



MOLEKULARE WIRKMECHANISMEN
DES ANTIDEPRESSIVUMS VENLAFAXIN

-

GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN
IN MAUS UND MENSCH

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Florian Lukas Patrick Proft

aus

Erlenbach am Main

Würzburg 2014

Eingereicht am: 28.10.2014

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Engstler
Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Deckert
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Erich Buchner

Tag der Verteidigung:

Promotionsurkunde ausgehändigt am:

für U + M & GA

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	
1.	Symptomatik & Diagnosekriterien.....	1
1.1.	Depression.....	2
1.2.	Bipolare affektive Störung.....	2
2.	Epidemiologie der Depression.....	3
3.	Ätiologie der Depression	
3.1.	Stressachse.....	4
3.2.	Monoamin-Defizit / Serotonin-Defizit.....	5
3.3.	Neurogenese & neuronale Plastizität.....	8
4.	Pharmakotherapie affektiver Störungen.....	11
5.	Venlafaxin	
5.1.	Pharmakodynamik	
5.1.1.	Serotonerg-noradrenerger Wirkmechanismus.....	13
5.1.2.	Andere Wirkmechanismen von Venlafaxin.....	14
5.2.	Pharmakokinetik.....	15
5.3.	Pharmakogenetik.....	16
6.	Ziele der vorliegenden Arbeit	
6.1	Ziel 1: Identifizierung potentieller genetischer Korrelate des antidepressiven Effektes von Venlafaxin.....	20
6.2.	Ziel 2: personalisierte Pharmakotherapie mit Venlafaxin.....	21
II.	Material & Methoden	
1.	Material.....	22
2.	Methoden	
2.1.	Tierstudie	
2.1.1.	Wahl der Versuchstiere.....	28
2.1.2.	Findung der zu applizierenden Venlafaxin-Dosis.....	28
2.1.3.	Venlafaxin-Gewinnung.....	30
2.1.4.	Venlafaxin-Gabe an die Versuchstiere.....	30
2.1.5.	Präparation der Hirnregionen von Interesse.....	31
2.1.6.	Quantifizierung von Venlafaxin, O-Desmethylvenlafaxin und Monoamin-Neurotransmittern im murinen ZNS mittels HPLC-Analyse.....	33

2.1.7.	RNA-Extraktion aus murinem Hippokampus-Gewebe.....	35
2.1.8.	Bestimmung von RNA-Qualität und Konzentration.....	36
2.1.9.	Umschreiben der RNA in cDNA.....	36
2.1.10.	Hypothesenfreie Microarray Expressions-Analyse der DBA/2-Hippokampi zur Generierung von Kandidatengenomen.....	36
2.1.11.	Evaluierung der per Microarray gefundenen Kandidatengene mit quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR)	37
2.2.	Humanstudie	
2.2.1.	Patienten-Einschluss.....	43
2.2.2.	Blutprobennahme.....	45
2.2.3.	Serumkonzentrationsanalyse von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin.....	45
2.2.4.	RNA-Extraktion aus humanem Blut.....	46
2.2.5.	Bestimmung von RNA-Quanti- und Qualität.....	46
2.2.6.	Umschreiben der RNA in cDNA.....	46
2.2.7.	Prüfung der cDNA-Synthese.....	47
2.2.8.	Genexpressionsanalyse in humanen Leukozyten mittels qRT-PCR.....	48
2.2.9.	DNA-Extraktion aus humanem Blut.....	50
2.2.10.	Genotypisierung von 5-HTTLPR, rs25531 und rs28386840.....	50
2.3.	Statistische Auswertung.....	51
III.	Ergebnisse	
1.	Venlafaxin- und O-Desmethylvenlafaxin-Konzentrationen im murinen ZNS....	53
2.	Monoamin-Neurotransmitter-Konzentrationen im murinen ZNS.....	54
2.1.	Serotonin.....	54
2.2.	Noradrenalin.....	54
2.3.	Dopamin.....	55
3.	Genexpressionsuntersuchungen	
3.1.	Microarray-Analyse (muriner Hippokampus).....	58
3.2.	qRT-PCR (muriner Hippokampus).....	62
3.3.	qRT-PCR (humane Leukozyten).....	65
4.	Pharmakogenetische Untersuchung am Menschen: Assoziation von Genotyp, Serumkonzentration und Therapie-Antwort	
4.1.	Klinische Daten, Serumkonzentrationen und Genotypen sowie Komedikation innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs.....	68

4.2.	Therapie-Antwort und <i>SLC6A2</i> - / Noradrenalin-Transportergen-Polymorphismus.....	70
4.3.	Therapie-Antwort und <i>SLC6A4</i> - / Serotonin-Transportergen-Polymorphismus..	70
IV.	Diskussion	
1.	Identifizierung potentieller genetischer Korrelate des antidepressiven Effektes von Venlafaxin.....	72
1.1.	Venlafaxin- und O-Desmethylvenlafaxin-Konzentrationen im murinen Gehirn.	72
1.2.	Monoamin-Neurotransmitter-Konzentrationen im murinen Gehirn.....	73
1.3.	Genexpression im murinen Hippokampus.....	74
1.3.1.	Microarray Expressionsanalyse.....	75
1.3.2.	qRT-PCR Expressionsanalyse.....	75
1.4.	Genexpression in humanen Leukozyten.....	78
2.	Personalisierte Pharmakotherapie mit Venlafaxin.....	82
V.	Zusammenfassung	88
VI.	Summary	92
VII.	Literaturverzeichnis	95
VIII.	Publikationsliste	108
IX.	Abbildungsverzeichnis	109
X.	Tabellenverzeichnis	110
XI.	Danksagung	112
XII.	Curriculum Vitae	114
XIII.	Ehrenwörtliche Erklärung	115

Abkürzungsverzeichnis

5-HIAA	- 5-Hydroxy-Indole-Acetic Acid (5-Hydroxyindolacetat)
5-HT	- 5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTT	- 5-Hydroxytryptamin-Transporter, Serotonin-Transporter
5-HTTLPR	- 5-Hydroxytryptamin-Transporter Linked Polymorphic Region (<i>SLC6A4</i> -Promotor Längenpolymorphismus)
AGNP	- Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie
aRNA	- antisense RNA (Gegenstrang RNA)
BE X	- Blutentnahme an Tag 5 - 8 nach Venlafaxin-Ersteinnahme
BE XX	- Blutentnahme an Tag 25 - 32 nach Venlafaxin-Ersteinnahme
bp	- basepairs (Anzahl der Basenpaare)
cDNA	- complementary DNA (zu RNA komplementäre DNA)
CGI-I(-Scale)	- Clinical Global Impression-Improvement-Scale (Skala für den Klinischen Gesamteindruck der Symptomveränderung)
DA	- Dopamin
DOPAC	- 3,4-Dihydroxy-Phenylacetat
DNA	- Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DDV	- N,O-Didesmethylvenlafaxin
DSM-5	- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Version 5)
FDR	- False Discovery Rate (Falsch Positiv-Rate)
g	- mittlere Erdbeschleunigung (9,81 m/s ² , bei Zentrifugation)
H ₂ O dd	- doppelt destilliertes Wasser (<i>Aqua bidestillatus</i>)
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie)
HVA	- Homovanillic acid (Homovanillinsäure)
ICD-10	- International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (Version 10)
IZKF	- Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung, Einrichtung der medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
ko	- knock-out (eines Gens, Gen im Text entsprechend kursiv)
logFC	- logarithmierter Fold Change (Maß der Genexpressionsveränderung bei Microarray-Analyse)

MHPG	- 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol
mRNA	- messenger RNA (Boten-RNA)
NA	- Noradrenalin
NAT	- Noradrenalin-Transporter
NDV	- N-Desmethylvenlafaxin
NRI	- Norepinephrine Reuptake-Inhibitor (Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer)
ODV	- O-Desmethylvenlafaxin
PBS	- Proteinbiosynthese
PCR	- Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
qRT-PCR	- quantitative Real-Time PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
RNA	- ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	- ribosomale RNA
rs12345	- reference single-nucleotide polymorphism (hier: Nummer 12345)
RT	- Raumtemperatur / reverse Transkriptase
NCBI	- National Center for Biotechnology Information (USA)
SNP	- single-nucleotide polymorphism (Einzelbasenmutation)
sNRI	- selective Norepinephrine Reuptake-Inhibitor (selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer)
SNRI	- Serotonin Norepinephrine Reuptake-Inhibitor (Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer)
sSNRI	- selective Serotonin Norepinephrine Reuptake-Inhibitor (selektiver Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer)
<i>Taq</i> -Polymerase	- DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	- Tricyclic Antidepressant (Trizyklisches Antidepressivum)
TDM	- Therapeutisches Drug Monitoring ("Medikamentenspiegelbestimmung")
VEN	- Venlafaxin
WHO	- World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
ZEMM	- Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin, Einrichtung der medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Gen-Akronyme / offizielle Bezeichnungen

<i>Actb</i>	- actin, beta
<i>Alas1</i>	- aminolevulinate, delta-, synthase 1
<i>Arc</i>	- activity-regulated cytoskeleton-associated protein
<i>B2m</i>	- beta-2 microglobulin
<i>CaMK2d</i>	- calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta
<i>Dusp1</i>	- dual specificity phosphatase 1
<i>Egr2</i>	- early growth response 2
<i>Fos</i>	- FBJ osteosarcoma oncogene
<i>Gh</i>	- growth hormone
<i>Gusb</i>	- glucuronidase, beta
<i>Hmbs</i>	- hydroxymethylbilane synthase
<i>Hprt</i>	- hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (<i>Mus musculus</i>)
<i>HPRT1</i>	- hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (<i>Homo sapiens</i>)
<i>Mef2c</i>	- myocyte enhancer factor 2C
<i>Nfil3</i>	- nuclear factor, interleukin 3, regulated
<i>Nr4a1</i>	- nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
<i>Pgk1</i>	- phosphoglycerate kinase 1
<i>Prkacb</i>	- protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta
<i>SLC6A2</i>	- Solute Carrier Family 6, Member 2 (Noradrenalin-Transporter Gen)
<i>SLC6A4</i>	- Solute Carrier Family 6, Member 4 (Serotonin-Transporter Gen)
<i>Sdha</i>	- succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein
<i>Tbp</i>	- TATA box binding protein
<i>Tfrc</i>	- transferrin receptor
<i>YWHAZ</i>	- tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide

(Gene sind in dieser Arbeit kursiv, ihre entsprechenden Proteinprodukte in Recte geschrieben)

I. Einleitung

1. Symptomatik & Diagnosekriterien

Die aktuelle Nosologie der Psychopathologien ordnet unter affektiven Störungen die Manie, die Depression sowie als bipolare affektive Störung das alternierende Auftreten dieser beiden Zustände, eventuell unterbrochen von symptomfreien Perioden, ein. Für eine Diagnose stehen Symptomkataloge zur Verfügung anhand derer geprüft wird, ob und in welchem Schweregrad ein Mensch betroffen ist. Sie dienen der genormten und reproduzierbaren Diagnosestellung im Fall der grundlegend sehr heterogenen psychischen Erkrankungen. Das "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders" ist das von der American Psychiatric Association herausgegebene Klassifikationssystem und aktuell in der fünften Auflage (DSM-5) in den Vereinigten Staaten von Amerika (United States of America, USA) in Gebrauch. Das Kompendium "International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems" (ICD) wird von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) gestellt und findet weltweit, mit Ausnahme der USA, Anwendung bei der Diagnostizierung. Aktuell ist die zehnte Auflage des ICD in Gebrauch (ICD-10).

In jedem Fall ist Voraussetzung für eine Diagnosestellung, dass die auftretenden Symptome derart ausgeprägt sind, dass das Individuum selbst beziehungsweise seine Umwelt subjektiv darunter leiden. Weiterhin ist ein Auftreten der Symptomatik über mindestens zwei Wochen am Stück und in diesem Zeitraum an den meisten Tagen festzustellen. Durch Ausschlussdiagnostik muss sichergestellt sein, dass die Symptomatik idiopathisch und nicht sekundär aufgrund (hirn)organischer Ursachen auftritt. So können affektive Störungen beispielsweise auf Demenzerkrankungen (Bertoux et al., 2012), Infektionen mit dem Syphilis-Erreger *Treponema pallidum* (Barbosa et al., 2012), multiple Sklerose (Tapos und Sivaswamy, 2013) eine Hypo- oder Hyperthyreose (Krishna et al., 2013) oder auch auf eine Überaktivität der hypothalamisch-hypophysär-adrenergen Achse aufgrund von Neoplasien (Reed et al., 1983) zurückgeführt werden. Des Weiteren können die Symptomatiken infolge des Konsums psychoaktiver Substanzen ("Drogen", Pharmazeutika) oder als dessen Nachwirkung beziehungsweise im Laufe einer Entwöhnung, beobachtet werden (Handelsman et al., 1992; Seivewright and Dougal, 1993; Leventhal et al., 2013).

1.1. Depression

Einzelne depressive Episoden sind im ICD-10 mit F32 codiert. In Abhängigkeit von der Beeinträchtigung der normalen Lebensführung beziehungsweise der Symptomkombination kann diagnostisch zwischen leichter (F32.0), mittelgradiger (F32.1) und schwerer depressiver Episode (F32.2) unterschieden werden. Depression ist gekennzeichnet durch einen anhaltenden Zustand von konstant gedrückter, düster-dunkel negativer Stimmung, Begeisterungs- und Interessenlosigkeit, Hoffnungslosigkeit, Minderwertigkeitsgefühl und Gedankenschleifen, eine Unfähigkeit Freude zu empfinden (Anhedonie) sowie somatische Symptome, beispielsweise Appetit- und Libidoverlust, motorische beziehungsweise psychomotorische Hemmung und ein Gefühl körperlicher Schwäche bis hin zu einem Stupor. Die Diagnose F32.2 ist oft verbunden mit dem Vorliegen von Gedanken im Hinblick auf, beziehungsweise dem Versuch eines Suizids. Treten zusätzlich Halluzinationen beziehungsweise Wahnvorstellungen auf, wird die Diagnose F32.3 (schwere depressive Episode mit psychotischen Symptomen) gestellt. Von rezidivierender depressiver Störung (F33) wird gesprochen wenn depressive Episoden in regelmäßigen oder unregelmäßigen Zeitintervallen auftreten und zwischen ihnen keine manischen oder hypomanischen Episoden zu verzeichnen sind.

1.2. Bipolare affektive Störung

Bipolare affektive Störung (ICD-10 F31) bezeichnet ein alternierendes Auftreten von depressiven und manischen beziehungsweise hypomanischen Episoden in entsprechender Ausprägungen (leicht oder mittelgradig, schwer; mit oder ohne psychotische Symptome). (Hypo)manische Phasen sind diagnostisch definiert als Zeitabschnitte unnormal empfundener Aktivität, übersteigertem Antrieb und realitätsfremd-positiver Selbsteinschätzung. Negativ empfundene Aspekte können ein Gefühl des Getriebenseins und der inneren Unruhe sein. Das ICD-10 listet eine isolierte Manie unter F30. Manische und depressive Symptomatik muss zur Diagnosestellung von F31 jeweils mindestens einmal zugegen sein. Dieses Kriterium ist anamnestisch zu prüfen. Zwischen den bei der bipolaren affektiven Störung auftretenden Krankheitszuständen können symptomfreie Zeitintervalle liegen. Zusätzlich kann bei entsprechender Anamnese und einer aktuell vorliegenden Kombination beziehungsweise einem raschen symptomatischen Wechsel zwischen den beiden Polen eine gemischte Episode (F31.6) beobachtet werden.

2. Epidemiologie der Depression

Zur Epidemiologie affektiver Erkrankungen liegen zahlreiche nationale und internationale Untersuchungen aus verschiedenen Ländern vor. Überwiegend handelt es dabei um Studien bezüglich depressiver Störungen oder allgemein Depression. Laut WHO litten 2011 global etwa 350 Millionen Menschen an einer Depression und damit machte diese Diagnose den größten Anteil an psychischen Erkrankungen aus.

Für die Bevölkerung Europas im Jahr 2010 wird von Wittchen et al. (2011) eine 12-Monats-Prävalenz von 38,2 % für eine psychische Störung geschätzt, der depressiven Störung wird dabei eine Prävalenz von 6,9 % zugeordnet. Die Depressionsprävalenz lag laut einer Erhebung des Robert-Koch-Institutes (RKI) in Deutschland in den Jahren 2008 bis 2011 mit 10,2 % bei Frauen in der Altersgruppe zwischen 18 und 79 Jahren nahezu doppelt so hoch wie bei Männern (6,1 %).

Im Gesundheitsreport der Techniker Krankenkasse (TK) von 2012 werden psychische und Verhaltensstörungen als Hauptursache für Arbeitsunfähigkeitsmeldungen unter Erwerbstätigen im Jahr 2011 genannt. Insbesondere bei Frauen erhöhten sich die Fehlzeiten aufgrund psychischer Störungen im Vergleich zwischen 2010 und 2011 um 20,8 %, für Männer wird ein Zuwachs von 6,2 % angegeben. Es wird diesbezüglich von der Fortsetzung eines Trends der Vorjahre gesprochen. Insgesamt wird für Berufstätige im Vergleich zum Jahr 2000 eine Erhöhung der Fehlzeiten aufgrund der Diagnose einer psychischen Störung um 70 % ausgewiesen.

Richter et al. (2008) konnten in einer Metaanalyse von 44 Studien zu psychischen Erkrankungen aus den Jahren 1947 bis 2006 keine Zunahme nachweisen und führen den gesellschaftlichen Eindruck zurück auf eine erhöhte Sensibilität, verfeinerte Diagnostik und die verringerte Stigmatisierung psychisch Kranker, wodurch deren Bereitschaft sich in Behandlung zu begeben gestiegen ist. Dieselben Mechanismen führen vermutlich auch zu den von den Krankenkassen vorgelegten Zahlen.

Nach Schätzungen der WHO im "Global Burden of Disease, 2004 Update" werden psychische Störungen im Jahr 2030 die meistgestellte Diagnose sein. Die weltweit aufgrund psychischer Erkrankungen entstehenden Kosten werden nach Schätzung des World Economic Forum und der Harvard University von 2,5 Billionen US \$ im Jahr 2010 auf über 6 Billionen US \$ im Jahr 2030 angestiegen sein.

3. Ätiologie der Depression

3.1. Stressachse

Stress, insbesondere chronischer psychosozialer Stress, kann Induktor depressiver Symptomatik sein (Kendler et al., 1999; Kendler et al., 2002). Als zugrunde liegender Mechanismus dieser biologisch-physiologischen beziehungsweise pathogenen Reaktion auf externe Bedingungen wird eine Hyperaktivität oder Übererregbarkeit des hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Systems („hypothalamic-pituitary-adrenal axis“, HPA-axis / HPA-Achse) aufgrund defizitärer Selbstregulation angesehen.

Die physiologische Stressreaktion dient im evolutionären Sinn einer Anpassung des Organismus an Umweltbedingungen, das heißt der Bewältigung „stressiger“, eine adaptive Reaktion erfordernder, Situationen. Auf ein noradrenerges Signal des *Locus coeruleus* hin wird im Hypothalamus, einem Kerngebiet des limbischen Systems, Kortikotropin-freisetzendes Hormons („Corticotropin-releasing hormone“, CRH) synthetisiert und freigesetzt. CRH wiederum veranlasst Synthese und Ausschüttung von ACTH (Adrenocorticotropin-freisetzendes Hormon, „adrenocorticotropine-releasing hormone“) aus dem Hypophysenvorderlappen. ACTH erreicht über die Blutbahn die Nebennieren und induziert dort die Ausschüttung von Stresshormonen in Form von Corticosteroiden, anteilig hauptsächlich des Glucocorticoids Cortisol (11 β -Hydroxycortison, C₂₁H₃₀O₅). Cortisol bildet nach Bindung an seinen intrazellulären Rezeptor mit diesem einen Transkriptionsfaktor und kann somit via Beeinflussung der Genexpression adaptive Prozesse initiieren. Über negative Rückkopplungsschleifen begrenzen die freigesetzten Glucocorticoide eine weitere Sekretion stimulierender Hormone. Von nachgewiesener Bedeutung für das inhibierende Feedback sind im Zentralnerven-System (ZNS) Hypothalamus und Hypophyse selbst, des Weiteren wurde der Hippokampus als übergeordnete regulative Instanz identifiziert (Swaab et al., 2005; Juruena, 2013).

Fortgesetzte Stimulierung aufgrund chronischen Stresses kann zu einer Desensitivierung dieser zentralen Regulationsmechanismen, einer graduell ausgeprägten Glucocorticoid-Resistenz, führen (Pariante und Miller, 2001). Auch kann aufgrund eventuell im Laufe der Entwicklung erworbener, regulativer Defizite oder genetisch basierter Variation (Mutation) des Systems eine Vulnerabilität im Sinne einer Übererregbarkeit bestehen und damit bei Eintreten einer

entsprechenden, als belastend empfundenen Situation eine Hyperaktivität der HPA-Achse ausgelöst werden (Heim et al., 2008; Baes et al., 2014).

Bei depressiven Patienten wurden im Vergleich zu Kontrollpersonen deutlich erhöhte Cortisol-Gehalte im Blut gefunden (Board et al., 1956; Weber et al., 2000). Im Experiment zeigten Nagetiere infolge übermäßiger, induzierter Sekretion von CRH depressions-ähnliches Verhalten (Owens und Nemeroff, 1993). Diese Befunde weisen sichtbar auf eine Assoziation der beobachteten Phänomene hin.

Andauernde, überphysiologische Aktivität der HPA-Achse und resultierend chronisch erhöhte Cortisolgehalte können aufgrund der nahezu ubiquitär präsenten Rezeptorensysteme zu Veränderungen in zahlreichen Organen beziehungsweise Systemen und metabolischen Vorgängen führen. Im Zusammenhang mit depressiver Symptomatik erscheint insbesondere ein Einfluss auf monoaminerge Transmission und neuronale Plastizität im ZNS von Relevanz. So konnten Veränderungen zentralnervöser Monoamingehalte beziehungsweise -freisetzung (Anisman and Sklar, 1979; Weiss et al., 1981; Gambarana et al., 1999) sowie reduzierte hippocampale Neurogenese bei gleichzeitig intensivierter Neurodegeneration infolge fortgesetzten Stresses beziehungsweise erhöhten Glucocorticoid-Konzentrationen nachgewiesen werden (Sapolsky et al., 1986; Czéh und Lucassen, 2007). In zahlreichen Studien an Tieren wurde untersucht, inwieweit sich Stress und resultierende anhedone, depressions-ähnliche Zustände in synaptischer Plastizität beziehungsweise deren Veränderung niederschlagen. Tiere, primär Nagetiere, wurden Stress-Paradigmen unterworfen, anschließend in histologischen Untersuchungen die Zahl und Stärke der synaptischen Verbindungen sowie der ausgebildeten neuronalen Fortsätze und Verschaltungen bestimmt und mit nicht-gestressten Kontrolltieren verglichen. Die essentielle Erkenntnis aus diesen Experimenten ist, dass in verschiedenen Hirnregionen gestresster Tiere geringere interneuronale Verschaltungen zu finden sind (Watanabe et al., 1992; Galea et al., 1997; Bessa et al., 2009). Auch war im präfrontalen Kortex und im Hippokampus veränderte mRNA- und Proteinexpression von Exocytoseproteinen nachzuweisen (Müller et al., 2011).

3.2. Monoamin-Defizit / Serotonin-Defizit

Die Monoamindefizit-Hypothese zur Entstehung depressiver Symptomatik geht davon aus, dass die Monoamin-Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und in Bezug auf affektive

Erkrankungen insbesondere Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) in reduzierter Konzentration bei der Kommunikation zwischen Prä- und Postsynapse zur Verfügung stehen und diese daher nicht in ausreichendem Maß stattfindet, beziehungsweise, dass ein daraus hervorgehendes Ungleichgewicht innerhalb des neuronalen Netzwerkes die Pathologie bedingt. Auf einen präsynaptischen Reiz hin werden serotoninhaltige Vesikel exozytotisch in den synaptischen Spalt entleert. Serotonin diffundiert durch den Spalt zur Postsynapse und aktiviert dort durch Bindung an Serotonin-Rezeptoren postsynaptische Mechanismen. Ein Defizit, welches zu unzureichender Reiztransmission führt, kann folglich verschiedene Ursachen haben. Zu geringes präsynaptisches Vorliegen des Transmitters aufgrund verringerter Synthese basierend auf geringer Konzentration des Serotonin-Vorläufers Tryptophan, Synthese anderer Tryptophan-basierter Moleküle oder erhöhter Abbaurate von Serotonin, mangelhafter Transfer der Transmittermoleküle in die synaptischen Vesikel, reduzierte Ausschüttung infolge eines präsynaptischen Reizes aufgrund defizitärer dafür benötigter molekularer Maschinerie und folglich Exozytose zu geringer Mengen, um den für eine Transmission erforderlichen Konzentrationsgradienten zu erzeugen, erhöhte enzymatische Degradation der Transmittermoleküle im synaptischen Spalt und auch eine unzureichende postsynaptische Rezeption beziehungsweise Weiterleitung des Reizes ab der Postsynapse, basierend auf unnormaler Rezeptionskapazität oder defizitärer *second messenger*-Dynamik, kommen hierfür in Frage.

Sowohl Tiermodelle der Depression als auch Befunde erkrankter Menschen geben Hinweise auf eine reduzierte zentrale Serotonin-Präsenz bei depressiver Symptomatik (Shaw et al., 1967; Lloyd et al., 1974; Birkmayer und Riederer, 1975; Bridges et al., 1976; Li et al., 2003; Hasegawa et al., 2006; Iritani et al., 2006; Barton et al., 2008). Klinisch-pharmakologische Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die verringerte Transmission auch auf einer erhöhten Wiederaufnahmekapazität der Präsynapse für die Transmittermoleküle beruhen kann. Für die präsynaptische Wiederaufnahme sind spezifische Proteine (Wiederaufnahme-Transporter) zuständig, der Vorgang dient physiologisch der Beendigung der Transmission. Die Wiederaufnahmekapazität der Präsynapse ist somit primär abhängig von der Anzahl der transmembranär vorhandenen Transporter.

Der humane Serotonin-Transporter (5-HTT) ist auf Chromosom 17 in Bande 17q12 durch das Gen *SLC6A4* (Solute Carrier Family 6 (neurotransporter serotonin), Member 4) codiert (Gelernter et al., 1995). Der periphere und der zentrale Serotonin-Transporter sind in ihrer molekularen Struktur identisch, wodurch eine Modellierung zentraler Transportvorgänge in

peripherem Gewebe, beispielsweise anhand von Blutzellen, ermöglicht wird (Lesch et al., 1993).

In der Promotor-Region des Gens *SLC6A4* wurde die Serotonin-Transporter-assoziierte polymorphe Region (*5-HTT*-Gene Linked Polymorphic Region, *5-HTTLPR*) identifiziert, ein DNA-Polymorphismus, welcher die Genexpressionsrate signifikant beeinflusst. Dieser Polymorphismus besteht in der, im Vergleich zur "wildtypischen" Version, Insertion beziehungsweise Deletion einer 43 Basenpaare (bp) langen, Guanin und Cytosin reichen Sequenz im Bereich des *SLC6A4*-Promotors. Die Allele werden bei Anwesenheit der Sequenz als "langes Allel" (long allele, l-Allel) und bei Abwesenheit als "kurzes Allel" (short allele, s-Allel) bezeichnet (Heils et al., 1996; Wendland et al., 2006).

Untersuchungen zeigten, dass das dominante s-Allel mit einer im Vergleich zum l-Allel um etwa die Hälfte reduzierten *SLC6A4*-Expression einhergeht (Lesch et al., 1996). Es wird angenommen, dass die sich ausbildende Sekundärstruktur des DNA-Moleküls in der *SLC6A4*-Promotor-Region bei Vorliegen des l-Allels eine Bindung von Faktoren begünstigt die der Initiierung der Proteinbiosynthese (PBS) dienen. Der resultierende Unterschied der Proteinexpression kann Einfluss auf die transmembranäre Transportkapazität und damit auf die Aufrechterhaltungsdauer und Intensität der Transmission nehmen. *In vitro*-Experimente ließen erkennen, dass die Serotonin-Aufnahme in Lymphoblasten bei Vorliegen eines s-Allels um bis zu über 50 % reduziert ist (Lesch et al., 1996). Auch die Serotonin-Aufnahme in Thrombozyten ist bei humanen Trägern des s-Allels signifikant geringer als bei homozygoten l-Allel-Trägern (Greenberg et al., 1999).

Assoziiert mit dem l-Allel wurde ein Polymorphismus identifiziert ("rs25531"; Kraft et al., 2005) durch den bei Vorhandensein der Base Guanin (l_G) anstatt Adenin (l_A) die Expressionsrate auf jene des s-Allels reduziert wird (Nakamura et al., 2000; Hu et al., 2006). Eine Untersuchung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) am lebenden humanen Gehirn konnte für homozygote l_A-Allel-Träger eine signifikant höhere 5-HTT-Dichte nachweisen (Praschak-Rieder et al., 2007).

