| WHO | World Health Organization |

Zusammenfassung

Einleitung: Lithiumaugmentation (LA) ist eine effektive Strategie in der Behandlung der therapieresistenten Depression (TRD). Es fehlen jedoch klinisch anwendbare Prädiktoren für das Ansprechen auf LA. Vorangegangene Arbeiten zeigten eine signifikante Assoziation des Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) -50T/C Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) mit dem Ansprechen auf LA bei TRD-Patienten. Ziel dieser Dissertationsarbeit ist die Identifikation weiterer SNPs der GSK3 β -vermittelten Signaltransduktion (Wnt/ β -Catenin- und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) / Proteinkinase-B (AKT)-Signalweg) als Responseprädiktoren für LA.

Methoden: In einer prospektiven multizentrischen Kohortenstudie wurde das genetische Material von 148 Probanden mit TRD unter LA anhand der Microarray Bio-Chips „Infinium Exome-24“ und „Infinium OmniExpress-24“ genotypisiert. Die Schwere der Depression wurde mit der Hamilton Depression Rating Skala (HAM-D-17) bei Baseline und nach mindestens 4 Wochen LA-Behandlung bestimmt. Es erfolgte eine systematische Literaturrecherche zur Selektion von SNPs nach festgelegten Kriterien (Der SNP zeigt eine Assoziation mit Response oder Remission bei AD-Behandlung mit $p < 0,05$, die Signifikanz bleibt nach Hinzufügen von Kovariaten, Korrektur für multiples Testen oder Replikation in einer unabhängigen Stichprobe erhalten). Proxy-Beziehungen wurden mit dem SNP Annotation and Proxy Search Systems (SNAP) geprüft ($r^2 < 0,8$, Basenpaarabstand > 500). Die Remissionswahrscheinlichkeit wurde mittels Cox-Regressionsanalyse untersucht.

Ergebnisse: Es wurden 6 SNPs für die statistischen Analysen selektiert: rs1530056 (FRZB); rs2709373 und rs12477677 (CREB1); rs352428, rs3800373 und rs9380526 (FKBP5). 2 SNPs zeigten eine signifikante Assoziation mit Remission unter LA: Der CREB1-Proxy-SNP rs12477677 ($p = 0,033$) und sein CC-Genotyp ($p = 0,011$) sowie der FRZB-SNP rs1530056 GG-Genotyp ($p = 0,036$). Die übrigen SNPs zeigten keine Assoziation.

Schlussfolgerung: Dies ist die erste klinische Studie, die den Einfluss systematisch selektierter SNPs der GSK3 β -vermittelten Signaltransduktion auf Remission unter LA untersucht. Laut der vorliegenden Ergebnisse spielen 2 SNPs des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (rs1530056 und rs12477677) eine entscheidende Rolle bei dem Erreichen einer Remission unter LA, die als potentielle Responseprädiktoren für LA eingesetzt werden könnten.

Abstract

Introduction: Lithium augmentation (LA) is an effective strategy in therapy of treatment-resistant depression (TRD). However, clinically applicable predictors of LA-response are missing. Previous studies showed significant association between the glycogen-synthase-kinase-3 β (GSK3 β) -50T/C single nucleotide polymorphism (SNP) and LA-response in TRD-patients. The aim of this study was to identify further SNPs in GSK3 β -transmitted signaling (Wnt/ β -catenin- and phosphoinositide-3-kinase (PI3K) / protein kinase-B (AKT)-pathway) as predictors of LA-response.

Methods: In a multi-site prospective cohort study we genotyped the genetic material of 148 TRD-patients with LA-treatment with „Infinium Exome-24“ and „Infinium OmniExpress-24“ microarray chips. Depression severity was assessed using the Hamilton Depression Rating Scale (HAMD-17) at baseline and after at least 4 weeks of LA-treatment. In order to select SNPs we conducted a systematic literature research with predetermined criteria (the SNP shows a significant association with response or remission in antidepressant treatment with $p < 0,05$, the significance remains after addition of covariates, multiple testing correction or replication in an independent sample). Proxy-relations were analysed with the SNP Annotation and Proxy Search System (SNAP) ($r^2 < 0,8$, base pair distance > 500). Remission was tested in a Cox Proportional-Hazards Model.

Results: We selected 6 SNPs for statistical analysis: rs1530056 (FRZB); rs2709373 and rs12477677 (CREB1); rs352428, rs3800373 and rs9380526 (FKBP5). 2 SNPs showed significant association with remission in LA-treatment: CREB1 proxy SNP rs12477677 ($p = 0,033$) and its CC-genotype ($p = 0,011$) as well as FRZB-SNP rs1530056 GG-genotype ($p = 0,036$). No association was found for the remaining SNPs.

Conclusion: This is the first clinical study investigating the influence of a systematic selection of SNPs in the GSK3 β -transmitted signaling on remission in TRD-patients treated with LA. Present results suggest that 2 SNPs in the Wnt/ β -catenin pathway (rs1530056 and rs12477677) might play a significant role in reaching remission during LA-treatment and could function as potential predictors of LA-response.

1 Einleitung

1.1 Depression

1.1.1 Depressive Störungen

Depressive Störungen zählen zu den häufigsten und schwersten Formen psychischer Erkrankung¹. Zu den typischen Symptomen zählen Traurigkeit, Interesselosigkeit und Antriebsverlust sowie Gefühllosigkeit und Minderwertigkeitserleben. Weiterhin leiden depressive Patienten an einhergehenden somatischen Beschwerden wie Schlafstörungen, Müdigkeit und Appetitverlust. Nicht zuletzt kann eine Depression Suizidalität verursachen und im schlimmsten Fall zum Suizid führen².

Die Wahrscheinlichkeit im Laufe des Lebens an einer Depression zu erkranken liegt bei bis zu 17%³. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) leiden weltweit über 300 Millionen Menschen aller Altersklassen an einer depressiven Störung⁴. Dabei entwickeln 15-25% der Patienten einen chronischen Verlauf⁵. Unter allen Erkrankungen, welche zu langfristiger Behinderung führen, steht die Major Depression an vierter Stelle¹ und wird Berichten der WHO zufolge schon 2020 Platz zwei einnehmen⁶.

Weiterhin gehen depressive Erkrankungen mit hohen Rückfallraten einher, wobei ca. 50% der Patienten nach der ersten Episode und sogar bis zu 80% nach der zweiten Episode eine oder mehrere weitere depressive Episoden erleiden⁷. Durch die hierbei entstehenden hohen Kosten durch Arbeitsunfähigkeit und Produktivitätsminderung haben besonders die schweren, therapieresistenten und rezidivierenden Formen depressiver Störungen einen bedeutenden sozioökonomischen Einfluss^{7,8}.

1.1.2 Therapieresistente Depression

Therapieresistenz ist ein weit verbreitetes Problem in der Behandlung depressiver Erkrankung. In der größten bisher durchgeführten Studie zur Therapie der Depression in den USA, der STAR*D-Studie (Sequenced Treatment Alternatives to Relieve

Depression), konnten lediglich 37% der Patienten nach 12 Wochen Citalopram-Einnahme und 67% nach insgesamt 4 adäquaten Therapieversuchen eine Remission erreichen⁹. Weiterhin zeigten mehrere Zulassungs- und Wirksamkeitsstudien zu verschiedenen Antidepressiva (AD), dass ein Drittel bis die Hälfte der Probanden nicht auf die Behandlung ansprach^{10,11}.

Eine allgemeingültige Definition des Begriffes der therapieresistenten Depression (TRD) existiert nicht, häufig wird der Begriff jedoch als das Nichtansprechen auf mindestens zwei medikamentöse Therapieversuche verstanden, die sich in der AD-Klasse unterscheiden und bezüglich Dosis und Dauer adäquat durchgeführt wurden¹². Im klinischen Alltag zeichnen sich jedoch häufig unsystematische Therapieverläufe mit inadäquat durchgeführten Pharmakotherapien ab, welche als eine der Hauptursachen für TRD angesehen werden. Die Arbeiten verschiedener Forschungsgruppen konnten zeigen, dass eine algorithmusbasierte Therapie einer Behandlung nach freiem klinischen Ermessen überlegen ist¹³⁻¹⁵. Die Festlegung einer idealen Abfolge einzelner Behandlungsschritte ist hierbei weiterhin ausstehend. Derzeit empfiehlt die aktuelle deutsche S3-Leitlinie / Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression¹⁶ die Lithiumaugmentation (LA) als Maßnahme mit den besten Wirksamkeitsnachweisen im zweiten Schritt der „Maßnahmen bei Nichtansprechen“ auf einen adäquaten Therapieversuch.

1.2 Lithium

1.2.1 Lithiumaugmentation

Augmentation wird definiert als Therapiemaßnahme, bei der einem AD eine weitere Substanz hinzugefügt wird, welche selbst nicht zur Klasse der AD gehört und keine Standardtherapie einer depressiven Episode darstellt¹⁷. Augmentationsverfahren können in der Behandlung von TRD eingesetzt werden. Als Behandlungsmaßnahme mit optimaler Evidenzlage¹⁸ nimmt die LA eine zentrale Rolle in der Behandlung der therapieresistenten unipolaren Depression ein.

Ab den 50er Jahren wurde Lithium zunächst als Phasenprophylaxe in der bipolaren Störung sowie als Akuttherapie bei manischen Episoden eingesetzt¹⁹. Anfang der 80er Jahre berichteten de Montigny et al. erstmals von der erfolgreichen Behandlung therapieresistenter unipolar depressiver Patienten durch die zusätzliche Gabe von Lithium zum eingesetzten Antidepressivum²⁰. Seither konnten zahlreiche offene Studien sowie 10 randomisierte placebokontrollierte Studien die Effektivität der LA bei TRD belegen, wobei Ansprechraten von bis zu 50% beschrieben wurden^{18,21}.

Trotz hoher Evidenz wird LA in der Praxis jedoch immer noch zurückhaltend eingesetzt. Die geringe therapeutische Breite des Lithiums, regelmäßige Spiegelkontrollen sowie befürchtete Nebenwirkungen, wie z.B. Tremor, Gewichtszunahme oder Nephrotoxizität führen zu Anwendungsunsicherheiten beim Behandler. Außerdem fehlen klinisch anwendbare Prädiktoren für das Ansprechen auf LA, die eine gezielte Therapiezuweisung ermöglichen würden.

1.2.2 Wirkmechanismen von Lithium

Trotz jahrzehntelanger Forschungsbemühungen sind die Wirkmechanismen von Lithium aufgrund ihrer Komplexität noch nicht hinreichend aufgeklärt²². Anders als traditionelle AD und Antipsychotika bindet Lithium nicht an zelluläre Rezeptoren, sondern entfaltet seine Wirkung über die Modifikation intrazellulärer Second-Messenger-Systeme, nachgeschaltete Neurotransmitter-Rezeptoren und Enzymhemmung mit anschließender Modulation komplex vernetzter intrazellulärer Signalkaskaden²³.

Nach aktuellem Forschungsstand scheinen GABAerge, neurotrophe und genetische Effekte für die Wirkung der LA eine Rolle zu spielen¹⁹. Weitere Studienergebnisse zeigen einen steigernden Effekt von Lithium auf die neuroendokrine Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse sowie auf den Serotoninstoffwechsel; zwei neurobiologische Systeme, die auf die Regulation affektiver Störungen entscheidenden Einfluss nehmen^{19,24}. Hierbei erhöht Lithium die Ausschüttung von Glukokortikoiden und Serotonin und steigert die Serotoninbiosynthese über Modulierung der Genexpression²⁵⁻²⁷.

Darüber hinaus werden Lithium neuroprotektive Eigenschaften durch die Beeinflussung des Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) zugeschrieben, welcher Zellüberleben und synaptische Plastizität fördert²⁸. Laut präklinischer Untersuchungsergebnisse steigt BDNF unter Lithiumeinfluss, auch in klinischen Studien zeigten sich zweifach erhöhte BDNF-Serumwerte unter LA im Vergleich zu einer einfachen AD-Behandlung^{29,30}.

1.2.3 Inhibition der GSK3 β

Außerdem ist Lithium ein direkter und indirekter Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β), einer Serin/Threonin-Kinase, welche vorwiegend zentral exprimiert wird und als proapoptotisches Enzym negativ auf Zellüberleben und synaptische Plastizität wirkt^{31,32}. Die Inhibition erfolgt vermutlich über eine Kompetition von Lithium mit Magnesium³³.

Eine Folge der GSK3 β -Inhibition ist die Aktivierung von Cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg³⁴. CREB unterstützt wiederum die Expression von BDNF, was antiapoptotische, neurotrophe und neuroprotektive Effekte begünstigt^{35,36}. Zudem nimmt die GSK3 β -Inhibition Einfluss auf die Modulation zirkadianer Rhythmen³⁷.

Auf genetischer Ebene wird darüber hinaus eine Assoziation zwischen dem GSK3 β -Gen und affektiven Störungen beschrieben. Hierbei konnte eine Kopplung von bipolaren affektiven Erkrankungen mit genetischen Markern gefunden werden, die nahe der Lokalisation des GSK3 β -Gens liegen³⁸. Außerdem zeigen tierexperimentelle Untersuchungen eine AD-ähnliche Wirkung unter GSK3 β -Inhibition^{39,40}. In Anbetracht dieser Ergebnisse scheint der positive Einfluss von Lithium auf Neuroprotektion und Neuroplastizität mit der Hemmung der GSK3 β zusammenzuhängen.

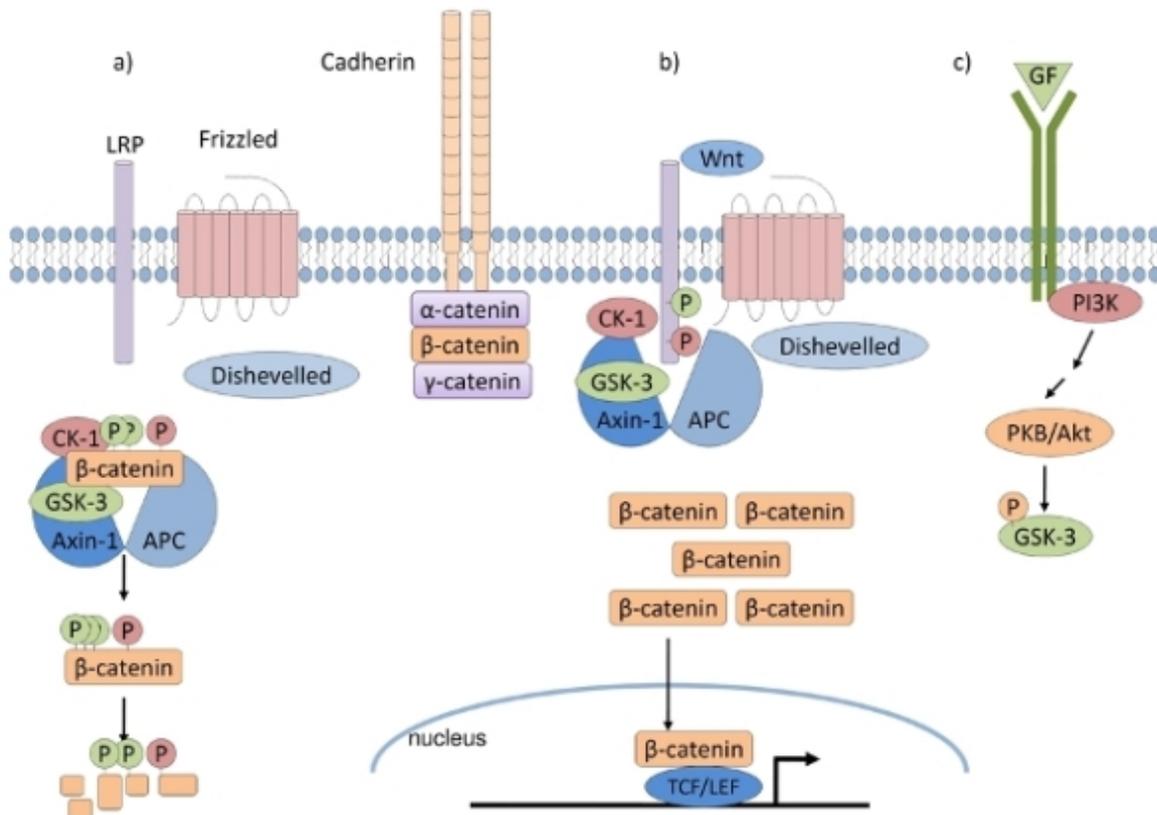
1.2.4 Wnt/ β -Catenin- und PI3K/AKT-Signalweg

Die GSK3 β spielt eine zentrale Rolle bei der Signalvermittlung im Wnt/ β -Catenin- und PI3Kinase/AKT-Signalweg und scheint über diese intrazellulären enzymatischen Kaskaden an der Vermittlung der Lithiumwirkung beteiligt zu sein. Die Wnt-Proteine

bilden eine Familie von Signalproteinen, die Zellteilung, Zellentwicklung sowie Zelldifferenzierung entscheidend beeinflussen⁴¹. Hierbei bindet Wnt an membranständige Frizzled- und LRP- (LDL-receptor related proteins) Proteinkomplexe, wodurch Signale an intrazelluläre Proteine wie z.B. GSK3 β und den Transkriptionsregulator β -Catenin weitergeleitet werden. In Abwesenheit des Wnt-Signals liegt GSK3 β mit Axin, Adenomatous Polyposis Coli (APC) und Casein-Kinase-1 (CK1) in einem intrazellulären Komplex vor, welcher den proteasomalen Abbau von β -Catenin über Phosphorylierung aufrechterhält⁴¹. Durch Wnt-Aktivierung sowie durch Lithiumeinfluss wird der Abbau von β -Catenin gehemmt, sodass β -Catenin im Zellkern akkumuliert und über Komplexbildung mit Transkriptionsfaktoren die spezifische Genaktivierung einleitet⁴². Unter den Zielgenen finden sich unter anderem Proteine, die für Neurogenese und neuronale Differenzierung entscheidend sind, wie zum Beispiel Neurogenin1, NeuroD1, Wnt3 und Wnt7a^{43,44}. Abbildung 1 a) und b) veranschaulichen den Wnt/ β -Catenin-Signalweg.

Der PI3K/AKT-Signalweg spielt eine zentrale Rolle für Zellentwicklung, Zellüberleben und den zellulären Stoffwechsel. Im PI3K/AKT-Signalweg binden Wachstumsfaktoren an membranständige Serin/Threonin-Kinasen oder G-Protein-Rezeptoren⁴⁵. Hierüber erfolgt die Aktivierung von PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), die ihr Substrat Phosphatidylinositol (3,4) Biphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol (3,4,5) Triphosphat (PIP3) konvertiert. Durch die erhöhte plasmatische Konzentration von PIP3 bindet dieses an die Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDPK1), die schließlich über Phosphorylierung die Proteinkinase B (AKT) aktiviert⁴⁵. Die Aktivierung von AKT hat unter anderem die Inhibition der GSK3 β zur Folge. Lithium wirkt ebenfalls aktivierend auf AKT durch Phosphorylierung⁴⁶ und wird über diesen Weg auch zum indirekten Inhibitor der GSK3 β . Abbildung 1 c) veranschaulicht den PI3K/AKT-Signalweg.

Abbildung 1: Wnt/ β -Catenin- und PI3K/AKT-Signalweg



Quelle: Woodgett 2010⁴⁷. Mit freundlicher Genehmigung von Faculty Opinions. a) In Abwesenheit des Wnt-Signals fördert der GSK3 β -Enzymkomplex den proteasomalen Abbau von β -Catenin. b) Wnt-Aktivierung mit Auflösung des GSK3 β -Enzymkomplexes, Akkumulation von β -Catenin im Zellkern und Genaktivierung. c) Hauptstrang des PI3K/AKT-Signalweges mit Darstellung der GSK3 β -Inhibition durch AKT.

So nehmen der Wnt/ β -Catenin- und PI3K/AKT-Signalweg als Vermittler der Lithiumwirkung durch den Einfluss auf Zellentwicklung, Zellmetabolismus und Genexpression eine zentrale Position in der Untersuchung potentieller Biomarker für das Ansprechen auf Lithiumaugmentation ein.

1.3 Responseprädiktion

1.3.1 Responseprädiktion der Lithiumaugmentation

Die Identifizierung und Anwendung eines zuverlässigen Prädiktors für das Ansprechen auf LA würde einen bedeutenden Fortschritt in der Behandlung der TRD darstellen. Der Einsatz eines solchen Biomarkers könnte eine individualisierte Therapieplanung ermöglichen, die eine frühzeitige Einschätzung des Therapieerfolges beinhalten würde. So könnte die LA als Behandlungsschritt bei TRD-Patienten optimal eingesetzt werden. Dementsprechend wäre die Untersuchung möglicher Prädiktoren von großem klinischen und gesundheitsökonomischen Interesse.

Im Rahmen der Behandlung affektiver Erkrankungen haben verschiedene Arbeitsgruppen bereits Prädiktoren für das Ansprechen auf eine Lithiumphasenprophylaxe bei bipolarer Störung untersucht. Hierbei konnten klinische Faktoren wie das Erreichen interepisodischer Remission, eine positive Familienanamnese für bipolare Störung sowie die Abwesenheit psychischer Nebenerkrankungen mit einer adäquaten Response auf eine Lithiumphasenprophylaxe assoziiert werden⁴⁸.

Bezüglich der Response bei LA haben einige wenige Studien klinische sowie demographische Daten untersucht. So scheint der Schweregrad der depressiven Episode mit dem Erfolg der LA in Verbindung zu stehen⁴⁹. Schwer depressiv erkrankte Patienten sprechen also besser auf LA an. Weiterhin konnten eine familiäre Vorbelastung für schwere Depression oder bipolare Störung sowie eine Vorgeschichte mit mindestens drei depressiven Episoden mit einer besseren Responserate assoziiert werden⁵⁰. Alvarez et al. fanden außerdem einen Zusammenhang zwischen einer erfolgreichen LA und psychomotorischer Verlangsamung sowie starkem Gewichtsverlust⁵¹. Alter, Geschlecht sowie die Klasse des augmentierten Antidepressivums zeigten hingegen keine Assoziation zum Responseverhalten der Patienten^{50,52}. Es ist zu erwähnen, dass die genannten Ergebnisse aufgrund des meist retrospektiven Studiendesigns, uneinheitlicher Methodik und kleiner Stichprobengrößen nur eine eingeschränkte Aussagekraft besitzen. Entsprechend

konnte keiner der genannten Faktoren als Prädiktor für Lithiumresponse in der Depressionsbehandlung etabliert werden.

Aufgrund des wachsenden Wissens um die Bedeutung genetischer Einflüsse auf Entstehung, Verlauf und Behandlung psychischer Erkrankungen rückte zuletzt die Untersuchung des prädiktiven Wertes genetischer Faktoren ins Zentrum des Forschungsinteresses. Hierbei konnten zwei vielversprechende Genvarianten identifiziert werden. Stamm et al. beschrieben eine signifikante Assoziation zwischen dem Serotonintransporter-Genpolymorphismus 5HTTLPR und Lithiumresponse, wobei homozygote Träger des kurzen S-Allels besser auf die Lithiumtherapie ansprachen als Träger des langen L-Allels. Auch der -50T/C Polymorphismus der GSK3 β erwies sich als einflussreiche Genvariante bezüglich des Ansprechens auf LA, die im Folgenden näher erläutert wird.

1.3.2 GSK3 β -50T/C Single Nucleotide Polymorphismus

Als Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) werden verschiedene Variationen einzelner Basenpaare innerhalb eines DNA-Strangs bezeichnet. Definitionsgemäß handelt es sich um bestimmte Lokalisationen im menschlichen Genom, bei denen sich die verschiedenen Allele in einem einzigen Nukleotid unterscheiden. Über 90% der genetischen Variation basiert auf diesem Austausch einzelner Nukleotide⁵³. In der DNA eines Individuums treten im Durchschnitt 4 bis 5 Millionen SNPs sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Regionen des Genoms auf. Abhängig von der Nukleotidvariation kann ein SNP Einfluss auf Genregulation, Proteinproduktion sowie Proteinfunktion nehmen⁵³ und so potentiell als biologischer Marker fungieren.

Der -50T/C SNP der GSK3 β , auch unter seiner „Reference SNP-ID“ bezeichnet als rs334558, befindet sich in der Promotorregion des GSK3 β -Gens auf Chromosom 3 und könnte durch seine funktionell relevante Position Einfluss auf die Genexpression nehmen⁵⁴. Tatsächlich wurde in einer Untersuchung an zwei unterschiedlichen Zelllinien eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle im Bereich des -50T/C SNPs identifiziert. Hierbei geht das T-Allel (Wildtyp) mit einer höheren Transkriptionsrate sowie einer vermehrten TAU-Phosphorylierung einher als das C-Allel (Mutation)⁵⁵.

Weiterhin wurde der -50T/C SNP im Rahmen von bipolaren Störungen untersucht. So konnten Assoziationen zwischen dem -50T/C SNP und Krankheitsverlauf, Erstmanifestationsalter sowie Konzentrationsstörungen gefunden werden⁵⁶⁻⁵⁸. Benedetti et al. beschrieben darüber hinaus ein besseres Ansprechen auf eine Langzeit-Lithiumprophylaxe bei bipolar erkrankten Patienten, die Träger des C-Allels waren⁵⁹. Weitere pharmakogenetische Studien beschrieben unter der gleichen Medikation ein schlechteres Therapieansprechen und höhere Rezidivraten für T-Allel-Träger^{59,60}. Das C-Allel wird also bei der bipolar affektiven Störung als prognosebegünstigender Faktor angesehen.

Entsprechend konnte die eigene Arbeitsgruppe eine Assoziation zwischen dem -50T/C SNP und LA bei therapieresistenten unipolar depressiven Patienten zeigen, wobei unter homo- und heterozygoten C-Allel-Trägern eine signifikant höhere Remissionsrate vorherrschte, als bei homozygoten T-Allel-Trägern⁶¹. Diese Untersuchungsergebnisse machen den -50T/C SNP des GSK3 β -Gens zu einem Kandidatengen, das als Responseprädiktor für LA bei Patienten mit TRD fungieren könnte.

1.3.3 SNPs in der GSK3 β -vermittelten Signaltransduktion

Nach derzeitigem Forschungsstand zeigen weitere Polymorphismen enzymkodierender Gene der GSK3 β -vermittelten Signaltransduktion Assoziationen mit dem Ansprechen auf antidepressive Pharmakotherapie bei unipolar depressiven Patienten. So beschrieben Serretti et al. eine positive Assoziation eines SNPs des Transkriptionsfaktors CREB, welcher direkt von der GSK3 β inhibiert wird, mit Remission bei Major Depression⁶². Weiterhin zeigte eine Variante des frizzled-related protein Gens (FRZB), einem Antagonisten von Wnt und somit Regulator des Wnt-Signalweges, einen signifikanten Einfluss auf partielle Response unter klassischer AD-Therapie⁶³. Eine japanische Arbeitsgruppe fand einen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen schwer depressiver Patienten auf Fluvoxamin und einem CLOCK (Circadian locomotor output cycles kaput protein)-SNP, welcher für die Modulation zirkadianer Rhythmen relevant erscheint; hier wurden, wenn auch bei geringer Fallzahl, Assoziationen mit Response und Remission beschrieben⁶⁴.

Es existieren außerdem Untersuchungen zu Polymorphismen einzelner enzymkodierender Gene des Wnt-Signalweges und ihrem Effekt auf Lithiumresponse bei bipolar affektiv erkrankten Patienten. In einer pharmakogenetischen Studie von Mamdani et al. zeigten zwei CREB1-SNPs signifikante Assoziationen mit dem Ansprechen auf eine Lithiumphasenprophylaxe⁶⁵. Darüber hinaus scheint eine Genvariante des transkriptionshemmenden Kernrezeptors Rev-Erb alpha, der direkt durch die GSK3 β inhibiert wird, in Zusammenhang mit Nonresponse auf Lithiumtherapie zu stehen⁶⁶. Der Einfluss von Genvarianten der GSK3 β -vermittelten Signalkaskaden auf das Ansprechen auf LA in der unipolaren Depression wurde bis dato nicht untersucht.

1.4 Arbeitsziele

In der Behandlung der TRD ist die LA derzeit eine Behandlungsstrategie mit herausragender Evidenzlage. Es fehlen jedoch zuverlässige Prädiktoren für das Ansprechen auf LA, die eine frühzeitige und präzise Einschätzung des individuellen Therapieerfolges gewährleisten können. Die gegenwärtige Datenlage verdeutlicht den Einfluss der GSK3 β -assoziierten Signaltransduktion auf die Vermittlung der Lithiumwirkung. Der -50T/C SNP der GSK3 β als zentrales Enzym dieser enzymatischen Kaskaden zeigte außerdem einen signifikanten Einfluss auf die Lithiumresponse bei unipolar depressiven Patienten. Zudem beschreiben verschiedene Arbeitsgruppen positive Zusammenhänge zwischen dem Ansprechen auf AD bzw. Lithiumphasenprophylaxe und weiteren SNPs enzymkodierender Gene der GSK3 β -vermittelten Signalkaskaden. Bislang fehlen jedoch Untersuchungen zur Assoziation zwischen Polymorphismen dieser Signalwege mit dem Ansprechen auf LA in der unipolaren Depression. Die Identifikation eines solchen Biomarkers könnte zur Etablierung einer genotypbasierten Therapieplanung der TRD beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob neben dem GSK3 β -50T/C Polymorphismus weitere Genvarianten enzymcodierender Gene des Wnt/ β -Catenin- und PI3K/AKT-Signalweges mit Remission unter LA assoziiert sind.

Auf Basis der Vorbefunde zum Wnt/ β -Catenin- und PI3K/AKT-Signalweg und des -50T/C SNP der GSK3 β kann für diese Untersuchung folgende Fragestellung formuliert werden:

- Existieren neben dem GSK3 β -50T/C Polymorphismus weitere SNPs enzymcodierender Gene der GSK3 β -vermittelten Signalwege (Wnt/ β -Catenin-Signalweg und PI3K/AKT-Signalweg), die mit Remission unter LA in der unipolaren Depression assoziiert sind?

2 Methoden

2.1 Studie

2.1.1 Studienaufbau

Die Daten, die der hier vorliegenden Untersuchung zugrunde liegen, entstammen einer prospektiven, multizentrischen klinischen Studie zur Evaluierung des genotypabhängigen Ansprechens auf LA bei Patienten mit therapieresistenter unipolarer Depression. Die Studie beinhaltet zwei Studienarme mit den Akronymen „ALIA“ (Antidepressiva und Lithiumaugmentation) und „ELIA“ (Escitalopram und Lithiumaugmentation). Der vollständige Name der ALIA-Studie lautet „Prädiktive Relevanz genetischer Polymorphismen in der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) vermittelten intrazellulären Signaltransduktion für die Wirksamkeit der LA bei der antidepressivaresistenten Major Depression“; der vollständige Name der ELIA-Studie lautet „Antidepressive Effektivität, Sicherheit, Verträglichkeit und genetische Vorhersage des Behandlungserfolges einer Lithiumaugmentation bei Patienten mit Major Depression, die mit Escitalopram behandelt werden“. Die auf Basis dieser Studienarme erhobenen Daten ermöglichen, ausgehend von der Analyse der GSK3 β , die Untersuchung weiterer genetischer und biochemischer Biomarker bezüglich einer möglichen responseprädiktiven Eigenschaft bei LA in der unipolaren Depression.

2.1.2 Studienzentren

An den folgenden 12 Studienzentren, die Mitglieder des Berliner Wissenschaftsnetzes Depression⁶⁷ sind, wurde die ALIA/ELIA-Studie durchgeführt:

- 1) Charité Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte;
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
- 2) Vivantes Wenckeback-Klinikum, Berlin;
Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik
- 3) Schlosspark-Klinik, Berlin;
Abteilung für Psychiatrie

- 4) Fliedner Klinik, Berlin
- 5) Psychiatrische Universitätsklinik der Charité im St. Hedwig-Krankenhaus, Berlin
- 6) Evangelisches Krankenhaus Königin Elisabeth Herzberge, Berlin;
Abteilung für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik
- 7) Universitätsklinikum Leipzig;
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
- 8) Jüdisches Krankenhaus, Berlin;
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
- 9) Vivantes Auguste-Viktoria-Klinikum, Berlin;
Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik
- 10) Friedrich von Bodelschwingh-Klinik, Berlin;
Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie
- 11) Vivantes Humboldt-Klinikum, Berlin;
Abteilung für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik
- 12) St. Joseph-Krankenhaus, Berlin;
Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik

2.1.3 Einschlusskriterien

Um in die Studie aufgenommen zu werden, mussten Probanden folgende Kriterien erfüllen:

- Unipolare Major Depression gemäß ICD-10 (International Classification of Diseases)- und DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)-Kriterien
- Indikation für eine antidepressive Pharmakotherapie
- Hamilton Depression Rating Skala, 17 Items (HAMD-17) ≥ 12
- Unzureichendes Ansprechen auf eine antidepressive Monotherapie (mindestens 150 mg Imipramin-Äquivalent, mindestens 4 Wochen Dauer) und klinisch gestellte Indikation für eine LA
- Alter ≥ 18 Jahre
- Schriftliches Einverständnis nach Aufklärung

2.1.4 Ausschlusskriterien

Bei Zutreffen folgender Kriterien wurden Probanden aus der Studie ausgeschlossen:

- Kontraindikation für eine Lithiumtherapie (zB. Schwere Niereninsuffizienz, Schilddrüsenfunktionsstörung, signifikante EKG-Veränderungen)
- Depressives Syndrom aufgrund einer nicht-psychiatrischen bzw. einer weiteren Achse-I-Diagnose
- Diagnose einer Demenz oder einer organischen Gehirnerkrankung
- Diagnose einer Substanzabhängigkeit und Konsum dieser Substanz in den letzten 6 Monaten (ausgenommen Koffein und Nikotin)
- Diagnose einer Antisozialen Persönlichkeitsstörung

2.1.5 Studienablauf

Die ALIA/ELIA-Studie besteht aus einer vorgeschalteten Screeningphase (Pre-phase) und einer anschließenden Studienphase (Core Study). Die 4-wöchige Screeningphase dient der Patientenrekrutierung und Stichprobenselektion entsprechend der oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien. Potentielle Probanden mussten innerhalb dieser Phase eine suffiziente antidepressive Therapie erhalten.

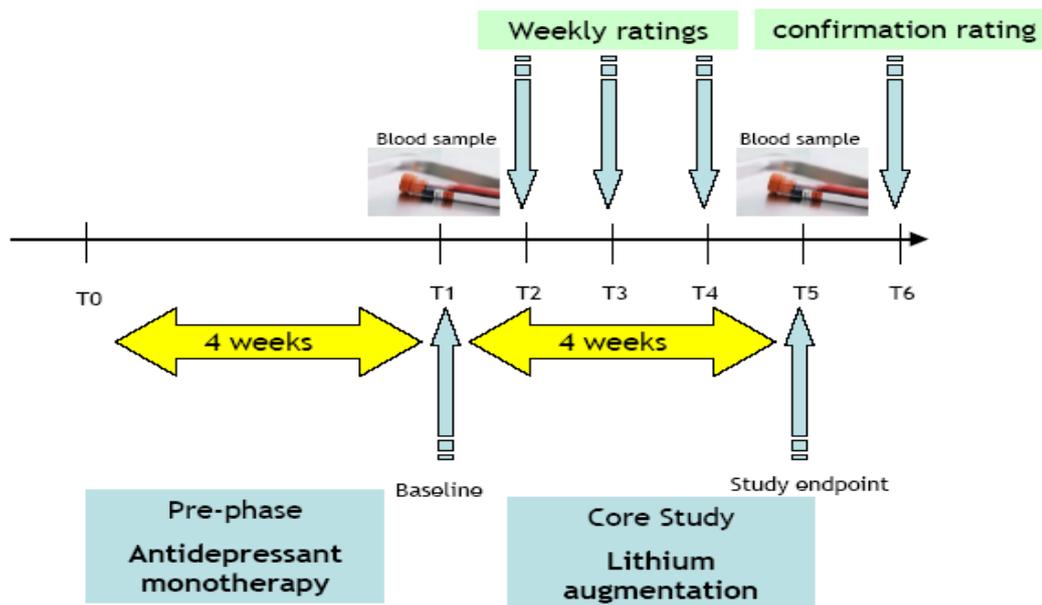
Es folgte die Einleitung der 4-wöchigen Studienphase mit der ersten Studienvisite (V1) und einer Blutentnahme vor der ersten Lithiumgabe bei Baseline, nachdem der Patient aufgeklärt worden war und sein schriftliches Einverständnis gegeben hatte. Die parallel zur LA angesetzte Begleitmedikation richtete sich nach den individuellen gesundheitlichen Bedingungen des jeweiligen Probanden und fiel in den Entscheidungsbereich des behandelnden Arztes.

In den anschließenden Studienvisiten (V2 – V4) wurden wöchentliche Erhebungen des HAMD-17 durchgeführt. Im Rahmen der Behandlung mit Lithium fanden regelmäßige Spiegelkontrollen statt, deren Ergebnisse während den Studienvisiten dokumentiert wurden. Sobald sich der Lithiumspiegel (LS) 2 Wochen lang bei $\geq 0,5$ mmol/l (suffizienter LS) stabilisiert hatte, wurde das Ende der Studienphase mit der letzten Studienvisite (V5) und einer weiteren Blutentnahme eingeleitet.

Basierend auf dem ersten und letzten HAMD-17-Wert konnte eine Aussage über das Ansprechen auf LA im Sinne einer Remission getroffen werden. Remission wurde dabei definiert als HAMD-Punktwert ≤ 7 . Abbildung 2 veranschaulicht den Studienablauf.

Abbildung 2: Studienablauf am Beispiel der ALIA-Studie

Flow Chart: Antidepressant - Lithium Augmentation Study (ALIA-Studie)



Quelle: ALIA-Studie; T0: Beginn der Screeningphase; T1: Beginn der Studienphase mit Blutentnahme bei Baseline; T2 – T4: Wöchentliche Erhebung des HAMD-17; T5: Ende der Studienphase mit Blutentnahme

2.1.6 Messinstrumente

Die für diese Arbeit relevanten angewandten Messinstrumente werden im Folgenden entsprechend ihres Einsatzes in den jeweiligen Studienvisiten beschrieben:

T1 (Baseline):

- BADO-Anamnesebogen (Basisdokumentation)
- Soziodemographische Daten (Alter, Geschlecht)
- HAMD-17
- Therapieresistenzlevel nach Thase and Rush (Ausführung siehe unten)
- Mini International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.)

T2 – T5:

- HAMD-17 (Hamilton Depression Rating Scale, 17 Items)
- Medikation
- LS-Bestimmung

T1 und T5:

- Körpergröße und Körpergewicht zur Berechnung des BMI (Body-Maß-Index)

2.1.6.1 Festlegung des Therapieresistenzlevels nach Thase and Rush

Stadium 1: Non-Response auf mindestens einen adäquaten Behandlungsversuch mit einem Antidepressivum

Stadium 2: Stadium 1 und Non-Response auf einen adäquaten Behandlungsversuch mit einem Antidepressivum aus einer anderen Wirkstoffklasse

Stadium 3: Stadium 2 und Non-Response auf einen adäquaten Behandlungsversuch mit einem trizyklischen Antidepressivum

Stadium 4: Stadium 3 und Non-Response auf einen adäquaten Behandlungsversuch mit einem (irreversiblen) Monoaminoxidase (MAO) – Hemmer

Stadium 5: Stadium 4 und Non-Response auf eine adäquat durchgeführte bilaterale Elektrokonvulsionstherapie (EKT)

2.1.7 Untersuchungsmaterial

Um Material für genetische Analysen zu erhalten, wurden 2 Blutentnahmen durchgeführt, eine bei Baseline vor LA, die andere bei Studienende nach mindestens 4 Wochen unter LA. Das Blut wurde nach herkömmlichem klinischen Vorgehen aus einer peripheren Vene entnommen. Die 3 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen, die für diese Untersuchung relevant sind, wurden bei der ersten Visite vor Beginn der Lithiumaugmentation entnommen, mit einem dem Probanden zugeordneten pseudonymisierten Zahlencode versehen und innerhalb von maximal 3

Stunden bei -37 Grad eingelagert. Bei Studienende wurden die gekühlten EDTA-Proben kollektiv ans Institut für Humangenetik, Department of Genomics, Forschungszentrum Life & Brain des Universitätsklinikums Bonn versandt.