Zahlreiche Studien assoziierten *SLC6A4* mit psychiatrischen Erkrankungen, unter anderem affektiven Störungen (Lesch et al., 1996; Du et al., 1999). Auch Variationen in regionaler Hirnaktivität wurden mit *5-HTTLPR* assoziiert. So ist die amygdaläre Aktivität infolge angstrepräsentierender Stimuli in s-Allel-Trägern im Vergleich zu homozygoten l-Allel-Trägern signifikant ausgeprägter (Hariri et al., 2002). Die Großzahl der Studien fand eine Assoziation von *SLC6A4*-Genotypen und affektiven Störungen in Verbindung mit weiteren Faktoren wie Geschlecht, sozialen Gegebenheiten beziehungsweise traumatischen Ereignissen in der

Lebensgeschichte (Caspi et al., 2003; Baune et al., 2008; Lazary et al., 2008; Klauke et al., 2011; Wang et al., 2011; Brown et al., 2013). Eine Replikation der Resultate war nicht in jedem Fall erfolgreich (Gutiérrez et al., 1998). Auch Metaanalysen konnten eine Assoziation nur teilweise bestätigen (Munafò et al., 2009; Risch et al., 2009).

3.3. Neurogenese & neuronale Plastizität

Das Gehirn ist permanent mit einer sich verändernden Umwelt konfrontiert und muss folglich ständig neue Informationen verarbeiten und integrieren (cerebrale Plastizität). Dies wird bewerkstelligt durch kontinuierlichen Auf- und Abbau beziehungsweise die Modulation von Verbindungen zwischen den Neuronen (neuronale beziehungsweise synaptische Plastizität).

Entgegen der Annahme, dass die Neuronenzahl des menschlichen Gehirns spätestens ab dem Einsetzen der Pubertät konstant ist, wurde von Eriksson et al. (1998) nachgewiesen, dass im Hippokampus adulter humaner Individuen (Alter > 55 Jahre) Neurogenese stattfindet. Adulte Neurogenese war vorher bereits im Gehirn von Ratten entdeckt worden (Altman, 1962; Kaplan und Hinds, 1977). Ebenfalls in Tierstudien wurde bestätigt, dass sich neugebildete Neurone funktional in das vorhandene hippocampale Netzwerk eingliedern (van Praag et al., 2002).

Im Zusammenhang mit affektiven Störungen wird dem Hippokampus besondere Bedeutung zuerkannt, da diese Region neben ihrer regulierenden Beteiligung an der HPA-Achsenaktivität im limbischen System eine zentrale Schaltstelle für die Generierung des Langzeitgedächtnisses und für Lernvorgänge darstellt (Vertes, 2006). Er wird als bedeutende Kontrollregion für die Integration, emotionale Interpretation, Bildung und Konsolidierung von deklarativen Langzeitgedächtnisinhalten und deren Assoziationen erachtet (Izquierdo und Medina, 1997; Breton und Robertson, 2013; McKenzie et al., 2013). Die Region unterhält afferente und efferente Verbindung sowohl zu niedrigeren, beispielsweise Amygdala und Hypothalamus, als auch höheren cerebralen Zentren, beispielsweise dem Neokortex (Segal, 1979; Olton et al., 1982; Denham und Borisyuk, 2000). Aufgrund dieser zentralen Funktion wird der Hippokampus als essentiell für die Ausbildung und Festigung von Verhaltensmustern sowie beim Menschen auch für Entstehung und Remission affektiver Störungen angesehen (Buchheim et al., 2012; Turner et al., 2012; Oliveira et al., 2013). Als Region adulter Neurogenese im limbischen System kann seine zelluläre Struktur und interzelluläre Kommunikation mit Veränderung des Verhaltens, basierend auf neuer oder andersartiger, erlernter Interpretation von äußeren und inneren Gegebenheiten assoziiert werden (Becker und Wojtowicz, 2007; Sesack und Grace, 2010; Eisch und Petrik, 2012; Mendez-David et al., 2013).

Adulte Neurogenese findet im Hippokampus in der Subkörnerzellschicht ("subgranular zone", SGZ) des *Gyrus dentatus* statt, die gebildeten Zellen wandern in die Körnerzellschicht des Hippokampus ein und integrieren sich in bestehende Verschaltungen (Jessberger et al., 2008; Albert et al., 2009). Untersuchungen mittels bildgebender Verfahren (Magnet Resonanz-Imaging, MRI; funktionelle Magnet-Resonanz Tomographie, fMRT) zeigten in depressiven Individuen ein geringeres Hippokampus-Volumen als in gesunden Kontrollpersonen (Sheline et al., 1996; Maller et al., 2007; Ezzati et al., 2013). Cobb et al. (2012) fanden reduzierte Hippokampus-Volumina in Abhängigkeit von der Dauer beziehungsweise der Chronizität depressiver Symptomatik. Die *post mortem* Untersuchung von hippokampalem Gewebe ließ bei depressiven Individuen eine deutlich geringere Anzahl reifer Körnerzellen im *Gyrus dentatus* erkennen als bei nicht-depressiven Personen (Boldrini et al., 2013).

Das physiologische Korrelat zu Lernvorgängen und dem Aufbau von Erinnerungen ist die Verstärkung interneuroner Verbindungen durch Bildung neuer persistierender Synapsen und Intensivierung der Signalübertragung an bestehenden Synapsen durch Langzeit-Potenzierung („long term potentiation“, LTP; Bliss und Lømo, 1973; Sarvey et al., 1989). Ebenso ist die Langzeit-Depression („long term depression“, LTD; Lynch et al., 1977) und der Rückbau von Verbindungen beteiligt an Veränderungen der neuronalen Verschaltung (Becker et al., 2008). Dies entspricht dem von D. O. Hebb im Jahr 1949 formulierten Prinzip. Die Prozesse sind zeitabhängig beziehungsweise werden initiiert wenn die aufeinanderfolgenden präsynaptischen Reize sich in bestimmten Zeitintervallen ereignen. Die Bildung einer LTP oder LTD an der Synapse ist zusätzlich abhängig von dem Zeitpunkt zu dem die Präsynapse retrograd durch einen exzitatorischen post-synaptischen Stromfluss ("Excitatory Post-Synaptic Current", EPSC) erregt wird (Bi und Poo, 1998; Karmarkar und Buonomano, 2002). Die Veränderungen an der Synapse werden also durch bidirektionale Kommunikation zwischen Prä- und Postsynapse bedingt. Der sekundäre Schritt besteht in der Expression von Proteinen, die die morphologischen Veränderungen einleiten, steuern und erhalten (Kinasen, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren, Neurotrophine), die Substanz der neuen Strukturen darstellen, oder im Fall der LTD den Rückbau der Verbindung bewerkstelligen (Lombroso und Ogren, 2009; Yang und Zhou, 2009; Molnár, 2011; Cheung et al., 2013; Matsuura et al., 2013; Khoutorsky et al., 2013; Ramiro-Cortés und Israely, 2013).

Die auf den angeführten Erkenntnissen basierende Hypothese zur Entstehung affektiver beziehungsweise depressiver Symptomatik geht davon aus, dass reduzierte adulte Neurogenese und in reduziertem Maße erfolgende synaptische Plastizität, möglicherweise ausgelöst durch reduzierte Expression neurotropher Faktoren, für die Pathologie verantwortlich ist (Jacobs et

al., 2000). Es kann angenommen werden, dass aus verringerter zerebraler Plastizität eine verringerte kognitive Flexibilität folgt, welche es dem depressiven Individuum nicht ermöglicht, neue, erweiternde Faktoren in seine subjektive Realität einzuschließen und sich so die Ausweglosigkeit der Situation manifestiert (Psychostase).

4. Pharmakotherapie depressiver Störungen

Die Mittel der Wahl zur Pharmakotherapie depressiver Erkrankung haben pharmakodynamisch sämtlich eine Wiederaufnahme-Inhibition monoaminerger Neurotransmitter gemein.

Primär wird auf das serotonerge System eingewirkt, einige trizyklische Antidepressiva (TCAs) und atypische Antidepressiva wie zum Beispiel Venlafaxin, weisen auch eine noradrenerge Komponente auf. Allgemein sind die eingesetzten Pharmaka einer Placebo-Applikation bei schwerer, das heißt klinisch ausgeprägter depressiver Störung deutlich überlegen (Hewett et al., 2010; Levkovitz et al., 2011; Gibbons et al., 2012; Leucht et al., 2012; Marchesi et al., 2013).

Durch die Blockade der präsynaptischen Transporterproteine für die Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin wird eine Konzentrationserhöhung dieser Substanzen im synaptischen Spalt erreicht und die synaptische Transmission intensiviert. Diese Intensivierung der Transmission wird als Initiator des antidepressiven Mechanismus betrachtet.

Es ist bekannt, dass das noradrenerge und das serotonerge System im ZNS anatomisch und funktional interagieren und sich gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen (Aghajanian, 1985; Chiang and Aston-Jones, 1993; Mongeau et al., 1993; Hughes and Stanford, 1996). Gleichzeitiger Einflussnahme auf beide Systeme wird höhere Effektivität zugeschrieben.

Ein Phänomen der antidepressiven Pharmakotherapie ist die meist mehrwöchige Latenzzeit, welche zwischen der Ersteinnahme des Medikamentes und dem Eintritt des antidepressiven Effektes bei fortgesetzter Einnahme besteht ("lag of onset"). Die im Tierexperiment und teilweise klinisch bestätigte Theorie zur Ursache dieser Latenzzeit besagt, dass zwar bereits nach Applikation einer ersten Dosis die Wiederaufnahme-Inhibition einsetzt, die resultierende Erhöhung der Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt aufgrund einer dadurch über präsynaptische Autorezeptoren induzierten Reduktion der Exozytose-Aktivität aber subeffektiv bleibt. Während der beobachteten Latenzzeit findet nach chronischer Aktivierung der Autorezeptoren, vermutlich mittels Translokation (Internalisierung) und Degradation derselben, eine präsynaptische Desensibilisierung statt. In Folge kommt es zu einer im Vergleich zum prämedizierten Zustand verstärkten Exozytose und Transmission (de Montigny et al., 1990; Artigas et al., 1996; McAskill et al., 1998; Béïque et al., 2000; Nutt, 2002).

Die aktuell in Deutschland zur antidepressiven Pharmakotherapie zugelassenen selektiven Serotonin - Noradrenalin - Wiederaufnahme - Inhibitoren ("selective Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors", sSNRI) sind Duloxetin, Milnacipran und Venlafaxin. Diese sSNRIs unterscheiden sich in ihren Affinitätsverhältnissen für ihre Zielstrukturen. Milnacipran zeigt

identische serotonerge und noradrenerge Aktivität, Duloxetin hat eine zehnfach höhere Affinität für den Serotonin-Transporter als für den Noradrenalin-Transporter, bei Venlafaxin liegt dieses Verhältnis bei 30 : 1 (Montgomery, 2008).

5. Venlafaxin

5.1. Pharmakodynamik

5.1.1. Serotonerg-noradrenerger Wirkmechanismus

Der sSNRI Venlafaxin (VEN) ist in Deutschland seit 1995 als Antidepressivum zugelassen und wird heute auch in der Pharmakotherapie von Angst- und Panikstörungen sowie chronischen Schmerzen eingesetzt (Stahl et al., 2005; Beipackzettel Venlafaxin Präparat). Affinität für cholinerge, histaminerge und adrenerge Rezeptoren wurde nicht beziehungsweise in vernachlässigbarer Größenordnung festgestellt, wodurch ein günstigeres Nebenwirkungsprofil zu verzeichnen ist als bei nicht-selektiven Substanzen (Muth et al., 1986).

Im Tierexperiment zeigte Venlafaxin in den entsprechenden Paradigmen eine Wirkung wie man sie von einem Antidepressivum erwartet (Dhir und Kulkarni, 2007; Dhir und Kulkarni, 2008; Ide et al., 2010). Venlafaxin-Applikation über einen Zeitraum von 14 Tagen ließ im cerebralen Kortex und im Hippokampus von Ratten keine Veränderung der Serotonin- und Noradrenalin-Transporter-Dichte erkennen, wobei allerdings im Forced-Swim-Test (FST) ein antidepressivum-ähnlicher Effekt zu beobachten war (Zhao et al., 2009). Eine Venlafaxin-Gabe über den Zeitraum von 21 Tagen an Ratten in einer Untersuchung mittels Autoradiographie ließ im Zingulum sowie in agranulärem und perirhinalem Kortex auf eine signifikant geringere Serotonin-Transporter-Dichte schließen als nach Desipramin- und Trimipramin-Behandlung, wobei in Hirnstamm und Hippokampus keine Veränderungen gefunden wurden (Hébert et al., 2001). Dieselbe Studie fand in mehreren untersuchten Regionen nach Venlafaxin-Applikation im Vergleich zu Fluoxetin- und Trimipramin-Gabe eine signifikant reduzierte Noradrenalin-Transporter-Dichte, allerdings unter anderem nicht im *Locus coeruleus*.

Die pharmakologische Aktivität von Venlafaxin im Menschen wurde bezüglich Serotonin mittels Analyse der Serotonin-Konzentration in Thrombozyten von Probanden, die über einen Zeitraum von einer Woche Venlafaxin beziehungsweise Plazebo erhalten hatten untersucht. Sowohl nach 150 als auch 300 mg Venlafaxin pro Tag zeigten sich im Vergleich zu Plazebo hochsignifikant geringere thrombozytäre Serotonin-Gehalte (Blier et al., 2007). Debonnel et al. (2007) fanden bereits bei einer Dosierung von täglich 75 mg nach sieben und 28 Tagen hochsignifikant geringere Serotonin-Gehalte in den Thrombozyten.

Mittels der Untersuchung der Auswirkung einer intravenösen (i.v.) Tyramin-Bolusapplikation auf den systolischen Blutdruck nach Venlafaxin-Gabe von 75 oder einschleichend 225 mg / d

über einen Zeitraum von einer Woche und von 75 oder einschleichend 375 mg / d über einen Zeitraum von drei Wochen wurde die Inhibition des Noradrenalin-Transportes durch die Substanz am Menschen untersucht ("Tyramine Pressor Response"; Ghose und Turner, 1975). Die 75 mg / d-Dosierungen zeigten keinen Einfluss auf den Tyramin-Effekt, wohingegen sowohl bei 225 als auch 375 mg / d nach einer beziehungsweise nach drei Wochen ein deutlich geringerer Blutdruckanstieg zu erkennen war (Debonnel et al., 2007).

Die Experimente der Arbeitsgruppen um Blier und Debonnel weisen deutlich auf eine dosisabhängige Inhibition des Serotonin- beziehungsweise des Noradrenalin-Transportes durch Venlafaxin hin. Bei Gabe niedriger Dosisierung hat Venlafaxin den Effekt eines sSRI, in höheren Dosierungen entfaltet sich der sSNRI-Effekt. Venlafaxin kann somit als sSNRI mit dosisabhängiger Wirkung bezeichnet werden. Als letztlich entscheidend für einen pharmakologischen Effekt muss jedoch die Konzentration einer Wirksubstanz an ihrem Wirkort angesehen werden.

Auch besitzt Venlafaxin weitere, möglicherweise für den Therapie-Effekt relevante Wirkmechanismen.

5.1.2. Andere Wirkmechanismen von Venlafaxin

Venlafaxin inhibierte *in vitro* die durch Korticosteroide induzierte Transkription (Augustyn et al., 2005). In einem Akut-Stress-Paradigma zeigte sich im paraventriculären Nucleus von Ratten, die für 27 Tage mit Venlafaxin vorbehandelt worden waren, ein signifikant geringerer Anstieg der für CRF kodierenden mRNA als bei mit Vehikel vorbehandelten Tieren (Stout et al., 2002). Mit diesen Effekten könnte eine Normalisierung der HPA-Funktion assoziiert sein.

Venlafaxin führte *in vitro* in PC12-Zellen zu einem dosisabhängigen Anstieg der mRNA-Menge des Enzyms Superoxid-Dismutase 1 (SOD1), welches dem Abbau oxidativen Stresses dient und damit neuroprotektive Eigenschaft besitzt (Greenlund et al., 1995; Li et al., 2000). Die Reduktion oxidativen Stresses erhöht die Wahrscheinlichkeit geringerer Zell- und insbesondere Neuronschädigung sowie für eine Reduktion apoptotischer Vorgänge sowohl bezüglich vorhandener als auch neugebildeter Strukturen.

Venlafaxin zeigte antiinflammatorische Eigenschaften durch Suppression der Transkription diverser Cytokine (Interleukin 12 p40, TNF- α , Interferon- γ) *in vitro* und im Mausmodell der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (Vollmar et al., 2009).

Venlafaxin und andere Antidepressiva führten bei erfolgreicher Behandlung zu einer Erhöhung der Plasma-Level des Neurotrophins „Brain-derived neurotrophic Factor“ (BDNF) auf das

Niveau der Kontrollpersonen (Aydemir et al., 2005; Gonul et al., 2005; Aydemir et al., 2006; Yoshimura et al., 2007; Lee und Kim, 2008). Auch fanden sich in humanem hippocampalem *post mortem* Gewebe bei antidepressiv behandelten Individuen höhere BDNF-Gehalte als in nicht antidepressiv Behandelten (Chen et al., 2001). Analoge Befunde stammen aus Tiermodellen der Depression (Czubak et al., 2009; Larsen et al., 2010; Zhang et al., 2010) und *in vitro* Untersuchungen (Lee et al., 2010; Angelucci et al., 2011). Von erhöhten BDNF-Gehalten kann wiederum auf eine für einen antidepressiven Effekt notwendige Neurogenese geschlossen werden.

Eine Microarray-Untersuchung auf differentielle Genexpression in humanen Leukozyten vor und nach vierwöchiger Venlafaxin-Applikation ließ signifikante Unterschiede bei Genen erkennen, die mit Signaltransduktion, Regulation der PBS und metabolischen Funktionen assoziiert sind (Kálmán et al., 2005). In diese Studie waren sechs Personen fortgeschrittenen Alters eingeschlossen.

Unklar ist, ob und wenn ja, welche dieser zusätzlichen Wirkmechanismen für den therapeutischen Effekt von Venlafaxin relevant sind.

5.2. Pharmakokinetik

Chemisch betrachtet handelt es sich bei Venlafaxin um das Phenylethylamin-Derivat (RS)-1-[2-Dimethylamino-1-(4-methoxyphenyl) ethyl] cyclo-hexan-1-ol mit der Summenformel $C_{17}H_{27}NO_2$ und einem Molekulargewicht von $M = 277,86 \text{ g/mol}$ (Haskins et al., 1985; siehe auch Abbildung 1). Die Verbindung liegt in pharmazeutischen Produkten als Hydrochlorid des Racemats vor und wird heute meist als retard Präparat (Extended Release, XR) gegeben. Initiale Dosierungen liegen bei 37,5 - 75 mg / d, die empfohlene tägliche Maximaldosis beträgt 450 mg. Nach Applikation *per os* (p.o.) wird Venlafaxin im gastro-intestinalen Trakt zu 92 - 98 % resorbiert (relative Bioverfügbarkeit, F_{rel}). Die absolute Bioverfügbarkeit (F_{abs}) nach p.o. Gabe beträgt 45 - 59 % bei einer Plasmaprotein-Bindung von 27 %, das Verteilungsvolumen $7,5 \pm 3,7 \text{ l/kg}$ und die Plasma Clearance $1,3 \pm 0,6 \text{ l/h/kg}$ (Troy et al., 1997; Katzman und Jacobs, 2007).

Venlafaxin unterliegt einem ausgeprägten *first pass*-Metabolismus. Das hepatische Cytochrom P450 Isoenzym 2D6 (CYP2D6) katabolisiert Venlafaxin durch Abspaltung der Methylgruppe (-CH₃) des Sauerstoffes zu dessen Hauptmetabolit O-Desmethylvenlafaxin (ODV). Weiterer primärer Metabolit ist das durch CYP3A4 gebildete N-Desmethylvenlafaxin (NDV). ODV und NDV können durch CYP3A4 beziehungsweise CYP2D6 jeweils in einem

zweiten Demethylierungsschritt zu N,O-Didesmethylvenlafaxin (DDV) metabolisiert werden (Fogelman et al., 1999; Wijnen et al., 2009; siehe auch Abbildung 1). Venlafaxin wird zu 58 % in O-Desmethylvenlafaxin, zu 1 % in N-Desmethylvenlafaxin und zu 18 % in N,O-Didesmethylvenlafaxin metabolisiert, was sich im renalen Ausscheidungsprofil widerspiegelt. Beim Menschen werden innerhalb von 48 Stunden 87 % einer Dosis renal und 10 % mit den Fäzes ausgeschieden (Howell et al., 1993). N-Desmethylvenlafaxin und N,O-Didesmethylvenlafaxin besitzen keine, beziehungsweise auch aufgrund ihres mengenmäßigen Anteils vernachlässigbare pharmakologische Aktivität, wohingegen O-Desmethylvenlafaxin nahezu mit der Muttersubstanz Venlafaxin identische Eigenschaften zeigt (Klamerus et al., 1992). Der Metabolismus von Venlafaxin ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die Plasmahalbwertszeit von Venlafaxin beträgt fünf Stunden, jene von O-Desmethylvenlafaxin 11 Stunden. Nach Applikation wird die Spitzenkonzentration von Venlafaxin im Blut innerhalb von 2,4 Stunden, jene von O-Desmethylvenlafaxin innerhalb von 4,3 Stunden erreicht (Mendlewicz, 1995).

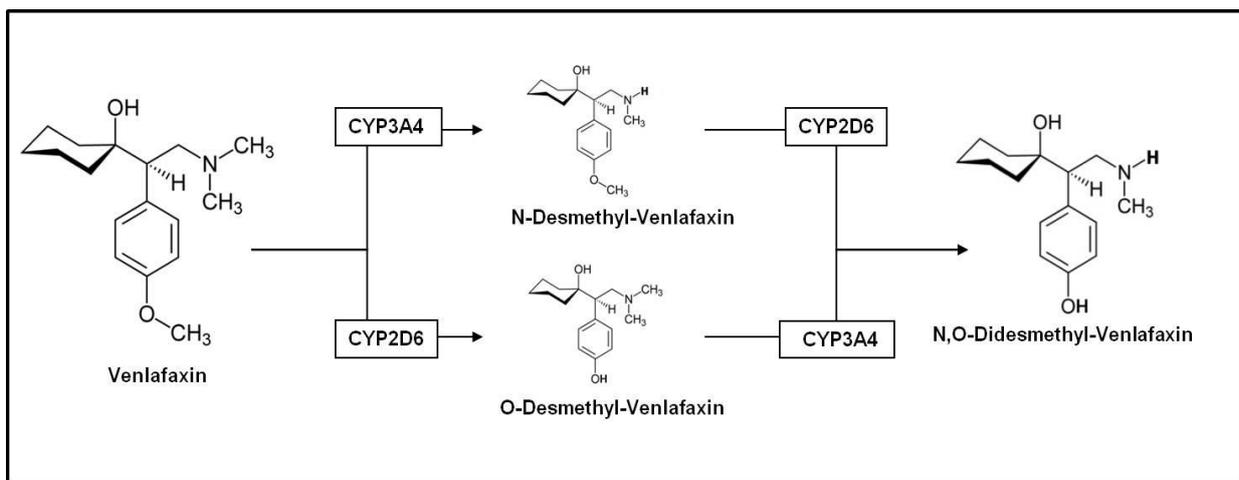


Abbildung 1: schematische Darstellung von Venlafaxin und durch CYP450-Isoenzyme gebildete Metaboliten (nach: Wijnen et al., 2009; Strukturformeln mittels ChemSketch Freeware, Version 12, ACD Labs, Frankfurt, Deutschland und MS Paint)

5.3. Pharmakogenetik

Pharmakogenetische Variationen mit Einfluss auf Enzymaktivitäten, können bei verschiedenen Individuen unter identischer Dosierung zu deutlich unterschiedlichen Konzentrationen an aktiver Substanz führen. CYP2D6, das vermutlich am intensivsten untersuchte CYP-Isoenzym, ist neben der Metabolisierung von Venlafaxin beteiligt an der Umsetzung von zahlreichen weiteren Xenobiotika, einschließlich diverser Psychopharmaka (Hicks et al., 2013). Die

wildtypische Variante von *CYP2D6* besteht in zwei aktiven Allelen, Träger dieser Variante werden als "schnelle Metabolisierer" bezeichnet. Durch Duplikation kann *CYP2D6* in drei oder mehr Kopien im Genom vorliegen wodurch die Enzym-Quantität erhöht und der Metabolismus beschleunigt wird ("ultraschnelle Metabolisierer"). Es besteht hierbei die Gefahr, dass die Konzentration antidepressiv aktiver Substanz unter die therapeutische Effektivität fällt oder dort verweilt und ein therapeutischer Effekt nicht eintritt (Veeffkind et al., 2000). "Intermediäre" und "langsame Metabolisierer" sind Träger nur eines oder keines *CYP2D6*-Allels oder besitzen aufgrund mutierter Allele Enzyme mit geringerer oder fehlender Aktivität (Zhou, 2009). Hierbei besteht aus therapeutischer Sicht die Gefahr, dass bei üblichen regelmäßigen Applikationsintervallen eine Akkumulation von Wirkstoff stattfindet und Konzentrationen oberhalb des therapeutischen Fensters beziehungsweise in einem toxischen Bereich resultieren (Lessard et al., 1999). Alternativ kann die Metabolisierung zu inaktiven Substanzen erhöht sein (Hermann et al., 2008).

Bei polypharmazeutischen Therapie-Ansätzen besteht durch Interaktionen der Substanzen die Gefahr einer Phänokonversion von Metabolisiererstatus. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass unter erwachsenen, mit Venlafaxin therapierten Patienten 4 % die genetische Basis des langsamen Metabolisierers trugen, allerdings bei 27 % eine langsame Metabolisierung zu beobachten war (Preskorn et al., 2013).

Beim Therapeutischen Drug Monitoring (TDM; "Medikamentenspiegelbestimmung") wird mittels quantifizierender Analyse-Methoden die Serumkonzentration von pharmakologisch aktiven Substanzen bestimmt und auf diesem Weg die durch mögliche pharmakokinetische Variation unsichere Einschätzung eines zu erwartenden Effektes über die applizierte Dosis teilweise umgangen. Die Verwendung von Serumkonzentrationen ermöglicht die Einschätzung des zu erwartenden Effektes von einer Position aus, welche sich einen Schritt näher am Zielorgan der Psychopharmaka, dem Gehirn, befindet. Auch dieser Ansatz hat allerdings Grenzen. Venlafaxin führte in einem *in vitro*-Modell der humanen Blut-Hirn-Schranke (BHS; "Blood-Brain-Barrier", BBB) zu signifikanter Induktion von Efflux-Transport-Proteinkomplexen (Bachmeier et al., 2011). Dies konnte auch im Mausmodell *in vivo* für verschiedene Gewebe nachgewiesen werden (Bachmeier et al., 2013). Venlafaxin zeigte dabei *in vitro* ein geringes Inhibitions-Potential am Effluxtransporter P-Glykoprotein (P-gp; auch bezeichnet als MDR1, "Multi-Drug-Resistance-Protein 1"; Weiss et al., 2003).

Auf Basis klinischer Daten wurden durch die Arbeitsgruppe für Therapeutisches Drug Monitoring der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP-TDM-Gruppe) empirisch Serumkonzentrationen für zahlreiche Psychopharmaka

bestimmt, welche als empfohlene Konzentrationsbereiche bei Freiheit von unerwünschten Nebenwirkungen den angestrebten Therapie-Effekt erwarten lassen (Baumann et al., 2004). Da der Hauptmetabolit O-Desmethylvenlafaxin ein mit der Muttersubstanz Venlafaxin identisches pharmakodynamisches Profil an den primären Zielstrukturen aufweist, werden die Serumkonzentrationen dieser beiden Substanzen zu einem Summenserumspiegel addiert. Er liegt für Venlafaxin zwischen 100 und 400 ng / ml Serum (Hiemke et al., 2011).

Eine Therapiesteuerung unter Verwendung von TDM lässt ökonomische Vorteile erkennen da zum einen minimal notwendige Dosierungen der Psychotropika zur Erreichung (hochwahrscheinlich) effektiver Serumkonzentrationen eingesetzt werden können und weiterhin der Bedarf einer sekundären Therapie von unerwünschten Nebenwirkungen schwindet (Preskorn und Fast, 1991; Lundmark et al., 2000). Patienten können deutlich früher aus stationärer Behandlung entlassen werden (Simmons et al., 1985).

Die Effektivität einer pharmakologisch-antidepressiven Therapie in Zusammenhang mit dem *SLC6A4*-Genotyp für *5-HTTLPR*, teilweise unter Einbeziehung von rs25531, wurde in zahlreichen Studien untersucht. Allerdings kam Venlafaxin nur in einzelnen dieser Studien zum Einsatz. In einem koreanischen Kollektiv von Patienten mit depressiver Störung zeigten l-Allel-Träger nach vierwöchiger Venlafaxin-Einnahme im Vergleich zu homozygoten s-Allel-Trägern eine bessere therapeutische Antwort (Lee et al., 2010).

In anderen Studien wurden verschiedene sSRIs (Citalopram, Fluoxetin, Fluvoxamin, Paroxetin, Sertralin) verwendet und die Resultate assoziierten häufig l- beziehungsweise l_A-Allel-Träger mit einem besseren therapeutischen Ansprechen auf die Medikation (Pollock et al., 2000; Zanardi et al., 2001; Illi et al., 2010). Eine Studie ergab, dass bei homozygoten s-Allel-Trägern mit einem Alter über 25 Jahren eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein Nicht-Ansprechen besteht (Joyce et al., 2003). Zwei Untersuchungen fanden für homozygote l-Allel-Träger eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für eine Remission in Pharmakotherapie mit Citalopram, nach Einschluss des rs25531 war die Assoziation allerdings nicht mehr zu erkennen (Huezo-Diaz, 2009; Mrazek et al., 2009).

Für den Noradrenalin-Transporter und *SLC6A2*-Varianten liegen bezüglich eines Therapie-Effektes von Venlafaxin keine Informationen vor. Ein *SLC6A2*-Polymorphismus wurde mit einer erhöhten Suszeptibilität für die Aufmerksamkeits-Defizit / Hyperaktivitäts-Störung (ADHS) assoziiert und scheint auch bei deren Pharmakotherapie mit dem Dopamin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitor Methylphenidat einen Einfluss auf den therapeu-

tischen Effekt zu besitzen (Joung et al., 2010; Kim et al., 2010). Dieser Polymorphismus, rs28386840, besteht in einem Basenaustausch (Adenin, "A" gegen Thymin, "T") in der *SLC6A2*-Promotor-Region. Die Expression des Noradrenalin-Transporters ist *in vitro* bei Vorliegen eines T-Allels um etwa 50 % gegenüber homozygoten A-Genotypen reduziert (Kim et al., 2006) und Träger des T-Allels zeigten eine bessere therapeutische Antwort auf Methylphenidat (Kim et al., 2010). Eine Assoziation von rs28386840 mit anderen psychiatrischen, insbesondere affektiven Erkrankungen oder einem Einfluss auf den therapeutischen Effekt wurde nicht nachgewiesen (Hahn et al., 2008). Auch die Assoziation mit ADHS wurde mehrfach nicht repliziert (Renner et al., 2011; Sengupta et al., 2012).

In den hier angeführten Studien zu Assoziationen von *SLC6A2*- sowie *SLC6A4*-Varianten mit einem therapeutischen Effekt antidepressiver Medikation waren stets die applizierten Dosierungen zugrunde gelegt worden, sodass letztlich unklar ist, ob nicht variierende Serumkonzentrationen die Ergebnisse verfälschten.

6. Ziele der vorliegenden Arbeit

6.1. Ziel 1: Identifizierung potentieller genetischer Korrelate des antidepressiven Effektes von Venlafaxin

Wie ersichtlich wurden zahlreiche potentielle Mechanismen der Wirksamkeit von Venlafaxin identifiziert. Die angeführten Studien untersuchten meist einzelne *a priori* definierte Merkmale, deren Einfluss beziehungsweise Beeinflussung anhand vorangegangener Erkenntnisse vermutet wurde. So ergeben sich Anhaltspunkte für durch Venlafaxin induzierte physiologische Veränderungen, die an der antidepressiven Wirkung beteiligt sind. Der beim Menschen beobachtete "dosisabhängige" duale serotonerg-noradrenerge Mechanismus der Substanz muss als von besonderem Interesse angesehen werden, da physiologische Effekte unter lediglich serotonerger Aktivität sich von serotonerg-noradrenerger Aktivität unterscheiden sollten, beziehungsweise im zweiten Fall zusätzliche Faktoren als beeinflusst beziehungsweise von Einfluss angenommen werden können. Die Kenntnis induzierter, sekundärer physiologischer Veränderung als Grundlage therapeutischer Effektivität könnte eine zukünftige, gezieltere Intervention durch neue Pharmazeutika ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher im Sinne der Grundlagenforschung und im Hinblick auf die Identifizierung neuer Angriffspunkte pharmakologischer Intervention die Auswirkung chronischer Venlafaxin-Applikation in verschiedenen Dosierungen auf die Genexpression untersucht.

Dazu wurden zwei ineinander übergehende Ansätze herangezogen. Zunächst wurden im Tierexperiment über einen Zeitraum von einem Monat verschiedene Venlafaxin-Dosen an Mäuse verabreicht und deren Hippokampus hypothesenfrei mittels Microarray auf Effekte bezüglich Genexpressionsraten analysiert.

Im zweiten Schritt wurde die Expression der in der Tierstudie als differentiell exprimiert identifizierten Gene in Leukozyten von Patienten nach einmonatiger Venlafaxin-Einnahme analysiert. Expressionsänderungen in Leukozyten können Hinweise auf Vorgänge im menschlichen Gehirn geben (Sullivan et al., 2006; van Heerden et al., 2009; Bosker et al., 2012). Auf Basis dieses Wissens könnte eine gezieltere pharmakologische Einflussnahme unter Umgehung des monoaminergen Systems entwickelt werden.

6.2. Ziel 2: personalisierte Pharmakotherapie mit Venlafaxin

In zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit funktionale genetische Variationen von *SLC6A2* und *SLC6A4* im Zusammenspiel mit vorliegenden Serumsummenkonzentrationen von Venlafaxin und seinem Hauptmetabolit O-Desmethylvenlafaxin den erwünschten Effekt einer Pharmakotherapie vorhersagen lassen. Mit Kenntnis dieser Zusammenhänge wäre ein höherer Grad an individuell zugeschnittener Behandlung möglich. Es bestünde die Möglichkeit, Patienten bei vorliegender Information zu ihrem Genotyp von *5-HTTLPR* und / oder rs28386840 initial gezielter und schneller auf einen benötigten Serumspiegel hin zu dosieren, wobei eine Überwachung der Serumkonzentration mittels TDM die Titration in den angestrebten Bereich unterstützen und helfen kann, unerwünschte Effekte zu vermeiden beziehungsweise gegebenenfalls Venlafaxin als deren Ursache zu determinieren. Mit diesem Ziel wurden in einem naturalistischen Studien-Design klinische Patienten während einer depressiven Episode aufgrund einer unipolaren depressiven Störung oder im Rahmen einer bipolaren affektiven Erkrankung genotypisiert, ihre symptomatische Veränderung nach einer vierwöchigen Therapiedauer evaluiert und bezüglich eines Zusammenhanges mit den Serumkonzentrationen an Pharmakon analysiert.

II. Material & Methoden

1. Material

allgemeines Ge- und Verbrauchsmaterial, allgemeine Geräte

- sterilisiertes, demineralisiertes Wasser (H₂O dd), Eigenherstellung mittels Barnstead NANOpure[®] Diamond[™] Life Science (UV/UF)-Reinstwasseranlage (Thermo Fisher Scientific, 419 Sutton Road, Southend On Sea, Essex SS2 5PH, United Kingdom)
- Methanol (MeOH; CH₄O) puriss p.a., Acetonitril (ACN; C₂H₃N) puriss p.a., Isopropanol (C₃H₈O) puriss p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Kolbenhubpipetten verschiedener, bedarfsgemäß maximaler Volumina (1 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Mehrkanalpipetten verschiedener, bedarfsgemäß maximaler Volumina (10 µl, 20 µl, 100 µl; PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland und Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- unsterile Pipettenspitzen diverser Maximalvolumina (10 µl, 100 µl, 1000 µl; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- sterile, RNase- und DNase-freie Pipettenspitzen diverser Volumina (0,1 - 10 µl, 0,5 - 20 µl, 2 - 100 µl, 2 - 200 µl, 20 - 300 µl, 100 - 1200 µl; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- unsterile Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- sterile, RNase- und DNase-freie Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml; "Safe-Lock Tubes, Eppendorf BioPur"; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- sterile, RNase- und DNase-freie Reaktionsgefäße für PCR-Ansätze in 4er- und 8er-Ketten ("Multiply[®]-PCR-Ketten"; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- sterile, RNase- und DNase-freie Zentrifugen-Gefäße (15 ml und 50 ml; "Cellstar Tubes[®]", Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Autoklav "VB-40" (Systec GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- elektronische Analysen- und Präzisionswaage "PB4002-S/FACT" (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Schweiz)
- Feinwaage "HL52" (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland)
- pH-Meter "SevenEasy[™] pH Meter" (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz)
- Ultraschallbad "Sonorex Super, RK 103H" (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland)
- diverse Zentrifugen

Tierstudie - Experiment, Dissektion & HPLC-Analysen

- DBA/2 Mäuse, Alter 6 - 8 Wochen; 30/31 x männlich (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland)
- Venlafaxin-Tabletten 37,5 mg ("Venlafaxin-1 A Pharma[®] 37,5 mg Tabletten", Packung à 20 Tabletten (N1), vorliegend als Venlafaxin-Hydrochlorid - entsprechend 37,5 mg Venlafaxin pro Tablette (1 A Pharma GmbH, Oberhaching, Deutschland)
- Isofluran (C₃H₂ClF₅O; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland)
- Binokular "Olympus SZX7" (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)
- Kaltlichtquelle "KL 1500 LCD" (Schott AG, Mainz, Deutschland)
- Kälteplatte mit Temperierungs-Einheit (Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Reinsubstanzen Venlafaxin (VEN; C₁₇H₂₇NO₂, vorliegend als Hydrochlorid) und O-Desmethylvenlafaxin (ODV; C₁₆H₂₅NO₂), Reinheit HPLC-Grad (Wyeth Reference Standards, New York, U.S.A.)
- Reinsubstanzen Noradrenalin (NA; C₈H₁₁NO₃, vorliegend als Hydrochlorid), 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG; C₉H₁₂O₄, vorliegend als Hemipiperazinium-Salz), Dopamin (DA; C₈H₁₁NO₂, vorliegend als Hydrochlorid), 3,4-Dihydroxyphenylacetat (DOPAC; C₈H₈O₄), Homovanillinsäure (HVA; C₉H₁₀O₄), Serotonin / 5-Hydroxytryptamin (5-HT; C₁₀H₁₂N₂O, vorliegend als Hydrochlorid), 5-Hydroxyindolacetat (5-HIAA; C₁₀H₉NO₃) - Reinheit aller Substanzen "HPLC-Grad" (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

HPLC - mobile Phase für Monoamin-Analyse: 0,50 mM TEA
0,10 mM EDTA
0,10 M NaH₂PO₄
0,65 mM Oss } 10 % MeOH, 90 % H₂O dd
pH 4,1

HPLC - stationäre Phase für Monoamin-Analyse:

EC 250/4.6 NUCLEOSIL[®]100-5 C18 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

HPLC - mobile Phase für VEN- und ODV-Analyse: 15,00 % v/v ACN
0,09 % v/v TEA pH 2,5
ad 100,00 % v/v mit H₂O dd

HPLC - stationäre Phase für VEN- und ODV-Analyse:

EC 150/4.6 NUCLEODUR[®]100-3 CN-RP (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

HPLC-Analysen (Humanstudie)

HPLC - Spüeluent für VEN- und ODV-Analyse: 5 % v/v ACN
95 % v/v H₂O dd

HPLC - analytischer Eluent für VEN- und ODV-Analyse:

wie mobile Phase für Tierstudie (Seite 23)

HPLC - stationäre Phase / Extraktionssäule für VEN- und ODV-Analyse:

MZ-PerfectBond[®] 10-4.0, CN 20µm (MZ Analysetechnik, Mainz, Deutschland)

HPLC - stationäre Phase / analytische Säule für VEN- und ODV-Analyse:

wie bei Tierstudie (Seite 23)

RNA-Extraktion aus murinen Hippokampi

- peqGOLD RNAPure[™] (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Deutschland)
- Kugelmühle "TissueLyser" & Kugeln (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- Chloroform puriss p.a. (HCCl₃; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- "MaxTract[™] High Density 200 x 1,5 ml" (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- "Ethanol absolut für die Molekularbiologie" (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- "RNeasy Mini Kit (250)" (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- "RNAse free DNase Set (50)" (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

RNA-Extraktion aus humanem Blut

- "PAXgene[®] Blood RNA Kit" (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Schweiz)
- Schüttelinkubator "Thermomixer[®]comfort" (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Ethanol (C₂H₆O) "Ethanol absolute, ≥ 99.8 % (GC)" (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- "RNAse free DNase Set (50)" (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

qRT-PCR-Expressionsanalyse von DBA/2-Hippokampi und humanen Leukozyten

- "iScript™ cDNA Synthesis Kit" (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

- "iQ™ SYBR® Green Supermix" (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

- Primer

- designed mit NCBI-Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

hs_Tph1_Intron-System: f 5'-AAGGCCCAATTGAAATGTCGC-3'
r 5'-GTAAGTGGCCGAAAGGAGCA-3'

→ bezogen von metabion international AG, Martinsried, Deutschland

oder

- als "QuantiTect Primer Assay" bezogen von Qiagen (Hilden, Deutschland)

- Primereffizienz: Programm "LinRegPCR Version 11.1, Januar 2009"

- 384-Well-qRT-PCR-Platte "4titude Framestar® 480/384" (4titude Ltd., Berlin, Deutschland)

- DEPC-H₂O, MgCl₂-Lösung, Desoxynukleotid-Gemisch, *Taq*-Polymerase, Thermocycler, Gel-Elektrophorese: siehe unten "Genotypisierung (Humanstudie)"

qRT-PCR

- "C1000™ Thermal Cycler" mit "CFX384™ Real-Time System" und "CFX Manager™ Software" (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

- "SYBR® Select Master Mix for CFX" (applied biosystems, Texas, USA)

- 384-Well-qRT-PCR-Platte "4titude Framestar® 480/384" (4titude Ltd., Berlin, Deutschland)

- Referenzgen-Wahl: Programm "qbasePLUS Version 2.4, 20120828-0902" (Biogazelle NV, Zwijnaarde, Belgium)

- automatisches Pipettiersystem "epMotion 5075 TMX" und zugehörige 50 µl-Spitzen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

DNA-Extraktion aus humanem Blut

Lysispuffer: 15,50 % v/v 1 M NH₄Cl (aq)
1,00 % v/v 1 M KHCO₃ (aq)
0,02 % v/v 0,5 M EDTA (aq)
ad 100,00 % v/v mit H₂O dd

SE-Puffer: 75 mM NaCl (aq)
25 mM EDTA (aq; aus 0,5 M Lösung)

Lysis-Puffer und SE-Puffer werden nach dem Ansetzen autoklaviert

- Proteasen-Gemisch ("Pronase E"; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Protease-Lösung: 20 mg Pronase E + 1 ml Wasser (LiChrosolv[®], Merck, Darmstadt, Deutschland)

- Matrix-Röhrchen ("Matrix[™] 2D Barcoded Storage Tubes"; Thermo Scientific, St- Leon-Rot, Deutschland)

Genotypisierung (Humanstudie)

- 96-Well Platte "twin.tec PCR Plate 96 semi-skirted" (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

- Trishydroxymethyl-Aminomethan-Base (s) / TRIS-Base "Tris ultrapure" (C₄H₁₁NO₃; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

"DEPC-Wasser": - 0,05 % DEPC in H₂O dd, über Nacht bei 37 °C schütteln
(Schüttelwasserbad - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
- autoklavieren (degradiert auch DEPC)

- Primer für 5-*HTTLPR*-PCR: f 5'-TGCCGCTCTGAATGCCAGCAC-3'
r 5'-GGGATTCTGGTGCCACCTAGACG-3'
(Eigendesign; Metabion international AG, Martinsried, Deutschland)

- Primer für rs28386840-PCR: f 5'-CTCTAGTTTTCTTGCCCCCTCAAG-3'
r 5'-GAGACAGCAAAGGGAAGGAAACCA-3'
(Eigendesign; Metabion international AG, Martinsried, Deutschland)

- Polyoxyethylenesorbitan-Monolaurate "Tween[®]20" (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

PCR-Puffer "Goldstar 10x": 200 mM (NH₄)₂SO₄
750 mM TRIS-HCl (pH 9) } in H₂O dd
0,1 % Tween[®]20

- Bovines Serumalbumin (BSA) ("BSA 100 x purified"; New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland)

MgCl₂-Puffer (25 mM): 500 mM KCl
100 mM TRIS-HCl (pH 8,3)
0,25 % Tween[®]20
0,25 mg/ml BSA
25 mM MgCl₂ } in H₂O dd

- Desoxy-Adenin-Triphosphat (dATP), Desoxy-Cytosin-Triphosphat (dCTP), Desoxy-Guanosin-Triphosphat (dGTP), Desoxy-Thymin-Triphosphat (dTTP), je 40 µmol als Natrium-Salz, je 100 mM (U1240; Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)

Nukleotid-Gemisch (je 2,5 mM): Komposition entsprechender Volumina der dATP-, dCTP-, dGTP- und dTTP-Stocklösung in H₂O dd (LiChrosolv[®])

- *Taq*-Polymerase (DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus*, "Haus *Taq*"); laborinterne Eigenherstellung nach Desai und Pfaffle (1995)

TAE-Puffer (Konzentrat 25 x): 121,0 g Tris-Base (s)
28,5 ml Eisessig/"Acetat" (l)
50,0 ml EDTA-Lösung } + H₂O dd ad 1000 ml

Konzentrat wird vor Gebrauch mit H₂O dd 1 : 25 (1 + 24) verdünnt

Gel: - für x-%iges Gel x g Agarose einwiegen + 100 ml TAE-Puffer
- in Mikrowellenherd bis zur vollständigen Transparenz erhitzen
- pro 100 ml Agarose-Lösung 3 Tropfen Ethidiumbromid-Lösung (0,07 %) zugeben
- in Gelkammer mit Kamm gewünschter Zahnzahl giessen und aushärten lassen
- bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahren

- 3,3',5,5'-Tetrabrom-Phenolsulfonphthalein ("Bromphenolblau", C₁₉H₁₀Br₄O₅S; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

- 1,2,3-Propantriol ("Glycerol", C₃H₈O₃; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Blaupuffer: 10 ml H₂O dd
1 ml Glycerol
"eine Spatelspitze" Bromphenolblau

- Puffer für rs25531-Genotypisierung "NEBuffer 4, #B7004S, 10 x Concentrate" *

- Restriktionsenzym für rs25531-Genotypisierung "MspI, #R0106L, 20.000 U/ml" *

- Puffer für rs28386840-Genotypisierung "NEBuffer 3, #B7003S, 10 x Concentrate" *

- Restriktionsenzym für rs28386840-Genotypisierung "BsrI, # R0527L, 5000 U/ml" *

* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland)

2. Methoden

2.1. Tierstudie

2.1.1. Wahl der Versuchstiere

Ziel der Tierstudie war es im Hippokampus Gene zu identifizieren, bei denen unter dem Einfluss verschiedener Dosierungen von Venlafaxin eine differentielle Expression zu beobachten ist. Aufgrund von gegebener Infrastruktur sowie im Hinblick auf ökonomische Aspekte wurde die Maus als Versuchstier gewählt. Voraussetzung des zu verwendenden Stammes war eine Sensitivität des serotonergen sowie noradrenergen Systems der Tiere für die eingesetzte Substanz. Mittels Literaturrecherche wurde der Inzucht-Mausstamm "Dilute Brown Non-Agouti" (DBA/2) identifiziert, für den nachgewiesen worden war, dass beim Menschen eingesetzte, antidepressiv wirksame Substanzen (trizyklische Serotonin- / Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitoren, TCA-SNRI; selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren, sSRI; selektive Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitoren, sNRI) in Standardverhaltenstests einen antidepressivum-ähnlichen Effekt auf das Verhalten der Tiere haben (Lucki et al., 2001; Ripoll et al., 2003; Sugimoto et al., 2008). Venlafaxin selbst war in DBA/2-Mäusen bisher nicht untersucht worden.

2.1.2. Findung der zu applizierenden Venlafaxin-Dosis

Zur Dosisfindung wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, in die Veröffentlichungen einbezogen wurden, in denen Mäuse verschiedener Stämme das Antidepressivum Venlafaxin durch p.o.-Applikation erhalten hatten. Es sollten hinsichtlich der jeweiligen Studienziele effektive verwendete Dosierungen identifiziert werden, um anhand dieser die im hier geplanten Experiment anzuwendenden Applikationsmengen zu definieren. Die Literaturrecherche offenbarte eine hohe Diversität der eingesetzten Venlafaxin-Dosen. Auch eröffneten sich die Fragen, inwieweit akute und chronische Gabe hinsichtlich der verwendeten Dosen zu bewerten sind und ob die Verwendung verschiedener Mausstämmen in den verschiedenen Untersuchungen als vernachlässigbar betrachtet werden darf. Bei der hier beabsichtigten chronischen Gabe über einen Zeitraum von 30 Tagen wird analog der Situation im Menschen die Einstellung eines dynamischen Gleichgewichtes (*steady state* des Venlafaxin-Spiegels in Blut und ZNS) angestrebt. Anhand der Literaturrecherche ließ sich

bezüglich der zu applizierenden Dosierungen keine abschließende Instruktion ableiten. Die in die Recherche einbezogenen Publikationen und die hier relevanten Informationen sind in Tabelle 1 einzusehen. Die eingesetzten Dosierungen bewegten sich zwischen 6 und 120 mg / kg, appliziert akut oder chronisch, p.o. oder intragastral (i.g.). Die höchste chronische Dosis wurde von Howell et al. (1993) männlichen CD Albino-Mäusen über einen Zeitraum von 14 Tagen mit einer i.g. Dosis von 120 mg / kg / d verabreicht. Allerdings wurden in diesem Fall keine Verhaltensuntersuchungen durchgeführt. Aufgrund uneinheitlicher Information bezüglich zu verwendender Dosierungen und der bei Howell et al. offensichtlich ohne nachteilige Effekte chronisch eingesetzten Dosis von 120 mg / kg / d wurden die hier zu applizierenden Dosen unter Abdeckung der in der Literatur gefundenen Dosisbreite auf 30 mg / kg / d beziehungsweise 100 mg / kg / d festgelegt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten reines Trinkwasser.

Die bei einem beispielsweise 70 kg schweren Patienten verwendeten Dosierungen von 75 - 375 mg / d entsprechen einer Dosis von 1,1 - 5,4 mg / kg / d. Da der murine Metabolismus einen im Vergleich zum Menschen höheren Umsatz aufweist, wurden die Dosierungen im eher hohen getesteten Bereich als äquipotent eingeschätzt. Patat et al. (1998) geben die orale Bioverfügbarkeit von Venlafaxin im gesunden Probanden mit 40 - 45 % an, während Aryal et al. (2012) in männlichen CD1-Mäusen eine Bioverfügbarkeit von 11,6 % fanden. Die im Verhältnis höheren, täglichen Gaben bei den untersuchten Mäusen wurden auch unter diesem Aspekt als äquipotent bewertet.

Autor (Jahr)	verwendeter Mausstamm	eingesetzte Venlafaxin Dosis / Dosen	Applikationsweg	Applikationsdauer
Howell et al., (1993)	CD Albino (♂)	i) 10, 35 oder 120 mg / kg ii) 120 mg / kg	i.g.	i) akut ii) 14 d
Mirza et al., (2007)	NMRI (♀)	20 mg / kg	p.o.	28 d
Vollmar et al., (2009)	SJL/L (♀)	6, 20 oder 60 mg / kg	p.o., s.c.*	bis zu 80 d

Tabelle 1: Listung der für die Venlafaxin-Dosisfindung herangezogenen Veröffentlichungen; angeführt sind Erstautor und Erscheinungsjahr, verwendeter Mausstamm, applizierte Venlafaxin-Dosen in mg / kg, Applikationsweg (i.g. intragastral, p.o. peroral, s.c. subcutan) und Applikationsdauer;

* Applikation mittels osmotischer Miniaturpumpen

2.1.3. Venlafaxin-Gewinnung

Venlafaxin zur Gabe an die Versuchstiere wurde mittels Ultraschall-Homogenisierung aus Venlafaxin-Hydrochlorid-Tabletten der Firma 1A Pharma[®] gewonnen. Jede Tablette enthält 37,5 mg Venlafaxin. Die Tabletten werden zunächst im Mörser pulverisiert. Jeweils drei gemörsterte Tabletten werden in 15 ml-Sorvall-Zentrifugenröhrchen (Sorvall[®]Instruments, E.I. du Pont de Nemours & Co. (Inc.), Wilmington, Delaware, U.S.A.) mit 9 ml hochreinem Wasser (H₂O dd) überdeckt und die Suspension im Ultraschall-Homogenisator (Branson Digital Sonifier[®], G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd, Deutschland) für 1 min bei einer Amplitude von 30 % auf Eis behandelt. Anschließend wird die Suspension zentrifugiert (40700 g ± 4000 g, 4 °C, 20 min) und der Überstand in ein 50 ml-Zentrifugengefäß dekantiert. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C. Aus dem Verhältnis von Pharmakon pro Tablette und dem Aufnahmevolumen ergibt sich unter Annahme vollständiger Lösung im Extrakt eine Venlafaxin-Konzentration von 12,5 mg / ml. Diese Konzentration und damit die erfolgreiche Extraktion von Venlafaxin aus der Tablettenmatrix wird mittels HPLC-Analyse bestätigt. Die prinzipiellen Bedingungen der HPLC-Methodik sind in Tabelle 7 (Seite 45) aufgeführt, injiziert wird für diese Prüfung die Lösung von Venlafaxin in H₂O dd. Die für die Studie notwendige Stabilität von Venlafaxin in wässriger Lösung über mindestens eine Woche wurde durch weitere Konzentrationsanalysen über einen Zeitraum von drei Wochen untersucht. Eine 12,5 mg / ml-Lösung wurde dazu in einem Laborschrank bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt und durch künstliche Quellen einem Lichteinfluss ausgesetzt der den späteren Versuchsbedingungen entsprach. Die Vermessung von Aliquots der Lösung mittels HPLC im Zwei-Tages-Rhythmus bestätigte die Stabilität der Substanz, eine nicht-enzymatische Degradation fand unter den gegebenen Bedingungen nicht statt.

2.1.4. Venlafaxin-Gabe an die Versuchstiere

Die in der Studie verwendeten DBA/2-Mäuse männlichen Geschlechts wurden über Charles River Laboratories (Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) der Medizinischen Fakultät an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg in Einzelkäfigen unter Standardbedingungen (21 °C ± 1 °C, Luftfeuchtigkeit 50 - 55 %, 12 h Hell-Dunkel-Zyklus (Lichtphase 0700 - 1900)) gehalten. Die Zuteilung der Tiere in die einzelnen experimentellen Gruppen (Kontrolltiere - kein Venlafaxin, niedrige Dosis - 30 mg / kg / d, hohe Dosis - 100 mg / kg / d) erfolgte nach dem

Zufallsprinzip. Trockenfutter wurde *ad libitum* zur Verfügung gestellt. In einem Vorversuch wurde über den Zeitraum von einer Woche das Trinkverhalten der einzelnen Tiere durch tägliches Wiegen der Trinkflaschen beobachtet, um die durchschnittliche tägliche Trinkwasseraufnahme zu evaluieren. Diese Zeitspanne gewährleistete auch die Akklimatisierung der Tiere an die Umgebungsbedingungen. Für die Studie wurde das Trinkwasser der Tiere ausgehend von dem durchschnittlichen wöchentlichen Konsum mit entsprechenden Konzentrationen an Venlafaxin aus den Tablettenextrakten versetzt, um eine tägliche Aufnahme der angestrebten Menge an Pharmakon zu gewährleisten. Anhand von täglichem Wiegen der Trinkflaschen über die Dauer des Experimentes (2.5. - 1.6.2011) wurde das Konsumverhalten weiterhin beobachtet und die Venlafaxin-Konzentration bei Bedarf in wöchentlichem Rhythmus angepasst. Das experimentelle Design war von der Regierung von Unterfranken unter dem Aktenzeichen 55.2-2531.01-7/09 genehmigt worden. Am letzten Tag des Experimentes wurden die Tiere durch geschultes und autorisiertes Personal mit Isofluran narkotisiert und dekapitiert. Der Schädelknochen wurde entlang der Schädelnähte durchschnitten, die Gehirne als Ganzes entnommen, in vorbereitete Alufolie eingeschlagen und sofort in mit Trockeneis (CO₂ (s), -78,5 °C) gekühltes Isopropanol gegeben. Die Gehirne wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.5. Präparation der Hirnregionen von Interesse

Zur Sektion und Präparation der zu untersuchenden Gehirnregionen werden die vollständigen, gefrorenen Gehirne zunächst in einer Glaspetrishale auf einer Kälteplatte (-5 °C) leicht angetaut und anschließend mittels Skalpell durch mehrere parallele Schnitte auf koronarer Ebene unterteilt (siehe Abbildung 2).