2.2 Laboranalysen

2.2.1 DNA-Extraktion

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Extraktion und -Weiterverarbeitung erfolgte am oben genannten Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn unter Anwendung folgender Laborgeräte zur Nukleinsäuren-Isolation der Firma PerkinElmer chemagen Technologie GmbH⁶⁸:

- chemagic Magnetic Separation Module I instrument (chemagic MSM I)
- chemagic Stand 50k Type A (Artikel No. CMG-305)
- chemagic DNA Blood10k Kit (Artikel No. CMG-102)

Der Inhalt des chemagic DNA Blood10k Kits setzt sich wie folgt zusammen:

- Magnetkügelchen (dienen der Pallet-Separation im chemagic MSM I)
- Lysepuffer
- Bindungspuffer
- 4 x Waschpuffer: (1) pH 5.1-5.6; (2) pH 5.1-5.6; (3) pH 5.1-5.6; (4) pH 6.0-6.7
- Elutionspuffer pH 7.8-8.2
- Protease

Die Schritte zur DNA-Verarbeitung werden orientierend am Anleitungsprotokoll des chemagic DNA Blood10k Kits⁶⁹ erläutert:

1. 10ml Blut werden in ein geeignetes Gefäß gegeben.
2. Zur Blutprobe werden 50µl Protease und 9ml Lysepuffer hinzugefügt.
Die Lösung wird gemischt und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3. Nach dem Lyseschritt werden 1,2ml Magnetkügelchen und 29ml Bindungspuffer hinzugegeben.
Die Lösung wird erneut gemischt und 5 Minuten inkubiert.
4. Das Gefäß mit der Lösung wird nun in der linken Vertiefung des chemagic Stand 50k positioniert und 4 Minuten stehengelassen, sodass sich die Metallkügelchen verteilen können.
Daraufhin wird der Überstand abpipettiert und das Gefäß aus dem chemagic Stand 50k entfernt.
5. Der Lösung werden nun 15ml Waschpuffer (1) beigemischt.
Sie wird gemischt und für 2 Minuten inkubiert.
6. Das Gefäß mit der Lösung wird erneut für 2 Minuten im chemagic Stand 50k platziert, sodass sich die Kügelchen verteilen.
Der Überstand wird dann entfernt und das Gefäß der Halterung entnommen.
7. Schritt 5 und 6 werden nun jeweils mit 15ml Waschpuffer (2) und 15ml Waschpuffer (3) wiederholt.
Anschließend wird das Gefäß im chemagic MSM I platziert.
8. Sobald sich die Kügelchen durch die magnetische Wirkung an eine Seite des Gefäßes angelagert haben, werden 40ml Waschpuffer (4) hinzugegeben.
Nach 1 Minute Inkubation wird der Überstand abpipettiert und das Gefäß aus der Halterung entfernt.
9. Nun werden 1-2ml Elutionspuffer hinzugefügt und mit den Magnetkügelchen und dem DNA-Pellet 20 Sekunden lang gut vermischt.
Die Lösung wird anschließend unter leichtem Schwenken für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
10. Das Gefäß wird dann in der rechten Vertiefung des chemagic Stand 50k positioniert und 3 Minuten stehengelassen, sodass sich die Magnetkügelchen verteilen können.
Nun wird das Eluat mit der gereinigten DNA extrahiert.

Die DNA-Konzentration der einzelnen Proben wurde nach der Extraktion mit dem NanoDrop 8000 Microvolume UV-Vis Spectrophotometer der Firma Thermo Fisher Scientific⁷⁰ gemessen.

2.2.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung der DNA-Proben wurde ebenfalls am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Sie erfolgte genomweit mit Hilfe zweier Microarray Bio-Chips der Firma Illumina: Infinium Exome-24 BeadChip⁷¹ und Infinium OmniExpress-24 BeadChip⁷².

Bei DNA-Microarray handelt es sich um eine moderne Technik zur Bestimmung der Genexpression, welche die parallele Analyse mehrerer tausender DNA-Sequenzen und ihrer Variationen ermöglicht. Die Methode basiert auf der Hybridisierung komplementärer Nukleinsäuren. Die Arbeitsschritte der Genotypisierung werden in Anlehnung an den Infinium HTS Assay Protocol User Guide⁷³ folglich kurz dargestellt:

Tag 1:

1. Die DNA-Proben werden für die Amplifikation denaturiert und neutralisiert.
2. Die Amplifikation erfolgt anschließend während einer Inkubation über Nacht.

Tag 2:

3. Die amplifizierte DNA wird nun durch einen kontrollierten enzymatischen Prozess fragmentiert.
4. Anschließend wird die DNA mit Isopropanol ausgefällt und bei 4 Grad zentrifugiert, sodass die DNA-Fragmente akkumulieren.
5. Mit einem Hybridisierungspuffer wird die DNA als Vorbereitung auf die Hybridisierung resuspendiert.
6. Die DNA-Probe wird auf den BeadChip aufgetragen und mithilfe der IntelliHyb Dichtung verteilt. Der beladene BeadChip wird nun über Nacht im Illumina Hybridization Oven inkubiert, sodass sich die Hybridisierung von DNA-Fragmenten und Sonden stattfinden kann.

Tag 3:

7. Nicht gebundene und unspezifisch gebundene DNA wird in Vorbereitung auf Extension und Färbung abgewaschen.
8. Der Extensions- und Färbungsprozess findet in einer kapillären Durchflussskammer statt. Hierbei werden die Gensonden um ein Nukleotid verlängert, wobei die Probe-DNA als Matrize verwendet wird. An diese Nukleotide ist jeweils grüner oder roter Fluoreszenzfarbstoff gebunden.
9. Der gefärbte BeadChip wird nun vom Illumina HiScan / iScan System gescannt, wobei mithilfe eines Lasers der gebundene Farbstoff zum fluoreszieren angeregt wird. Das Scan-System produziert hochaufgelöste Bilder des Fluoreszenz-Musters und leitet hieraus den Genotyp ab.

2.3 Literaturrecherche

Es erfolgte eine systematische Literaturrecherche mit dem Ziel, genetische Varianten des Wnt- und PI3K/AKT-Signalweges auszuwählen, die eine Assoziation mit dem Ansprechen auf antidepressive Pharmakotherapie aufweisen und deren Einfluss auf Lithiumresponse bei LA in der unipolaren Depression untersucht werden soll. Das Flussdiagramm in Abbildung 3 gibt eine Übersicht über das Vorgehen bei der Literaturrecherche. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte erläutert.

2.3.1 Auflistung der Proteine

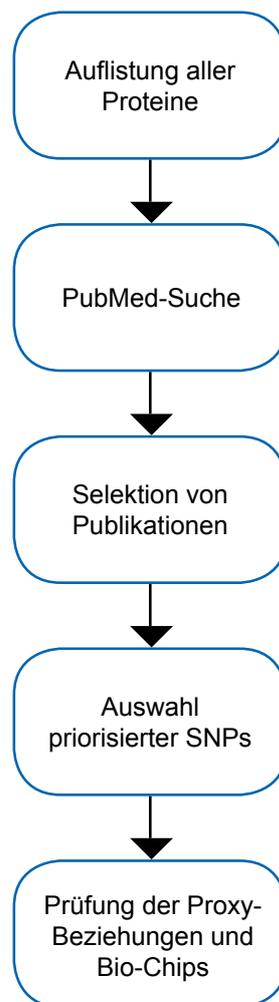
Im ersten Schritt wurde eine Auflistung aller Proteine aus Wnt- und PI3K/AKT-Signalweg in Anlehnung an Pathway-Maps aus der „KEGG-Pathway-Database“ (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)⁷⁴ erstellt. Diese Datenbank beinhaltet eine Sammlung aller Proteine und proteinkodierenden Gene molekularer Signalwege, welche Inhalt der Forschung darstellen bzw. zu denen Publikationen veröffentlicht wurden.

2.3.2 PubMed-Suche

Anschließend wurde die biomedizinische Datenbank PubMed im Juli 2017 nach Publikationen durchsucht, in welchen ein möglicher Bezug zwischen genetischen Varianten (SNPs) der gelisteten Proteine und dem Ansprechen auf antidepressive Pharmakotherapie untersucht wird. Hierbei wurde für jedes einzelne gelistete Protein folgende Suchbegriff-Kombination eingegeben:

Name des Proteins AND polymorphism, genetic[MeSH Terms] AND depression AND ((antidepressant OR lithium) OR (response OR remission)) Filters: Humans

Abbildung 3: Schritte der Literaturrecherche



Quelle: Eigene Darstellung

2.3.3 Selektion von Publikationen

Aus den Suchergebnissen erfolgte eine Selektion von Publikationen, in denen Response und/oder Remission bei antidepressiver Pharmakotherapie in der unipolaren Depression Gegenstand der Untersuchung ist.

2.3.4 Auswahl priorisierter SNPs

Aus den selektierten Publikationen erfolgte daraufhin die Auswahl priorisierter SNPs nach folgenden Kriterien:

- Der SNP ist mit Response und/oder Remission bezüglich antidepressiver Pharmakotherapie assoziiert.
- Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,05$ bzw. $p = 5 \times 10^{-8}$
- Die Signifikanz bleibt nach Hinzufügen von Kovariaten, Korrektur für multiples Testen oder Replikation in einer unabhängigen Stichprobe erhalten.

2.3.5 Prüfung der Proxy-Beziehungen und der Microarray Bio-Chips

Die ausgewählten SNPs wurden mithilfe des „SNP Annotation and Proxy Search“-Systems (SNAP)⁷⁵ einer Kopplungsanalyse unterzogen. Ziel war es, SNPs benachbarter Genorte zu identifizieren, die häufiger gemeinsam vererbt werden, als durch Zufall in einer Population zu erwarten wäre (Proxy-SNPs). Dies SNPs befinden sich in einem Kopplungsungleichgewicht bzw. linkage disequilibrium (LD).

Zunächst wurden die Proxy-Beziehungen der ausgewählten SNPs untereinander untersucht. Hierbei wurde der Grenzwert für r^2 bei $< 0,8$ ($0 =$ kein LD; $1 =$ volles LD) und der SNP-Abstand bei > 500 Basenpaaren festgelegt. SNPs, die in Proxy-Beziehung, also in starkem LD mit $r^2 > 0.8$, zu einem anderen SNP aus der Auswahl standen, wurden ausgeschlossen.

Weiterhin wurden die für diese Untersuchung verwendeten Microarray Bio-Chips „Infinium Exome-24“ und „Infinium OmniExpress-24“ am Institut für Psychiatrische Phänomik und Genomik der Universitätsklinik München auf die SNP-Auswahl hin

durchsucht. SNPs, die nicht auf den Chips gefunden werden konnten, wurden an dieser Stelle erneut mithilfe des SNAP einer genomweiten Kopplungsanalyse unterzogen und die beiden Chips wiederholt auf die gefundenen Proxy-SNPs hin geprüft.

Aus diesem Vorgehen ergab sich eine SNP-Auswahl, bestehend aus SNPs und Proxy-SNPs, welche auf Remission unter LA hin untersucht werden konnte.

2.4 Statistische Analysen

Die Datenauswertung und statistischen Rechnungen erfolgten mit dem Statistical Package for Social Science (SPSS), Version 24 der Firma IBM. Im Rahmen der Darstellung demographischer und klinischer Daten wurde für kategoriale Variablen die absolute Häufigkeit und der prozentuale Anteil, für metrische Variablen der Mittelwert und die Standardabweichung beschrieben.

2.4.1 Dropout

Die Stichprobe wurde weiterhin auf eine mögliche Populations-Stratifizierung hin untersucht. Das Phänomen der Populations-Stratifizierung kann als potentieller Confounder auftreten, wenn abstammungsbezogene Unterschiede in den Allel-Frequenzen der Stichprobe bestehen. Zunächst wurden die Daten der Stichprobe gemeinsam mit den Daten aus der dritten Phase des „International HapMap Project“⁷⁶ analysiert. Das „International HapMap Project“ stellt eine Kartographierung der Haplotypen des menschlichen Genoms auf Basis von 1301 DNA-Proben zur Verfügung. Anschließend wurde eine Hauptkomponentenanalyse mit dem smartpca-Programm (Version 13050) durchgeführt, um Abstammungs-Komponenten zu berechnen. Auf Basis der Visualisierung der ersten beiden Hauptkomponenten konnten Probanden mit hoher genetischer Abweichung von der kaukasischen Ethnizität identifiziert werden. Um Populations-Stratifizierung als Confounder auszuschließen wurde folglich das Vorliegen einer kaukasischen Ethnizität als Dropout-Kriterium festgelegt.

Um weitere potentielle Confounder bei der Untersuchung des Therapieansprechens unter Lithiumaugmentation auszuschließen, wurden von der Arbeitsgruppe für Affektive Störungen der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Campus Mitte insgesamt 6 Dropout-Kriterien ausgearbeitet:

- Die LA-Behandlung muss mindesten für 28 Tage erfolgt sein
- Es darf kein Diagnosewechsel erfolgen
- Der HAMD-Wert bei Baseline muss <12 Punkte betragen
- Es darf keine unzulässige Vormedikation eingenommen werden
- Es darf keine unzulässige Begleitmedikation eingenommen werden
- Es muss eine kaukasische Ethnizität vorliegen

Probanden, die diese Kriterien nicht erfüllten wurden von den statistischen Analysen ausgeschlossen.

2.4.2 Cox-Regressionsanalyse

Für die vorliegende Untersuchung wurde die Cox-Regressionsanalyse als statistisches Verfahren gewählt. Die Cox-Regressionsanalyse ermöglicht die Untersuchung des Eintrittszeitpunktes eines Ereignisses, in diesem Fall das Eintreten von Remission unter LA bei TRD. Weiterhin kann der Einfluss unabhängiger Variablen, hier die ausgewählten SNPs aus Wnt- und PI3K/AKT-Signalweg, auf die Zeit bis zum Ereigniseintritt analysiert werden. Hierbei wird angenommen, dass der Einfluss einer Variable auf das betreffende Ereignis über die Zeit konstant ist. Das bedeutet, dass mithilfe der Cox-Regressionsanalyse die Remissionswahrscheinlichkeit auch über den Zeitpunkt des Studienendes hinaus abgeschätzt werden kann, wenn ein Patient bei der letzten Visite noch kein Therapieansprechen gezeigt hat. Die Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse wurden mit Hazard Ratio und p-Wert (p) beschrieben.

2.4.3 Screening

Für jeden einzelnen SNP aus der SNP-Auswahl wurde eine univariate Screening-Analyse auf Basis der Cox-Regression durchgeführt, um den jeweiligen Effekt der SNPs auf Remission unter LA zu untersuchen. Anlehnend an die Ergebnisse einer

Simulations-Studie zu Confounder-Selektions-Strategien von Maldonado et al. wurde hier ein höheres Signifikanzniveau von $p < 0,15$ gewählt.

2.4.4 Multivariate Analysen

SNPs, deren p-Werte im Screening innerhalb des Signifikanzniveaus lagen, wurden in einem multivariaten Rechenmodell weiter untersucht. Als potentielle Einflussfaktoren auf das Therapieansprechen wurden folgende Kovariaten hinzugefügt:

- HAMD-Wert bei Baseline
- Alter
- Geschlecht
- Vorliegen eines suffizienten LS $> 0,5$ mmol/l über mindestens 14 Tage

Dieses Rechenmodell wurde ebenfalls zur Untersuchung der Genotypen der SNPs eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

Die Prüfung einer möglichen Abweichung vom Hardy Weinberg Gleichgewicht der signifikanten SNPs wurde durch Dr. rer. nat. Urs Heilbronner vom Institut für Psychiatrische Phänomik und Genomik der Universitätsklinik München mit der Software PLINK 1.9⁷⁷ durchgeführt.

2.4.5 Interaktion

Weiterhin wurde geprüft, ob die Effekte der SNPs bzw. Genotypen mit signifikanten p-Werten unabhängig voneinander bestanden oder ob eine Interaktion nachzuweisen war. Hierzu wurden die entsprechenden SNP- bzw. Genotyp-Variablen sowie ihr Interaktionsterm (SNP*SNP bzw. Genotyp*Genotyp) in ein multivariates Regressionsmodell integriert. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

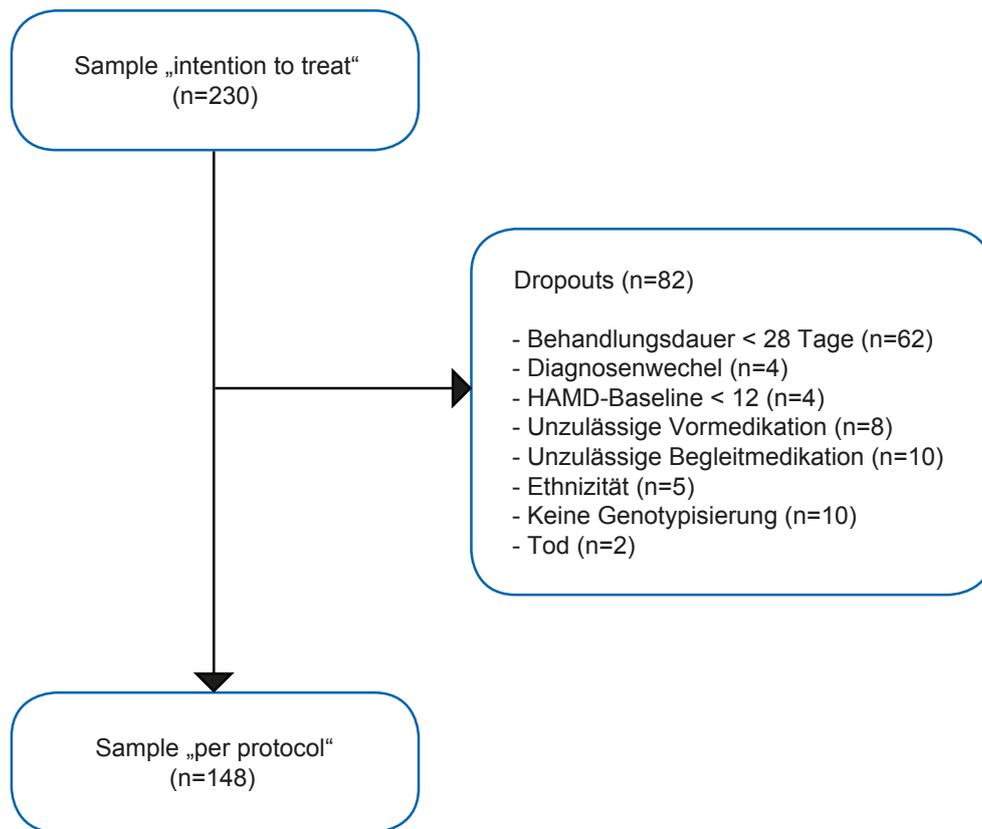
3.1 Stichprobe

Zum Zeitpunkt der Datenauswertung waren 230 Probanden in die ALIA/ELIA-Studie eingeschlossen. Die gesamte Stichprobe bestand demnach aus 230 Patienten.

3.1.1 Dropout

Für die Datenauswertung und die statistischen Analysen wurde aus der gesamten Stichprobe eine Auswahl an Probanden getroffen, welche die in 2.4.1 genannten Dropout-Kriterien erfüllten. Probanden, die ein oder mehrere Kriterien nicht erfüllten, wurden als Dropouts gewertet und nicht in die Auswahl einbezogen. Hierzu gehörten 8 Probanden mit unzulässiger Vormedikation, 10 Probanden mit unzulässiger Begleitmedikation, 4 Probanden aufgrund eines Diagnosewechsels, 4 Probanden mit HAMD bei Baseline unter 12 Punkten, 62 Probanden mit einer Behandlungsdauer von unter 28 Tagen, 5 Probanden mit nicht-kaukasischer Ethnizität und 10 Probanden wegen fehlender Genotypisierung bei fehlenden oder nicht verwendbaren Blutproben. Zwei Probanden verstarben im Studienverlauf. Bei einigen Dropout-Probanden trafen zwei oder mehr Dropout-Kriterien zu. Insgesamt wurden 82 Patienten aus der gesamten Stichprobe ausgeschlossen, sodass die Daten von 148 für eine Per-protocol-Analyse zur Verfügung standen. Im Folgenden werden diese 148 Patienten als Per-protocol-Sample (PP-Sample) bezeichnet. Abbildung 4 veranschaulicht den Prozess der Patientenselektion.

Abbildung 4: Patientenselektion nach Dropout-Kriterien



Quelle: Eigene Darstellung. Selektion des Per-protocol-Samples anhand der 6 festgelegten Dropoutkriterien (siehe 2.4.1). Hinzu kamen Dropouts durch fehlende Genotypisierung und Tod von Probanden im Studienverlauf.

3.1.2 Alter und Geschlecht

Tabelle 1: Übersicht über die Altersverteilung im PP-Sample

| Variable | N | MW | SD |
|---------------|-----|------|-------|
| Alter (Jahre) | 148 | 48,6 | 13,80 |

N = Anzahl; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

Tabelle 2: Übersicht über die Geschlechterverteilung im PP-Sample

| Variable | N | % |
|------------|--------|-------|
| Geschlecht | | |
| Weiblich | 92/148 | 62,2% |
| Männlich | 56/148 | 37,8% |

N = Anzahl; % = Prozentualer Anteil

Der Mittelwert im Alter der Probanden lag bei 48,6 Jahren. Von insgesamt 148 Probanden waren 92 weiblich (62,2%) und 56 männlich (37,8%).