Aus den leicht angetauten Gehirnscheiben werden mit Hilfe eines Binokulars unter Kaltlichtbeleuchtung die Regionen von Interesse beziehungsweise deren im jeweiligen Schnitt vorhandener Anteil in sagittaler Aufsicht mittels stumpfer Spatel abgelöst und sofort in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen auf Trockeneis wieder gefroren. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Regionen sind Hirnstamm, Cerebellum, Kortex und Hippokampus. Bilateral ausgebildete Regionen werden hemisphärengetrennt für die Untersuchung bereit gestellt. In Abbildung 3 sind die Schnittebenen 3 (rostraler Hippokampus-Anteil) und 5 (caudaler Hippokampus-Anteil) dargestellt und die zu präparierenden Anteile der Hippokampi sowie des Kortex markiert.

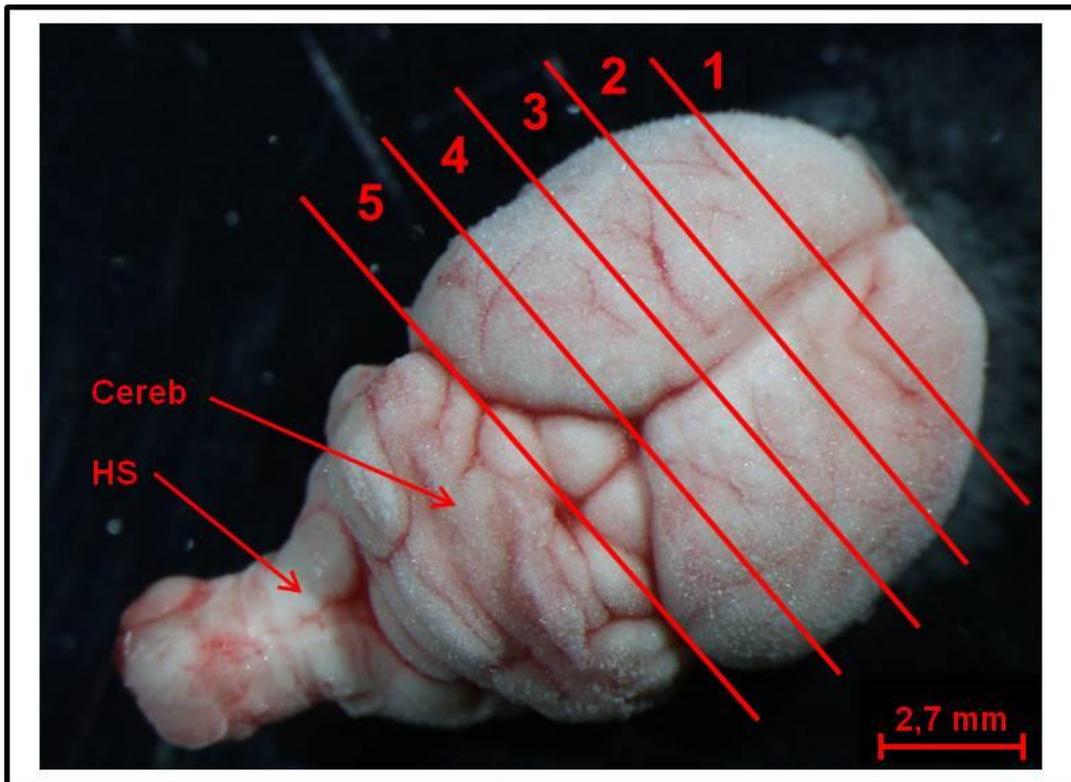


Abbildung 2: Vollständiges, gefrorenes Gehirn einer DBA/2-Maus auf Kälteplatte mit eingezeichneten Koronarschnittebenen 1 - 5; der caudale Teil des Hirnstammes (HS) und das aufsitzende Cerebellum (Cereb) sind links im Bild zu erkennen (eigene Aufnahme)

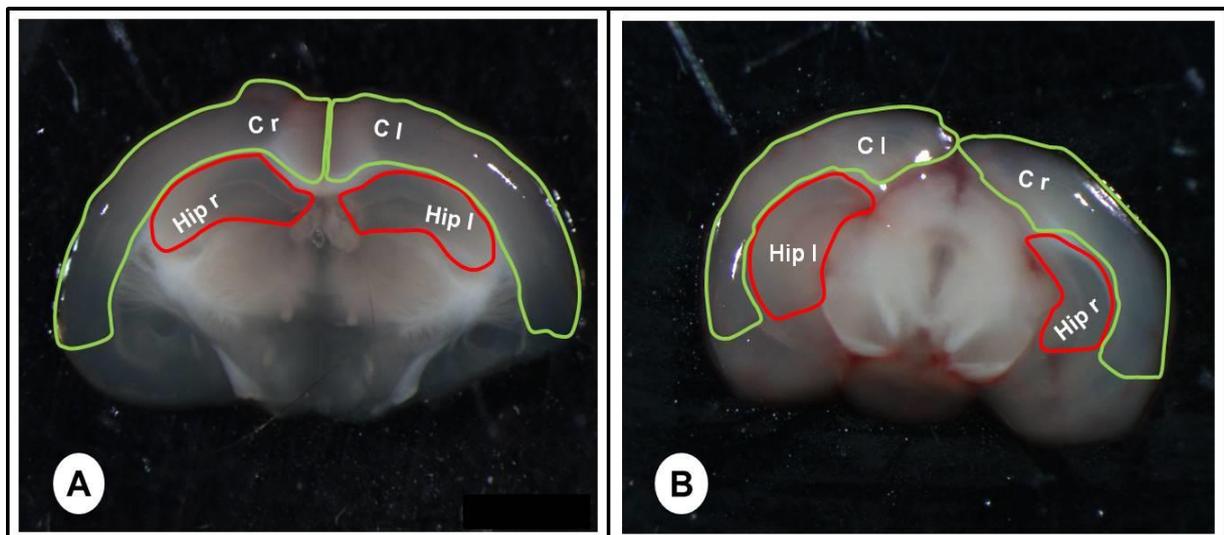


Abbildung 3: Koronarschnitte eines DBA/2-Maus-Gehirns in sagittaler Ansicht (eigene Aufnahmen); **A** Schnittebene 3 (siehe Abbildung 2) mit rostralem Hippokampus-Anteil, **B** Schnittebene 5 (siehe Abbildung 2) mit caudalem Hippokampus-Anteil; rote Markierung: Hippokampus (Hip r - rechts, Hip l - links), grüne Markierung: Kortex (C r - rechts, C l - links)

2.1.6. Quantifizierung von Venlafaxin, O-Desmethylvenlafaxin und

Monoamin-Neurotransmittern im murinen ZNS mittels HPLC-Analyse

Die Konzentrationen von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin sollten *post mortem* in Hirnstamm, Cerebellum und Kortex der Studientiere bestimmt werden, um sicherzustellen, dass die Substanzen dosisabhängig im Gehirn vorhanden sind. Die Quantifizierung der Monoamin-Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT) sowie deren Hauptmetabolite 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-Dihydroxy-Phenylacetat (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindolacetat (5-HIAA) wurde durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der verschiedenen Venlafaxin-Dosierungen auf ihre Konzentration zu untersuchen.

Die Gewebestücke werden für die HPLC-Analysen im Verhältnis 1 : 10 (1 + 9) in saurem Standard-HPLC-Puffer mit Antioxidans ("DTPA / H₃PO₄-Puffer"; 150 mM ortho-Phosphorsäure, H₃PO₄; 500 µM Diethylentriamin-Pentaacetat, DTPA) aufgenommen und per Ultraschallhomogenisator auf Eis unter Argon-Atmosphäre bis zur vollständigen Homogenisierung bei einer Amplitude von 15 % behandelt. Der Aufschluss des Gewebes wird unter Argon-Atmosphäre durchgeführt, um einer nicht-enzymatischen Degradation der Analyten-Moleküle, hauptsächlich durch Oxidation an Luftsauerstoff, vorzubeugen. Die Homogenisate werden zentrifugiert (40700 g ± 4000 g, 4 °C, 20 min), der Überstand in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Vor der Injektion werden die Homogenisate durch Mikrozentrifugenfiltration (Amicon Ultra Centrifugal Filters, Ausschlussgröße / molecular weight cut-off (MWCO) 3 kD, Millipore, Cork, Irland; 21400 g, RT, 6 min) von eventuell vorhandenen groben Verunreinigungen befreit.

Die Analysen wurden durchgeführt auf einem Agilent 1100 HPLC-System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit automatisierter Probenaufgabe (Autosampler), Degaser für die flüssigen Phasen und einem Säulenofen zur Temperierung von Eluat und analytischer Säule. Venlafaxin- und O-Desmethylvenlafaxin wurden mit einem Fluoreszenzdetektor (FLD; Agilent Technologies) vermessen. Für die Monoamin-Transmitter kam ein elektro-chemischer Detektor (ECD; Model 1640; Bio-Rad, München, Deutschland) zum Einsatz. Die Auswertung der Messungen erfolgte über das Programm "ChemStation for LC" Rev. A. 10.02 [1757] (Agilent Technologies) anhand des Verhältnisses der Signalintensitäten von Kalibrator- und Probenlösungen.

Für die Quantifizierung von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin werden zunächst Reinsubstanz-Stammlösungen (10 mg / ml) in Methanol und aus diesen unter

Zusammenführung in mehreren Verdünnungsschritten mit DTPA / H₃PO₄-Puffer die drei verwendeten Kalibrationslösungen (150 / 300 / 600 ng / ml) hergestellt. Die Analyse der Gewebekomponenten erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{Exzitation}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 305 \text{ nm}$). Die mobile Phase setzt sich zusammen aus 84,91 % H₂O dd, 15,0 % Acetonitril (ACN) und 0,09 % Triethylamin (6,43 mM; TEA), ihr pH-Wert wird mittels H₃PO₄ auf 2,5 eingestellt. Als stationäre Phase dient Cyanopropyl-modifiziertes Kieselgel (Säule: EC 150/4.6 NUCLEODUR®100-3 CN-RP, Macherey-Nagel, Deutschland). Die Chromatographie wird isokratisch bei einer Temperatur von 40 °C und einem Fluss von 1 ml / min durchgeführt. Der Probenhalter des Autosamplers wird auf 20 °C temperiert. Das Injektionsvolumen (IV) beträgt für Kalibrator- und Probenlösungen jeweils 50 µl. Vermessung der Einzelsubstanzen dient der Findung der Retentionszeiten. Die Retentionszeit betrug für Venlafaxin 8 min und für O-Desmethylvenlafaxin 4 min. Die Nachweisgrenze wurde für Venlafaxin mit 7 ng / ml und für O-Desmethylvenlafaxin mit 10 ng / ml berechnet. Analog werden zur Quantifizierung der Monoamin-Transmitter zunächst Stammlösungen (10 mg / ml) von NA, MHPG, DA, DOPAC und 5-HT in DTPA / H₃PO₄-Puffer hergestellt. Aufgrund geringerer Löslichkeit in wässrigem Medium wird die HVA-Stammlösung mit der Konzentration 1 mg / ml und die 5-HIAA-Stammlösung mit 2,5 mg / ml angesetzt. Im ersten Verdünnungsschritt werden die sieben Analyten in Konzentrationen von jeweils 500 µg / ml zusammengeführt und in weiteren Schritten die drei Kalibratorlösungen hergestellt (20 / 40 / 80 ng / ml jedes Analyten). Die Retentionszeiten betragen: NA 7,2 min, MHPG 9,8 min, DA 13,8 min, DOPAC 15,1 min, HVA 35,7 min, 5-HT 31,5 min und 5-HIAA 25,4 min. Die Elution wird isokratisch bei 35 °C und einem Fluss von 0,75 ml / min vollzogen. Die mobile Phase setzt sich zusammen aus 90 % H₂O dd und 10 % Methanol (MeOH) mit 0,1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 0,5 mM Triethylamin (TEA), 0,65 mM Octansulfonsäure (Oss) und 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄), der pH-Wert wird mit H₃PO₄ auf 4,1 eingestellt. Als stationäre Phase kommt Octadecyl-modifiziertes Kieselgel zum Einsatz (Säule: EC 250/4.6 NUCLEOSIL®100-5 C18, Macherey-Nagel, Deutschland). Der Probenhalter des Autosamplers wird mittels Thermostatisierungseinheit auf 20 °C temperiert. Das IV beträgt jeweils 35 µl. Die experimentell bestimmten Nachweisgrenzen lagen für die jeweilige Substanz bei: NA, MHPG, DA und DOPAC - 1,3 ng/ml, 5-HIAA, 5-HT und HVA - 2,5 ng/ml.

2.1.7. RNA-Extraktion aus murinem Hippokampus-Gewebe

Die Extraktion wurde jeweils aus dem kompletten Hippokampus vorgenommen. Das Gewebe überschritt in keinem Fall die zulässige Masse von 40 mg pro Extraktionsansatz. Verwendet wurde eine Kombination der kommerziell angebotenen Extraktionsprotokolle der Firmen PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) und Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland). Zum Aufschluss des Gewebes wird das auf Trockeneis gefrorene Probengut zunächst in einem RNase-freien 2 ml-Safelock-Röhrchen (Eppendorf) mit 500 µl pegGOLD RNAPure™ (PEQLAB) überdeckt und im TissueLyser (Qiagen) für 3 min bei einer Frequenz von 20 Hz behandelt. Es folgt Inkubation bei RT für 5 min. Nach kurzem Herunterzentrifugieren (13700 g, 4 °C) werden auf jeden Ansatz 100 µl Chloroform (HCCl₃) gegeben und es wird für 5 min auf Eis (≈ 0 °C) inkubiert. Die Ansätze werden in MaXtract™ High Density 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Qiagen) überführt und bei 4 °C für 5 min mit 13700 g zentrifugiert. Die MaXtract™-Gelschicht bildet währenddessen eine Barriere zwischen der unteren, organischen protein- sowie lipid-fragmenthaltigen Phase und der oberen wässrigen Phase, in welcher sich die Nukleinsäuren befinden. Zentrifugationsschritte im Folgenden werden stets bei RT durchgeführt. In RNase-freien 1,5 ml-Reaktionsgefäßen werden je 250 µl eines 70 %igen Ethanol-DEPC-Wasser-Gemisches vorgelegt, die wässrigen Phasen zupipettiert und nach Durchmischung auf RNeasy® Spin Säulen (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) überführt. Nach Zentrifugation (13700 g, 30 s) und Verwerfen des Durchlaufs werden je 350 µl des Waschpuffers "RW 1" (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) auf die Säule gegeben und wie im vorherigen Schritt durchzentrifugiert. 80 µl DNase I Inkubationsgemisch (10 µl DNase I Stocklösung + 70 µl DNA-Verdau Puffer (Qiagen) vorgemischt) werden auf die Membran der Spin-Säule pipettiert, gefolgt von Inkubation für 15 min bei RT zwecks Verdau der auf der Säule vorhandenen DNA. Nach der Inkubation werden 350 µl RW 1-Puffer aufgegeben, durchzentrifugiert (13700 g, 30 s) und verworfen. Anschließend werden zweimalig pro Probe je 500 µl "RPE"-Puffer (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) auf die Säule gegeben und nach einer Inkubationszeit von 1 min mit 13700 g durchzentrifugiert und verworfen. Zur vollständigen Trocknung des Säulenmaterials folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (13700 g, 2 min). Die Säule wird auf ein RNase-freies 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und die Elution der RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (13700 g, 1 min) vollzogen. Die Eluate werden umgehend auf Eis gekühlt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.8. Bestimmung von RNA-Qualität und Konzentration

RNA-Quali- und -Quantität in den Extrakten aus den Hippokampi der Mäuse wurden in der Microarray Core Unit des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) des Universitätsklinikums Würzburg mittels Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) bestimmt. Das Funktionsprinzip entspricht dem unter 2.2.5. (Seite 46) bezüglich des Experion™-Systems (Bio-Rad) beschriebenen.

2.1.9. Umschreiben der RNA in cDNA

Die RNA aus den Hippokampi der Tiere wurde in der Microarray Core Unit des IZKF im Zuge der standardisierten Affymetrix-Methodik zur Microarray-Analyse mittels GeneChip® 3' IVT Express Assay (Affymetrix UK Ltd., High Wycombe HP10 0HH, United Kingdom) zunächst in cDNA konvertiert. Diese cDNA wurde zum einen für die Microarray-Untersuchung zu antisense RNA (aRNA) weiterverarbeitet und zum anderen in den Messungen mit quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) zur Validierung der Array-Resultate eingesetzt.

2.1.10. Hypothesenfreie Microarray Expressions-Analyse der DBA/2-Hippokampi zur Generierung von Kandidatengen

Die Microarray-Analyse der RNA-Extrakte aus den Hippokampi der DBA/2-Mäuse wurde in Kooperation mit der Microarray Core Unit des IZKF durchgeführt. Eingesetzt wurde der GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 (Affymetrix). Der Chip ermöglicht die synchrone Analyse von über 39000 Transkripten (Data Sheet, Affymetrix). Die Vorbereitung der RNA wurde unter Verwendung des GeneChip® 3' IVT Express Assays (Affymetrix) durchgeführt. Dabei wird die RNA über cDNA als Intermediat in aRNA umgeschrieben. Biotinylierte Ribonukleotide vermitteln die Fluoreszenzmarkierung der aRNA-Moleküle durch Bindung eines doppelten Streptavidin-Phycoerythrin-Komplexes. Die markierte aRNA wird in den Chip eingespritzt. Nach Hybridisierung der aRNA an die entsprechende Zielsequenz wird der Chip mit einem Lasersystem (Affymetrix) gescannt. Anhand der bekannten Belegung des Arrays mit spezifischen Sequenzsonden wird durch die Affymetrix-Software das Hybridisierungsmuster eines jeden Arrays bezüglich der Intensität für jede Zielsequenz in Expressionsmuster übersetzt.

Die rohen Expressionswerte werden einer Varianz-Stabilisierung unterzogen, um die einzelnen Signale innerhalb eines jeden Arrays zu normalisieren (Huber et al., 2002). Der sich anschließende Summierungsschritt mittels "median-polish" innerhalb des von Irizarry et al. (2003) entwickelten Programms "log scale robust multi-array analysis" liefert für jeden Array einen Expressionsmittelwert. Die berechneten Mittelwerte werden anschließend einer logarithmischen Transformation unterzogen. Mittels t-Test wird für jedes Gen jeweils zwischen zwei experimentellen Gruppen ein logarithmierter Fold Change- (logFC-) der Expression berechnet (Smyth, 2004).

Um der Gefahr falsch-positiver Befunde aufgrund multiplen Testens zu reduzieren werden die nominalen p -Werte mit der "False Discovery Rate (FDR)"-Methode korrigiert (Benjamini und Hochberg, 1995). Ein korrigierter p -Wert beziehungsweise eine $FDR < 5\%$ wurde bei der Auswertung der Arrays für eine signifikant differentielle Expression vorausgesetzt.

2.1.11. Evaluierung der per Microarray gefundenen Kandidatengene mit quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Evaluierung der per Microarray nach 30-tägiger Venlafaxin-Gabe an DBA/2-Mäuse gefundenen Kandidatengene ("Zielgene", siehe Tabelle 2) anhand qRT-PCR wurde mit einem CFX384TM Real-Time System auf einem C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad) in Kombination mit dem SYBR[®]Select Master Mix for CFX (applied biosystems, Texas, USA) durchgeführt. Die Auswertung der Analysen findet mittels der CFXTM-Software (Bio-Rad) statt. Die Daten der Probenanalysen werden in das Programm geladen und eine "Gene Study" (Teil des Programms) durchgeführt, welche nach Normalisierung der Zielgenexpression anhand der Referenzgenexpression relative Expressionswerte für jede Probe ausgibt. Wiederholungsmessungen einzelner Proben mit bestimmten Primerpaaren werden über die in jeder Messung mitgeführten "Inter Run Calibrators" (IRCs) normalisiert.

Die Effizienzen der einzelnen Primerpaare werden anhand der Proben-Analysedaten über das Programm LinRegPCR (Version 11.1, Januar 2009) bestimmt und in der Gene Study eingetragen. Eine Effizienz von 100 % entspricht dabei einer Verdoppelung des DNA-Materials mit jedem PCR-Zyklus. Die Effizienzen der für die Analyse muriner Hippokampus-RNA eingesetzten Primerpaare lagen zwischen 82,0 und 85,4 %.

Zielgene	Spezies: <i>Mus musculus</i>	
Akronym	Offizielle Bezeichnung	Transkript-Identifikation (NCBI)
<i>Dusp1</i>	dual specificity phosphatase 1	NM_013642
<i>Mef2c</i>	myocyte enhancer factor 2C	NM_001170537
<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene	NM_010234
<i>Nfil3</i>	nuclear factor, interleukin 3, regulated	NM_017373
<i>Nr4a1</i>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NM_010444
<i>Egr2</i>	early growth response 2	NM_010118
<i>CaMK2d</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	NM_001025438
<i>Prkacb</i>	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta	NM_011100
<i>Arc</i>	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	NM_001276684 NM_018790

Tabelle 2: mittels qRT-PCR in murinem Hippokampusgewebe auf differentielle Expression hin untersuchte Zielgene; Angabe der Gen-Akronyme, der offiziellen Bezeichnung sowie der Transkript-Identifikationsnummer laut National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Referenzgene dienen bei der qRT-PCR als Normalisierungsparameter für die Zielgenexpression zwischen den einzelnen untersuchten Proben. Prämisse für die Verwendung ist eine von der Behandlung unabhängige Expression. Als Referenzgene bieten sich somit Housekeeping-Gene an, deren Proteinprodukte für die prinzipielle Funktion (struktureller Aufbau, basaler Metabolismus, PBS) einer Zelle benötigt und daher konstitutionell exprimiert werden. Die Expression der Referenzgene in den einzelnen Proben wird analysiert und die gemessene Zielgen-Expression relativ zu dieser in der Auswertung betrachtet.

In Vorversuchen werden die potentiellen Referenzgene im Hinblick auf Stabilität und Homogenität der Expression in jeweils zehn repräsentativen Proben untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden bereits in vorherigen qRT-PCR-Analysen im hiesigen Labor verwendete Referenz-gene in Betracht gezogen (siehe Tabelle 3). Die zu verwendenden Referenzgene wurden durch das Programm qbasePLUS (Version 2.4, 20120828-0902; basierend auf den Programmen geNorm und qBase; Biogazelle NV, Zwijnaarde, Belgium) identifiziert (Vandesompele et al., 2002). Es sind dies im Fall der Tierstudie die als am homogensten exprimiert identifizierten Gene *Sdha* und *Tbp*.

Referenzgene	Spezies: <i>Mus Musculus</i>	
Akronym	Offizielle Bezeichnung	Transkript-Identifikation (NCBI)
<i>B2m</i>	beta-2 microglobulin	NM_009735
<i>Hprt</i>	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	NM_013556
<i>Hmbs</i>	hydroxymethylbilane synthase	NM_001110251 NM_013551
<i>Actb</i>	actin, beta	NM_007393
<i>Sdha</i> **	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	NM_023281
<i>Pgk1</i>	phosphoglycerate kinase 1	NM_008828
<i>Tfrc</i>	transferrin receptor	NM_011638
<i>Tbp</i> **	TATA box binding protein	NM_013684

Tabelle 3: für die qRT-PCR-Untersuchung der murinen Hippokampi in Frage kommende Referenzgene (** letztlich verwendete Referenzgene); Angabe der Gen-Akronyme, der offiziellen Bezeichnung sowie der Transkript-Identifikationsnummer laut NCBI

Die für die Untersuchungen verwendeten Primerpaare entstammten entweder dem Produktkatalog der Qiagen GmbH oder wurden nach Eigendesign mit dem Programm "Primer-BLAST" des National Center for Biotechnology Information (NCBI) von Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert und geliefert (siehe Tabellen 4 und 5).

Die Primerpaare werden zunächst in Vorversuchen auf ihre Funktionalität geprüft. Von besonderer Bedeutung ist hierbei, sicherzustellen, dass eine spezifische Amplifikation des gewünschten Produktes ("Amplikon") stattfindet sowie eine Amplifikation von genomischer DNA (gDNA) nicht stattfindet. Eine Amplifikation von eventuell vorhandener gDNA wird unterbunden durch die Verwendung von Primerpaaren, die sich intronspannend beziehungsweise über eine Exon-Exon-Grenze an die Template-DNA anlagern. Durch die Zeitvorgabe des Syntheseschrittes ist eine vollständige Polymerisation intronhaltiger DNA aufgrund hoher Produktlängen nicht möglich. Primer die an Exon-Exon-Grenzen an die Template DNA binden können an intronhaltige gDNA nicht binden.

Zur Prüfung der Funktionalität werden an repräsentativen cDNA- sowie gDNA-Proben vergleichbarer Herkunft qRT-PCR-Analysen der (potentiell) zu verwendenden Primerpaare durchgeführt.

Für jedes Primerpaar werden im Verhältnis 1 : 6 Mastermixe aus der Primersuspension und dem SYBR® Select Master Mix for CFX Reagenzien-Gemisch hergestellt. Zuvor werden die von Qiagen bezogenen Primerpaar-Lyophilisate nach Herstellerangaben aufbereitet und die

von Metabion in separaten Gefäßen in Suspension gelieferten forward- und reverse-Primer in einer 1 : 20 (1 + 1 + 18) Verdünnung mit DEPC-Wasser zusammengeführt.

Die cDNA-Lösungen werden vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 4 mit DEPC-Wasser verdünnt. Für die Messungen werden in 384-Well-qRT-PCR-Platten ("4titude Framestar 480/384", 4titude Ltd., Berlin, Deutschland) jeweils 6 µl des Mastermixes pro Reaktionsansatz vorgelegt und 4 µl cDNA-Lösung zugegeben ($V_{\text{ges}} = 10 \mu\text{l}$). Jede Probe wird im Duplikat analysiert. Negativkontrollen werden bei jeder Messung und für jedes Primerpaar mitgeführt, das heißt diese Ansätze enthalten zwar Mastermix jedoch Wasser anstatt cDNA-Template. Bei den Analysen der einzelnen Gene werden auf jeder 384-Well-qRT-PCR-Platte mehrere IRCs mitgeführt, die bei der Auswertung zur Normalisierung zwischen den einzelnen Platten verwendet werden.

Zielgene		Spezies: <i>Mus musculus</i>		
Akronym	Primersequenzen		Amplikongröße	Bezugsquelle (Bestellnummer)
<i>Dusp1</i>	f 5'-TGGTTCAACGAGGCTATTGAC-3'		70 bp	Metabion
	r 5'-GGCAATGAACAAACACTCTCC-3'			
<i>Mef2c</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht		113 bp	Qiagen (QT00103733)
<i>Fos</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht		81 bp	Qiagen (QT00147308)
<i>Nfil3</i>	f 5'-GGACCAGGGAGCAGAACC-3'		64 bp	Metabion
	r 5'-GTCCGGCACAGGGTAAATC-3'			
<i>Nr4a1</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht		134 bp	Qiagen (QT00101017)
<i>Egr2</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht		103 bp	Qiagen (QT00160125)
<i>Camk2d</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht		95 bp	Qiagen (QT01062404)
<i>Prkacb</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht		92 bp	Qiagen (QT00112399)
<i>Arc</i>	1	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	134 bp	Qiagen (QT00250684)
	2	f 5'-AGGGGCTGAGTCCTCACA-3'	90 bp	Metabion
		r 5'-GACTTCTCAGCAGCCTTGAGAC-3'		
	3	f 5'-GCAGCAGACCTGACATCCTG-3'	68 bp	
		r 5'-AGCTCTGCTCTTCTTCACTGG-3'		
	4	f 5'-GCTGAAGCCACAAATGCAG-3'	96 bp	
		r 5'-GCTGAGCTCTGCTCTTCTTCA-3'		
	5	f 5'-ACACCAGGTCTCAAGGCTGC-3'	120 bp	
r 5'-GTCTTGGAACCCATGTAGGCA-3'				
6	f 5'-GGTGAGCTGAAGCCACAAATG-3'	83 bp		
	r 5'-CTGGTATGAATCACTGCTGGGG-3'			
7*	f 5'-CCCCAGCAGTGATTCATACCA-3'	176 bp		
	r 5'-CAGCAAAGACTTCTCAGCAGC-3'			

Tabelle 4: für die qRT-PCR-Analyse muriner Hippokampus-RNA auf differentielle Expression hin getestete und verwendete Primerpaare der Zielgene; * für *Arc* letztlich verwendetes Primerpaar; Angabe der Gen-Akronyme (siehe auch Tabelle 2), der Sequenzen des forward (f) und des reverse (r) Primers soweit bekannt, der Größe des jeweiligen Amplikons in Basenpaaren (bp) sowie von Bezugsquelle und gegebenenfalls Bestellnummer

Referenzgene		Spezies: <i>Mus musculus</i>	
Akronym	Primersequenzen	Amplikongröße	Bezugsquelle (Bestellnummer)
<i>B2m</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	143 bp	Qiagen (QT01149547)
<i>Hmbs</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	109 bp	Qiagen (QT00494130)
<i>Actb</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	77 bp	Qiagen (QT01136772)
<i>Sdha</i> *	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	150 bp	Qiagen (QT01037666)
<i>Pgk1</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	116 bp	Qiagen (QT01780331)
<i>Tfrc</i>	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	106 bp	Qiagen (QT00122745)
<i>Tbp</i> *	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	114 bp	Qiagen (QT00198443)

Tabelle 5 für die qRT-PCR-Analyse muriner Hippokampus-RNA auf differentielle Expression hin in Frage kommende Referenzgenprimerpaare (* letztlich verwendete Referenzgene); Angabe der Gen-Akronyme (siehe auch Tabelle 3), Amplikongröße (bp) sowie der Bezugsquelle und der Bestellnummer

Für sämtliche qRT-PCR-Analysen wurde dasselbe, für die SYBR[®]Select Master Mix for CFX -Anwendung optimierte Protokoll verwendet (siehe Tabelle 6). Zur Aktivierung der Reagenzien werden die Reaktionsgemische zunächst auf 50 °C erhitzt und für 2 min bei dieser Temperatur inkubiert. Eine initiale Denaturierung wird über 2 min bei 95 °C durchgeführt. Es schließen sich 40 Zyklen mit jeweils Denaturierung für 15 s bei 95 °C und Synthese für 1 min bei 60 °C an. Am Ende eines jeden Zyklus wird die emittierte Fluoreszenz infolge Interkalation des Fluorophors in die synthetisierte doppelsträngige DNA (dsDNA) gemessen. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Menge an vorhandener dsDNA. Zur Quantifizierung der in den einzelnen Proben ursprünglich vorhandenen Menge an cDNA und damit an ursprünglicher RNA, wird die PCR-Phase mit exponentieller Amplifikation herangezogen. Der Beginn dieser Phase ist definiert durch den C_q-Wert, das heißt durch jenen Amplifikationszyklus, nach dem die Produktmenge und damit die gemessene Fluoreszenz erstmals deutlich vom Hintergrundsignal zu differenzieren ist. Der C_q-Wert wird durch die CFX Manager[™]-Software bestimmt. In den Zyklen vor dem C_q-Wert findet aufgrund suboptimaler sterisch-kinetischer Bedingungen keine exponentielle Amplifikation statt. Während der Amplifikationszyklen jenseits der exponentiellen Phase kommt es aufgrund sterischer Hinderung durch die vorhandene Produktmenge und der relativen Abnahme der

Verfügbarkeit von Reagenzien im Vergleich zu der nun vorhandenen Menge an Template zu einem Einschwenken in eine Plateauphase.