3.1.3 Aktuelle depressive Episode

Tabelle 3: Parameter zur aktuellen depressiven Episode im PP-Sample

| Variable | N | % |
|--------------------------------------|---------|-------|
| Schwere der aktuellen Episode | | |
| Leicht (HAMD-17 8-14 Punkte) | 11/147 | 7,4% |
| Mittel (HAMD-17 15-25 Punkte) | 101/147 | 68,2% |
| Schwer (HAMD-17 \geq 26 Punkte) | 35/147 | 23,6% |
| Dauer der aktuellen Episode | | |
| < 1 Monat | 7/146 | 4,7% |
| < 3 Monate | 23/146 | 15,5% |
| < 6 Monate | 42/146 | 28,4% |
| < 1 Jahr | 30/146 | 20,3% |
| < 2 Jahre | 21/146 | 14,2% |
| < 5 Jahre | 17/146 | 11,5% |
| < 10 Jahre | 2/146 | 1,4% |
| >10 Jahre | 4/146 | 2,7% |
| Therapieresistenzlevel | | |
| Stadium 1 | 5/147 | 3,4% |
| Stadium 2 | 60/147 | 40,5% |
| Stadium 3 | 34/147 | 23,0% |
| Stadium 4 | 40/147 | 27,0% |
| Stadium 5 | 8/147 | 5,4% |

N = Anzahl; % = Prozentualer Anteil; HAMD = Hamilton Depression Rating Skala

In der ersten Visite vor Beginn der Lithiumaugmentation wurde die Schwere der aktuellen depressiven Episode anhand des erreichten Punktwertes in der Hamilton Depressions-Skala mit 17 Items (HAMD-17) ermittelt. Eine leichte Depression wurde bei 8-14 Punkten, eine mittelschwere Depression bei 15-25 Punkten und eine schwere Depression bei \geq 26 Punkten diagnostiziert. Die meisten Patienten (68,2%) litten an einer mittelschweren Depression, gefolgt von 23,6% mit schwerer Depression. Bei

70% der Patienten dauerte die aktuelle depressive Episode seit weniger als einem Jahr an.

Basierend auf den bereits stattgefundenen Therapieversuchen wurde das Therapieresistenzlevel der Patienten nach dem Schema von Thase and Rush (Erläuterung siehe 2.1.6.1) festgelegt. 60 Patienten (40,5%) wurden hierbei Stadium 2 zugeordnet, sie hatten also schon 2 adäquate Therapieversuche mit 2 AD unterschiedlicher Wirkstoffklassen erfolglos durchgeführt. Weitere 74 Patienten (50%) wurden Stadium 3 und 4 zugeordnet und wurden neben 2 adäquaten Therapieversuchen einer weiteren Behandlung mit einem trizyklischen Antidepressivum (TCA) oder zwei weiteren Behandlungen mit einem TCA und einem MAO-Hemmer unterzogen.

3.1.4 Aktuelle Pharmakotherapie

Tabelle 4: Verteilung der antidepressiven Medikation und der Komedikation im PP-Sample

| Variable | N | % |
|--|--------|-------|
| <u>Antidepressive Medikation</u> | | |
| Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) | 76/145 | 51,4% |
| Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) | 35/144 | 23,6% |
| Trizyklisches Antidepressivum (TCA) | 14/143 | 9,5% |
| Noradrenalin-Dopamin-Wiederaufnahmehemmer (NDRI) | 8/143 | 5,4% |
| MT-Agonist und 5HT2c-Antagonist (Agomelatin) | 4/143 | 2,7% |
| Alpha2-Antagonist (Mirtazapin) | 27/143 | 18,2% |
| MAO-Hemmer | 4/143 | 2,7% |
| <u>Komedikation</u> | | |
| Atypisches Antipsychotikum | 42/143 | 28,5% |
| Antiepileptikum | 10/143 | 6,8% |
| Benzodiazepin | 35/140 | 23,6% |
| Niederpotentes Neuroleptikum | 4/141 | 2,7% |

N = Anzahl; % = Prozentualer Anteil

Um in die ALIA/ELIA-Studie aufgenommen zu werden, mussten Probanden mindestens 4 Wochen lang eine antidepressive Medikation eingenommen haben.

SSRI stellten hierbei mit 51,4% den größten Anteil an eingesetzter antidepressiver Pharmakotherapie. Es folgten SNRI mit 23,6% und alpha2-Antagonisten (Mirtazapin) mit 18,2%. Die am häufigsten verabreichten Komedikationen waren atypische Antipsychotika mit 28,5% und Benzodiazepine mit 23,6%.

3.1.5 Lithiumspiegel

Tabelle 5: Daten zum LS im Studienverlauf im PP-Sample

| Variable | N | % |
|---|---------|-------|
| Mind. ein LS \geq 0,4 mmol/l | 146/148 | 98,6% |
| Mind. 14 Tage suffizienter LS \geq 0,5 mmol/l | 135/148 | 91,2% |

N = Anzahl; % = Prozentualer Anteil; LS = Lithiumspiegel

Bei 146 Probanden (98,6%) konnte im Verlauf der Studie mindestens ein LS von \geq 0,4 mmol/l gemessen werden. Bei 135 Probanden stabilisierte sich ein suffizienter LS von \geq 0,5 mmol/l über mindestens 14 Tage.

3.1.6 HAMD-Punktwert

Tabelle 6: Veränderung des HAMD-Punktwertes unter LA im PP-Sample

| Variable | N | MW | SD |
|--|-----|------|-------|
| HAMD-Punktwert bei erster Visite (vor LA) | 148 | 21,8 | 5,09 |
| HAMD-Punktwert bei letzter Visite (unter LA) | 148 | 12,3 | 7,19 |
| Reduktion im HAMD-Punktwert zwischen erster und letzter Visite | 148 | 9,5 | 7,14 |
| Prozentuale Reduktion im HAMD-Punktwert zwischen erster und letzter Visite | 148 | 43,5 | 30,06 |

N = Anzahl; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; HAMD = Hamilton Depression Rating Skala

Der Mittelwert des HAMD-Punktwertes lag vor Lithiumaugmentation bei 21,8 und sank im Verlauf der Studie auf einen Mittelwert von 12,3. Dies entspricht einer Reduktion von 9,5 Punkten (43,5%).

3.1.7 Response und Remission

Tabelle 7: Häufigkeit des Erreichens von Response und Remission im PP-Sample

| Variable | N | % |
|--------------------|--------|-------|
| Response erreicht | 70/148 | 47,3% |
| Remission erreicht | 51/148 | 34,5% |

N = Anzahl; % = Prozentualer Anteil

Von 148 Patienten konnten 70 (47,3%) eine Response und 51 (34,5%) eine Remission unter Lithiumaugmentation erreichen. Response war hierbei definiert als Reduktion des HAMD-Punktwertes $\geq 50\%$, Remission als HAMD-Punktwert ≤ 7 bei der letzten Visite.

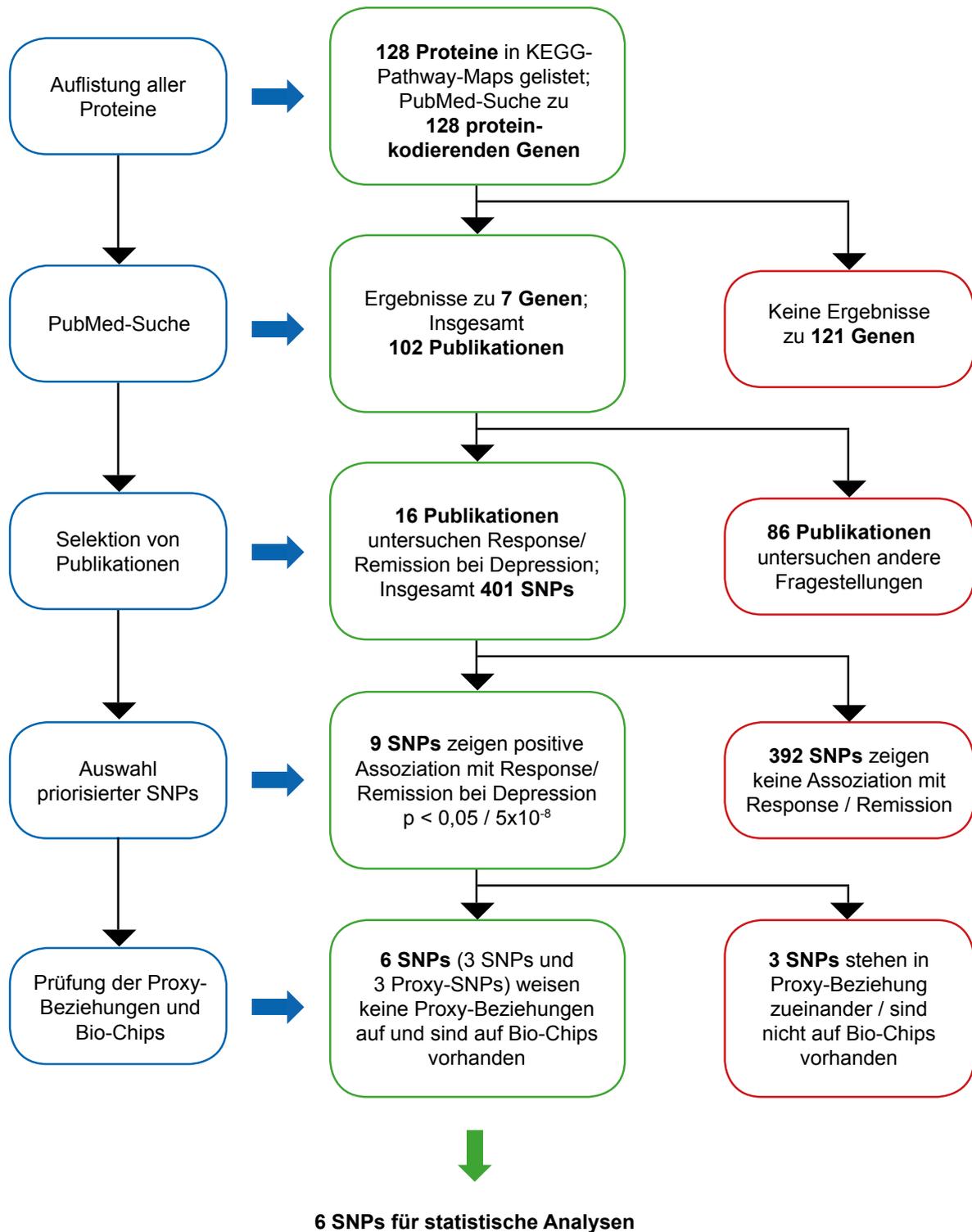
3.2 Literaturrecherche

An den 148 Probanden des PP-Samples sollte der Einfluss genetischer Varianten des Wnt- und PI3K/AKT-Signalweges auf das Therapieansprechen unter LA hin untersucht werden. Hierzu erfolgte eine Literaturrecherche wie in 2.3 erläutert. Das Flussdiagramm in Abbildung 5 veranschaulicht die Abfolge der Schritte in der Literaturrecherche und die Ergebnisse der einzelnen Schritte.

3.2.1 Auflistung der Proteine aus Wnt- und PI3K/AKT-Signalweg

Auf Basis der Pathway-Maps aus der KEGG-Pathway-Database konnten insgesamt 128 Proteine, 75 für den Wnt- und 53 für den PI3K/AKT-Signalweg, gefunden werden. Tabelle 16 und Tabelle 17 im Anhang zeigen eine Auflistung aller 128 proteinkodierenden Gene.

Abbildung 5: Schritte der Literaturrecherche mit Ergebnissen



Quelle: Eigene Darstellung

3.2.2 PubMed-Suche

In der PubMed-Suche zu den 128 proteinkodierenden Genen wurden Ergebnisse zu insgesamt 7 Genen, 5 aus dem Wnt-Signalweg (FRZB, APC, CREB1, CLOCK, FKBP5) und 2 aus dem PI3K/AKT-Signalweg (AKT1, BCL2) gefunden. Die folgenden zwei Tabellen geben eine Übersicht über die verwendeten Suchbegriff-Kombinationen und die Anzahl der Ergebnisse der PubMed-Suche zu diesen 7 Genen. Zu den übrigen 121 Genen wurden keine Ergebnisse gefunden.

Tabelle 8: Anzahl der Ergebnisse der PubMed-Suche zu Genen des Wnt- und PI3K/AKT-Signalwegs

| Gen | Suchbegriff-Kombination | Ergebnisse |
|-------------|---|------------|
| <u>WNT:</u> | | |
| FRZB | (((sfrp3) AND polymorphism, genetic[MeSH Terms]) AND depression) AND ((antidepressant OR lithium) OR (response OR remission)) Filters: Humans | 1 |
| APC | (((apc) AND polymorphism, genetic[MeSH Terms]) AND depression) AND ((antidepressant OR lithium) OR (response OR remission)) Filters: Humans | 1 |
| CREB1 | (((creb1) AND polymorphism, genetic[MeSH Terms]) AND depression) AND ((antidepressant OR lithium) OR (response OR remission)) Filters: Humans | 30 |
| CLOCK | (((clock) AND polymorphism, genetic[MeSH Terms]) AND depression) AND ((antidepressant OR lithium) OR (response OR remission)) Filters: Humans | 21 |
| FKBP5 | (((fkbp5) AND polymorphism, genetic[MeSH Terms]) AND depression) AND ((antidepressant OR lithium) OR (response OR remission)) Filters: Humans | 32 |

PI3K/AKT:

| | | |
|------|--|---|
| AKT1 | (((akt1) AND polymorphism, genetic[MeSH Terms]) AND depression) AND ((antidepressant OR lithium) OR (response OR remission)) Filters: Humans | 1 |
| BCL2 | (((bcl2) AND polymorphism, genetic[MeSH Terms]) AND depression) AND ((antidepressant OR lithium) OR (response OR remission)) Filters: Humans | 1 |

FRZB = secreted frizzled-related protein 3; APC = adenomatous polyposis coli; CREB1 = cAMP responsive element binding protein 1; CLOCK = circadian locomotor output cycles kaput; FKBP5 = FK506 binding protein 5; AKT1 = RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; BCL2 = B-cell lymphoma protein

3.2.3 Selektion von Publikationen

Zu den genannten 7 Genen erschienen im Rahmen der PubMed-Suche insgesamt 102 Publikationen. 16 dieser Publikationen untersuchten unter anderem Response und/oder Remission bei antidepressiver Pharmakotherapie in der unipolaren Depression. In den weiteren 86 Publikationen wurden andere Fragestellungen untersucht, zum Beispiel die Assoziation zwischen SNPs und Depression (unipolar oder bipolar), Erkrankungsanfälligkeit, Suizidalität, Schlafstörungen oder kognitiver Dysfunktion.

3.2.4 Auswahl priorisierter SNPs

In den 16 selektierten Publikationen wurden insgesamt 401 SNPs aus Wnt- und PI3K/AKT-Signalweg bezüglich Response und/oder Remission untersucht. Hiervon zeigten 9 SNPs eine positive Assoziation (5 mit Response, 3 mit Remission, 1 mit Response und Remission) bei einem p-Wert $\leq 0,05$. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die 9 SNPs, die für die weitere Untersuchung priorisiert wurden. Die übrigen 392 SNPs wiesen in der Literatur keine Assoziation mit Response und/oder Remission nach unseren Kriterien auf und wurden somit nicht weiter untersucht.

Tabelle 9: Übersicht über die priorisierten SNPs aus den selektierten Publikationen mit zugehörigen p-Werten und Assoziationen

| Gen | priorisierte SNPs | Assoziation | p | Publikation |
|------------------|-------------------|------------------------|-----------------|--|
| <u>WNT:</u> | | | | |
| FRZB | rs1530056 | Response | 0,038 | Jang et al., 2013 PMID 23207650 |
| CREB1 | rs889895 | Remission | 0,02 | Calati et al., 2013 PMID 23537502 |
| | rs7569963 | Remission | 0,015 | Seretti et al., 2011 PMID 20643483 |
| CLOCK | rs3736544 | Response/ Remission | 0,007/ 0,008 | Kishi et al., 2009 PMID 19347611 |
| FKBP5 | rs352428 | Response | 0,003 | Ellsworth et al., 2013 PMID 23324805 |
| | rs1360780 | Response | 0,04 | Kirchheiner et al., 2008 PMID 18597649 |
| | | | 0,02 | Binder et al., 2004 PMID 15565110 |
| | rs3800373 | Response | 0,04 | Kirchheiner et al., 2008 PMID 18597649 |
| | rs4713916 | Remission | 0,049 | Lekman et al., 2008 PMID 18191112 |
| <u>PI3K/AKT:</u> | | | | |
| AKT1 | rs1130214 | Response | 0,017 | Losenkov et al., 2016 PMID 26515520 |

FRZB = secreted frizzled-related protein 3; CREB1 = cAMP responsive element binding protein 1; CLOCK = circadian locomotor output cycles kaput; FKBP5 = FK506 binding protein 5; AKT1 = RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; p = p-Wert; PMID = PubMed-Identifikationsnummer

3.2.5 Prüfung der Proxy-Beziehungen und der Microarray Bio-Chips

Auf den Microarray Bio-Chips, mit denen die Genotypisierung durchgeführt wurde, konnten 3 der 9 priorisierten SNPs (rs1530056, rs352428, rs3800373) identifiziert werden. Unter den 9 priorisierten SNPs wurde eine Proxy-Beziehung entdeckt, hierbei bestand zwischen rs3800373 und rs1360780 ein Kopplungsungleichgewicht von $r^2 = 0,914$. Als Proxy von rs3800373 konnte rs1360780 von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen werden.

Die restlichen 5 SNPs wurden einer genomweiten Kopplungsanalyse unterzogen, um mögliche Proxy-SNPs für die weiterführenden Analysen zu finden. Für 3 SNPs wurden Proxy-SNPs gefunden, welche auf den Bio-Chips identifiziert werden konnten. Für rs3736544 konnte kein Proxy-SNP gefunden werden und für rs1130214 war kein Proxy-SNP auf den Bio-Chips vorhanden, sodass auch diese SNPs nicht weiter untersucht werden konnten.

Die 6 SNPs und Proxy-SNPs aus dem Wnt-Signalweg, die in den folgenden statistischen Analysen auf eine Assoziation mit Remission unter LA geprüft wurden, sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Übersicht über die SNP-Auswahl für die statistischen Analysen

| Gen | SNPs | Proxy-SNPs |
|-------------|-------------------------|--------------------------|
| <u>WNT:</u> | | |
| FRZB | <i>rs1530056</i> | |
| CREB1 | rs889895 | <i>rs2709373</i> |
| | rs7569963 | <i>rs12477677</i> |
| FKBP5 | <i>rs352428</i> | |
| | <i>rs3800373</i> | |
| | rs4713916 | <i>rs9380526</i> |

Fett und kursiv = SNPs und Proxy-SNPs, die für die statistischen Analysen ausgewählt wurden

3.3 Statistische Analysen

3.3.1 Screening

Im univariaten Screening wurden zunächst die Allel-Variablen der 6 selektierten SNPs auf eine mögliche Assoziation mit Remission unter LA hin untersucht. Als Allel-Variable wird hier eine kategoriale Variable bezeichnet, die alle drei Allel-Kombinationen bzw. Genotypen beinhaltet. Als Referenz wurde jeweils der Genotyp mit dem häufigsten Auftreten gewählt.

Für rs1530056 ($p = 0,134$) und rs12477677 ($p = 0,084$) konnte in der univariaten Cox-Regressionsanalyse ein p -Wert $< 0,15$ gefunden werden. Auch der rs1530056 GG-Genotyp ($p = 0,052$) sowie der rs12477677 CC-Genotyp ($p = 0,030$) zeigten im Screening p -Werte deutlich unterhalb des festgelegten Signifikanzniveaus. Wie aus Abbildung 6 und 7 hervorgeht, zeigen diese beiden Genotypen eine im Vergleich deutlich erhöhte Remissionswahrscheinlichkeit. Tabelle 11 zeigt die Screening-Ergebnisse der 6 selektierten SNPs.

Tabelle 11: Ergebnisse des univariaten Screenings für Remission unter LA mit Allel-Variablen

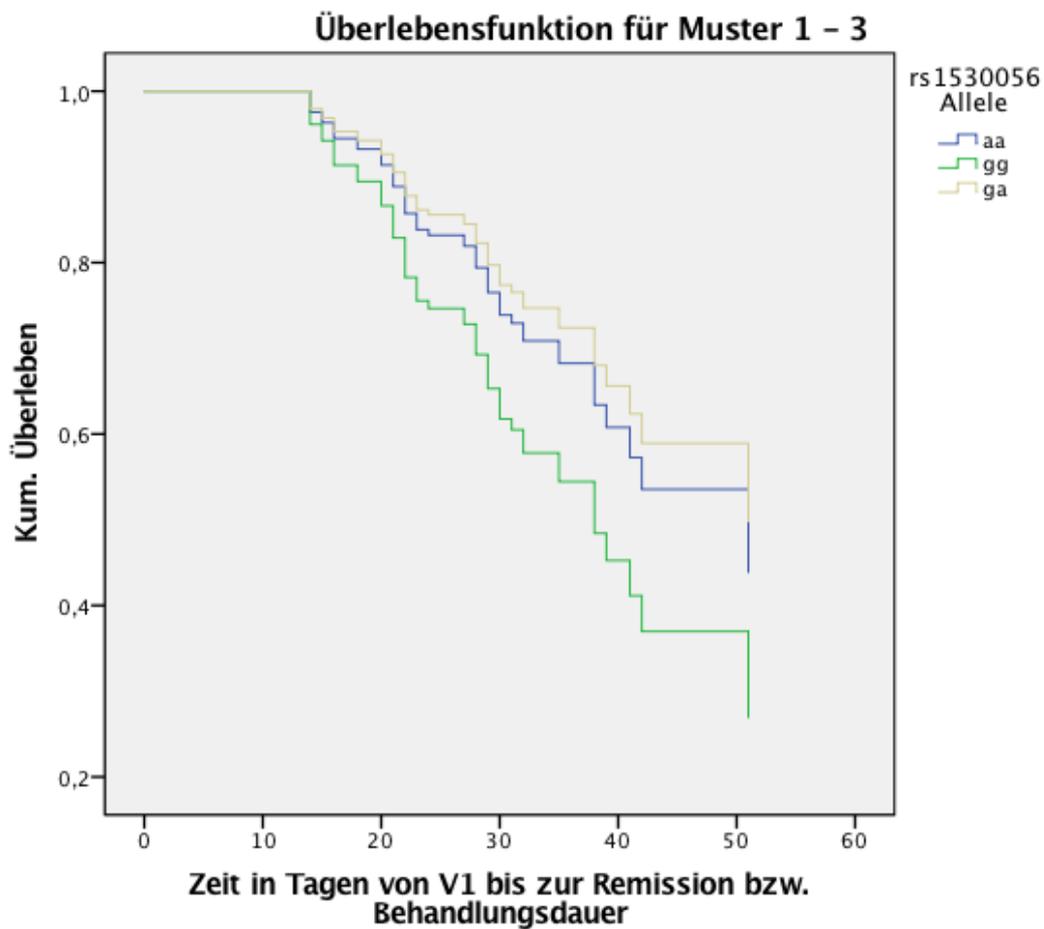
| Variable (SNP) | N | HR (95% KI) | p |
|-----------------------------|-----|-----------------------|--------------|
| rs1530056 | 148 | | 0,134 |
| rs1530056 AA vs. GA | 148 | 1,181 (0,578 – 2,412) | 0,647 |
| rs1530056 GG vs. GA | 148 | 1,881 (0,993 – 3,561) | 0,052 |
| rs2709373 | 148 | | 0,917 |
| rs2709373 CT vs. TT | 148 | 0,884 (0,482 – 1,620) | 0,690 |
| rs2709373 CC vs. TT | 148 | 0,853 (0,116 – 6,251) | 0,875 |
| rs12477677 | 148 | | 0,084 |
| rs12477677 CT vs. TT | 148 | 1,042 (0,559 – 1,873) | 0,940 |
| rs12477677 CC vs. TT | 148 | 2,684 (1,097 – 6,565) | 0,030 |
| rs352428 GA vs. GG | 148 | 0,669 (0,313 – 1,427) | 0,298 |

(AA-Allel nicht vorhanden)

| | | | |
|---------------------|-----|-----------------------|-------|
| rs3800373 | 148 | | 0,669 |
| rs3800373 GT vs. TT | 148 | 0,778 (0,423 – 1,432) | 0,419 |
| rs3800373 GG vs. TT | 148 | 0,700 (0,168 – 2,925) | 0,625 |
| rs9380526 | 148 | | 0,442 |
| rs9380526 CT vs. TT | 148 | 0,683 (0,380 – 1,228) | 0,203 |
| rs9380526 CC vs. TT | 148 | 0,922 (0,280 – 3,035) | 0,893 |

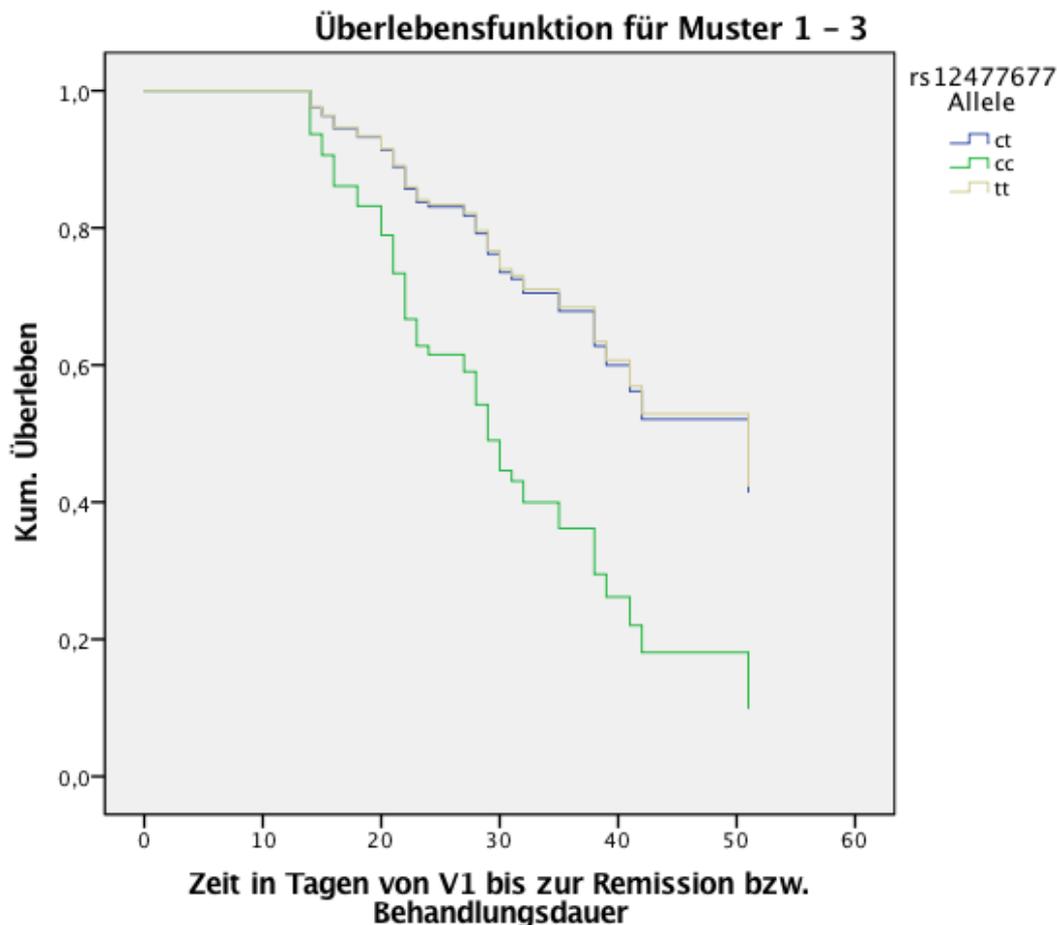
N = Anzahl; HR = Hazard Ratio; KI = Konfidenzintervall; p = p-Wert; Fett und kursiv = SNPs mit p-Wert < 0,15

Abbildung 6: Behandlungsdauer bis zur Remission unter LA für rs1530056



GA = Genotyp GA, Referenz; AA = Genotyp AA vs. GA; GG = Genotyp GG vs. GA; V1 = Visite 1

Abbildung 7: Behandlungsdauer bis zur Remission unter LA für rs12477677



TT = Genotyp TT, Refrenz; CT = Genotyp CT vs. TT; CC = Genotyp CC vs. TT; V1 = Visite 1

3.3.2 Multivariate Analysen

Rs1530056 und rs12477677 wurden in einem multivariaten Regressionsmodell mit Allel-Variablen unter Einbezug relevanter Kovariaten (HAMD bei Baseline, Alter, Geschlecht, suffizienter LS > 0,5 mmol/l über mindestens 14 Tage) weiter untersucht. Für beide SNPs konnte keine signifikante Abweichung vom Hardy Weinberg Gleichgewicht beobachtet werden (rs1530056: $p = 0,1019$; rs12477677: $p = 0,826$).

Das multivariate Regressionsmodell mit Allel-Variablen ergab signifikante p-Werte ($p < 0,05$) für den rs12477677 SNP ($p = 0,033$) und seinen CC-Genotyp ($p = 0,011$) sowie für den rs1530056 GG-Genotyp ($p = 0,036$). Einen Überblick über die Ergebnisse der multivariaten Analyse mit Allel-Variablen gibt Tabelle 12.

Tabelle 12: Ergebnisse des multivariaten Regressionsmodells für Remission unter LA mit Allel-Variablen

| Variable (SNP/Kovariate) | N | HR (95% KI) | p |
|-----------------------------|-----|------------------------|--------------|
| rs1530056 | 148 | | 0,106 |
| rs1530056 AA vs. GA | 148 | 1,268 (0,614 – 2,617) | 0,521 |
| rs1530056 GG vs. GA | 148 | 2,014 (1,045 – 3,881) | 0,036 |
| rs12477677 | 148 | | 0,033 |
| rs12477677 CT vs. TT | 148 | 1,018 (0,549 – 1,888) | 0,954 |
| rs12477677 CC vs. TT | 148 | 3,329 (1,321 – 8,398) | 0,011 |
| HAMD | 148 | 0,901 (0,845 – 0,960) | 0,001 |
| Alter | 148 | 1,017 (0,996 – 1,039) | 0,106 |
| Geschlecht | 148 | 0,808 (0,453 – 1,441) | 0,470 |
| Suffizienter LS | 148 | 5,001 (0,685 – 36,530) | 0,113 |

N = Anzahl; HR = Hazard Ratio; KI = Konfidenzintervall; p = p-Wert; HAMD = Hamilton Depression Scale bei Baseline; Suffizienter LS = Suffizienter Lithiumspiegel > 0,5 mmol/l über mindestens 14 Tage; Fett und kursiv = SNPs mit p-Wert < 0,05

Weiterhin wurden der rs1530056 GG-Genotyp und der rs12477677 CC-Genotyp in einem multivariaten Regressionsmodell mit Genotyp-Variablen unter Einbezug relevanter Kovariaten (HAMD bei Baseline, Alter, Geschlecht, suffizienter LS > 0,5 mmol/l über mindestens 14 Tage) untersucht. Eine Genotyp-Variable ist eine kategoriale dichotome Variable, in der der signifikante Genotyp gegen die übrigen Genotypen gerechnet wurde.

Das multivariate Regressionsmodell mit Genotyp-Variablen ergab signifikante p-Werte für den rs1530056 GG-Genotyp ($p = 0,039$) sowie für den rs12477677 CC-Genotyp ($p = 0,008$). Einen Überblick über die Ergebnisse der multivariaten Analyse mit Genotyp-Variablen gibt Tabelle 13.

Tabelle 13: Ergebnisse des multivariaten Regressionsmodells für Remission unter LA mit Genotyp-Variablen

| Variable (SNP/Kovariate) | N | HR (95% KI) | p |
|---------------------------------------|-----|------------------------|--------------|
| <i>rs1530056 GG vs. GA/AA</i> | 148 | 0,543 (0,304 – 0,970) | 0,039 |
| <i>rs12477677 CC vs. CT/TT</i> | 148 | 0,298 (0,122 – 0,732) | 0,008 |
| HAMD | 148 | 0,901 (0,846 – 0,960) | 0,001 |
| Alter | 148 | 1,017 (0,996 – 1,038) | 0,120 |
| Geschlecht | 148 | 0,799 (0,449 – 1,422) | 0,445 |
| Suffizienter LS | 148 | 4,971 (0,682 – 36,214) | 0,113 |

N = Anzahl; HR = Hazard Ratio; KI = Konfidenzintervall; p = p-Wert; HAMD = Hamilton Depression Scale bei Baseline; Suffizienter LS = Suffizienter Lithiumspiegel > 0,5 mmol/l über mindestens 14 Tage; Fett und kursiv = SNPs mit p-Wert < 0,05

3.3.3 Interaktion

Das Regressionsmodell zur Prüfung der SNP-SNP-Interaktion mit Allel-Variablen ergab keine Signifikanz für die Interaktionsterme aller vier Allel-Kombinationen. Die Effekte der Allel-Variablen bestehen demnach unabhängig voneinander.

Tabelle 14: Ergebnisse des Regressionsmodells zur Prüfung der Interaktion zwischen den SNPs mit Allel-Variablen

| Variable (SNP/IT) | N | HR (95% KI) | p |
|--------------------------------|-----|------------------------|-------|
| rs1530056 | 148 | | 0,071 |
| rs1530056 AA vs. GA (1) | 148 | 1,351 (0,503 – 3,633) | 0,551 |
| rs1530056 GG vs. GA. (2) | 148 | 2,672 (1,122 – 6,364) | 0,026 |
| rs12477677 | 148 | | 0,476 |
| rs12477677 CT vs. TT (1) | 148 | 1,808 (0,697 – 4,691) | 0,224 |
| rs12477677 CC vs. TT (2) | 148 | 1,249 (0,158 – 9,898) | 0,833 |
| rs1530056 * rs12477677 | 148 | | 0,270 |
| rs1530056 (1) * rs12477677 (1) | 148 | 0,419 (0,080 – 2,198) | 0,304 |
| rs1530056 (1) * rs12477677 (2) | 148 | 3,230 (0,272 – 38,312) | 0,353 |
| rs1530056 (2) * rs12477677 (1) | 148 | 0,333 (0,084 – 1,312) | 0,116 |
| rs1530056 (2) * rs12477677 (2) | 148 | 4,822 (0,364 – 63,843) | 0,233 |

IT = Interaktionsterm; N = Anzahl; HR = Hazard Ratio; KI = Konfidenzintervall; p = p-Wert

Das Regressionsmodell zur Prüfung der SNP-SNP-Interaktion mit Genotyp-Variablen ergab keine Signifikanz für den Interaktionsterm rs1530056 GG * rs12477677 CC. Die Effekte der Genotyp-Variablen bestehen demnach unabhängig voneinander.

Tabelle 15: Ergebnisse des Regressionsmodells zur Prüfung der Interaktion zwischen den Genotypen mit Genotyp-Variablen

| Variable (Genotyp/IT) | N | HR (95% KI) | p |
|------------------------------|-----|------------------------|-------|
| rs1530056 GG vs. GA/AA | 148 | 0,187 (0,033 – 1,063) | 0,059 |
| rs12477677 CC vs. CT/TT | 148 | 0,138 (0,030 – 0,629) | 0,011 |
| rs1530056 GG * rs12477677 CC | 148 | 3,069 (0,490 – 19,238) | 0,231 |

IT = Interaktionsterm; N = Anzahl; HR = Hazard Ratio; KI = Konfidenzintervall; p = p-Wert

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Genpolymorphismen der GSK3 β -vermittelten Signalkaskaden (Wnt/ β -Catenin- und PI3K/AKT-Signalweg) zu identifizieren, die mit dem Ansprechen auf LA bei unipolar depressiven Patienten assoziiert sind. Hierzu erfolgte eine systematische Literaturrecherche mit PubMed nach festgelegten Kriterien. Die verwendeten Daten entstammen der ALIA/ELIA-Studie. Diese zeichnet sich durch das bis dato größte Sample an Probanden mit TRD aus, die mit LA behandelt wurden. Die Ergebnisse der statistischen Analysen basieren auf den Daten von 148 therapieresistenten unipolar depressiven Patienten, die eine LA erhalten haben.

Es konnten zwei SNPs des Wnt/ β -Catenin-Signalweges identifiziert werden, die mit einer höheren Remissionswahrscheinlichkeit unter LA einhergehen. Der Proxy-SNP rs12477677 zeigte eine signifikante Assoziation mit Remission, wobei Träger des CC-Genotyps eine zwei- bis dreifach erhöhte Remissionswahrscheinlichkeit aufwiesen. Auch der GG-Genotyp des SNPs rs1530056 war mit Remission assoziiert. Die Effekte der beiden SNPs und ihren Genotypen bestanden unabhängig voneinander. Für SNPs des PI3K/AKT-Signalweges wurde keine Assoziation mit Remission unter LA gefunden.

Im Folgenden werden relevante Ergebnisse, Methoden sowie Stärken und Schwächen der vorliegenden Arbeit diskutiert.

4.1 Relevante Ergebnisse

4.1.1 FRZB-SNP rs1530056

Die vorliegende Untersuchung zeigte eine signifikante Assoziation von rs1530056 mit Remission unter LA. Rs1530056 ist ein SNP des FRZB-Gens, das für das Protein SFRP3 (Secreted frizzled-related protein 3) kodiert. Rs1530056 befindet sich auf Chromosom 2 an Position 182830118 in einem translatierten Bereich am 3'-Ende des

Gens^{63,78}. SFRP3 fungiert als Antagonist von Wnt. Es hindert Wnt an der Bindung an seinen membranständigen Rezeptor und inaktiviert somit den Wnt/ β -Catenin-Signalweg⁷⁹. Folglich wird β -Catenin weiter abgebaut und die Genaktivierung bleibt inhibiert.

Rs1530056 wurde im Rahmen der Literaturrecherche auf Basis einer Untersuchung von Jang et al.⁶³ für die statistischen Analysen ausgewählt. Diese ist bisher die einzige Forschungsgruppe, die Untersuchungen zu SFRP3 im Zusammenhang mit Depression und ihrer Behandlung publiziert hat.

In dem selektierten Paper berichteten Jang et al. eine Assoziation von rs1530056 mit partieller Response; dabei zeigten A-Allel-Träger insgesamt ein besseres Ansprechen auf AD-Therapie als G-Allel-Träger⁶³. Die Prüfung einer öffentlichen Datenbank zu Assoziationen von SNPs und Genexpression zeigte zudem eine geringere FRZB-Expressionsrate bei A-Allel-Trägern⁸⁰. Niedrigere SFRP3-Konzentrationen gingen also mit verminderter Wnt-Antagonisierung und somit erhöhter Wnt-Signalweg-Aktivierung einher, welche Neuroprotektion und synaptische Plastizität fördert^{81,82}. Diese Ergebnisse verweisen auf eine funktionelle Relevanz von rs1530056 durch Regulation der FRZB-Expression bei AD-Response⁶³.

Die Untersuchung von Jang et al. geht zurück auf Vorergebnisse einer präklinischen Studie derselben Arbeitsgruppe zur Genexpression unter Elektrokrampftherapie, in der nach regelmäßiger elektrokonvulsiver Stimulation stark reduzierte SFRP3-Konzentrationen in Maus-Hippocampi gefunden wurden. Auch unter kontinuierlicher SSRI-Behandlung wurde eine hippocampale SFRP3-Suppression festgestellt⁸³. Um die mögliche Bedeutung der SFRP3-Reduktion als Mediator antidepressiver Effekte zu prüfen, führten Jang et al. Verhaltensanalysen an SFRP3-Knockout-Mäuse durch. Hierbei zeigten Knockout-Mäuse und heterozygote Mäuse ein deutlich stärkeres antidepressives Verhalten im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen. Der antidepressive Effekt konnte durch SSRI-Gabe nicht gesteigert werden; die Gen-Suppression selbst war also entscheidend für den erzielten antidepressiven Effekt⁶³. Diese Beobachtungen verweisen auf die Rolle von FRZB als Zielgen in der Depressionsbehandlung.

Im Bereich neuropsychiatrischer Forschung untersuchte die Arbeitsgruppe um Inestrosa et al. die Rolle des Wnt-Signalweges für die Entstehung und Behandlung von Morbus Alzheimer; FRZB-1 antagonisierte hierbei die reparativen Effekte von Wnt-Proteinen gegen neurotoxisches Beta-Amyloid⁸⁴. FRZB und sein Proteinprodukt fungieren hier also als Gegenspieler zu neuroprotektiven Prozessen. Diese Ergebnisse stützen die Berichte von Jang et al. zu FRZB als Antagonist antidepressiver und neuroprotektiver Effekte.

Darüber hinaus besteht eine begrenzte Anzahl an Untersuchungen zu FRZB und seinem Protein SFRP3, diese beziehen sich vorwiegend auf den Zusammenhang mit Tumor- und Skeletterkrankungen^{85,86}. In einer Fall-Kontroll-Studie mit kleiner Fallzahl beschrieben Alanazi et al. eine starke Assoziation einer SFRP3-Variante mit einem verminderten Erkrankungsrisiko für Brustkrebs⁸⁷. Ein anderer FRZB-SNP zeigte sich in einer retrospektiven Studie mit größerem Sample mit der Entstehung von Knie-Osteochondrose assoziiert⁸⁸. Die Aussagekraft für einen Vergleich mit unserer Untersuchung ist zwar begrenzt, da sich die Studien in Aufbau und Samplegröße sowie im untersuchten Gen-Polymorphismus von unserer unterscheiden. Jedoch verdeutlichen diese Ergebnisse die Bedeutung von FRZB für Differenzierung, Proliferation und Regulierung zellulärer Prozesse.