PCR-Schritt	Reaktions-Temperatur	Reaktionsdauer
1. Initiierung / Aktivierung	50°C	120 s
2. initiale Denaturierung	95°C	120 s
3. Denaturierung	95°C	15 s
4. Annealing / Synthese *	60°C	60 s
5. Denaturierung	95°C	10 s
6. Schmelzkurvenanalyse: Erhöhung der Proben temperatur in 0,5 °C-Schritten (je 5 s gehalten) von 65 °C auf 95 °C; Fluoreszenzmessung je vor nächstem Erhöhungsschritt		

40 x

Tabelle 6: qRT-PCR-Protokoll für Expressionsanalysen mittels CFX384™ Real-Time System und C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad); PCR-Reaktion und Schmelzkurvenanalyse; (* Messung der aktuellen Probenfluoreszenz)

Nachdem die 40 Zyklen durchlaufen sind, wird zur Prüfung der Produktreinheit eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die fragmentlängenabhängige, vollständige Dissoziation der beiden DNA-Stränge bei einer spezifischen Temperatur führt zu einem rapiden Fluoreszenzabfall. Kongruenter Kurvenverlauf in sämtlichen Proben wird zum Nachweis spezifischer Amplifikation herangezogen. Zur weiteren Prüfung der Produktspezifität werden ausgewählte Proben jeder qRT-PCR-Messung auf 3 %iges, ethidiumbromidhaltiges Agarose-Gel aufgetragen und die Produktgrößen mit dem erwarteten Wert verglichen (siehe Tabellen 4 und 5).

2.2. Humanstudie

2.2.1. Patienten-Einschluss

Die Humanstudie umfasste zwei Teile. Zum einen wurde auf der Tierstudie aufbauend die Genexpression nach Venlafaxin-Einnahme untersucht, zum zweiten der vermutete Zusammenhang von Venlafaxin- und O-Desmethylvenlafaxin-Serumsummenkonzentration, ausgewählten Polymorphismen des Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahme-Transporter-Gens und der Therapie-Effektivität. Die Studie war unter dem Aktenzeichen 96/11 von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt worden und folgte den Vorgaben der Deklaration von Helsinki zu den ethischen Grundsätzen für die medizinische

Forschung am Menschen. Vor Studieneinschluss wurde nach Aufklärung über Studieninhalt und -ziel das Einverständnis der Patienten zu den Untersuchungen schriftlich festgehalten.

Die Patienten für die Untersuchung auf Ebene des Transkriptoms wurden zwischen August 2010 und August 2011 ausschließlich prospektiv durch mehrmals wöchentliche Durchsicht der Kadizes auf den Stationen der Erwachsenenpsychiatrie der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg identifiziert. Einschlusskriterien waren die Diagnose einer depressiven Symptomatik im Rahmen einer unipolaren oder bipolaren affektiven Störung, die bei Aufnahme in die Klinik durch Anamnese bestätigte Naivität für Venlafaxin und die Initialisierung einer psychopharmakologischen Behandlung mit diesem Medikament. Das naturalistisch-klinische Design der Studie erlaubte beziehungsweise erforderte den Einschluss von Patienten unabhängig von deren Geschlecht, Alter, Venlafaxin-Dosis und somatischer Komorbidität.

Patienten für die Untersuchung des Zusammenhanges von Venlafaxin- und O-Desmethylvenlafaxin-Serumsummenkonzentration, Therapie-Effektivität und den Genotypen des Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahme-Transporter-Gens wurden zusätzlich auf retrospektivem Weg identifiziert. Die Datengesamtheit des Speziallabors für Therapeutisches Drug Monitoring an der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg beinhaltet(e) Analysedaten ab dem Jahr 2003. Diese wurde nach Venlafaxin-Serumspiegelmessungen durchsucht. Nach den als Venlafaxin-Rezipienten identifizierten Patienten wurde anschließend die DNA-Datenbank von Prof. Dr. med. Andreas Reif durchsucht. Patienten von denen sowohl TDM-Daten als auch DNA-Material vorhanden waren, wurden in das Kollektiv aufgenommen.

Die in der Studie herangezogenen klinischen Informationen wurden in jedem Fall den Anforderungsscheinen des TDM-Labors entnommen. Erhoben wurden die täglich applizierte Dosis an Venlafaxin (mg / d) sowie die resultierende Summenserumkonzentration (ng / ml), Geschlecht und Alter der Patienten, die Komedikation sowie die Veränderung der Symptomatik anhand der Clinical Global Impression-Improvement-Scale (CGI-I). Diese Skala verbalisiert anhand von sieben Kategorien die Veränderung der Symptomatik des Patienten im Vergleich zwischen dem Zeitpunkt des Behandlungsbeginns und dem innerhalb der der Blutentnahme vorausgehenden sieben Tage gewonnenen Eindruck des Schweregrades der Erkrankung. Mögliche, durch den Psychiater zu treffende Beurteilungen lauten "sehr viel besser", "viel besser", "nur wenig besser", "unverändert", "etwas schlechter", "viel schlechter", "sehr viel schlechter" und "nicht beurteilbar" (Guy (Editor), 1976; Busner and Targum, 2007).

2.2.2. Blutprobennahme

Zur quantitativen Bestimmung der Serumkonzentration werden nach den Vorgaben der TDM-Routine sieben bis neun Milliliter Vollblut in eine zusatzfreie Serummonovette abgenommen. Die Blutentnahme erfolgt in nüchternem Zustand und mindestens 12 Stunden nach der letzten Medikamentengabe, um die Messung eines Talspiegels zu gewährleisten. Zeitgleich mit der Blutentnahme wird durch den behandelnden Psychiater der Anforderungsschein für die Analyse ausgefüllt und damit der aktuelle klinische und studienrelevante Status des Patienten dokumentiert.

Zur Untersuchung der Expression von Genen unter dem Einfluss einer Venlafaxin-Therapie werden Blutproben mit dem PAXgene® Blood RNA System (PreAnalytiX, Qiagen) zu zwei Zeitpunkten ("BE X" fünf bis acht Tage und "BE XX" 25 bis 32 Tage nach Initialisierung der Venlafaxin-Einnahme) entnommen. Diese Proben werden bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

Für die Genotypisierung des Patienten werden in zwei EDTA-Monovetten jeweils 7 - 9 ml Blut abgenommen und bis zur Bearbeitung im Kühlschrank bei 4 - 8 °C gelagert. Die Extraktion der DNA erfolgte binnen zweier Tage.

2.2.3. Serumkonzentrationsanalyse von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin

Die HPLC-Methodik (siehe Tabelle 7) entspricht im Wesentlichen der unter 2.1.6. (Seite 33) für die Analyse der Maushirn-Homogenisate beschriebenen. Allerdings findet hier zunächst eine online-Aufreinigung der Analyten statt, bevor ihre chromatographische Trennung und schließlich die Detektion über Eigenfluoreszenz erfolgt.

Probenmatrix	humanes Serum
Injektionsvolumen	100 µl
Extraktionssäule	MZ-PerfectBond® 10-4.0, CN 20 µm
Spüleluent	19 : 1 vol / vol ACN in H ₂ O dd
analytische Säule	MN EC 150/4.6 Nucleodur® 100-3 CN-RP
analytischer Eluent	15 % ACN + 0,09 % TEA + 84,91 % H ₂ O dd
Fluss (Spüleluent & analytischer Eluent)	0,75 ml / min
Säulentemperatur	30 °C
Retentionszeit (Venlafaxin)	11,5 min
Retentionszeit (O-Desmethylvenlafaxin)	9,0 min

Tabelle 7: HPLC-Bedingungen für Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin-Analyse in humanem Serum und Venlafaxin in Venlafaxin-Tablettenextrakten

2.2.4. RNA-Extraktion aus humanem Blut

Die Entnahme des Blutes erfolgt mittels PAXgene[®] Blood RNA System, zur Aufarbeitung der RNA wird der zugehörige PAXgene[®] Blood RNA Kit (PreAnalytiX, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet und nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Die Lagerung der RNA-Eluat erfolgt bei -80 °C.

2.2.5. Bestimmung von RNA-Quanti- und -Qualität

Zur Bestimmung der RNA-Quali- und -Quantität wurde für die RNA aus humanen Leukozyten das "Experion[™] Automated Electrophoresis System" (Bio-Rad) in Kombination mit dem "Experion[™] RNA StdSens Analysis Kit" (Bio-Rad) nach Herstellerangaben verwendet. Per Analyse mit dem Programm "Eukaryotic Total RNA StdSens" wird die Proben-RNA hinsichtlich Integrität und Konzentration vermessen, indem im "Lab on a Chip"-Format Elektrophoresen durchgeführt werden. Als Indikatoren dienen dabei die ribosomale 18S (1847 Nukleotide) und 28S (4718 Nukleotide) RNA (18S rRNA beziehungsweise 28S rRNA). Das Flächenverhältnis der Peaks von 28S zu 18S rRNA im Elektropherogramm wird herangezogen, um die Integrität der (m)RNA zu beurteilen. Die Grundlage dieser Vorgehensweise ist die im Vergleich zur 18S rRNA vermutlich aufgrund struktureller Unterschiede rascher fortschreitende, nicht-enzymatische Degradation der 28S rRNA. Bei einer RNA-Probe von hoher Qualität wird von einem 28S / 18S rRNA-Verhältnis von 2 : 1 ausgegangen (Becker et al., 2009). Die Quantifizierung findet über eine Fluoreszenzintensitätsmessung in Relation zu der RNA-Leiter mit bekannten Konzentrationen statt. Zur Beurteilung wird das gemessene Verhältnis durch die Experion[™] Software in den RNA Quality Index (RQI; Stufen 1 - 10) umgeformt. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Proben mit einem RQI > 7 verwendet, wobei dieser Wert *per definitionem* die untere Grenze für hohe RNA-Qualität markiert.

2.2.6. Umschreiben der RNA in cDNA

Für die Umschreibung der RNA aus humanen Leukozyten in cDNA wurde der "iScript[™] cDNA Synthesis Kit" (Bio-Rad) nach Herstellerangaben verwendet. Das Gesamtvolumen eines einfachen Umschreibeansatzes beträgt bei diesem Kit 20 µl, welche sich zusammensetzen aus 4 µl "5x iScript Reaction Mix", 1 µl "iScript Reverse Transcriptase"

sowie 15 µl der Kombination von nuklease-freiem Wasser mit RNA-Template. Die eingesetzte Menge an RNA-Template betrug hier 500 ng. Ausgehend von der RNA-Konzentrationsmessung wird das entsprechend benötigte Volumen an RNA-Suspension ermittelt und mit nuklease-freiem Wasser auf 15 µl ergänzt. Um eine Kontrolle der Reaktion und eventueller Kontaminationen zu ermöglichen werden zusätzlich Ansätze mitgeführt, die anstatt der reversen Transkriptase oder anstatt der Template-RNA Wasser enthalten. Die Ansätze werden zur cDNA-Synthese nach Herstellerprotokoll im Thermocycler prozessiert. Nach dem Durchlaufen des Reaktionsprotokolls werden die Ansätze im Verhältnis 1 : 5 mit TE-Puffer versetzt und anschließend in Arbeits- und Stocklösung aufgeteilt. Die Arbeitslösung wird bei 4 °C, die Stocklösung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.7. Prüfung der cDNA-Synthese

Zur Prüfung der cDNA-Synthese aus humaner Leukozyten-RNA sowie auf eventuell vorhandene gDNA wird zunächst eine Polymerase-Kettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction", PCR) durchgeführt (Protokoll siehe Tabelle 8). Hierfür werden Primer verwendet die in einem intronischen Bereich des Gens der humanen Tryptophanhydroxylase 1 ("hs_Tph1_Intron") binden. Die Basensequenzen des verwendeten Primerpaares sind im Materialteil angegeben. Pro PCR-Ansatz werden 2,5 µl 15 mM MgCl₂-Lösung, 1 µl 2,5 mM Nukleotidmix, 2 µl Primerverdünnung, 0,2 µl *Taq*-Polymerase, 1 µl der entsprechenden Nukleinsäurelösung sowie 18,3 µl DEPC-Wasser in einem 200 µl-Reaktionsgefäß zusammengeführt ($V_{ges} = 25 \mu\text{l}$).

PCR-Schritt	Reaktions-Temperatur	Reaktionsdauer
1. initiale Denaturierung	95°C	300 s
2. Denaturierung	95°C	40 s
3. Annealing	61,1°C	40 s
4. Elongation	72°C	40 s
5. "Ausklang"	72°C	300 s
6. Ende der PCR	10°C	-

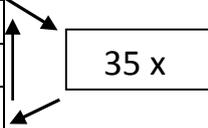


Tabelle 8: PCR-Bedingungen für Prüfung der cDNA mittels hs_Tph1_Intron-System

Nach durchlaufenem Reaktionsprotokoll werden einzelne Ansätze mit 6 µl Blaupuffer versetzt und ein Volumen von jeweils 13 µl auf 2 %iges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen. Das Amplikon des hs_Tph1_Intron-Systems weist eine Größe von 198 bp auf

und wird unter UV-Belichtung identifiziert. Bei Nachweis von gDNA sind die betroffenen Proben aus der Analyse auszuschließen beziehungsweise ist durch die Verwendung entsprechender Primerpaare die Amplifikation der gDNA in der qRT-PCR zu unterbinden.

2.2.8. Genexpressionsanalyse in humanen Leukozyten mittels qRT-PCR

Die Analyse der Genexpression wird analog der unter 2.1.11. (Seite 37) ausgeführten Methode durchgeführt. Tabelle 9 führt die zur Analyse gewählten Zielgene sowie potentielle und verwendete Referenzgene an. Die getesteten und letztlich eingesetzten Primer für Ziel- und Referenzgene sind in den Tabellen 10 und 11 gelistet. Die Amplifikationseffizienzen der verwendeten Primerpaare lagen zwischen 81,5 % und 83,9 %.

Zielgene	Spezies: <i>Homo sapiens</i>	
Akronym	Offizielle Bezeichnung	Transkript-Identifikation (NCBI)
<i>Dusp1</i>	dual specificity phosphatase 1	NM_004417
<i>Mef2c</i>	myocyte enhancer factor 2C	NM_001131005
<i>Fos</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	NM_005252
<i>Nfil3</i>	nuclear factor, interleukin 3 regulated	NM_005384
<i>Nr4a1</i> *	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NM_001202233
<i>Egr2</i> *	early growth response 2	NM_000399
Referenzgene	Spezies: <i>Homo sapiens</i>	
Akronym	Offizielle Bezeichnung	Transkript-Identifikation (NCBI)
<i>HPRT1</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_000194
<i>Gusb</i>	glucuronidase, beta	NM_000181
<i>Alas1</i>	aminolevulinate, delta-, synthase 1	NM_000688
<i>Sdha</i> **	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	NM_004168
<i>YWHAZ</i>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	NM_001135699
<i>Tfrc</i> **	transferrin receptor (p90, CD71)	NM_001128148

Tabelle 9: Liste der mittels qRT-PCR in humanen Leukozyten auf differentielle Expression hin untersuchten Gene (Zielgene; * Untersuchung nicht erfolgt, da in den Proben eine zu geringe Menge an cDNA-Template vorlag um eine valide Analyse zu gewährleisten) und in Frage kommender Referenzgene (** letztlich verwendete Referenzgene; diese Gene hatten die homogenste Expression zwischen den Proben der beiden Abnahmezeitpunkte gezeigt); Angabe der Gen-Akronyme, der offiziellen Bezeichnung sowie der Transkript-Identifikationsnummer laut NCBI

Zielgene	Spezies: <i>Homo sapiens</i>				
Akronym	Primersequenzen	Amplikongröße	Bezugsquelle (Bestellnummer)		
<i>Dusp1</i>	f 5'-TCCCCTGAGTACTAGCGTCC-3'	81 bp	Metabion		
	r 5'-GGGCCACCCTGATCGTAGA-3'				
<i>Mef2c</i>	1	f 5'-GGTTTGGACAACAAAGCCC-3'	89 bp	Metabion	
		r 5'-TTTGCAACTCTTCTTTGGCAC-3'			
	2	f 5'-GGTTTGGACAACAAAGCCC-3'	77 bp		
		r 5'-CTTTGGCACCAGTGCCTTTC-3'			
	3	f 5'-GGTTTGGACAACAAAGCCC-3'	75 bp		
		r 5'-TTGGCACCAGTGCCTTTCT-3'			
	4	f 5'-GGTTTGGACAACAAAGCCC-3'	85 bp		
		r 5'-CAACTCTTCTTTGGCACCAGT-3'			
	5*	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	81 bp		Qiagen (QT00053368)
	<i>Fos</i>	f 5'-GGGGCAAGGTGGAACAGTTA-3'	137 bp		Metabion
r 5'-TTGGTCTGTCTCCGCTTGGGA-3'					
<i>Nfil3</i>	f 5'-CCCGAGAGCAGGAACACG-3'	73 bp	Metabion		
	r 5'-TCTGGGATAAATCCGTCAGGC-3'				
<i>Nr4a1</i> [°]	1	f 5'-GGCAGACGGGATAATGTGGT-3'	70 bp	Metabion	
		r 5'-GGCTTGGATACAGGGCATCT-3'			
	2	f 5'-GACGGGATAATGTGGTTGGC-3'	81 bp		
		r 5'-TGGTGTCCCATATTGGGCTT-3'			
	3	f 5'-CCCTGAAGGCAGACGGGATA-3'	93 bp		
		r 5'-CTGGTGTCCCATATTGGGCTT-3'			
	4	f 5'-AAGGCAGACGGGATAATGTGG-3'	85 bp		
		r 5'-GTGTCCCATATTGGGCTTGGGA-3'			
	5	Sequenz wird durch den Hersteller nicht veröffentlicht	72 bp		Qiagen (QT00095515)
	<i>Egr2</i> [°]	f 5'-GGCCCCTTTGACCAGATGAA-3'	87 bp		Metabion
r 5'-TGGGAGATCCAACGACCTCT-3'					

Tabelle 10: für die qRT-PCR-Analyse humaner Leukozyten auf differentielle Expression hin getesteten und verwendeten Zielgen-Primerpaare (*: für *Mef2c* letztlich verwendete Primer; °: die Untersuchung ließ sich hier nicht praktikabel durchführen, da in den Proben eine zu geringe Menge an cDNA-Template vorlag um eine valide Analyse zu gewährleisten); Angabe der Gen-Akronyme (siehe auch Tabelle 9), der Sequenzen des forward (**f**) und des reverse (**r**) Primers soweit bekannt, der Größe des jeweiligen Amplikons in Basenpaaren (bp) sowie der Bezugsquelle und gegebenenfalls der Bestellnummer

Referenzgene	Spezies: <i>Homo sapiens</i>		
Akronym	Primersequenzen	Amplikongröße	Bezugsquelle (Bestellnummer)
<i>HPRT1</i>	f 5'-TGCTTTCCTTGGTCAGGCAG-3'	75 bp	Metabion
	r 5'-TTCGTGGGGTCCTTTTCACC-3'		
<i>Gusb</i>	f 5'-GCCGACTTCTCTGACAACCG-3'	95 bp	Metabion
	r 5'-GGAACTGGCATGTCCACGG-3'		
<i>Alas1</i>	f 5'-CGGGATGGAGTCATGCCAAA-3'	98 bp	Metabion
	r 5'-ATCAGAGAACTCGTGCTGGC-3'		
<i>Sdha</i> *	f 5'-AACATCGGAACTGCGACTC-3'	83 bp	Metabion
	r 5'-CTTCTTGCAACACGCTTCCC-3'		
<i>YWHAZ</i>	Sequenz wird vom Hersteller unter Verschluss gehalten	147 bp	Qiagen (QT02321522)
<i>Tfrc</i> *	f 5'-CGCGCTAGTGTTCTTCTGTG-3'	89 bp	Metabion
	r 5'-TGACAATGGTTCTCCACCAA-3'		

Tabelle 11: Liste der für die qRT-PCR-Analyse humaner Leukozyten auf differenzielle Expression hin in Frage kommende Referenzgen-Primerpaare (* letztlich verwendete Referenzgene; diese Gene hatten die homogenste Expression zwischen den Proben der Gruppen gezeigt); Angabe der Gen-Akronyme (siehe auch Tabelle 12), der Sequenzen des forward (f) und des reverse (r) Primers soweit bekannt, der Größe des jeweiligen Amplikons in Basenpaaren (bp) sowie der Bezugsquelle und gegebenenfalls der Bestellnummer

2.2.9. DNA-Extraktion aus humanem Blut

Um die Genotypisierung der Patienten hinsichtlich ihrer Varianten der untersuchten Polymorphismen durchführen zu können, wird im ersten Schritt die DNA aus dem gewonnenen Blut isoliert. Hierfür wird eine modifizierte Version der im Jahre 1988 von Miller et al. publizierten Methode angewendet. Die extrahierte DNA wird bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.10. Genotypisierung von 5-HTTLPR, rs25531 und rs28386840

Die Genotypisierungen wurden im Wesentlichen analog zu den von Deckert et al. (1997), Wendland et al. (2006) und Renner et al. (2011) veröffentlichten Methoden durchgeführt. Zunächst wird zur Vervielfältigung des DNA-Materials eine PCR durchgeführt. Die l- und s-Allele des 5-HTTLPR, der im l-Allel des 5-HTT-Gens gelegene Polymorphismus rs25531 und der SLC6A2-Polymorphismus rs28386840 werden mittels Agarosegel-Elektrophorese anhand von Längenreferenzen unter UV-Belichtung identifiziert. Für rs25531 wird die DNA einem Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym MspI unterzogen. Für rs28386840 wird das

Restriktionsenzym BsrI eingesetzt. Beide Enzyme entstammen dem Produktkatalog von New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland).

2.3. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Microarray-Untersuchungen wurde von Herrn Dr. biol. hum. Claus-Jürgen Scholz der Microarray Core Unit des IZKF wie unter 2.1.10. (Seite 36) beschrieben vorgenommen.

Die statistische Auswertung der übrigen Untersuchungen wurde mit SPSS Statistics (Version 20 beziehungsweise 21; IBM) durchgeführt. In jedem Fall wurde ein p -Wert von 0,05 als Signifikanz-Grenze verwendet.

Die in Hirnstamm, Cerebellum und Kortex der DBA/2-Mäuse gemessenen Gehalte an Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin, der Monoamin-Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin und Serotonin sowie ihrer Metaboliten und die nach qRT-PCR für jedes untersuchte Gen erhaltenen Expressionswerte wurden in Abhängigkeit von den Behandlungsgruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test und gegebenenfalls *post hoc* mittels Mann-Whitney-U-Test auf statistisch signifikante relative Unterschiede hin untersucht. Zweitgenannter Test wurde auch für den gruppeninternen Vergleich der Expression nach Herkunftshemisphäre der Hippokampi verwendet.

Die Genexpression in humanen Leukozyten wurde in Bezug auf den Abnahmezeitpunkt hin geschlechtsunabhängig und in den geschlechtsstratifizierten Untergruppen mittels t-Test analysiert. Für den Vergleich der Expression unter niedriger (≤ 200 ng / ml) beziehungsweise hoher (> 200 ng / ml) Serumsummenkonzentration zum Zeitpunkt BE XX wurde nach Testung auf Normalverteilung der nicht-parametrisch testende Mann-Whitney-U- beziehungsweise der parametrisch testende t-Test eingesetzt.

Die CGI-I-Werte wurden dichotomisiert, wobei eine Evaluierung von "sehr viel besser" (1) und "viel besser" (2) als therapeutisch angestrebter Effekt ("gutes Ansprechen") und von "wenig besser" (3), "unverändert" (4) oder "schlechter" (5, 6, 7) als ungenügender Effekt ("schlechtes Ansprechen") definiert wurde (siehe auch Owens et al., 2008; Kim et al., 2010).

Falls eine Evaluierung nicht möglich gewesen war (CGI-I „nicht beurteilbar“) wurde der betreffende Patient aus der Untersuchung ausgeschlossen.

Die Genotypen von *SLC6A2* sowie *SLC6A4* wurden nach Kim et al. (2010) beziehungsweise Ruhé et al. (2009) in "niedrig-exprimierend" und "hoch-exprimierend" dichotomisiert.

Durch Trichotomisierung der Summenserumkonzentrationen aus Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin wurden die Variablen "niedriger Summenserumspiegel" (bis 200 ng / ml), "hoher Summenserumspiegel" (201 - 400 ng / ml) und "supra-empfohlener Summenserumspiegel" (über 400 ng / ml) definiert. Bei der Definition dieser Bereiche wird Bezug genommen auf die von der AGNP empfohlenen Summenspiegelbereiche von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin bei Patienten in antidepressiver Therapie (100 - 400 ng / ml). Eine Klassifizierung dieser Art wurde bereits von Dreimüller et al. (2011) verwendet.

Um Zusammenhänge zwischen den Genotypen, Summenserumkonzentration und der Therapie-Antwort beim Menschen im Gesamtkollektiv und durch Trichotomisierung der Summenserumspiegel definierten Subkollektiven statistisch zu analysieren, wurden Kreuztabellen-Analysen mit dem χ^2 -Test beziehungsweise dem Exakten Test nach Fisher durchgeführt.

Eine Korrektur für multiples Testen fand nur im Rahmen der Microarray-Untersuchung statt.

III. Ergebnisse

1. Venlafaxin- und O-Desmethylvenlafaxin-Konzentrationen im murinen ZNS

Per HPLC und Fluoreszenzdetektion sollten die Konzentrationen von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin in Hirnstamm, Cerebellum und Kortex von männlichen DBA/2-Mäusen nach einmonatiger Venlafaxin-Applikation (p.o.) in verschiedenen Dosierungen gemessen werden. Die Methodik zur Analyse wurde validiert und zeigte bei Vermessung von Reinsubstanzlösungen von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin in den Konzentrationen 150 / 300 / 600 ng / ml plausible Resultate.

Die Chromatogramme der durchgeführten Analysen zeigten zu den entsprechenden Retentionszeiten in den Homogenisaten sämtlicher Behandlungsgruppen Peaks von geringer Höhe, Unterschiede waren visuell nicht auszumachen. Die resultierenden Zahlenwerte stehen kaum in Relation zur Behandlungsgruppe. Im Falle einer quantitativ-konstanten Interferenz beziehungsweise Unterlagerung der Analytenpeaks durch unbekannte Substanzen identischer Retentionszeit, welche sich über die Höhe der Peaks in den Chromatogrammen der Kontrolltiere ergeben würde, bestünde die Möglichkeit, die Menge an unbekanntem Substanzen in den Verumgruppen per Subtraktion zu eliminieren. Diese Konstanz war jedoch nicht gegeben, was sich insbesondere daran zeigte, dass nach Subtraktion der in Kontrolltieren gemessenen "Analyten"-Konzentration von den Quantitäten der Verumgruppen teilweise negative Konzentrationen resultierten. Es kann daher aus diesen Analysen auch qualitativ nicht bestätigt werden, dass Venlafaxin sein Zielorgan erreicht hat und über die Dauer des Experimentes mit einer konstanten Konzentration in dessen Physiologie eingriff.