Interessanterweise zeigt die vorliegende Arbeit eine signifikante Assoziation des rs1530056 GG-Genotyps mit dem Ansprechen auf LA ($p = 0,036$; HR = 2,014), während in der Studie von Jang et al. A-Allel-Träger eine bessere Response auf AD-Behandlung aufwiesen. Anlehnend an die Ergebnisse von Jang et al. kann davon ausgegangen werden, dass G-Allel-Träger im Verhältnis zu A-Allel-Trägern höhere FRZB-Expressionsraten aufweisen⁶³, was letztlich die Wnt-Aktivierung hemmen und neuroprotektive Effekte vermindern würde. Folglich wären GG-Genotyp-Träger höherer Neurotoxizität ausgesetzt. Lithium wirkt direkt inhibierend auf die GSK3 β , wodurch der Wnt/ β -Catenin-Signalweg disinhibiert und somit neuroprotektive Effekte gesteigert werden⁶¹. Rs1530056 GG-Genotyp-Träger könnten daher stärker von Neuroprotektion durch Lithium profitieren. Die Ergebnisse einer retrospektiven Untersuchung von Bschor et al. unterstützen diese Überlegung; schwer depressiv erkrankte Patienten sprachen hier besser auf eine LA-Behandlung an⁴⁹. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten zudem C-Allel-Träger des GSK3 β -50T/C SNPs

eine signifikant bessere LA-Response verglichen mit T-Allel-Trägern⁶¹. Das C-Allel ging im Verhältnis mit geringerer GSK3 β -Transkription einher, was auf einen funktionellen Effekt des SNPs schließen lässt⁵⁵. SFRP3 fördert über Wnt-Antagonisierung indirekt die Aktivität der GSK3 β . Hohe SFRP3-Level könnten also die Aktivität geringer GSK3 β -Level stabilisieren, welche unter LA wiederum inhibiert würde.

Im Vergleich zur Studie von Jang et al. mit 541 Probanden und Einbezug einer Kontrollgruppe⁶³ stand für unsere Untersuchung eine im Vergleich geringe Anzahl an Patientendaten ohne Kontrollgruppe zur Verfügung, sodass die Möglichkeit eines falsch positiven Ergebnisses berücksichtigt werden sollte. Eine weitere Limitation unserer Untersuchung gegenüber Jang et al. liegt im explorativen Ansatz ohne Korrektur für multiples Testen. Weitere Unterschiede sind zu nennen: Jang et al. untersuchten partielle Response unter AD-Behandlung, definiert als 25% Minderung der Symptomstärke, gemessen an wöchentlichen HAMD-Ratings, wobei die Patienten im Schnitt 11 Wochen stationär verblieben⁶³. Die vorliegende Arbeit untersuchte hingegen Remission unter LA, definiert als HAMD \leq 7 bei der letzten Studienvisite nach mindestens 4 Wochen LA-Behandlung und Erreichen eines suffizienten LS für mindestens 14 Tage, sodass Mess- und Zeitkriterien hier klarer gesetzt wurden. Für die statistischen Analysen führten Jang et al. Haplotyp-basierte Assoziationstests mit dem frei zugänglichen Programm PLINK durch⁶³. Unsere Arbeitsgruppe wählte die Cox-Regressionsanalyse als statistisches Modell, für die SPSS verwendet wurde. Aufgrund der genannten Unterschiede sind die beiden Untersuchungen nur begrenzt vergleichbar, beide Ergebnisse erweitern jedoch das Verständnis der Bedeutung von rs1530056 in der antidepressiven Behandlung.

Die vorgestellten Ergebnisse und Voruntersuchungen sprechen insgesamt für einen Einfluss von rs1530056 auf das Ansprechen auf LA. Darüber hinaus bestehen Hinweise auf die funktionelle Relevanz des SNPs, die unsere Ergebnisse stützen. Die hier gefundene Assoziation ist jedoch kritisch zu betrachten und sollte in einem größeren Sample einschließlich einer Korrektur für multiples Testen erneut untersucht werden. Fortführend wäre auch die Überprüfung einer möglichen Interaktion von rs1530056 und dem GSK3 β -50T/C SNP interessant. Aufgrund der spärlichen

Datenlage sind außerdem weitere Kandidatengen-Studien notwendig, um die Rolle von FRZB für AD-Response zu bestätigen.

4.1.2 CREB1-SNP rs12477677

Im multivariaten Regressionsmodell zeigte rs12477677 sowie sein CC-Genotyp eine signifikante Assoziation mit Remission unter LA. Rs12477677 ist ein Proxy-SNP von rs7569963, einem SNP des CREB1-Gens. Rs7569963 befindet sich auf Chromosom 2 an Position 208181429 am 3'-Ende des Gens⁶². CREB1 kodiert für den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element binding protein), der direkt von der GSK3 β inhibiert wird³⁴. Eine Inaktivierung der GSK3 β , zum Beispiel durch Lithium, fördert die Aktivierung von CREB durch die Proteinkinase A und erhöht die Transkription seiner Zielgene⁸⁹.

Wir selektierten den CREB1-SNP rs7569963 aus einer Kandidatengenstudie von Serretti et al.⁶². Fünf CREB1-SNPs wurden auf eine mögliche Assoziation mit Response, Remission und Therapieresistenz unter AD-Therapie bei Patienten mit Major Depression geprüft. Die Arbeitsgruppe berichtete einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem rs7569963 GG-Genotyp und Remission. Die Assoziation konnte in Allel- und Haplotyp-basierten Analysen nicht bestätigt werden. Das A-Allel des SNPs zeigte sich hingegen mit Therapieresistenz assoziiert, was sich auch in Haplotyp-basierten Analysen widerspiegelte⁶². Die Signifikanz aller Ergebnisse blieb im Sub-Sample weiblicher Probanden nicht erhalten. Insgesamt lag eine kleine Samplegröße von 190 Patienten vor⁶², welche die fehlende Bestätigung der Signifikanz in weiteren Analysen und im Sub-Sample mit bedingen könnte.

Serretti et al. wählten die fünf CREB1-SNPs auf Basis von Untersuchungen von Perlis et al. aus. Die Arbeitsgruppe überprüfte CREB1-Polymorphismen auf einen möglichen Zusammenhang mit einem erhöhten Aufkommen von Aggression in einem kleinen Sample depressiver Patienten. Für einen SNP konnte eine Assoziation im männlichen Sub-Sample gefunden werden, rs7569963 zeigte jedoch keine Signifikanz⁹⁰. In einer weiterführenden Studie untersuchten Perlis et al. einen möglichen Einfluss derselben SNPs auf AD-assoziierte Suizidalität. Das Sample umfasste über 1000 depressive Probanden unter Citalopram-Behandlung⁹¹. Rs7569963 zeigte hier eine signifikante

Assoziation mit neu aufgetretenen Suizidgedanken. Ohne Einbezug einer Placebo-kontrollierten Kontrollgruppe konnte der Effekt jedoch nicht als behandlungsspezifisch bestätigt werden⁹¹. Entsprechend fand eine unabhängige Arbeitsgruppe keine Assoziation des SNPs mit Suizidalität in einer Kandidatengenstudie mit 250 Probanden⁹². Die Untersuchungen variieren in Studienaufbau, Samplezahl sowie statistischen Verfahren und können aufgrund der Unterschiede im untersuchten SNP-Effekt nicht direkt mit der vorliegenden Arbeit verglichen werden. Dennoch verweisen vor allem die Ergebnisse von Perlis et al. auf den Einfluss von rs7569963 auf das Therapieansprechen bei Depression. Bisher wurde der rs7569963 SNP in keinem weiteren Kontext untersucht.

Zahlreiche Studien haben die wichtige Rolle von CREB für die Entstehung depressiver Erkrankungen sowie für ihre Behandlung bestätigt. Laut letzten Forschungsergebnissen zeigten sich mehrere CREB-SNPs mit der Entstehung einer Major Depression assoziiert^{93,94}. Unter anderem entdeckten Liu et al. eine signifikante Assoziation mit einem CREB-Haplotypen⁹⁴. In einer Fall-Kontroll-Studie von Wei et al. mit über 1000 Probanden zeigte ein weiterer SNP eine Korrelation mit Major Depression⁹³. Frühere Untersuchungen beschrieben außerdem erniedrigte CREB-Level bei depressiven Patienten sowie gesteigerte CREB-Level unter langfristiger AD-Therapie⁹⁵. In präklinischen Studien führte eine Erhöhung der CREB-Konzentration zu antidepressivem Verhalten bei Mäusen⁹⁵. Die Regulierung von CREB-Expression und -Aktivität sind jedoch komplex; so führten hingegen einige AD zu verminderter CREB-Expression und -Funktion⁹⁶ und in Tiermodellen zeigten sich in einigen Hirnregionen erniedrigte CREB-Konzentrationen mit antidepressivem Verhalten assoziiert⁹⁷. Darüber hinaus bestehen Hinweise auf den Einfluss von CREB1-Polymorphismen auf Lithium-Response bei bipolarer Erkrankung; so beschrieben Mamdani et al. die Assoziation zweier CREB1-SNPs mit dem Ansprechen auf eine Lithiumphasenprophylaxe⁶⁵.

Eine mögliche funktionelle Relevanz von rs7569963 wurde bis dato nicht untersucht. Durch seine Lokalisation in einer nicht-Protein-kodierenden Region am 3'-Ende des CREB1-Gens⁹¹ spielt der SNP keine direkte Rolle für die Proteinsynthese. Untersuchungen beschrieben jedoch die reichliche Transkription von nicht-proteinkodierender Ribonukleinsäure (ncRNA), die einen regulierenden Einfluss auf

Translation, Stabilisierung und Editing von Messenger-RNA ausübt; im Rahmen synaptischer Aktivität bei Langzeitgedächtnis-Speicherung scheint CREB die Transkription dieser ncRNA zu induzieren⁹⁸. Darüber hinaus wurde die entscheidende Rolle von CREB für neuronale Plastizität, Kognition und Langzeitgedächtnis in mehreren Untersuchungen bestätigt^{99–101}. Diese Berichte könnten auf eine funktionelle Bedeutung von CREB1-Polymorphismen, wie auch rs7569963, hinweisen.

Anlehnend an die Häufigkeitsverteilungen der Allele entspricht das A-Allel von rs7569963 dem C-Allel des rs12477677 Proxy-SNPs. Im Gegensatz zur Studie von Serretti et al., in der A-Allel-Träger eine höhere AD-Resistenz-Wahrscheinlichkeit aufwiesen, zeigten unsere Ergebnisse eine Assoziation des rs12477677 CC-Genotyps mit Remission unter LA. Darüber hinaus zeigte sich auch ein signifikanter Gesamteffekt des Proxy-SNPs bezüglich Remission unter LA ($p = 0,033$). Es kann vermutet werden, dass das genotypabhängige Therapieansprechen auf AD oder LA mit einer unterschiedlichen Modulierung von CREB1-Expression und CREB-Aktivierung zusammenhängt. Dementsprechend könnte der mit LA assoziierte CC-Genotyp mit einer geringeren CREB1-Expression einhergehen. Durch eine folglich verminderte transkriptionale CREB-Aktivität würden neurotoxische Effekte gefördert. Dies könnte entsprechend der Ergebnisse von Serretti et al. mit erhöhter Nonresponse auf AD-Therapie einhergehen⁶². Lithium könnte diesem Effekt durch gezielte GSK3 β -Inhibition und einhergehende Erhöhung der CREB-Aktivität entgegenwirken.

Vorangegangene Untersuchungen zum GSK3 β -50T/C SNP beschrieben verminderte GSK3 β -Transkription sowie erhöhte LA-Response-Wahrscheinlichkeit bei C-Allel-Trägern⁶¹. Die GSK3 β ist ein direkter Inhibitor von CREB und reguliert somit unmittelbar die CREB-Aktivität³⁴. Dementsprechend sollte fortführend geprüft werden, ob die hier gefundene Assoziation von rs12477677 vom Effekt des GSK3 β -50T/C SNPs abhängig ist. Unterschiedliche Ergebnisse zum Ansprechen auf LA und AD wurden in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zum 5HTTLPR Serotonin Transporter Polymorphismus beschrieben: Homozygote s-Allel-Träger sprachen besser auf LA an¹⁰², während homozygote l-Allel-Träger in einer Studie von Kirchheiner et al. eine höhere Response-Wahrscheinlichkeit unter SSRI-Monotherapie zeigten¹⁰³. Serotonin reguliert über verschiedene Signalwege die Aktivität der GSK3 β durch inhibitorische Phosphorylierung. Dysregulationen serotonerger Aktivität haben

eine verminderte GSK3 β -Inhibition zur Folge¹⁰⁴, was eine gesteigerte CREB-Hemmung bewirkt. Folglich wäre die Untersuchung einer möglichen Interaktion von rs12477677 und 5HTTLPR weiterführend interessant.

Eine Limitation dieser Arbeit sowie der Untersuchung von Serretti et al. stellen die kleinen Samplegrößen dar, welche die statistische Aussagekraft einschränken können. Die Möglichkeit von falsch positiven Ergebnissen sowie von unentdeckten kleineren Assoziationen muss somit beachtet werden. Weiterhin unterscheiden sich die Untersuchungen in Studienaufbau und statistischem Vorgehen. Wir führten eine prospektive Interventionsstudie durch, während bei Serretti et al. retrospektiv Daten von Probanden verschiedener psychiatrischer Zentren eingeholt wurden⁶². Außerdem wurde die Depressionsdiagnose nach DSM-IV gestellt⁶². Wir richteten uns hingegen nach ICD-10 Kriterien. Im Unterschied zu der von uns gewählten Cox-Regressionsanalyse kam bei Serretti et al. ein allgemeines lineares Modell zur Anwendung⁶². In beiden Fällen wurden die Kovariaten „Alter“ und „Geschlecht“ als mögliche Einflussgrößen hinzugefügt, weitere Kovariaten unterschieden sich. Das Signifikanzniveau wurde bei Serretti et al. entsprechend Bonferroni Korrektur bei $p = 0,016$ festgelegt, was im Unterschied zu unserer rein explorativen Analyse eine verminderte Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse suggeriert. Die genannten Unterschiede schränken die Validität eines direkten Vergleiches der beiden Untersuchungen ein, beide Arbeiten untermauern jedoch die Relevanz des untersuchten CREB1-SNPs für das Therapieansprechen bei Depression.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für einen Einfluss von rs12477677 auf das Ansprechen auf LA. Zur Verifizierung der vorliegenden Ergebnisse sollte die Untersuchung in einem größeren Sample unter Einbezug einer Korrektur für multiples Testen repliziert werden. Weiterhin sind Studien zur funktionellen Relevanz des getesteten SNPs notwendig, um eine bessere Einordnung unserer Ergebnisse zu ermöglichen.

4.2 Methodische Aspekte

4.2.1 Studienaufbau

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine multizentrische prospektive Kohortenstudie zur Evaluierung des Genotyp-abhängigen Ansprechens auf LA bei Patienten mit TRD.

Ein Einschlusskriterium war ein unzureichendes Ansprechen auf eine antidepressive Monotherapie bei einer Behandlungsdauer von mindestens 4 Wochen. Dies schließt alle AD-Klassen mit ein. Die Arbeitsgruppe um Kirchheiner et al. untersuchte FKBP5-SNPs an 304 depressiven Patienten mit AD-Behandlung unterschiedlicher Klassen¹⁰⁵. Auch für die Kandidatengenstudie von Binder et al. wurden Patienten unter verschiedenen AD-Therapien rekrutiert¹⁰⁶. Hingegen untersuchte Ellsworth et al. in ihrer Kandidatengenstudie spezifisch depressive Probanden mit SSRI-Behandlung¹⁰⁷. Eine weitere Arbeitsgruppe fand keine Assoziation zwischen Therapieansprechen und der augmentierten AD-Klasse⁵¹. Da in diesen Studien teilweise sowohl uni- als auch bipolar erkrankte Probanden untersucht wurden¹⁰⁵ und die Samplezahlen deutlich auseinandergehen^{106,107}, kann ein direkter Vergleich mit unserer Studie nicht gezogen werden. Dennoch stellt die fehlende Differenzierung der AD-Klassen in den Analysen von Kirchheiner et al. und Binder et al. sowie in der vorliegenden Arbeit eine Limitation dar, da keine spezifische Aussage zu Assoziationen mit dem Therapieansprechen auf einzelne antidepressiv wirkende Substanzen getroffen wird. Um die Remission unter LA abhängig vom augmentierten Antidepressivum zu prüfen, sollte in einer weiterführenden Arbeit eine Auswertung der einzelnen AD-Klassen durchgeführt werden.

Soweit uns bekannt weist die ALIA/ELIA-Studie mit 230 Probanden das bis dato größte Sample an TRD-Patienten unter LA-Behandlung auf. Dennoch konnten aufgrund verschiedener Dropout-Kriterien (siehe 3.1.1) lediglich Daten von 148 Patienten für die statistischen Analysen verwendet werden. 10 Probanden wurden wegen fehlender Genotypisierung ausgeschlossen, da Blutproben nicht vorhanden oder nicht verwendbar waren, zum Beispiel durch inkorrekte Verarbeitung oder unklare Beschriftung. Diese Dropouts können in der weiteren Rekrutierung und

Probengewinnung mit einer Optimierung der standardisierten Einarbeitung der Interviewer vermieden werden.

4.2.2 Literaturrecherche

Auf Basis der systematischen Literaturrecherche mit PubMed wurden 6 SNPs (3 SNPs und 3 Proxy-SNPs) für die statistischen Analysen ausgewählt. Dabei erfolgte die Literaturrecherche nach festgelegten Kriterien, basierend auf Fragestellung, Diagnose, p-Wert und Proxybeziehungen (siehe 2.3).

Dieses Vorgehen unterscheidet sich von gängigen Kandidatengen Studien, die ausgewählte Gene untersuchen, sowie von genomweiten Assoziationsstudien, die das gesamte Genom auf eine Fragestellung hin screenen um spezifische Loci zu identifizieren. So untersuchten z.B. Kishi et al. drei SNPs des Kandidatengens CLOCK auf Responseprädiktion unter SSRI-Behandlung⁶⁴; in einer genomweiten Untersuchung fanden Wray et al. 44 SNPs mit Assoziation zum Erkrankungsrisiko für Depression¹⁰⁸. In den genannten Untersuchungen orientiert sich die Literaturrecherche an vorangegangener Forschung, es ist jedoch keine festgelegte Systematik im Vorgehen erkennbar. Die vorliegende Arbeit zeichnet sich durch eine systematische Literaturrecherche aus, die eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus der PubMed-Suche gewährleistet.

Bei der Wahl des Signifikanzniveaus in der SNP-Selektion ($p < 0,05$ bzw $p < 5 \times 10^{-8}$) sowie den Bedingungen zur Prüfung von Proxy-Beziehungen unter den SNPs ($r^2 < 0,8$; SNP-Abstand > 500 Basenpaare) orientierte sich unsere Untersuchung an Standards gängiger Kandidatengen- und Assoziationsstudien. In einer breit angelegten genomweiten Assoziationsstudie zu Depression von Howard et al. wurde ein Signifikanzniveau von $p < 5 \times 10^{-8}$ und ein Grenzwert für $r^2 < 0,1$ festgelegt¹⁰⁹. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit wurde der Grenzwert für r^2 hier konservativer gewählt. Es entsteht eine SNP-Selektion, in der eine gekoppelte Allelvererbung gänzlich ausgeschlossen werden kann, potentiell signifikante SNPs mit mittlerem LD zwischen $r^2 < 0,8$ und $r^2 < 0,1$ jedoch aus der Selektion fallen. Wie in unserer Untersuchung setzten Matsumoto et al. in einer Kandidatengenstudie zur AD-Response den Grenzwert für $r^2 < 0,8$ ¹¹⁰. Von Vorteil ist hier die Möglichkeit, potentiell

signifikante SNPs mit mittlerem LD zu selektieren, während SNPs mit hohem LD ausgeschlossen werden können.

Um die SNP-Anzahl einzugrenzen, beschränkten wir uns bei der Festlegung der Kriterien „Fragestellung“ und „Diagnose“ auf Response und/oder Remission bei antidepressiver Pharmakotherapie in der unipolaren Depression. Dieses Vorgehen ermöglichte eine genauere Eingrenzung der SNP-Auswahl. Jedoch wurden von Beginn an SNPs ausgeschlossen, die im Rahmen anderer Fragestellungen und Diagnosen untersucht wurden. SNPs, die in der ausgewählten Literatur keine signifikante Assoziation mit dem Therapieansprechen aufweisen konnten, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Des Weiteren konnten zwei selektierte SNPs bzw. ihre Proxy-SNPs nicht weiter untersucht werden, da sie nicht auf den verwendeten Bio-Chips vorhanden waren. Im Sinne einer umfassenderen Pathwayanalyse könnte das Einbeziehen der zuvor genannten Kriterien sowie die Verwendung alternativer Bio-Chips in einer folgenden Arbeit die Chance auf Identifizierung weiterer Responseprädiktoren für das Ansprechen auf LA erhöhen.

4.3 Stärken

Unsere Studie umfasst das bisher größte Patientenkollektiv mit therapieresistenter unipolarer Depression unter LA-Behandlung, das in einer prospektiven Längsschnittstudie untersucht wurde. Hierbei wurden umfassende klinische und demographische Daten erhoben, die einen möglichen Einfluss auf das Ansprechen einer LA haben könnten. So bildet unser Datensatz eine umfangreiche Basis zur Untersuchung diverser Fragestellungen bezüglich des Responseverhaltens unter LA. Frühere Untersuchungen zu diesem Thema sind durch retrospektive Studiendesigns, methodische Abweichungen sowie heterogene Sample vergleichsweise eingeschränkt^{19,49,50}.