2. Monoamin-Neurotransmitter-Konzentrationen im murinen ZNS

Die in Hirnstamm, Cerebellum und Kortex gemessenen Monoamin-Neurotransmitter-Konzentrationen wurden auf Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen untersucht. Für die Berechnungen in kortikalem Gewebe wurden die Mittelwerte aus den Messergebnissen der linken und rechten Hemisphären verwendet. Pro Dosisgruppe und Region flossen jeweils zehn beziehungsweise elf Werte in die Analyse ein.

Die Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen die Verhältnisse der untersuchten Substanzen zwischen den drei Behandlungsgruppen in Hirnstamm, Cerebellum und Kortex der männlichen DBA/2-Mäuse. Der Hirnstamm als Sitz der serotonergen und noradrenergen Zellkörper und Ort primärer Transmitter-Synthese kann als die am nachhaltigsten beeinflusste Region gelten.

2.1. Serotonin (5-HT)

Die Gehalte an 5-HT und seinem Hauptmetaboliten 5-HIAA unterschieden sich bei den Tieren sowohl im Hirnstamm als auch im Cerebellum in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe. In beiden Regionen lagen ihre Konzentrationen in der Hochdosisgruppe signifikant unter jenen in der Niedrigdosisgruppe. Die 5-HT- und die 5-HIAA-Konzentrationen in der Niedrigdosisgruppe waren im Hirnstamm allerdings teils signifikant höher als in der Kontrollgruppe, wohingegen im Cerebellum nahezu keine Differenz zwischen diesen Gruppen bestand. Kortikal wurden in den Verumgruppen teils geringere 5-HIAA-Konzentrationen beobachtet als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildungen 4, 5 und 6).

2.2. Noradrenalin (NA)

Die NA-Konzentrationen in den untersuchten Regionen zeigten keine Unterschiede, die statistisch signifikant waren. Im Hirnstamm fanden sich keine signifikanten Unterschiede der MHPG-Konzentrationen. Im Cerebellum waren hingegen signifikante Unterschiede im MHPG-Gehalt zu erkennen, wobei in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Verumgruppen jeweils eine höhere Konzentration vorlag. Die MHPG-Konzentration in der Hochdosisgruppe lag dabei signifikant über jener der Niedrigdosisgruppe (siehe Abbildungen 4, 5 und 6). Die Vermessung des kortikalen Areals in der Kontrollgruppe lieferte für MHPG extrem hohe und anhand der Literatur als unreliabel zu definierende Konzentrationen (Muramoto et al., 1982; Li et al., 1984; Huotari et al., 2002). Sie sind vermutlich zurückzuführen auf in den Proben

vorhandene, unbekannte und interferierende Substanzen. Die hochsignifikanten Unterschiede der MHPG-Konzentrationen zwischen Kontroll- und Veruntieren müssen daher als Artefakt eingestuft und aus der Theoriebildung ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 6).

2.3. Dopamin (DA)

DA und seine Hauptmetaboliten DOPAC und HVA wiesen geringfügige Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen auf. Statistische Signifikanz wurde nicht erreicht (siehe Abbildungen 4, 5 und 6).

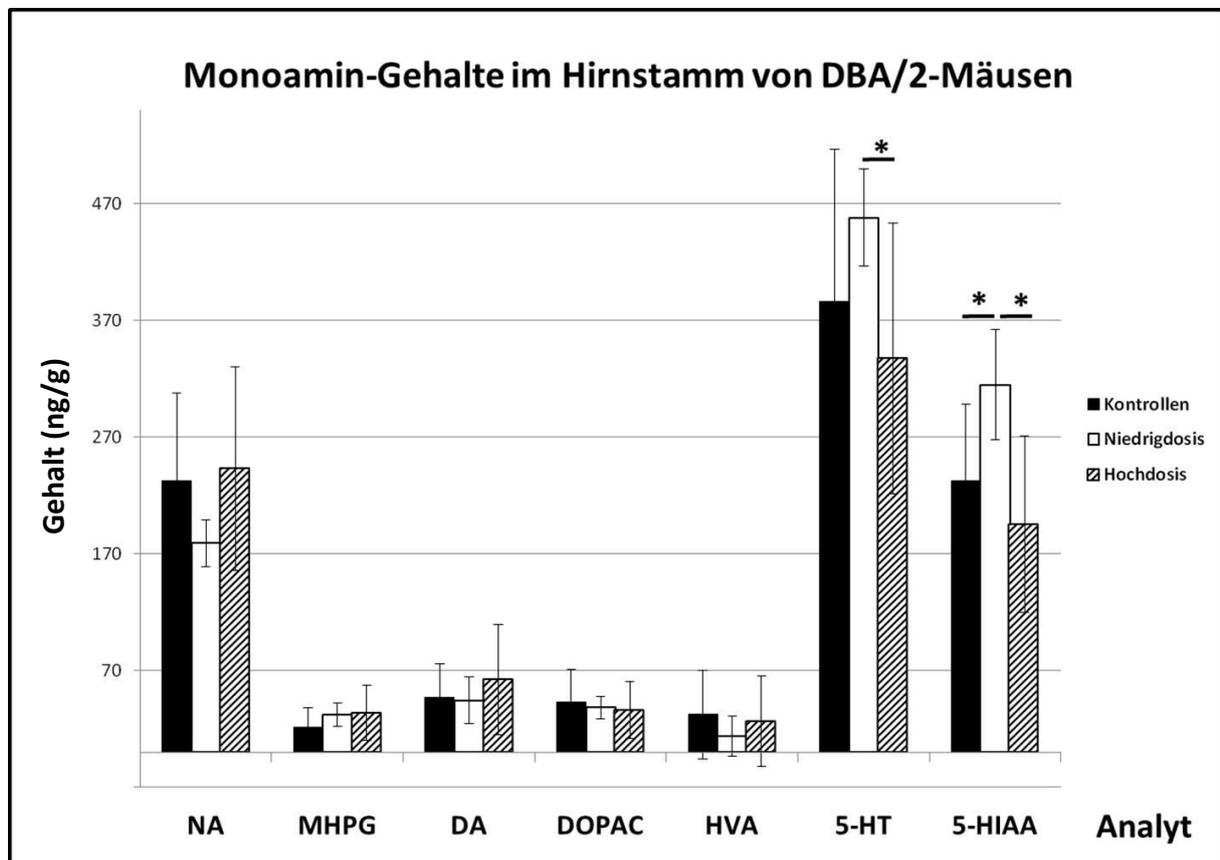


Abbildung 4: Konzentrationsmittelwerte (ng/g; \pm Standardabweichung) der Monoamin-Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT) sowie deren Hauptmetaboliten 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-Dihydroxy-Phenylacetat (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindolacetat (5-HIAA) im Hirnstamm von DBA/2-Mäusen nach einmonatiger Venlafaxin-Applikation (p.o.) in verschiedenen Dosierungen: Kontrollen 0 mg/kg/d - schwarz (n = 11), Niedrigdosis 30 mg/kg/d - weiß (n = 10), Hochdosis 100 mg/kg/d - schraffiert (n = 10); zu $p = 0,05$ signifikante Differenzen sind mit * markiert (Mann-Whitney-U-Test)

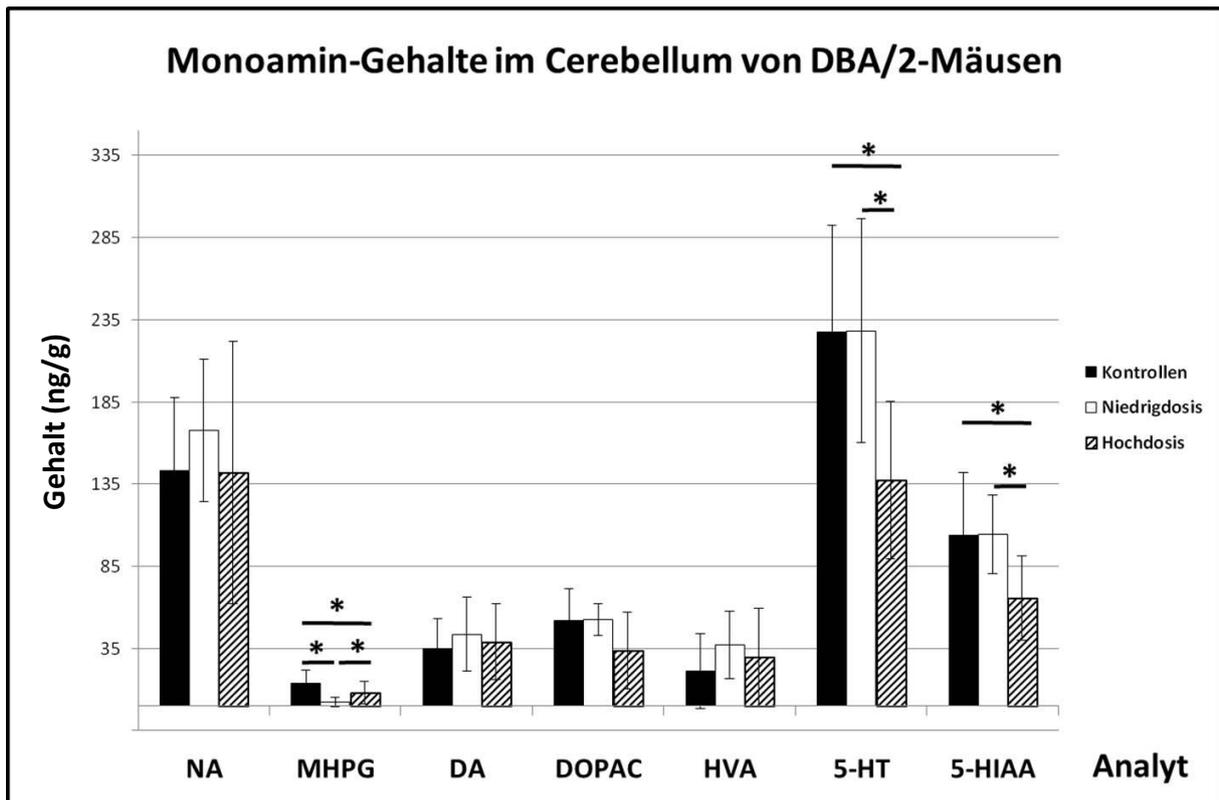


Abbildung 5: Konzentrationsmittelwerte (ng/g; \pm Standardabweichung) der Monoamin-Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT) sowie deren Hauptmetaboliten 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-Dihydroxy-Phenylacetat (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindolacetat (5-HIAA) im Cerebellum von DBA/2-Mäusen nach einmonatiger Venlafaxin-Applikation (p.o.) in verschiedenen Dosierungen: Kontrollen 0 mg/kg/d - schwarz (n = 11), Niedrigdosis 30 mg/kg/d - weiß (n = 10), Hochdosis 100 mg/kg/d - schraffiert (n = 10); zu $p = 0,05$ signifikante Differenzen sind mit * markiert (Mann-Whitney-U-Test)

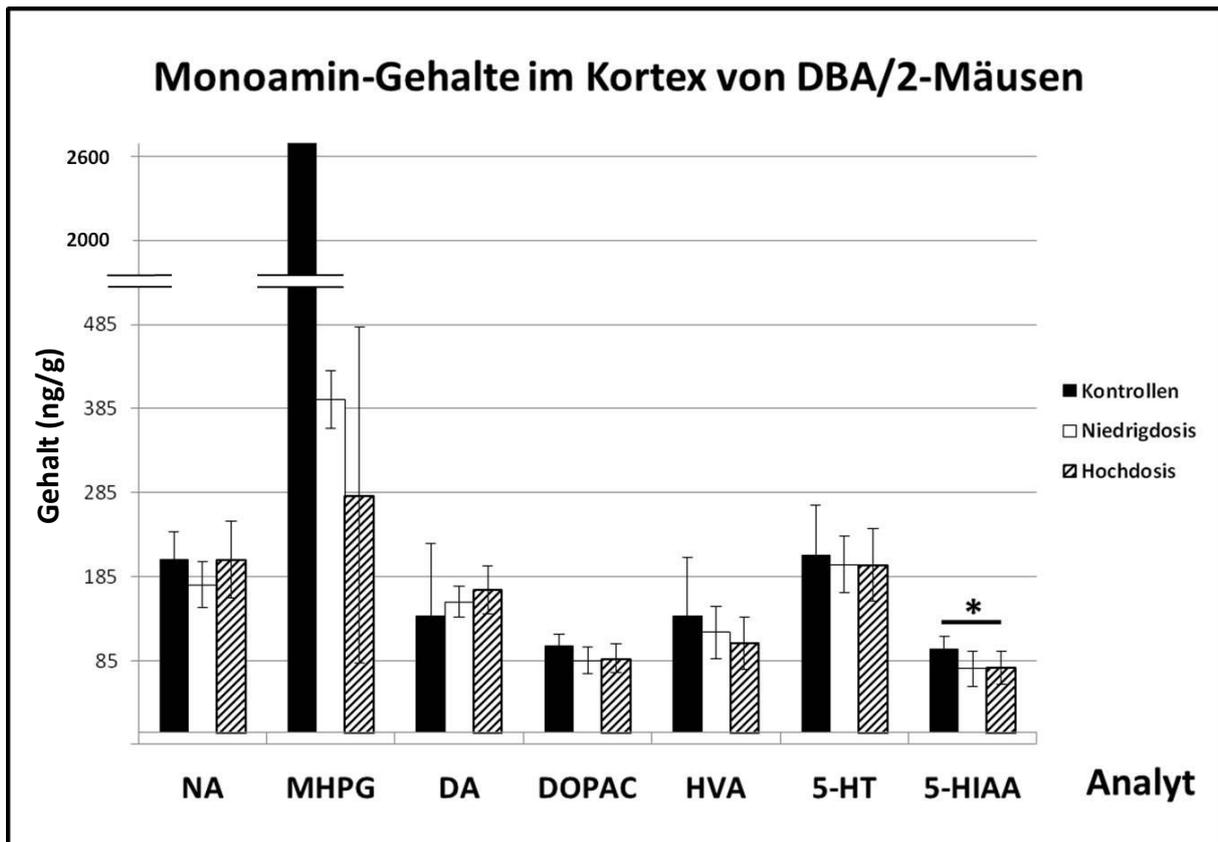


Abbildung 6: Konzentrationsmittelwerte (ng/g; \pm Standardabweichung) der Monoamin-Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT) sowie deren Hauptmetaboliten 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-Dihydroxy-Phenylacetat (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindolacetat (5-HIAA) im Kortex von DBA/2-Mäusen nach einmonatiger Venlafaxin-Applikation (p.o.) in verschiedenen Dosierungen: Kontrollen 0 mg/kg/d - schwarz (n = 11), Niedrigdosis 30 mg/kg/d - weiß (n = 10), Hochdosis 100 mg/kg/d - schraffiert (n = 10); zu $p = 0,05$ signifikante Differenzen sind mit * markiert (Mann-Whitney-U-Test)

3. Genexpressionsuntersuchungen

3.1. Microarray-Analyse (muriner Hippokampus)

Jeder Behandlungsgruppe waren zehn Mäuse zugeordnet, das in der Lieferung überzählige Tier wurde der Kontrollgruppe zugeteilt.

Die Microarray-Untersuchung auf differentielle Genexpression im Hippokampus infolge von Venlafaxin-Applikation wurde in den drei Dosisgruppen der männlichen DBA/2-Mäuse durchgeführt. Die Hippokampi wurden hemisphärengetrennt aus den Gehirnen präpariert und die RNA extrahiert. Für die Array-Hybridisierung wurden die RNA-Extrakte der gleichen Hemisphären in Abhängigkeit von den Behandlungsgruppen gepoolt (siehe Tabelle 12). Zunächst wurden sechs Chips untersucht (Chips 1 - 6).

DBA/2-Mäuse (♂)	rechte Hemisphäre	linke Hemisphäre
Kontrollgruppe	Tiere 1 - 5 (Chip 1)	Tiere 6 - 11 (Chip 2)
Niedrigdosisgruppe	Tiere 1 - 5 (Chip 3)	Tiere 6 - 10 (Chip 4)
Hochdosisgruppe	Tiere 1 - 5 (Chip 5)	Tiere 6 - 10 (Chip 6)

Tabelle 12: Pooling-Schema der RNA-Extrakte aus den Hippokampi der DBA/2-Mäuse für die ersten sechs Chips der Microarray-Untersuchung (Chip 1 - 6)

Bei der Auswertung der sechs Chips zeigte sich in der zweidimensionalen Korrespondenzanalyse eine teils erratische Verteilung bezüglich der Einflussvarianz "Venlafaxin-Dosis" (Abbildung 7). Zwecks übersichtlicher Veranschaulichung werden in den Darstellungen der Korrespondenzanalysen anstatt der Gen-Cluster die Chips gezeigt.

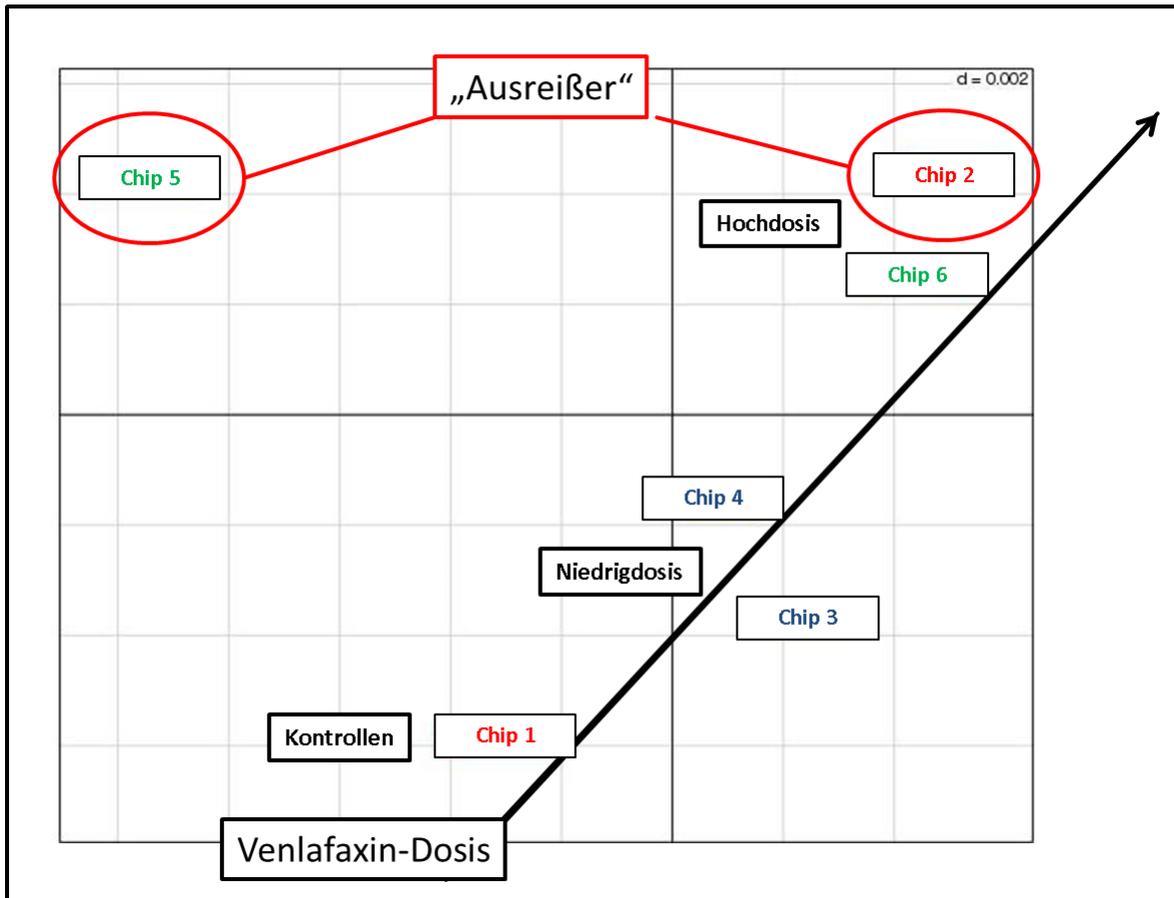


Abbildung 7: zweidimensionale Korrespondenzanalyse der ersten Microarray-Untersuchung (Chip 1 - 6), modifizierte Originaldaten; Chip 1 (n = 5) und 2 (n = 6): Kontrolltiere, Chip 3 und 4 (n je 5): Niedrigdosistiere, Chip 5 und 6 (n je 5): Hochdosistiere; Gerade: Korrelation von Venlafaxin-Dosis und Chip-Verteilungsmuster - Chip 2 und Chip 5 wurden aufgrund der Verteilung als Ausreißer definiert

Vor diesem Hintergrund wurden zwei weitere Chips (Chip 7 und Chip 8) vermessen, um Chip 2 und Chip 5 in der Analyse zu ersetzen. Sie waren beschickt mit den Hippokampus-RNA-Extrakten der kontralateralen Hemisphären der auf Chip 1 und Chip 6 analysierten Tiere. Damit war in der Kontroll- und der Hochdosisgruppe jeweils eine Anzahl von fünf Tieren enthalten, von denen jeweils der Hippokampus der linken und rechten Hemisphäre per Microarray analysiert wurde (siehe Tabelle 13).

DBA/2-Mäuse (♂)	rechte Hemisphäre	linke Hemisphäre
Kontrollgruppe	Tiere 1 - 5 (Chip 1)	Tiere 1 - 5 (Chip 7)
Niedrigdosisgruppe	Tiere 1 - 5 (Chip 3)	Tiere 6 - 10 (Chip 4)
Hochdosisgruppe	Tiere 6 - 10 (Chip 8)	Tiere 6 - 10 (Chip 6)

Tabelle 13: Pooling-Schema der RNA-Extrakte aus den Hippokampi der DBA/2-Mäuse für die Chips zur Microarray-Untersuchung der Genexpression nach Venlafaxin-Applikation

Abbildung 8 stellt die Verteilung dieser Chips in der zweidimensionalen Korrespondenzanalyse dar.

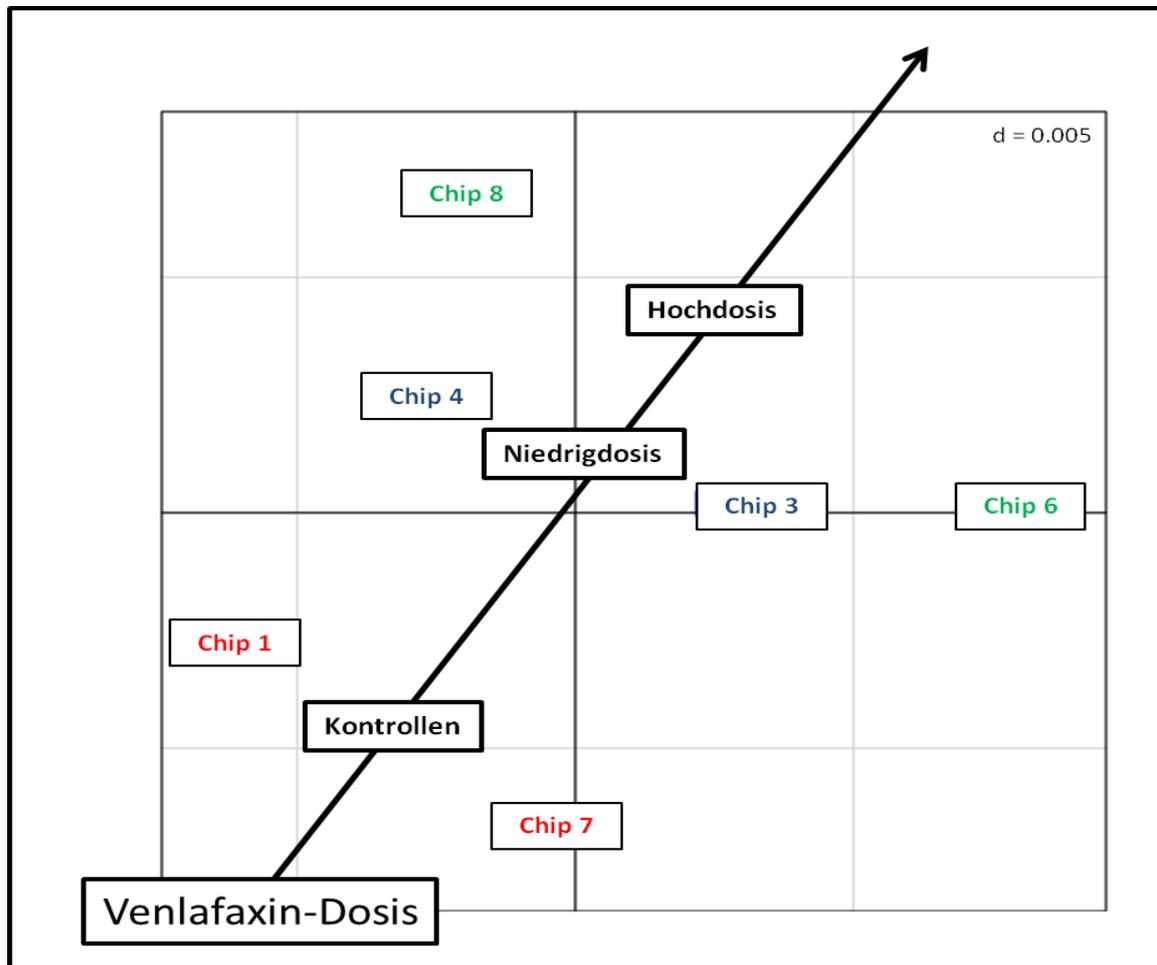


Abbildung 8: zweidimensionale Korrespondenzanalyse nach Analyse von zwei weiteren Chips (Chips 7 und 8), modifizierte Originaldaten; Chip 1 und 7 (n je 5): Kontrolltiere, Chip 3 und 4 (n je 5): Niedrigdosistiere, Chip 6 und 8 (n je 5): Hochdosistiere; Gerade: Korrelation von Venlafaxin-Dosis und Chip-Verteilungsmuster

Zu der Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden innerhalb der Behandlungsgruppen die Expressionswerte der Hippokampi aus rechter und linker Hemisphäre gepoolt und mittels t-Test jeweils zwei Gruppen miteinander verglichen. Die Untersuchung lieferte für den Vergleich zwischen Kontroll- und Niedrigdosisgruppe sowie Kontroll- und Hochdosisgruppe eine Liste signifikant differentiell exprimierter Gene (siehe Tabellen 14 und 15). Insgesamt zeigte die Microarray-Analyse zwischen Kontroll- und Niedrigdosistieren 28 mit $p < 0,05$ ("adj.P.Val", adjusted p-value) signifikant regulierte Gene, zwischen Kontroll- und Hochdosisgruppe wurden 122 signifikant differentielle Transkript-Abundanzen gefunden.

Aus diesen Listen wurden aufgrund ihrer biologischen Relevanz die signifikant differentiell exprimierte Gene *Arc*, *Camk2d*, *Dusp1*, *Egr2*, *Fos*, *Mef2c*, *Nfil3*, *Nr4a1*, *Prkacb* für die Validierung per qRT-PCR ausgewählt. Fünf dieser Gene (*Arc*, *Dusp1*, *Egr2*, *Fos*, *Nr4a1*) waren in beiden Verumgruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant differentiell exprimiert, eines (*Mef2c*) nur in der Niedrigdosisgruppe und drei der Gene (*Camk2d*, *Nfil3*, *Prkacb*) lediglich in der Hochdosisgruppe. Ausführungen zu der biologischen Relevanz dieser Gene im Kontext der vorliegenden Arbeit sowie entsprechende Literaturangaben befinden sich im Diskussionsteil.

ID	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	gene.symbol
1427683_at	-0,82	8,26	-8,62	1,37E-10	6,19E-06	Egr2
1418687_at	-0,74	10,07	-8,19	4,97E-10	1,12E-05	Arc
1427682_a_at	-0,73	8,03	-7,51	4,13E-09	5,05E-05	Egr2
1416505_at	-0,66	10,72	-7,49	4,47E-09	5,05E-05	Nr4a1
1450794_at	1,06	8,29	7,29	8,23E-09	7,42E-05	Avp
1423100_at	-0,55	10,74	-5,95	5,97E-07	2,99E-03	Fos
1427122_at	-0,54	8,39	-5,84	8,47E-07	3,82E-03	Copg2as2
1429169_at	-0,49	8,18	-5,61	1,75E-06	6,26E-03	Rbm3
1448830_at	-0,48	10,35	-5,22	6,10E-06	1,62E-02	Dusp1
1452160_at	-0,44	9,05	-5,00	1,24E-05	2,79E-02	Tiparp
1425833_a_at	0,45	11,95	4,98	1,33E-05	2,85E-02	Hpca
1416711_at	-0,44	9,37	-4,95	1,45E-05	2,97E-02	Tbr1
1451506_at	-0,46	10,31	-4,79	2,38E-05	4,30E-02	Mef2c
1451961_a_at	0,51	10,73	4,76	2,65E-05	4,42E-02	Mbp
1436750_a_at	-0,43	11,75	-4,72	2,96E-05	4,76E-02	Oxct1

Tabelle 14: Originaldaten (Auszug) des Vergleichs der Expression in Hippokampi der Kontroll- und der Niedrigdostiere (n je 10 Proben); gelistet sind Gene deren differentielle Expression mit einem $p < 0,05$ gefunden wurde; hinterlegt sind Gene die in Folge mittels qRT-PCR validiert wurden; ID: Identifikationsbezeichnung des Gens auf Affymetrix-Chips; logFC: logarithmierter "Fold Change" der Genexpression im Vergleich der Niedrigdosis- zu den Kontrolltieren

ID	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	gene.symbol
1427683_at	-0,84	8,26	-9,80	4,23E-12	8,90E-08	Egr2
1460613_x_at	0,92	7,12	9,68	5,92E-12	8,90E-08	Gh
1423100_at	-0,59	10,74	-7,11	1,47E-08	7,36E-05	Fos
1452378_at	-0,55	9,02	-6,87	3,13E-08	1,41E-04	Malat1
1437107_at	-0,54	10,16	-6,82	3,72E-08	1,52E-04	Rab6b
1454725_at	-0,52	10,61	-6,57	8,06E-08	2,80E-04	Tra2a
1416505_at	-0,51	10,72	-6,44	1,22E-07	3,66E-04	Nr4a1
1418687_at	-0,50	10,07	-6,17	2,93E-07	8,25E-04	Arc
1418932_at	-0,48	8,47	-6,00	4,99E-07	1,25E-03	Nfil3
1440290_at	-0,47	8,25	-5,67	1,44E-06	2,61E-03	Gm10010
1429169_at	-0,45	8,18	-5,66	1,51E-06	2,63E-03	Rbm3
1448830_at	-0,42	10,35	-5,10	8,87E-06	8,89E-03	Dusp1
1446607_at	-0,41	8,13	-5,08	9,65E-06	9,47E-03	Mtap7
1455599_at	-0,39	10,97	-4,83	2,10E-05	1,70E-02	Gfod1
1438494_at	-0,36	8,59	-4,37	8,82E-05	4,10E-02	Hrh1
1420610_at	-0,35	8,13	-4,36	9,04E-05	4,20E-02	Prkacb
1422659_at	-0,34	8,92	-4,33	1,00E-04	4,20E-02	Camk2d
1457344_at	-0,34	7,83	-4,32	1,04E-04	4,30E-02	Neto2
1440148_at	-0,42	7,99	-4,31	1,06E-04	4,30E-02	Gpr6

Tabelle 15: Originaldaten (Auszug) des Vergleichs der Expression in Hippokampi der Kontroll- und der Hochdosistiere (n je 10 Proben); gelistet sind Gene deren differentielle Expression mit einem $p < 0,05$ gefunden wurde; hinterlegt sind Gene die in Folge mittels qRT-PCR validiert wurden, ID: Identifikationsbezeichnung des Gens auf Affymetrix-Chips; logFC: logarithmierter "Fold Change" der Genexpression im Vergleich der Hochdosis- zu den Kontrolltieren

3.2. qRT-PCR (muriner Hippokampus)

Die qRT-PCR-Analysen in den Hippokampi der DBA/2-Mäuse in Kontroll-, Niedrig- und Hochdosisgruppe wurden anhand derselben RNA-Extrakte durchgeführt, die bereits auf den Microarray-Chips untersucht worden waren. In der Auswertung der Analysen wurde, wie schon bei den Microarrays, keine Trennung nach Herkunftshemisphäre vorgenommen, sodass in jeder Dosisgruppe jeweils zehn Proben in die Berechnungen einfließen. Zusätzlich wurde gruppenintern auf hemisphärenabhängige Differenzen hin analysiert. In der Kontroll- und Hochdosisgruppe wurde somit die Expression im rechten und linken Hippokampus jeweils eines Individuums in den Vergleich einbezogen, in der Niedrigdosisgruppe jene in unterschiedlichen Tieren. Abbildung 9 stellt die Vergleiche der relativen Expressions-Mittelwerte in den drei Behandlungsgruppen dar.

Die Microarray-Untersuchungen der Expression in den Hippokampi der Mäuse hatten für die Verumgruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe stets eine geringere Expression der anschließend per qRT-PCR untersuchten Gene (*Arc*, *Camk2d*, *Dusp1*, *Egr2*, *Fos*, *Mef2c*, *Nfil3*, *Nr4a1* und *Prkacb*) angezeigt. *Camk2d* und *Prkacb* wurden in der qRT-PCR-Analyse als zwischen den experimentellen Gruppen nicht-differentiell exprimiert gefunden. *Mef2c* zeigte sowohl in der Niedrig- als auch der Hochdosisgruppe signifikant höhere Expression als in der Kontrollgruppe. Für die anderen Gene wurde die Herunterregulation infolge einer Venlafaxin-Applikation in der qRT-PCR-Analyse bestätigt. Für *Nr4a1* wurde in der Hochdosisgruppe im Vergleich zu der Niedrigdosisgruppe eine signifikant höhere Expression gefunden. Bei den übrigen untersuchten Genen beschränkten sich signifikante Unterschiede auf den Vergleich der Kontroll- zu der Niedrig- beziehungsweise zu der Hochdosisgruppe.

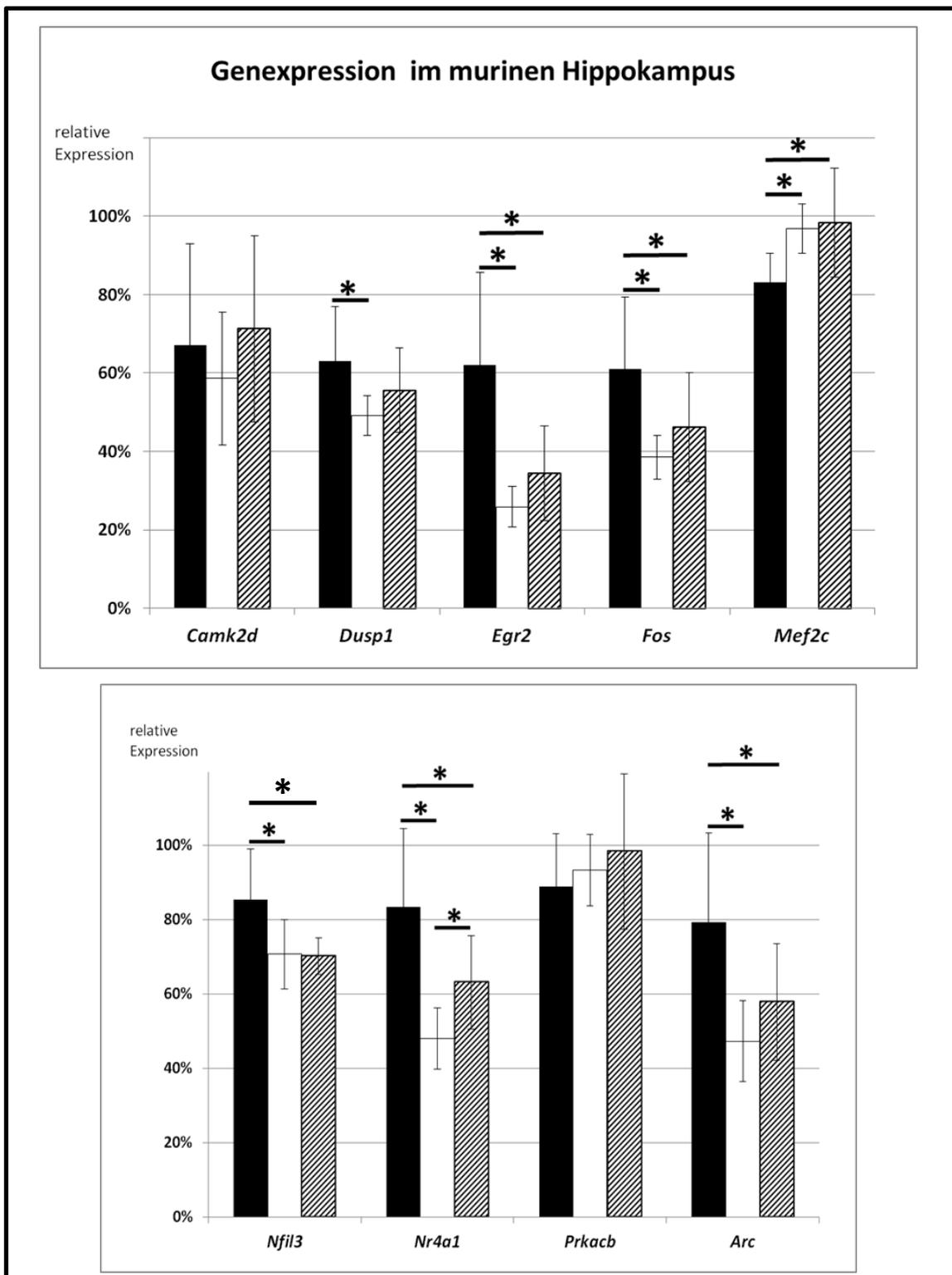


Abbildung 9: Vergleich der relativen Genexpression der per qRT-PCR analysierten Gene (*Camk2d*, *Dusp1*, *Egr2*, *Fos*, *Mef2c*, *Nfil3*, *Nr4a1*, *Prkacb*, *Arc*) in den Hippokampi von DBA/2-Mäusen nach einmonatiger Venlafaxin-Applikation, Mittelwerte mit Standardabweichung; Dosis-Gruppen: schwarz - Kontrollen (0 mg/kg/d), weiß - Niedrigdosis (30 mg/kg/d), schraffiert - Hochdosis (100 mg/kg/d); n jeweils 10 pro Gruppe, Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test, *post hoc* Mann-Whitney-U-Test; x-Achse: untersuchte Gene, y-Achse: relative Expression in Prozent; * kennzeichnet zu $p = 0,05$ signifikante Differenzen

Der gruppen- beziehungsweise tierinterne Vergleich der Expression in den Hippokampi der beiden Hemisphären zeigte in einzelnen Fällen (Kontrolltiere - *Arc* und *Prkacb*, Niedrigdosistiere - *Dusp1*) eine signifikante Differenz auf. Bei Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes wurde die Expression stets in der linken Hemisphäre stärker ausgeprägt gefunden.

Die Wahl der in humanen Leukozyten nach chronischer Venlafaxin-Applikation auf differentielle Expression hin zu untersuchenden Gene fiel anhand der im Vorangegangenen ausgeführten Ergebnisse der Tierstudie auf *Arc*, *Dusp1*, *Egr2*, *Fos*, *Mef2c*, *Nfil3* und *Nr4a1*.

3.3. qRT-PCR (humane Leukozyten)

Die Analyse von *Egr2* und *Nr4a1* zeigte in den Vortestungen der Primerpaare anhand repräsentativer Proben C_q -Werte um 30, was für eine valide Untersuchung als "zu spät" betrachtet wird. In der Praxis der qRT-PCR bedeutet dies, dass initial eine sehr geringe Menge an Template-mRNA vorhanden war. Diese Gene wurden daher im humanen Material nicht analysiert. Ebenso musste auf eine Untersuchung der *Arc*-Expression verzichtet werden, da die Testung mehrerer Primerpaare stets (auch) unspezifische Produkte lieferte und die Quantität der *Arc*-mRNA somit nicht verlässlich bestimmt werden konnte.

Insgesamt wurden 46 Patienten in die Analyse einbezogen. Das durchschnittliche Alter der Patienten in dem Kollektiv lag bei 44,7 Jahren ($SD \pm 17,5$) und der überspannte Bereich zwischen 18 und 82 Jahren. Das Kollektiv bestand aus 22 Frauen und 24 Männern. Die Frauen hatten ein Durchschnittsalter von 42,6 Jahren ($SD \pm 16,6$; Minimum 18 Jahre, Maximum 78 Jahre), die Männer von 46,6 Jahren ($SD \pm 18,4$; Minimum 21 Jahre, Maximum 82 Jahre). Bezüglich des Alters wurde zwischen den Geschlechtern mittels t-Test keine signifikante Differenz festgestellt ($t(44) = -770$; $p = 0,445$).

Analog der Tierstudie wurde nach einmonatiger Venlafaxin-Einnahme in humanen Leukozyten im Gesamtkollektiv für *Fos* eine signifikant geringere Expression gefunden ($t(90) = 2,898$; $p = 0,005$; siehe Abbildung 10). Die Expressionsunterschiede von *Dusp1*, *Mef2c* und *Nfil3* waren nicht signifikant ausgeprägt. Der Vergleich der Expression in Verbindung mit dem Serumsummenspiegel aktiver Substanz zum Zeitpunkt BE XX zeigte eine signifikante Reduktion der *Fos*-Expression lediglich innerhalb des Subkollektivs mit hoher Konzentration ($t(72) = 2,620$; $p = 0,011$; siehe Abbildung 11), nicht jedoch in dem Subkollektiv der neun Patienten mit niedriger Konzentration ($U = 25$; $Z = -1,369$; $p = 0,190$).

In keinem Fall waren signifikante geschlechtsabhängige Expressionsintensitäten innerhalb der beiden Untersuchungszeitpunkte BE X und BE XX zu beobachten. Zwischen den Zeitpunkten BE X und BE XX war für *Fos* bei den Männern ein Trend zu Signifikanz zu verzeichnen ($t(46) = 1,865; p = 0,070$) während die Herunterregulation bei den Frauen signifikant ausgeprägt war ($t(42) = 2,577; p = 0,014$).

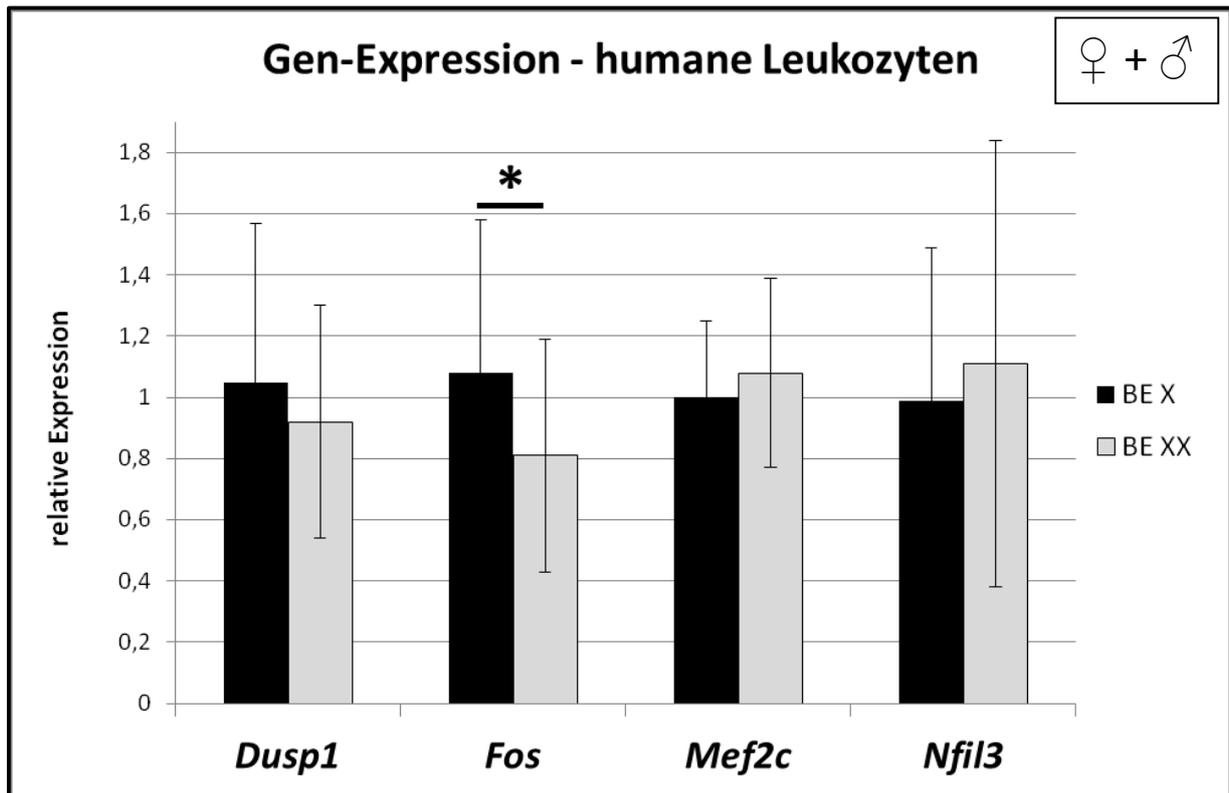


Abbildung 10: Vergleich der relativen Expression (y-Achse, mit Standardabweichung) der Gene *Dusp1*, *Fos*, *Mef2c* und *Nfil3* in Leukozyten von weiblichen und männlichen Patienten zu zwei Zeitpunkten nach Beginn einer Venlafaxin-Pharmakotherapie: BE X 5 - 8 Tage nach Ersteinnahme, BE XX 25 - 32 Tage nach Ersteinahme; n jeweils = 46; nach t-Test zu $p = 0,05$ signifikante Ergebnisse sind mit * gekennzeichnet

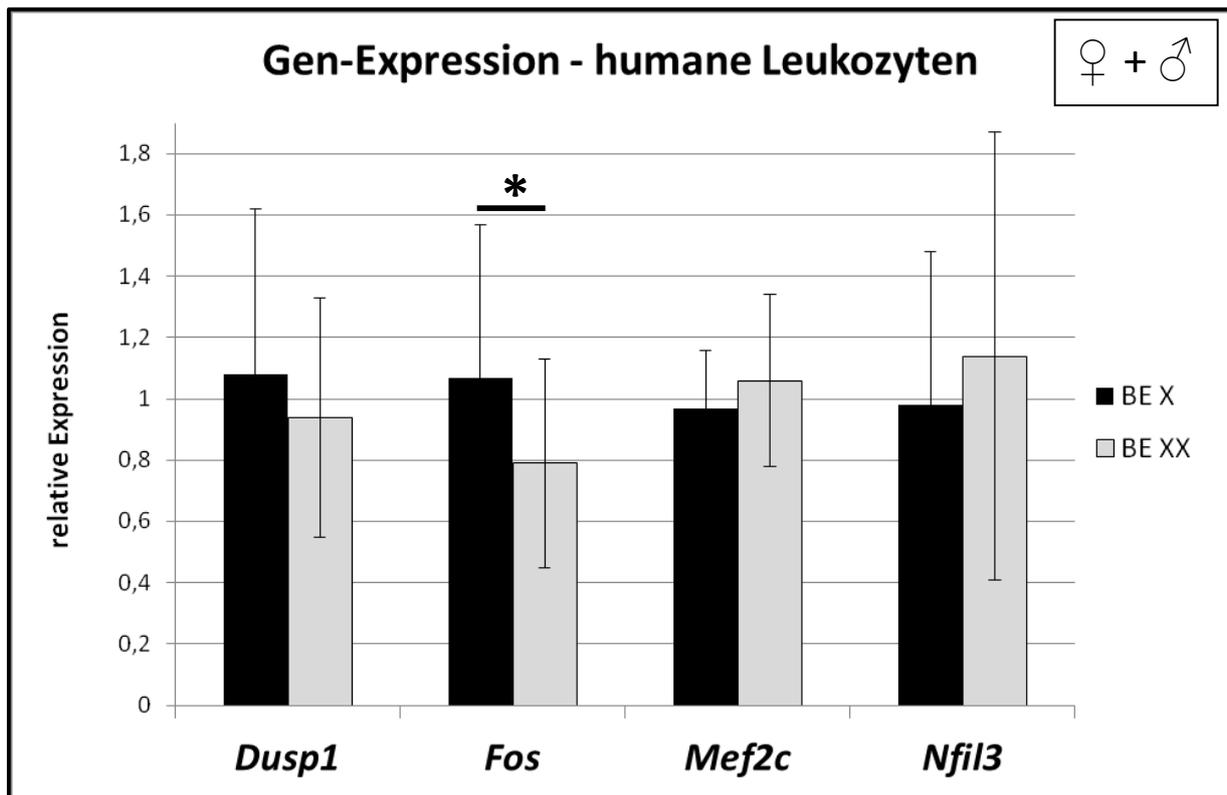


Abbildung 11: Vergleich der relativen Expression (y-Achse, mit Standardabweichung) der Gene *Dusp1*, *Fos*, *Mef2c* und *Nfil3* in Leukozyten von weiblichen und männlichen Patienten im Subkollektiv mit hohem Serumsummenspiegel zum Zeitpunkt BE XX (VEN + ODV > 200 ng/ml) zu zwei Zeitpunkten nach Beginn einer Venlafaxin-Pharmakotherapie: BE X 5 - 8 Tage nach Ersteinnahme, BE XX 25 - 32 Tage nach Ersteinahme; n jeweils = 37; nach t-Test zu $p = 0,05$ signifikante Ergebnisse sind mit * gekennzeichnet

4. Pharmakogenetische Untersuchung am Menschen:

Assoziation von Genotyp, Serumkonzentration und Therapie-Antwort

4.1. Klinische Daten, Serumkonzentrationen und Genotypen sowie Komedikation innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs

In die Untersuchung wurden retro- und prospektiv insgesamt 56 Patienten eingeschlossen. Die deskriptiven Daten des Kollektivs sind den Tabellen 16 (klinische Daten), 17 (Serumkonzentrationen und Genotypen) und 18 (Komedikation) zu entnehmen.

n (gesamt)		56
n (weiblich / männlich)		32 (57,1%) / 24 (42,9%)
Alter in Jahren \pm SD; Bereich		41,57 \pm 14,32; 18 - 74
Diagnose (ICD-10)	depressive Störung (unipolar)	41 (73,2%)
	bipolare affektive Störung	15 (26,8%)
CGI-I (dichotomisiert)	n ("gutes Ansprechen")	26 (46,4%)
	n ("schlechtes Ansprechen")	30 (53,6%)

Tabelle 16: deskriptive Statistik des Patienten-Kollektivs für die Untersuchung des Zusammenhanges von VEN + ODV-Serumkonzentration, *SLC6A2*- und *SLC6A4*-Genotyp und Therapie-Effekt; Angaben: absolute Anzahlen (n), Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD), Bereich oder prozentuale Anteile zu Geschlecht, Alter, Diagnose und dichotomisierten CGI-I-Werten

Insgesamt waren in etwa gleich häufig Frauen und Männer in dem untersuchten Kollektiv vertreten und entsprechend der Epidemiologie ein größerer Prozentsatz der Patienten unipolar als bipolar erkrankt. Nach 30 Tagen hatte ungefähr die Hälfte der Patienten ein gutes Ansprechen auf die Therapie gezeigt.

Die Genotyp-Frequenzen von *SLC6A2* (Gen des Noradrenalin-Transporters) und *SLC6A4* (Gen des Serotonin-Transporters) befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p > 0,1$).

Zwischen den Gruppen der Summenserumkonzentrationen an aktiver Substanz (niedrig, hoch, supra-empfohlen) sowie den Genotypen (niedrig-exprimierend, hoch-exprimierend) wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der eingenommenen Komedikationen festgestellt.

tägliche Venlafaxin-Dosis	Mittelwert (mg/d) \pm SD; Bereich	233,04 \pm 75,58; 75 - 375
	n (\leq 150 mg/d)	16 (28,6%)
	n ($>$ 150 mg/d)	40 (71,4%)
Serumsummenkonzentration (VEN + ODV)	Mittelwert (ng/ml) \pm SD; Bereich	370,70 \pm 181,84; 103 - 862
	n (\leq 200 ng/ml) "niedrig"	12 (21,4%)
	n (201 - 400 ng/ml) "hoch"	21 (37,5%)
	n ($>$ 400 ng/ml) "supra-empfohlen"	23 (41,1%)
SLC6A2	n (AA; "hoch-exprimierend")	26 (46,4%)
	n (AT/TT; "niedrig-exprimierend")	30 (53,6%)
SLC6A4	n (l _A l _A ; "hoch-exprimierend")	14 (25,0%)
	n (l _A l _G / l _G l _G / s _A / s _G / s _s ; "niedrig-exprimierend")	42 (75,0%)

Tabelle 17: deskriptive Statistik des Patienten-Kollektivs für die Untersuchung des Zusammenhanges von VEN + ODV-Serumkonzentration, SLC6A2- und SLC6A4-Genotyp und Therapie-Effekt; Angaben: absolute Anzahlen (n), Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD), Bereiche oder prozentuale Anteile zu täglicher Venlafaxin-Dosis, gemessenen Summenserkonzentrationen sowie in "niedrig-" und "hoch-exprimierend" dichotomisierte SLC6A2- und SLC6A4-Genotypen

Komedikation neben Venlafaxin	Antipsychotikum (z.B. Quetiapin, Aripiprazol)	ja	24 (42,9%)
		nein	32 (57,1%)
	Stimmungstabilisator (z.B. Lamotrigin, Lithium)	ja	20 (35,7%)
		nein	36 (64,3%)
	Benzodiazepin (z.B. Lorazepam)	ja	19 (33,9%)
		nein	37 (66,1%)
	Diuretikum (z.B. Hydrochlorothiazid)	ja	12 (21,4%)
		nein	44 (78,6%)
	L-Thyroxin	ja	5 (8,9%)
		nein	51 (91,1%)
	orales Kontrazeptivum	ja	4 (7,1%)
		nein	52 (92,9%)
	β -Blocker (Metoprolol, Bisoprolol)	ja	8 (14,3%)
		nein	48 (85,7%)
Antidiabetikum (Metformin)	ja	2 (3,6%)	
	nein	54 (96,4%)	
Protonenpumpenhemmer (Pantoprazol)	ja	5 (8,9%)	
	nein	51 (91,1%)	
	keine Komedikation		8 (14,29%)
Nebenwirkungen	ja		10 (17,9%)
	nein		46 (82,1%)

Tabelle 18: deskriptive Statistik des Patienten-Kollektivs für die Untersuchung des Zusammenhanges von VEN + ODV-Serumkonzentration, SLC6A2- und SLC6A4-Genotyp und Therapie-Effekt; Angaben: absolute Anzahlen und prozentuale Anteile zu den von den Patienten neben Venlafaxin eingenommenen Komedikationen sowie der Häufigkeit beobachteter unerwünschter Nebenwirkungen

4.2. Therapie-Antwort und *SLC6A2*- / Noradrenalin-Transportergen-Polymorphismus

Im Gesamtkollektiv der 56 Patienten waren keine signifikanten Assoziationen der symptomatischen Veränderung (CGI-I, "gutes Ansprechen" oder "schlechtes Ansprechen") mit dem Genotyp des *SLC6A2* SNP rs28386840 ($\chi^2 = 0,249$; $df = 1$; $p = 0,618$) oder der Serumkonzentration aktiver Substanz ($\chi^2 = 0,522$; $df = 2$; $p = 0,770$) zu erkennen.

Auch in den drei nach Summenserumkonzentration aus Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin stratifizierten Untergruppen mit niedrigen, hohen beziehungsweise supra-empfohlenen Konzentrationen zeigte der *SLC6A2*-Polymorphismus rs28386840 keine signifikante Assoziation mit der Veränderung der depressiven Symptomatik.

4.3. Therapie-Antwort und *SLC6A4*- / Serotonin-Transportergen-Polymorphismus

Der untersuchte Polymorphismus des für den Serotonin-Transporter kondierenden Gens *SLC6A4* war im Gesamtkollektiv signifikant mit dem Ansprechen assoziiert ($\chi^2 = 4,691$, $df = 1$, $p = 0,030$). Von 14 homozygoten Trägern des l_A -Allels, das heißt dem hochexprimierendem Genotyp, zeigten lediglich drei (ca. 21 %) ein gutes Ansprechen, wohingegen bei den Trägern niedrigexprimierender Genotypen gutes und schlechtes Ansprechen nahezu gleich verteilt gefunden wurden (siehe Abbildung 12).