Im Gegensatz zu anderen Studien lag der durchschnittliche LS in unserer Untersuchung im therapeutischen Bereich¹⁸. Dies spricht für eine suffiziente LA, die durch fachärztliche Betreuung unter größtenteils stationären Bedingungen

sichergestellt wurde. Die vorliegenden Ergebnisse basieren demnach auf einer qualitativ hochwertigen Durchführung der untersuchten Behandlungsstrategie.

Zur prospektiven Erfassung des Schweregrades der Depression wählten wir den HAMD-17. Dieser standardisierte Fragebogen zeichnet sich als diagnosespezifisches Messinstrument aus. Darüber hinaus wurde die Diagnose mittels M.I.N.I.-Fragebogen sicher gestellt. Im Vergleich erfolgte die Einstufung der Depressionsschwere in anderen Untersuchungen teils retrospektiv mit unspezifischeren Fragebögen⁵⁰. Um die Inter-Rater-Variabilität durch verschiedene Interviewer einzugrenzen wurden regelmäßig Mitarbeiter-Trainings durchgeführt. Dabei wurde ein Proband über den Studienverlauf hinweg vom selben Interviewer begleitet.

Die wöchentliche Erhebung des HAMD-17 ermöglichte die statistische Berechnung möglicher Einflussfaktoren auf eine Remission unter LA mittels Cox-Regressionsanalyse. Zur Ermittlung des Eintritts eines Ereignisses, hier Remission, stellt die Cox-Regressionsanalyse das geeignetste statistische Verfahren dar. Um weitere Einflussfaktoren zu berücksichtigen wurden Alter, Geschlecht und die Bedingung des suffizienten LS als Kovariaten mit einberechnet.

Insgesamt zeichnet sich die vorliegende Studie durch zahlreiche Maßnahmen zur Qualitätssicherung aus, welche die Reliabilität und Validität der Untersuchung stärken.

4.4 Limitationen

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren 230 Probanden in die ALIA/ELIA-Studie eingeschlossen, von denen Daten von 148 Probanden für die statistischen Analysen verwendet werden konnten. Die verhältnismäßig kleine Samplezahl stellt im Rahmen der statistischen Analysen eine Limitation unserer Studie dar, welche die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse beeinträchtigt. Derzeit wird die Probanden-Rekrutierung von unserer Arbeitsgruppe fortgesetzt um das Sample zu erweitern und so die Validität zukünftiger statistischer Auswertungen zu steigern. So sollten auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Zukunft in einem größeren Sample überprüft werden.

Wie weiter oben erwähnt erfolgte die Auswertung der Fragebögen in der Studienphase durch unterschiedliche Interviewer. Trotz HAMD-Training der Mitarbeiter bleibt die Einstufung der depressiven Episode durch den HAMD weitgehend subjektiv. Dies kann zur Folge haben, dass geeignete Probanden aus der Studie ausgeschlossen bzw. dass ungeeignete Probanden in die Studie aufgenommen wurden. Durch den Einsatz eines alleinigen Interviewers könnte diese Verzerrung aufgehoben werden. Dies ist aufgrund des multizentrischen Studienaufbaus und aufgrund der Probandenanzahl jedoch nicht zu ermöglichen. Bei fortgeführter Rekrutierung sollte diesem Bias mit einer Optimierung des HAMD-Trainings entgegengewirkt werden. Die Subjektivität der einzelnen Interviewer kann jedoch nicht eliminiert werden und muss als verzerrender Faktor angenommen werden.

In der vorliegenden Untersuchung wird das Erreichen einer Remission allein der LA-Behandlung zugeschrieben. Im Rahmen des Studiendesigns konnten parallel verlaufende heterogene Begleittherapien als potentielle Einflussfaktoren auf das Therapieansprechen nicht erfasst werden, sodass die Wirksamkeit der einzelnen Behandlungsmethoden nicht differenziert werden kann. Der Vergleich mit einer Kontrollgruppe, die anstatt der LA ein Placebo erhält, hätte diese Fehlerquelle zwar relativieren können. Ein solches Vorgehen wäre jedoch ethisch nicht vertretbar gewesen.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass der CREB1-Proxy-SNP rs12477677 und sein CC-Genotyp sowie der GG-Genotyp des FRZB-SNPs rs1530056 mit einer höheren Remissionswahrscheinlichkeit bei LA einhergehen. Entsprechend unserer Fragestellung konnten wir somit zwei weitere Genpolymorphismen neben dem GSK3 β -50T/C-SNP identifizieren, die eine Assoziation mit dem Ansprechen auf LA bei therapieresistenten Patienten aufweisen und als potentielle Responseprädiktoren für LA in Frage kommen.

Besonders der rs12477677-CC-Genotyp zeigte eine hochsignifikante Assoziation und scheint sich so besonders gut als genetischer Marker für eine gezielte und

individualisierte Therapieplanung zu eignen. Folglich sind Untersuchungen zur funktionellen Relevanz dieser SNPs notwendig. Die gefundene Assoziation zum rs1530056-GG-Genotyp verweist ebenfalls auf eine einflussreiche Rolle des SNPs auf LA-Ansprechen. Vorangegangene Studien, die seinen funktionellen Effekt bestätigten, stützen unser Ergebnis. Zukünftig ist die Replikation dieser Untersuchung in einem größeren Sample erforderlich, um unsere Ergebnisse zu beiden SNPs zu bestätigen. Hierbei sollte eine Korrektur für multiples Testen miteinbezogen werden. Weiterführend sollte das responseprädiktive Potential der SNPs in einer klinischen Studie geprüft werden. Darüber hinaus wäre die Untersuchung möglicher Interaktionen der beiden SNPs mit dem GSK3 β -50T/C SNP und dem Serotonin Transporter 5HTTLPR SNP interessant.

Die vorliegende Arbeit untermauert die Bedeutung genetischer Varianten der GSK3 β -vermittelten Signalkaskaden als vielversprechende Ansatzpunkte zur Identifikation zuverlässiger Responseprädiktoren bei LA-Behandlung. In diesem Sinne würde die Erarbeitung einer umfassenderen Pathwayanalyse der GSK3 β -vermittelten Signalwege eine interessante Fortführung dieser Arbeit darstellen. Dies könnte durch eine Überarbeitung und Erweiterung der von uns entwickelten Kriterien für eine reproduzierbare Literaturrecherche erfolgen, um eine größere Anzahl potentiell einflussreicher SNPs für die LA-Therapie zu erfassen.

Als Behandlungsstrategie mit der bislang besten Evidenzlage fällt der LA eine besondere Stellung in der Therapie der TRD zu. Dennoch sind die genauen Wirkmechanismen von Lithium noch weitgehend unbekannt und bedürfen weiterführender Untersuchungen. Eine genauere Kenntnis der Lithiumwirkung könnte zu einem besseren Verständnis seiner neuroprotektiven Effekte beitragen und darüber hinaus die Identifikation potentieller Responseprädiktoren unterstützen.

Die Etablierung solcher zuverlässiger Biomarker als Responseprädiktoren würde einen bedeutenden Fortschritt in der Entwicklung einer personalisierten Medizin darstellen. Im Rahmen der Behandlung von TRD tragen die Ergebnisse dieser Arbeit wichtige Erkenntnisse zur Optimierung der entsprechenden Therapieplanung bei und bedürfen eingehender Weiterentwicklung. Eine zukünftige Anwendung der hier identifizierten SNPs als Responseprädiktoren für LA böte die Möglichkeit eines

evidenzbasierten Entscheidungsprozesses in der Behandlung von TRD. Ein hierdurch optimierter LA-Einsatz könnte zur Vermeidung therapieresistenter Krankheitsverläufe sowie steigender Anwendungssicherheit beim Behandler führen und zur Etablierung einer personalisierten Therapie psychischer Erkrankungen beitragen.

5 Anhang

Tabelle 16: Gene des Wnt/ β -Catenin Signalweges

| Gen-Symbol | Gen-Name |
|------------|---|
| AXIN1 | Axis inhibition protein 1 |
| AXIN2 | Axin-like protein |
| DKK1 | Dickkopf-related protein 1 |
| DKK2 | Dickkopf-related protein 2 |
| DKK3 | Dickkopf-related protein 3 |
| DKK4 | Dickkopf-related protein 4 |
| KREMEN1 | Kringle containing transmembrane protein 1 |
| WIF1 | Wnt inhibitory factor 1 |
| WNT2B | Wnt family member 2b |
| WNT7A | Wnt family member 7a |
| CCER1 | Coiled-coil glutamate rich protein 1 |
| CK1a | Casein kinase 1 alpha |
| CK1e | Casein kinase 1 epsilon |
| CK2A1 | Casein kinase 2 alpha 1 |
| SFRP1 | Secreted frizzled-related protein 1 |
| SFRP2 | Secreted frizzled-related protein 2 |
| FRZB | Secreted frizzled-related protein 3 |
| SFRP4 | Secreted frizzled-related protein 4 |
| LRP1 | Low density lipoprotein receptor-related protein 1 |
| LRP5 | Low density lipoprotein receptor-related protein 5 |
| LRP6 | Low density lipoprotein receptor-related protein 6 |
| FZD1 | Frizzled class receptor 1 |
| FZD3 | Frizzled class receptor 3 |
| FZD6 | Frizzled class receptor 6 |
| FZD7 | Frizzled class receptor 7 |
| DVL1 | Dishevelled segment polarity protein 1 |
| DVL2 | Dishevelled segment polarity protein 2 |
| DVL3 | Dishevelled segment polarity protein 3 |
| DAAM2 | Dishevelled-associated activator of morphogenesis 2 |

| | |
|--------|--|
| SENP2 | Sentrin-specific protease 2 |
| PAR1 | Protease-activated receptor 1 |
| FRAT1 | Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1 |
| NKD1 | Naked cuticle homolog 1 |
| APC | Adenomatosis polyposis coli |
| CXXC4 | CXXC-type zink finger protein 4 |
| PKA | Protein kinase A |
| GCGR | Glucagon receptor |
| PSEN1 | Presenilin 1 |
| PSEN2 | Presenilin 2 |
| CTNNB1 | Catenin-beta 1 isoform x1 |
| TCF1 | Transcription factor 1 |
| TCF4 | Transcription factor 4 |
| TCF7L2 | Transcription factor 7-like 2 |
| LEF1 | Lymphoid enhancer-binding factor 1 |
| SMAD3 | SMAD family member 3 |
| SMAD4 | SMAD family member 4 |
| SMAD7 | SMAD family member 7 |
| NLK | Nemo-like kinase |
| HMGXB4 | HMG box-containing protein 4 |
| CTBP1 | C-terminal binding protein 1 |
| CTBP2 | C-terminal binding protein 2 |
| CREBBP | CREB binding protein |
| EP300 | E1A binding protein p300 |
| CREB1 | Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1 |
| CREB2 | Cyclic AMP-responsive element-binding protein 2 |
| CREB3 | Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3 |
| CRTC1 | CREB-regulated transcription coactivator 1 |
| ICAT | Beta-catenin-interacting protein 1 |
| E2F1 | E2F transcription factor 1 |
| SOX17 | SRY-box transcription factor 17 |
| CHD8 | Chromodomain helicase DNA binding protein 8 |
| RUVBL1 | RuvB-like protein 1 |
| AES | Amino-terminal enhancer of split |

| | |
|---------|---|
| TLE1 | Transducin-like enhancer of split 1 |
| MAP3K7 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 |
| PPP2R1A | Serine/threonine-proteine phosphatase 2A regulatory subunit A |
| AMER1 | APC membrane recruitment protein 1 |
| PPRC1 | PPARG related coactivator 1 |
| MYC | V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog |
| JUN | Jun-proto-oncogene |
| FRA1 | FOS-like antigen 1 |
| CCND1 | Cyclin D1 |
| MMP7 | Matrix metalloproteinase-7 |
| CLOCK | Circadian locomotor output cycles kaput protein |
| FKBP5 | FK506-binding protein 5 |

Auflistung in Anlehnung an KEGG-Pathway-Maps¹¹

Tabelle 17: Gene des PI3K/AKT-Signalweges

| Gen-Symbol | Gen-Name |
|------------|--|
| INSR | Insulin receptor |
| IRS1 | Insulin receptor substrate 1 |
| IGF1 | Insulin-like growth factor 1 |
| IRS4 | Insulin receptor substrate 4 |
| ARRB2 | Beta arrestin 2 |
| PPP2A4 | Serine/threonine-proteine phosphatase 2A activator |
| PDPK1 | Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 |
| SOCS1 | Suppressor of cytokine signaling 1 |
| PTPN1 | Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1 |
| MAPK8 | Mitogen-activated protein kinase 8 |
| PTPRF | Protein tyrosine phosphatase receptor type F |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3 kinase |
| AKT1 | AKT serine/threonin kinase 1 |
| AKT2 | AKT serine/threonin kinase 2 |
| AKT3 | AKT serine/threonin kinase 3 |
| PKCB | Classical protein kinase C beta type |

| | |
|----------|--|
| PRKCI | Atypical protein kinase C iota type |
| PDLIM5 | PDZ and LIM domain 5 |
| SREBF1 | Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 |
| PRKAA1 | Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 |
| PRKAA2 | Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2 |
| ACACA | Acetyl-CoA carboxylase alpha / biotin carboxylase 1 |
| FASN | Fatty acid synthase |
| PKLR | Pyruvate kinase isozymes R/L |
| HK1 | Hexokinase 1 |
| FOXO1 | Forkhead box protein O1 |
| PPARGC1A | Alpha peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha |
| PPARD | Peroxisome proliferator-activated receptor delta |
| G6PC | Glucose-6-phosphatase |
| FBP1 | Fructose-1,6-bisphosphatase |
| PCK1 | Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 |
| GYS1 | Glycogen synthase 1 |
| GYS2 | Glycogen synthase 2 |
| PPP1R1B | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B |
| PPP2CA | Protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha |
| PPP2R2C | Protein phosphatase 2 regulatory subunit B gamma |
| PHKG1 | Phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 1 |
| PDE4A | Phosphodiesterase 4A |
| PDE4B | Phosphodiesterase 4B |
| LIPE | Hormone-sensitive lipase |
| BAG1 | BCL2-associated athanogene 1 |
| BCL2 | B-cell CLL /lymphoma 2 protein |
| IMPA1 | Inositol monophosphatase 1 |
| IMPA2 | Inositol monophosphatase 2 |
| INPP1 | Inositol polyphosphate 1-phosphatase |
| INPP5D | Inositol polyphosphate 5-phosphatase D |
| INPPL1 | Inositol polyphosphate phosphatase like 1 |
| RPS6KB2 | Ribosomal protein S6 kinase beta |
| MTOR | Mechanistic target of rapamycin kinase |

| | |
|-------|---|
| TSC1 | Tuberous sclerosis 1 |
| TSC2 | Tuberous sclerosis 2 |
| EIF4E | Eukaryotic translation initiation factor 4E |
| RHEB | Ras homolog enriched in brain |

Auflistung in Anlehnung an KEGG-Pathway-Maps¹²

Literaturverzeichnis

1. Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn SY, Ali MK, Almazroa MA, Alvarado M, Anderson HR. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions , 1990 – 2010 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2197-2223. doi:10.1016/S0140-6736(12)61689-4
2. Definition einer Depression. Weltgesundheitsorganisation. Published January 2019. Accessed January 25, 2019. <http://www.euro.who.int/de/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/news/news/2012/10/depression-in-europe/depression-definition>
3. Kessler RC, Bromet EJ. The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Heal*. 2013;34:119-138. doi:10.1146/annurev-publhealth-031912-114409
4. Depression. World Health Organization. Accessed January 25, 2019. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>
5. Bschor T, Bauer M, Adli M. Chronic and Treatment Resistant Depression. Diagnosis and Stepwise Therapy. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111(45):766-776. doi:10.3238/arztebl.2014.0766
6. Murray CJL, Lopez AD. *The Global Burden Of Disease: A Comprehensive Assessment of Mortality and Disability from Diseases, Injuries, and Risk Factors in 1990 and Projected to 2020*. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41864/0965546608_eng.pdf?sequence=1. Published 1996. Accessed March 25, 2020.
7. Burcusa SL, Iacono WG. Risk for Recurrence in Depression. *Clin Psychol Rev*. 2007;27(8):959-985. doi:10.1016/j.cpr.2007.02.005
8. Fostick L, Silberman A, Beckman M, Spivak B, Amital D. The economic impact of depression: Resistance or severity? *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010;20(10):671-675. doi:10.1016/j.euroneuro.2010.06.001
9. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Ph D, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Ph D, Niederehe G, Ph D, Thase ME, Lavori PW, Ph D, Lebowitz BD, Ph D, Mcgrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Ph D. Acute and Longer-

- Term Outcomes in Depressed Outpatients Requiring One or Several Treatment Steps : A STAR*D Report. *Am J Psychiatry*. 2006;163(11):1905-1917. doi:10.1176/ajp.2006.163.11.1905
10. Bauer M, Whybrow PC, Angst J, Bschor T, Pfennig A, Versiani M, Möller H-J, WFSBP Task Force on Unipolar Depressive Disorders. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders, Part 1: Acute and Continuation Treatment of Major Depressive Disorder. *World J Biol Psychiatry*. 2002;3(1):5-43. doi:10.3109/15622970209150599
 11. Bauer M, Bschor T, Pfennig A, Whybrow PC, Angst J, Versiani M, Möller H-J, WFSBP Task Force on Unipolar Depressive Disorders. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders in Primary Care. *World J Biol Psychiatry*. 2007;8(2):67-104. doi:10.1080/15622970701227829
 12. McIntyre RS, Filteau M, Martin L, Patry S, Carvalho A, Cha DS, Barakat M, Miguelez M. Treatment-resistant depression : Definitions, review of the evidence, and algorithmic approach. *J Affect Disord*. 2014;156:1-7. doi:10.1016/j.jad.2013.10.043
 13. Bauer M, Rush A, Ricken R, Pilhatsch M, Adli M. Algorithms For Treatment of Major Depressive Disorder: Efficacy and Cost-Effectiveness. *Pharmacopsychiatry*. 2019;52(3):117-125. doi:10.1055/a-0643-4830
 14. Adli M, Bauer M, Rush AJ. Algorithms and Collaborative-care Systems for Depression: Are They Effective and Why? *Biol Psychiatry*. 2006;59(11):1029-1038. doi:10.1016/j.biopsych.2006.05.010
 15. Trivedi MH, Rush AJ, Crismon ML, Kashner TM, Toprac MG, Carmody TJ, Key T, Biggs MM, Shores-Wilson K, Witte B, Suppes T, Miller AL, Altshuler KZ, Shon SP. Clinical Results for Patients With Major Depressive Disorder in the Texas Medication Algorithm Project. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61(7):669. doi:10.1001/archpsyc.61.7.669
 16. Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression. Programm für Nationale Versorgungsleitlinien. Accessed August 5, 2019. <https://www.leitlinien.de/nvl/depression>
 17. Carvalho AF, Machado JR, Cavalcante JL. Augmentation strategies for treatment-resistant depression. *Curr Opin Psychiatry*. 2009;22(1):7-12.

doi:10.1097/YCO.0b013e32831be9ef

18. Crossley NA, Bauer M. Acceleration and augmentation of antidepressants with lithium for depressive disorders: two meta-analyses of randomized, placebo-controlled trials. *J Clin Psychiatry*. 2007;68(6):935-940.
doi:10.4088/jcp.v68n0617
19. Bauer M, Adli M, Ricken R, Severus E, Pilhatsch M. Role of Lithium Augmentation in the Management of Major Depressive Disorder. *CNS Drugs*. 2014;28(4):331-342. doi:10.1007/s40263-014-0152-8
20. Bschor T, Lewitzka U, Pfennig A, Bauer M. Fünfundzwanzig Jahre Lithiumaugmentation. *Nervenarzt*. 2007;78(11):1237-1247.
doi:10.1007/s00115-007-2273-5
21. Bauer M, Adli M, Baethge C, Berghöfer A, Sasse J, Heinz A, Bschor T. Lithium Augmentation Therapy in Refractory Depression: Clinical Evidence and Neurobiological Mechanisms. *Can J Psychiatry*. 2003;48(7):440-448.
doi:10.1177/070674370304800703
22. Phiel CJ, Klein PS. Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41(1):789-813. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.789
23. Brown KM, Tracy DK. Lithium: the pharmacodynamic actions of the amazing ion. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2013;3(3):163-176.
doi:10.1177/2045125312471963
24. Zobel A, Barkow K, Schulze-Rauschenbach S, von Widdern O, Metten M, Pfeiffer U, Schnell S, Wagner M, Maier W. High neuroticism and depressive temperament are associated with dysfunctional regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in healthy volunteers. *Acta Psychiatr Scand*. 2004;109(5):392-399. doi:10.1111/j.1600-0447.2004.00313.x
25. Sugawara M, Hashimoto K, Hattori T, Takao T, Suemaru S, Ota Z. Effects of lithium on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinol Jpn*. 1988;35(5):655-663. doi:10.1507/endocrj1954.35.655
26. Wegener G, Bandpey Z, Heiberg IL, Mørk A, Rosenberg R. Increased extracellular serotonin level in rat hippocampus induced by chronic citalopram is augmented by subchronic lithium: neurochemical and behavioural studies in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;166(2):188-194.
doi:10.1007/s00213-002-1341-6
27. Scheuch K, Höltje M, Budde H, Lautenschlager M, Heinz A, Ahnert-Hilger G,

- Priller J. Lithium modulates tryptophan hydroxylase 2 gene expression and serotonin release in primary cultures of serotonergic raphe neurons. *Brain Res.* 2010;1307:14-21. doi:10.1016/j.brainres.2009.10.027
28. Autry AE, Monteggia LM. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacol Rev.* 2012;64(2):238-258. doi:10.1124/pr.111.005108
29. Hashimoto R, Takei N, Shimazu K, Christ L, Lu B, Chuang D-M. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology.* 2002;43(7):1173-1179. doi:10.1016/s0028-3908(02)00217-4
30. Yoshimura R, Tsuji K, Ueda N, Nakamura J. Increase of plasma brain-derived neurotrophic factor levels in two psychotic depressed patients responding to lithium addition to paroxetine treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2007;3(5):683-686. Accessed January 7, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19300599>
31. Patel P, Woodgett JR. Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways? *Curr Top Dev Biol.* 2017;123:277-302. doi:10.1016/bs.ctdb.2016.11.011
32. Gould TD, Manji HK. The Wnt Signaling Pathway in Bipolar Disorder. *Neurosci.* 2002;8(5):497-511. doi:10.1177/107385802237176
33. Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 by Competition for Magnesium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(3):720-725. doi:10.1006/bbrc.2000.4169
34. Grimes CA, Jope RS. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem.* 2001;78(6):1219-1232. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00495.x
35. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron.* 1998;20(4):709-726. doi:10.1016/s0896-6273(00)81010-7
36. Gould TD, Quiroz JA, Singh J, Zarate CA, Manji HK. Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Mol Psychiatry.* 2004;9(8):734-755. doi:10.1038/sj.mp.4001518

37. Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science*. 2006;311(5763):1002-1005. doi:10.1126/science.1121613
38. Badenhop RF, Moses MJ, Scimone A, Mitchell PB, Ewen-White KR, Rosso A, Donald JA, Adams LJ, Schofield PR. A genome screen of 13 bipolar affective disorder pedigrees provides evidence for susceptibility loci on chromosome 3 as well as chromosomes 9, 13 and 19. *Mol Psychiatry*. 2002;7(8):851-859. doi:10.1038/sj.mp.4001114
39. Gould TD, Einat H, Bhat R, Manji HK. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004;7(4):387-390. doi:10.1017/S1461145704004535
40. Kaidanovich-Beilin O, Milman A, Weizman A, Pick CG, Eldar-Finkelman H. Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol Psychiatry*. 2004;55(8):781-784. doi:10.1016/j.biopsych.2004.01.008
41. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20(1):781-810. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126
42. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*. 1997;88(6):789-799. doi:10.1016/s0092-8674(00)81925-x
43. Hussaini SMQ, Choi C-I, Cho CH, Kim HJ, Jun H, Jang M-H. Wnt signaling in neuropsychiatric disorders: ties with adult hippocampal neurogenesis and behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;47:369-383. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.09.005
44. Teo CH, Soga T, Parhar IS. Brain Beta-Catenin Signalling During Stress and Depression. *Neurosignals*. 2018;26(1):31-42. doi:10.1159/000487764
45. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a011189. doi:10.1101/cshperspect.a011189
46. Chalecka-Franaszek E, Chuang DM. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8745-8750.

doi:10.1073/pnas.96.15.8745

47. Woodgett JR, Voskas D, Ling LS. Does GSK-3 provide a shortcut for PI3K activation of Wnt signalling? *F1000 Biol Rep*. 2010;2(82). doi:10.3410/B2-82
48. Grof P. Sixty years of lithium responders. *Neuropsychobiology*. 2010;62(1):8-16. doi:10.1159/000314305
49. Bschor T, Canata B, Müller-Oerlinghausen B, Bauer M. Predictors of response to lithium augmentation in tricyclic antidepressant-resistant depression. *J Affect Disord*. 2001;64(2-3):261-265. doi:10.1016/s0165-0327(00)00211-1
50. Sugawara H, Sakamoto K, Harada T, Ishigooka J. Predictors of efficacy in lithium augmentation for treatment-resistant depression. *J Affect Disord*. 2010;125(1-3):165-168. doi:10.1016/j.jad.2009.12.025
51. Alvarez E, Pérez-Solá V, Pérez-Blanco J, Queraltó JM, Torrubia R, Noguera R. Predicting outcome of lithium added to antidepressants in resistant depression. *J Affect Disord*. 1997;42(2-3):179-186. doi:10.1016/s0165-0327(96)01407-3
52. Bauer M, Adli M, Bschor T, Pilhatsch M, Pfennig A, Sasse J, Schmid R, Lewitzka U. Lithium's emerging role in the treatment of refractory major depressive episodes: augmentation of antidepressants. *Neuropsychobiology*. 2010;62(1):36-42. doi:10.1159/000314308
53. What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)? Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine. Accessed January 16, 2019. <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp>
54. Lau K-F, Miller CCJ, Anderton BH, Shaw P-C. Molecular Cloning and Characterization of the Human Glycogen Synthase Kinase-3 β Promoter. *Genomics*. 1999;60(2):121-128. doi:10.1006/GENO.1999.5875
55. Kwok JBJ, Hallupp M, Loy CT, Chan DKY, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR. GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2005;58(6):829-839. doi:10.1002/ana.20691
56. Benedetti F, Bernasconi A, Lorenzi C, Pontiggia A, Serretti A, Colombo C, Smeraldi E. A single nucleotide polymorphism in glycogen synthase kinase 3-beta promoter gene influences onset of illness in patients affected by bipolar disorder. *Neurosci Lett*. 2004;355(1-2):37-40. doi:10.1016/j.neulet.2003.10.021
57. Benedetti F, Serretti A, Colombo C, Lorenzi C, Tubazio V, Smeraldi E. A glycogen synthase kinase 3- β promoter gene single nucleotide polymorphism

- is associated with age at onset and response to total sleep deprivation in bipolar depression. *Neurosci Lett*. 2004;368(2):123-126.
doi:10.1016/j.neulet.2004.06.050
58. Jiménez E, Arias B, Mitjans M, Goikolea JM, Roda E, Ruíz V, Pérez A, Sáiz PA, Paz García-Portilla M, Burón P, Bobes J, Vieta E, Benabarre A. Association between GSK3 β gene and increased impulsivity in bipolar disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014;24(4):510-518.
doi:10.1016/j.euroneuro.2014.01.005
 59. Benedetti F, Serretti A, Pontiggia A, Bernasconi A, Lorenzi C, Colombo C, Smeraldi E. Long-term response to lithium salts in bipolar illness is influenced by the glycogen synthase kinase 3- β -50 T/C SNP. *Neurosci Lett*. 2005;376(1):51-55. doi:10.1016/j.neulet.2004.11.022
 60. Lin Y-F, Huang M-C, Liu H-C. Glycogen synthase kinase 3 β gene polymorphisms may be associated with bipolar I disorder and the therapeutic response to lithium. *J Affect Disord*. 2013;147(1-3):401-406.
doi:10.1016/j.jad.2012.08.025
 61. Adli M, Hollinde DL, Stamm T, Wiethoff K, Tshuridu M, Kirchheiner J, Heinz A, Bauer M. Response to Lithium Augmentation in Depression is Associated with the Glycogen Synthase Kinase 3-Beta - 50T / C Single Nucleotide Polymorphism. *Biol Psychiatry*. 2007;(32):1295-1302.
doi:10.1016/j.biopsych.2007.03.023
 62. Serretti A, Chiesa A, Calati R, Massat I, Linotte S, Kasper S, Lecrubier Y, Antonijevic I, Forray C, Snyder L, Bollen J, Zohar J, Ronchi D De, Souery D, Mendlewicz J. A preliminary investigation of the influence of CREB1 gene on treatment resistance in major depression. *J Affect Disord*. 2011;128(1-2):56-63.
doi:10.1016/j.jad.2010.06.025
 63. Jang M-H, Kitabatake Y, Kang E. Secreted frizzled-related protein 3 (sFRP3) regulates antidepressant responses in mice and humans. *Mol Psychiatry*. 2014;18(9):957-958. doi:10.1038/mp.2012.158.Secreted
 64. Kishi T, Kitajima T, Ikeda M, Kinoshita Y, Kawashima \AA EK, Okochi \AA ET, Okumura \AA ET. CLOCK may Predict the Response to Fluvoxamine Treatment in Japanese Major Depressive Disorder Patients. *NeuroMolecular Med*. 2009;11(2):53-57. doi:10.1007/s12017-009-8060-7
 65. Mamdani F, Alda M, Grof P, Young LT, Rouleau G, Turecki G. Lithium

- response and genetic variation in the CREB family of genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B(4):500-504. doi:10.1002/ajmg.b.30617
66. Campos-de-Sousa S, Guindalini C, Tondo L, Munro J, Osborne S, Floris G, Pedrazzoli M, Tufik S, Breen G, Collier D. Nuclear receptor rev-erb- α circadian gene variants and lithium carbonate prophylaxis in bipolar affective disorder. *J Biol Rhythms.* 2010;25(2):132-137.
doi:10.1177/0748730410362713
 67. Berliner Wissenschaftsnetz Depression. Accessed August 11, 2019.
<https://www.berliner-wissenschaftsnetz-depression.de/>
 68. PerkinElmer chemagen Technologie GmbH. Accessed August 7, 2019.
<https://chemagen.com/>
 69. chemagic DNA Blood10k Kit. PerkinElmer. Accessed August 7, 2019.
www.perkinelmer.com
 70. NanoDrop™ 8000 Spektralphotometer. Thermo Fisher Scientific. Accessed April 29, 2020. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-8000-GL#/ND-8000-GL>
 71. Infinium Exome-24 Kit. Illumina. Accessed March 30, 2020.
<https://emea.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-exome.html>
 72. Infinium OmniExpress-24 Kit. Illumina. Accessed March 30, 2020.
<https://emea.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-omni-express.html>
 73. Innium ® HTS Assay Protocol Guide. Illumina. Published 2013. Accessed August 7, 2019. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/humanomniexpress-24/infinium_hts_assay_protocol_user_guide_15045738_a.pdf
 74. KEGG PATHWAY Database. Accessed August 7, 2019.
<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
 75. SNAP | Broad Institute. Accessed July 8, 2019.
<https://www.broadinstitute.org/snap/snap>
 76. International HapMap Project. Sanger Insititute. Accessed February 10, 2020.
<https://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/human/hapmap3.html>
 77. PLINK: Whole genome data analysis toolset. Harvard. Accessed April 29, 2020. <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/download.shtml#download>
 78. rs1530056 Reference SNP Report - dbSNP. National Center of Biotechnology

- Information. Accessed February 29, 2020.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1530056>
79. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 13):2627-2634. doi:10.1242/jcs.00623
 80. Colantuoni C, Lipska BK, Ye T, Hyde TM, Tao R, Leek JT, Colantuoni EA, Elkahoulou AG, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Temporal dynamics and genetic control of transcription in the human prefrontal cortex. *Nature.* 2011;478(7370):519-523. doi:10.1038/nature10524
 81. Cerpa W, Toledo EM, Varela-Nallar L, Inestrosa NC. The role of Wnt signaling in neuroprotection. *Drug News Perspect.* 2009;22(10):579-591. doi:10.1358/dnp.2009.10.1436817
 82. Wang Y, Bao D-J, Xu B, Cheng C-D, Dong Y-F, Wei X, Niu C-S. Neuroprotection mediated by the Wnt/Frizzled signaling pathway in early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage. *Neural Regen Res.* 2019;14(6):1013. doi:10.4103/1673-5374.250620
 83. Guo JU, Ma DK, Mo H, Ball MP, Jang M-H, Bonaguidi MA, Balazer JA, Eaves HL, Xie B, Ford E, Zhang K, Ming G, Gao Y, Song H. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci.* 2011;14(10):1345-1351. doi:10.1038/nn.2900
 84. Inestrosa NC, Urra S, Colombres M. Acetylcholinesterase (AChE)-amyloid-beta-peptide complexes in Alzheimer's disease. the Wnt signaling pathway. *Curr Alzheimer Res.* 2004;1(4):249-254. doi:10.2174/1567205043332063
 85. Baker-LePain JC, Lynch JA, Parimi N, McCulloch CE, Nevitt MC, Corr M, Lane NE. Variant Alleles of the WNT Antagonist FRZB Are Determinants of Hip Shape and Modify the Relationship between Hip Shape and Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(5):1457. doi:10.1002/ART.34526
 86. Bahl C, Singh N, Behera D, Sharma S. High-order gene interactions between the genetic polymorphisms in Wnt and AhR pathway in modulating lung cancer susceptibility. *Per Med.* 2017;14(6):487-502. doi:10.2217/pme-2017-0018
 87. Alanazi MS, Parine NR, Shaik JP, Alabdulkarim HA, Ajaj SA, Khan Z. Association of single nucleotide polymorphisms in Wnt signaling pathway genes with breast cancer in Saudi patients. *PLoS One.* 2013;8(3):e59555. doi:10.1371/journal.pone.0059555
 88. Fernández-Torres J, Zamudio-Cuevas Y, López-Reyes A, Garrido-Rodríguez

- D, Martínez-Flores K, Lozada CA, Muñoz-Valle JF, Oregon-Romero E, Martínez-Nava GA. Gene–gene interactions of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in knee osteoarthritis. *Mol Biol Rep*. 2018;45(5):1089-1098. doi:10.1007/s11033-018-4260-2
89. Xue W, Wang W, Gong T, Zhang H, Tao W, Xue L, Sun Y, Wang F, Chen G. PKA-CREB-BDNF signaling regulated long lasting antidepressant activities of Yueju but not ketamine. *Sci Rep*. 2016;6(1):26331. doi:10.1038/srep26331
90. Perlis RH, Purcell S, Fagerness J, Cusin C, Yamaki L, Fava M, Smoller JW. Clinical and Genetic Dissection of Anger Expression and CREB1 Polymorphisms in Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry*. 2007;62(5):536-540. doi:10.1016/j.biopsych.2006.10.034
91. Perlis RH, Purcell S, Fava M, Fagerness J, Rush AJ, Trivedi MH, Smoller JW. Association Between Treatment-Emergent Suicidal Ideation With Citalopram and Polymorphisms Near Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein in the STAR*D Study. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(6):689. doi:10.1001/archpsyc.64.6.689
92. Carlberg L, Schosser A, Calati R, Serretti A, Massat I, Papageorgiou K, Kocabas NA, Mendlewicz J, Zohar J, Montgomery SA, Souery D, Kasper S. Association study of *CREB1* polymorphisms and suicidality in MDD: results from a European multicenter study on treatment resistant depression. *Int J Neurosci*. 2015;125(5):336-343. doi:10.3109/00207454.2014.936554
93. Wei Y, Bu S, Liu X, Li H. Association study of three single-nucleotide polymorphisms in the cyclic adenosine monophosphate response element binding 1 gene and major depressive disorder. *Exp Ther Med*. 2015;9(6):2235-2240. doi:10.3892/etm.2015.2408
94. Liu X, Xu Y, Cui D, Jiang S, Qian Y, Yu S, Jiang K. Association of cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein gene and major depressive disorder. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2010;27(3):263-266. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2010.0.006
95. Blendy JA. The Role of CREB in Depression and Antidepressant Treatment. *Biol Psychiatry*. 2006;59(12):1144-1150. doi:10.1016/j.biopsych.2005.11.003
96. Schwaninger M, Schöfl C, Blume R, Rössig L, Knepel W. Inhibition by antidepressant drugs of cyclic AMP response element-binding protein/cyclic AMP response element-directed gene transcription. *Mol Pharmacol*.

- 1995;47(6):1112-1118. Accessed February 21, 2020.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7603449>
97. Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci*. 2002;22(8):3262-3268. doi:20026293
 98. Mercer TR, Dinger ME, Mariani J, Kosik KS, Mehler MF, Mattick JS. Noncoding RNAs in long-term memory formation. *Neuroscientist*. 2008;14(5):434-445. doi:10.1177/1073858408319187
 99. Weeber EJ, Sweatt JD. Molecular Neurobiology of Human Cognition. *Neuron*. 2002;33(6):845-848. doi:10.1016/S0896-6273(02)00634-7
 100. Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*. 1998;21(4):869-883. doi:10.1016/s0896-6273(00)80602-9
 101. Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieff C, Sweatt JD. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci*. 1999;19(11):4337-4348. Accessed February 26, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10341237>
 102. Stamm TJ, Adli M, Kirchheiner J, Smolka MN, Kaiser R, Tremblay PB, Bauer M. Serotonin transporter gene and response to lithium augmentation in depression. *Psychiatr Genet*. 2008;18(2):92-97. doi:10.1097/YPG.0b013e3282f08a19
 103. Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong M-L, Licinio J, Roots I, Brockmüller J. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry*. 2004;9(5):442-473. doi:10.1038/sj.mp.4001494
 104. Polter AM, Li X. Glycogen Synthase Kinase-3 is an Intermediate Modulator of Serotonin Neurotransmission. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:31. doi:10.3389/fnmol.2011.00031
 105. Kirchheiner J, Lorch R, Lebedeva E, Seeringer A, Roots I. Genetic variants in FKBP5 affecting response to antidepressant drug treatment. *Pharmacogenomics*. 2008;9(7):841-846. doi:10.2217/14622416.9.7.841

106. Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Pu B, Papiol S, Seaman S, Lucae S, Kohli MA, Nickel T, Ku HE, Modell S, Fuchs B, Majer M, Pfennig A, Kern N, Baghai T, Deiml T. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet.* 2004;36(12):1319-1325. doi:10.1038/ng1479
107. Ellsworth KA, Moon I, Eckloff BW, Fridley BL. FKBP5 genetic variation: association with selective serotonin reuptake inhibitor treatment outcomes in major depressive disorder. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(3):156-166. doi:10.1097/FPC.0b013e32835dc133.FKBP5
108. Wray NR, Ripke S, Mattheisen M, Trzaskowski M, Byrne EM, Abdellaoui A, Adams MJ, Agerbo E, Air TM, Andlauer TMF, Bacanu S-A, Bækvad-Hansen M, Beekman AFT, Bigdeli TB, Binder EB, Blackwood DRH, Bryois J, Buttenschøn HN, Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat Genet.* 2018;50(5):668-681. doi:10.1038/s41588-018-0090-3
109. Howard DM, Adams MJ, Clarke T-K, Hafferty JD, Gibson J, Shiralilari M, Coleman JRI, Ward J, Wigmore EM, Alloza C, Shen X, Barbu MC, Xu EY, Whalley HC, Marioni RE, Porteous DJ, Davies G, 23andMe Research Team, Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genome-wide meta-analysis of depression in 807,553 individuals identifies 102 independent variants with replication in a further 1,507,153 individuals. *bioRxiv.* 2018;12:24. doi:10.1101/433367
110. Matsumoto Y, Fabbri C, Pellegrini S, Porcelli S, Politi P, Bellino S, Iofrida C, Mariotti V, Melissari E, Menchetti M, Martinelli V, Cappucciati M, Bozzatello P, Brignolo E, Brambilla P, Balestrieri M, Serretti A. Serotonin transporter gene: a new polymorphism may affect response to antidepressant treatments in major depressive disorder. *Mol Diagn Ther.* 2014;18(5):567-577. doi:10.1007/s40291-014-0110-7
111. Wnt signaling pathway - Homo sapiens (human). KEGG PATHWAY Database. Accessed March 30, 2020. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04310
112. PI3K-Akt signaling pathway - Homo sapiens (human). KEGG PATHWAY

Database. Accessed March 30, 2020. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04151

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nina Jolanda Fodaro, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss genetischer Varianten in der GSK3 β -vermittelten Signaltransduktion auf die Wirksamkeit der Lithiumaugmentation bei therapieresistenter unipolarer Depression“ / „The influence of genetic variants in GSK3 β -mediated signaling on the efficacy of lithium augmentation in treatment-resistant unipolar depression“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Mazda Adli für die Einbindung in die Arbeitsgruppe für Affektive Störungen und die Möglichkeit der Promotion. Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. Roland Ricken für die Vermittlung des Themas und die kompetente Betreuung meiner Dissertation.

Mein großer Dank gilt außerdem Dr. med. Pichit Buspavanich, Sandra Bopp sowie allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Affektive Störungen für ihre produktive Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf dem Weg zur Promotion mit Ermutigung und Vertrauen begleitet haben.