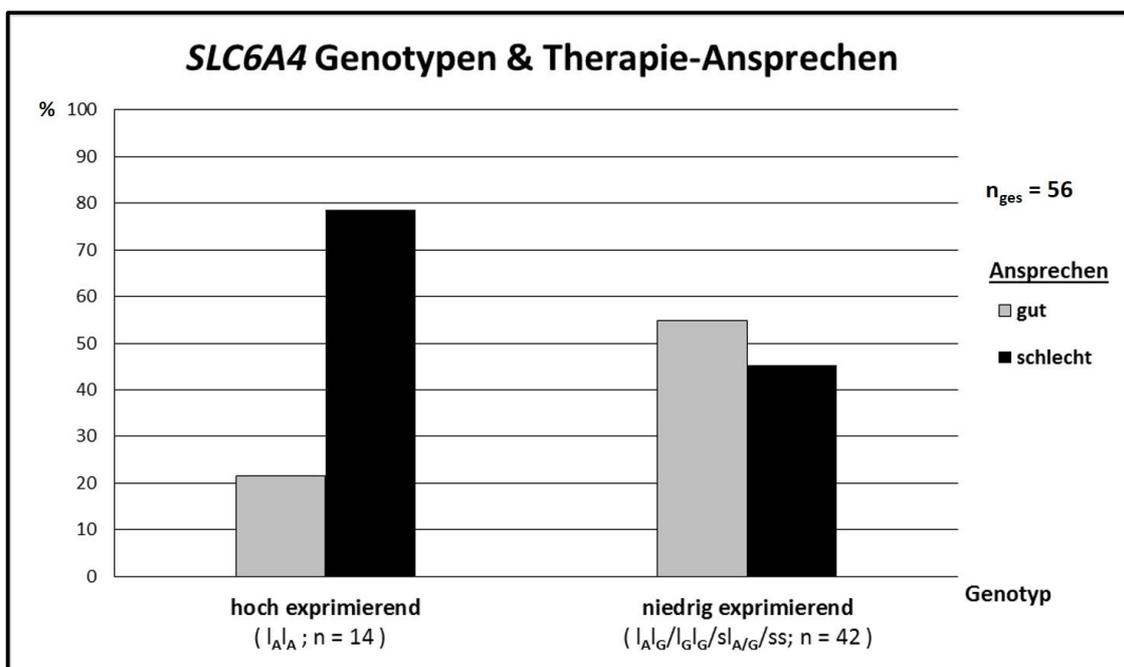


Abbildung 12: prozentuale Verteilung der *SLC6A4*-Expressionsaktivität bei gutem beziehungsweise schlechtem therapeutischem Ansprechen auf einmonatige Venlafaxin-Applikation
n (gesamt) = 56; $p = 0,030$

In den nach Serumkonzentration stratifizierten Unterkollektiven mit niedrigem und supraempfohlenem Spiegel war die Expressionsaktivität nicht signifikant mit den dichotomisierten CGI-I-Werten assoziiert (siehe Tabelle 19).

Bei Patienten, die eine hohe Konzentration von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin aufgebaut hatten, war die Expressionsaktivität signifikant mit der Therapie-Antwort assoziiert (siehe Tabelle 19). So hatten sämtliche fünf Träger des homozygoten l_A -Allels ein schlechtes Ansprechen gezeigt, wohingegen in der Gruppe der Träger mindestens eines niedrigexprimierenden Allels sowohl gutes als auch schlechtes therapeutisches Ansprechen bei etwa der Hälfte der Patienten zu beobachten war.

<u><i>SLC6A4</i></u>		<u>niedrige SSK</u>	<u>hohe SSK</u>	<u>supra SSK</u>
n		12	21	23
n (guter / schlechter Effekt)		5 / 7	9 / 12	12 / 11
l_{AA} (hochexprimierend)	n / % (gut)	0 / 0,0 %	0 / 0 %	3 / 37,5 %
	n / % (schlecht)	1 / 100,0 %	5 / 100 %	5 / 62,5 %
$l_{AG} / sl_A / sl_G / ss$ (niedrigexprimierend)	n / % (gut)	5 / 45,5 %	9 / 56,3 %	9 / 60,0 %
	n / % (schlecht)	6 / 54,5 %	7 / 43,8 %	6 / 40,0 %
<i>p</i> (Exakter Test nach Fisher)		0,583	0,039*	0,278

Tabelle 19: deskriptive Statistik nach Kreuztabellenanalyse und Ergebnisse des Exakten Tests nach Fisher in serumkonzentrationsbasierten Subkollektiven (niedrige / hohe / supra-empfohlene Serumsummenkonzentration, SSK) für den Zusammenhang der *SLC6A4*-Expressionsaktivität mit dichotomisierten CGI-I-Werten; gelistet sind die Umfänge der Unterkollektive (n) und Prozentangaben; * markiert Signifikanz zu $p = 0,05$

IV. Diskussion

1. Identifizierung potentieller genetischer Korrelate des antidepressiven Effektes von Venlafaxin

Im Zuge einer antidepressiven Pharmakotherapie differentiell exprimierte Gene können Hinweise auf physiologische Veränderung geben, die den gewünschten Effekt auf klinischer Ebene widerspiegeln beziehungsweise beinhalten. Aktuell gängige Antidepressiva üben pharmakodynamisch eine Wiederaufnahme-Inhibition der Monoamin-Neurotransmitter Serotonin und / oder Noradrenalin aus und es wird davon ausgegangen, dass durch die resultierende Intensivierung der transsynaptischen Kommunikation neuroplastische Prozesse angestoßen werden, die mit Remission einhergehen. Anhand des Monoamin-Wiederaufnahme-Inhibitors Venlafaxin, einem erfolgreich eingesetzten Antidepressivum mit "dosisabhängig" dualem Effekt, sollten Gene identifiziert werden, deren Produkte potentiell Ziele für neue Medikamente darstellen könnten. Ein direkter Eingriff in die antidepressive Mechanik unter Umgehung des monoaminergen Transmissionsystems könnte einen rascheren und verlässlicheren Wirkungseintritt gewährleisten und somit die Effektivität antidepressiver Pharmakotherapie steigern.

Dieses Ziel wurde über zwei Ebenen verfolgt. Zunächst wurde Venlafaxin über einen Zeitraum von einem Monat an Mäuse gegeben und ihr Hippokampus, die Kontrollinstanz zwischen externen Bedingungen und der Manifestierung von Lernverhalten sowie emotionaler Interpretation per Microarray auf differentiell exprimierte Gene gescannt. Nach Validierung ausgewählter Kandidatengene mittels qRT-PCR wurden diese Gene in Leukozyten von Patienten in Venlafaxin-Therapie auf differentielle Expression nach einmonatiger Einnahme untersucht.

1.1. Venlafaxin- und O-Desmethylvenlafaxin-Konzentrationen im murinen Gehirn

DBA/2-Mäuse hatten über einen Zeitraum von 30 Tagen drei unterschiedliche, tägliche Mengen Venlafaxin über ihr Trinkwasser aufgenommen (Kontroll-, Niedrigdosis-, Hochdosis-Gruppe).

Die Aufnahme der entsprechenden Mengen sollte durch Anpassung der Venlafaxin-Konzentration im Trinkwasser der Tiere sichergestellt werden. Gewisse, statistisch nicht-signifikante Schwankungen der täglich ingestierten Volumina in den Verumgruppen waren zu

beobachten. Eine Quantifizierung der Trinkwasseraufnahme in der Kontrollgruppe wurde aus ökonomischem Grund nicht durchgeführt, es darf jedoch davon ausgegangen werden, dass auch in dieser Gruppe die täglich konsumierten Volumina nicht zu 100 % konstant und den Verumgruppen vergleichbar waren. Die Etablierung eines *steady state* der Wirkstoffe über den Applikationszeitraum konnte damit erfolgen.

Um zu verifizieren, dass die Wirksubstanzen das Zielorgan erreicht haben und die erwartete differentielle Expression bestimmter Gene durch sie induziert ist, sollten mittels HPLC-FLD ihre Gehalte in mehreren Hirnregionen quantifiziert werden. Zu erwarten wäre eine relativ homogene Verteilung von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin zwischen den untersuchten Arealen gewesen, wobei sich die cerebelläre Konzentration eventuell aufgrund geringerer Zielstruktur-Dichte als niedriger hätte erweisen können als in Kortex und Hirnstamm (Kornhuber et al., 1995; Smith et al., 1997; Kornhuber et al., 1999).

Die analog zu der für die Bestimmung der Serumkonzentrationen eingesetzte analytische Methodik ermöglichte jedoch eine Quantifizierung nicht. Zu den durch Reinsubstanzvermessung bestimmten Retentionszeiten von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin waren in den Gewebeproben Signale vorhanden, allerdings zeigten diese keinen plausiblen Zusammenhang mit den applizierten Dosen. Insbesondere waren in den Kontrollproben Signale vorhanden, obwohl keine Substanz appliziert worden war. Die Frage, worum es sich bei den interferierenden Substanzen handelte und aus welchem Grund sie in offensichtlich schwankenden Quantitäten in den Gewebematerialien präsent waren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Ihre Identifizierung hätte mittels präparativer HPLC und anschließender massenspektrometrischer Analyse, gefolgt von einer Datenbank-Recherche und abschließender Identitätsbestätigung durch Vermessung entsprechender Referenz-Reinsubstanzen erfolgen müssen. Eine Möglichkeit, um in zukünftigen, vergleichbaren Ansätzen eine Quantifizierung durchführen zu können, könnte eine Extraktion und in Folge Aufreinigung und Konzentrierung der Analyten bieten. Dies könnte durch einen *a priori* Einsatz sensitiverer und vor allem spezifischerer Detektionsmethoden, beispielsweise Massenspektrometrie, unterstützt werden (Karlsson et al., 2010; Karlsson et al., 2011).

1.2. Monoamin-Neurotransmitter-Konzentrationen im murinen Gehirn

Die HPLC-ECD-Messungen umfassten Noradrenalin und dessen Metabolit 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG), Dopamin und seine Metaboliten 3,4-Dihydroxy-Phenylacetat (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) sowie Serotonin und dessen Metabolit

5-Hydroxyindol-Essigsäure (5-HIAA). Bestimmt wurden die Gesamtgehalte (intra- + extrazellulär) der Substanzen in den entsprechenden Gewebeproben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Applikation unterschiedlicher Venlafaxin-Dosen insbesondere einen Effekt auf die Gehalte von Serotonin und dessen Metabolit 5-HIAA in allen drei untersuchten Hirnregionen hatte. Im Hirnstamm, dem Ort der primären Synthese von Serotonin ist ein Dosis-Wirkungseffekt zu erkennen. Der Noradrenalin-Metabolit MHPG zeigte sich im Cerebellum differentiell reguliert. Das dopaminerge System wurde nicht moduliert.

Die Konzentration der Wirksubstanzen im Gehirn hatte nicht bestimmt werden können, ein noradrenerger Effekt und noch mehr ein dopaminerges Effekt bedingen jedoch eine deutlich höhere Konzentration an Venlafaxin. Eventuell liegt hierin der Grund für die beobachtete Diskrepanz.

Die Veränderungen der Konzentrationen an Serotonin und Noradrenalin sowie ihrer Metaboliten in den drei Dosisgruppen lassen einen indirekten Rückschluss auf eine Aktivität von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin in den Gehirnen der Versuchstiere zu. Einfluss auf die Monoamin-Gehalte durch Venlafaxin-Applikation war bereits in vorhergegangenen Studien nachgewiesen worden (zum Beispiel Muneoka et al., 2009), Unterschiede in Applikationsdauer und Spezies begrenzen jedoch eine vergleichende Interpretation der Quantitäten. Die beobachteten Veränderungen lassen trotz nicht messbarer Spiegel an Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin im Gehirngewebe den Schluss zu, dass diese zumindest so hoch waren, dass das serotonerge System und in einem geringen Maß auch das noradrenerge System beeinflusst worden sind. Damit übereinstimmend ist auch der Befund, dass in der Niedrigdosisgruppe lediglich 28 Gene, in der Hochdosisgruppe jedoch 122 Gene als signifikant differentiell exprimiert im Vergleich zu der Kontrollgruppe gefunden worden waren.

1.3. Genexpression im murinen Hippokampus

Ziel der Genexpressionsstudie an Mäusen war es, im Hippokampus Gene zu identifizieren die nach chronischer Applikation des sSNRI Venlafaxin in verschiedenen Dosierungen eine differentielle Expression aufweisen. Dosisabhängige Variationen auf Transkriptomebene können Hinweise auf mögliche mechanistische Effekte chronischer Applikation des Psychopharmakons geben. In zahlreichen Untersuchungen waren diverse Zielstrukturen von psychotropen Substanzen identifiziert worden. Es wurde gezeigt, dass verschiedene

Substanzen, die in der Therapie der Depression eingesetzt werden, einen therapeutischen Effekt über verschiedene Mechanismen entfalten können.

Im Rahmen der Tierstudie wurde zunächst das hippocampale Transkriptom der Mäuse nach 30tägiger Venlafaxin-Aufnahme hypothesenfrei mittels Microarray auf differentiell exprimierte Gene gescannt. Anschließend sollten ausgewählte differentiell exprimierte Gene per qRT-PCR-Analyse bezüglich des Grades der Expressionsdifferenzen validiert werden.

1.3.1. Microarray Expressionsanalyse

Venlafaxin führt beim Menschen im klinischen Idealfall nach zwei- bis vierwöchiger Applikation zum Eintreten des gewünschten antidepressiven Effektes, sodass angenommen werden muss, dass in diesem Zeitraum physiologische Veränderungen vonstatten gehen. Es ist somit davon auszugehen, dass mit der Untersuchung nach 30 Tagen alle klinisch relevanten Veränderungen detektiert wurden. Dabei fällt auf, dass sich unter den differentiell exprimierten Genen keine direkt und exklusiv mit dem serotonergen beziehungsweise noradrenergen Transmissionssystem assoziierten Gene befinden, sondern Gene, die nicht unmittelbar zu diesen Systemen gehören und damit in der Tat neue Ansätze eröffnen könnten.

1.3.2. qRT-PCR Expressionsanalyse

Venlafaxin induziert bei chronischer Applikation unter anderem eine Expressionsregulation von Genen, deren Proteinprodukte in vorangegangenen Studien als Faktoren neuronaler Aktivität und Plastizität beziehungsweise von Gedächtnisbildung und Lernverhalten identifiziert worden waren.

Die Expression von *Arc* wird durch synaptische Aktivität induziert, es handelt sich um ein neuronales "early response gene" (Fosnaugh et al., 1995). *Arc* wurde als Regulator des Notch-Pathways identifiziert, welcher beteiligt ist an neuronaler Differenzierung und Plastizität (Alberi et al., 2011). *Arc*-knock-out (ko)-Mäuse zeigen eine im Vergleich zu Wildtyp (wt)-Mäusen reduzierte Gesamtzahl an dendritischen Dornfortsätzen (Peebles et al., 2010) und erwiesen sich in verschiedenen Lernparadigmen als unfähig zu der Konsolidierung von neuen Inhalten im Langzeitgedächtnis (Plath et al., 2006).

In einer Tierstudie ließen Mäuse, in deren Hippokampus *Dusp1* überexprimiert worden war, depressions-ähnliches Verhalten erkennen. In Mäusen, deren hippocampale *Dusp1*-Expression nach "chronischem unvorhersehbaren Stress" ("chronic unpredictable stress",

CUS), einem Depressionsmodell, als erhöht gefunden worden war, reduzierte chronische Fluoxetin-Applikation sowohl das depressions-ähnliche Verhalten als auch die *Dusp1*-Expression (Duric et al., 2010). Diese Befunde assoziieren *Dusp1* direkt mit depressiver Erkrankung und die Expressionsreduktion mit Remission.

Egr2 kodiert für einen Zink-Finger-Wachstumsfaktor, der Teil von zellulären Proliferationsvorgängen ist (Joseph et al., 1988). Hippokampal fanden sich nach LTP-induzierender Stimulation deutlich erhöhte Gehalte an *Egr2*-mRNA und deutlich sowie langanhaltend des translatierten Proteins (Williams et al., 1995). Untersuchungen an adulten Mäusen mit konditional-neuronalem *Egr2*-ko im Vorderhirn mittels Verhaltens-, Gedächtnis- und Lernparadigmen ließen keine negativen Auswirkung im Vergleich zu den Kontrolltieren erkennen. Vielmehr zeigten die ko-Mäuse schnelleres motorisches Lernen und verbessertes Wiedererkennungsvermögen (Poirier et al., 2007).

Der Transkriptionsfaktor *Mef2c* ist „downstream target“ des MAP-Kinase Signalweges (Han et al., 1997). Im ZNS und speziell im Hippokampus reguliert *Mef2c* die Morphogenese von Dendriten, die Differenzierung post-synaptischer Strukturen und die Zahl exzitatorischer Synapsen. Vor diesem Hintergrund konnte in Nagetieren gezeigt werden, dass es an Lernvorgängen und der Ausbildung von Gedächtnis beteiligt ist (Barbosa et al., 2008; Flavell et al., 2008; Li et al., 2008; Akhtar et al., 2012). *Mef2c* wurde als ein Induktor von BDNF identifiziert (Lyons et al., 2012).

Der Transkriptionsfaktor *Nfil3* wurde ursprünglich als exklusiv in T-Zellen exprimiert angesehen, mittlerweile ist nachgewiesen worden, dass *Nfil3* auch neuronal exprimiert wird und dort während regenerativer Prozesse beziehungsweise neuroprotektiv aktiv ist (MacGillavry et al., 2009; Tamai et al., 2013). Des Weiteren wurde *Nfil3* als Transkriptionsfaktor identifiziert, der an der Ausbildung circadianer Rhythmen im Zusammenspiel mit zahlreichen weiteren Faktoren beteiligt ist (Mitsui et al., 2001; Ueda et al., 2005; Ohno et al., 2007). Abnorme circadiane Rhythmen wurden mit depressiver Symptomatik assoziiert. Nach *Nfil3*-Überexpression wurde eine im Vergleich zum Wildtyp verkürzte circadiane Periodik beobachtet (Yamajuku et al., 2011).

Das „immediate-early gene“ (IEG) *Nr4a1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription zahlreicher metabolismus-assoziiertes Gene in verschiedenen Geweben (Muskulatur, Fettgewebe, Herz, Gehirn, Leber) induzieren und damit Einfluss auf metabolische Funktionen ausüben kann (Pearen und Muscat, 2010). *Nr4a1*, ein sogenannter "orphan"-Rezeptor, ist ohne gebundenen Liganden aktiv (Zhao und Bruemmer, 2010). Eine Transkriptionsinduktion wurde nach Aktivierung membranständiger Serotonin-Rezeptoren

beobachtet (Gervais et al., 1999), sodass die Intensivierung der Transmission über diesen indirekten Mechanismus das Potential besitzt, Physiologie und Metabolismus von serotonergen Neuronen zu beeinflussen. Die Induktion durch "nerve growth factor" (Fahrner et al., 1990) weist auf eine Beteiligung an physiologischen Vorgängen im Zusammenhang mit neuronaler Differenzierung, Regenerierung sowie enzymatischer Neurotransmitter-Synthese hin (Thoenen et al., 1981; Yankner und Shooter, 1982; Heumann et al., 1987).

Das IEG *Fos* kodiert für eine Transkriptionsfaktor-Untereinheit, es ist beteiligt an der Umsetzung synaptischer Plastizität und kann damit eine Rolle bei Lernvorgängen sowie Gedächtnisbildung spielen (Greenberg und Ziff, 1984; Morgan und Curran, 1991; Yasoshima et al., 2006; Kemp et al., 2013). *Fos* verbindet sich dazu mit *Jun* und dieses Heterodimer besitzt im Gegensatz zu *Fos*-Monomeren hohe und spezifische DNA-Sequenz-Affinität (Chiu et al., 1988; Halazonetis et al., 1988).

Aufgrund der unterstützenden Datenlage aus der Literatur wurden daher diese Gene aus den im Microarray signifikant reguliert gefundenen Genen für eine Replikation mittels qRT-PCR ausgewählt.

Die durch Microarray-Analyse identifizierten Kandidatengene, die für die Validierung per qRT-PCR gewählt wurden, hatten durch Venlafaxin-Applikation sämtlich eine signifikant geringere Expression in den Verumgruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe gezeigt. Die qRT-PCR-Analysen bestätigten dies für *Egr2*, *Fos*, *Nr4a1* und *Arc*. Für *Dusp1* und *Nfil3* ließ die Validierung eine Signifikanz nur im Vergleich zwischen Kontroll- und Niedrigdosisgruppe erkennen, nicht jedoch für die Hochdosisgruppe. Die Expression von *Camk2d* und *Prkacb* war laut qRT-PCR nicht differentiell. *Mef2c* zeigte im Gegensatz zu der Microarray-Analyse in den beiden Verumgruppen jeweils eine signifikante Induktion der Expression.

Die beobachteten Diskrepanzen sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Normalisierungsmethoden in den beiden Messungen zurückzuführen, bei denen die Abundanz verschiedener Referenz-Transkripte zugrunde gelegt wurde.

In den humanen Untersuchungen wurden nur Transkripte analysiert, bei denen auch per qRT-PCR eine differentielle Expression gefunden worden war.

Eine Limitation der Untersuchung ist, dass die in der Studie verwendeten Mäuse des DBA/2-Stammes nicht als Depressionsmodell gelten. Da der Vergleich der unterschiedlich mit Venlafaxin behandelten Tiere innerhalb dieses Stammes und nicht zwischen einem Depressionsmodell und einem wildtypischen Stamm durchgeführt wurde, resultieren die

Befunde aus rein pharmakodynamischen Vorgängen. In weiterführenden Untersuchungen könnte bei einer identischen Anzahl von DBA/2-Mäusen beispielsweise durch Anwendung eines chronischen moderaten Stressors ("chronic mild stress"-Paradigma) ein depressionsähnliches Verhalten induziert werden, um dann nach anschließender identischer pharmakologischer Behandlung eine Expressionsanalyse durchzuführen.

In diesem Kontext könnten dann auch vergleichende Verhaltensversuche bezüglich eines antidepressivum-ähnlichen Effektes durchgeführt werden. Damit könnte beurteilt werden, ob die applizierten Venlafaxin-Dosen und die beobachtete differentielle Genexpression mit unterschiedlichem Verhalten in Verbindungen stehen.

1.4. Genexpression in humanen Leukozyten

Aufbauend auf den Resultaten der Tierstudie wurden analog in humanen Leukozyten die als differentiell exprimiert identifizierten Gene mittels qRT-PCR analysiert. Erfolgreich durchgeführt werden konnte diese Untersuchung für die Gene *Dusp1*, *Fos*, *Mef2c* und *Nfil3*.

Egr2 und *Nr4a1* ließen insgesamt und vermutlich gewebespezifisch eine sehr geringe Expression erkennen. Praktisch gesprochen lag in den RNA-Extrakten aus Leukozyten eine derart geringe Menge an *Egr2*- und *Nr4a1*-Transkript als Template vor, dass die Analysen beziehungsweise deren potentielle Ergebnisse auf der Basis praktischer Erfahrung von vornherein als unreliabel eingestuft werden mussten und deshalb nicht durchgeführt wurden. Maßstab hierfür war die Begutachtung der Amplifikationskurven im Zuge der Primervalidierung an einer repräsentativen Probenauswahl.

Dusp1 und *Mef2c* zeigten der Tierstudie entsprechend eine Reduktion beziehungsweise Induktion der Expression, die Differenzen fielen jedoch gering aus. Bei *Nfil3* war nach einmonatiger Venlafaxin-Einnahme im Gegensatz zur Tierstudie eher eine Induktion zu beobachten. Die Unterschiede zu den Ergebnissen der Tierstudie können sich mit den verschiedenen Organismen begründen lassen, aus denen die Proben stammten. Auch wurden unterschiedliche Gewebe analysiert. Im Fall der Tierstudie wurde das genuine Zielorgan untersucht, im Fall der Humanstudie das genuine Objekt.

Für *Fos* konnte im Gesamtkollektiv eine signifikante Herunterregulation der Expressionsrate ermittelt werden. Diese geringere *Fos*-Expression nach Venlafaxin-Applikation über einen Zeitraum von einem Monat zeigt Übereinstimmung mit dem Resultat der Tierstudie.

Bezüglich der Expressionsuntersuchungen ist somit die differentielle Expression des IEG *Fos* als primärer Befund zu betrachten. Sowohl im murinen als auch im humanen Organismus wurde nach einmonatiger Venlafaxin-Exposition eine signifikant reduzierte *Fos*-mRNA-Menge nachgewiesen, wodurch ein Hinweis auf die besondere Rolle dieses Gens beziehungsweise seines Translationsproduktes im Zusammenhang mit der Wirkung von Venlafaxin gewonnen werden konnte.

Hinweise für eine Rolle von *Fos* bei der Entstehung und der Remission depressiver Symptomatik ergeben sich aus Tierstudien. Eine *Fos*-modulierte aktivitätsabhängige BDNF-Induktion (Dong et al., 2006) lässt auf sowohl direkte als auch indirekte Beteiligung an Prozessen neuronaler Funktionen schließen.

In zwei Verhaltensparadigmen war zu beobachten, dass *Fos*-ko-Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren komplexe Aufgaben räumlicher Orientierung (Morris water maze) schwerlich meistern, dass einfache Lernvorgänge (rechts / links in einem T-maze) jedoch nicht betroffen sind (Paylor et al., 1994). Hippokampaler *Fos*-ko resultierte in weiblichen Mäusen in reduziertem Angstverhalten im "elevated-plus maze", wohingegen bei männlichen Mäusen keine signifikante Differenz zu den Kontrolltieren zu beobachten war. Ebenso fand sich bei weiblichen *Fos*-ko-Mäusen im Vergleich zu weiblichen wt-Tieren eine raschere Gewöhnung an einen täglich über 22 aufeinanderfolgende Tage auferlegten "restraint-stress" (Immobilisierung). Dieser war anhand der Glucocorticoid-Blutkonzentration quantifiziert worden. Männliche wt- und *Fos*-ko-Mäuse ließen keine unterschiedliche Habituation erkennen (McQuade et al., 2006). Es scheint also das Geschlecht zumindest bei den untersuchten Mäusen einen Einfluss auf die induzierten Vorgänge zu haben. Beide Befunde mit erhöhter Resilienz unter *Fos*-Expressionsreduktion sind in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass *Fos* unter Antidepressiva-Therapie verhaltensregulierend wirkt. Auch der Geschlechtseffekt wurde in der gleichen Richtung beobachtet.

Eine Studie, in der Ratten (Geschlecht nicht angegeben) postnatal über einen Monat täglich einem "maternal separation"-Paradigma unterzogen wurden, zeigte, dass diese Tiere im Vergleich zu jenen der Kontrollgruppe eine signifikant reduzierte *Fos*-Expression im Hippokampus sowie depressions-ähnliches Verhalten im FST aufweisen. Sowohl die orale Gabe des sSRI Fluoxetin als auch 30-minütiges tägliches Laufband-"Training" an den letzten zehn Tagen des Experimentes führte zu einer Normalisierung der *Fos*-Expression und auch des depressions-ähnlichen Verhaltens (Park et al., 2013). Dieser Befund steht im Kontrast zu

den Beobachtungen bei den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Mäusen. Mögliche Erklärungen sind die Unterschiede bei den Spezies, den verwendeten Paradigmen und den eingesetzten Substanzen.

Alle 46 Patienten der Expressionsstudie hatten Venlafaxin eingenommen und 95 % zeigten laut CGI-I-Beurteilung durch den behandelnden Psychiater nach vierwöchiger Einnahme eine Verbesserung der Symptomatik ("wenig besser" bis "sehr viel besser"). Die Patienten hatten Venlafaxin in unterschiedlichen Dosierungen erhalten und präsentierten ein breites Spektrum an Serumkonzentrationen, es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass im Lauf der Venlafaxin-Therapie über einen Monat eine Dosis- beziehungsweise Serumspiegeltitration anhand der TDM-Analysen bezüglich optimaler Wirkung erfolgt war. Da die Untersuchung in einem klinischen Milieu unter naturalistischen Bedingungen durchgeführt wurde, ist von zahlreichen Faktoren (Komedikation, Lebenswandel des Individuums) neben Venlafaxin auszugehen, die sich auf die Genexpression auswirken könnten. Es darf als höchstwahrscheinlich angenommen werden, dass bei keinen zwei Patienten des Kollektivs identische Voraussetzungen beziehungsweise identische zusätzliche Einflussfaktoren vorlagen. Trotz dieser Einschränkungen wurde *Fos* als signifikant differentiell exprimiert identifiziert, was auf seine Bedeutsamkeit für den Venlafaxin-Effekt hinweist.

Eine Unterteilung der Patienten nach Serumkonzentrationen ließ nur für hohe Spiegel eine signifikante Verringerung der *Fos*-Expression erkennen. Das Ausbleiben eines solchen Resultates bei den Patienten mit niedrigen Spiegeln kann allerdings auch auf die geringe Gruppengröße bei gleichzeitig ausgeprägten Standardabweichungen zurückzuführen sein.

Die Untersuchung der relativen Expression in Abhängigkeit von dem dichotomisierten Therapie-Effekt ließ für keines der untersuchten Gene signifikante Differenzen erkennen. Allerdings war die *Fos*-Expression bei Patienten mit gutem Ansprechen etwas geringer als bei Patienten mit schlechtem Ansprechen. Auch dieser Befund weist auf eine Bedeutung der *Fos*-Expression für den Venlafaxin-Effekt hin.

Aufbauend auf den hiesigen Befunden könnten als weitere Schritte Protein-Quantifizierung und Aktivitätsassays in Betracht gezogen werden, um die Auswirkung reduzierter Expression auf funktionaler Ebene zu untersuchen. Die neuronale Interaktion, die durch die Wiederaufnahme-Inhibition an der Synapse zumindest initial beeinflusst wird und die als essentiell für einen antidepressiven Effekt angesehen wird, ist an Leukozyten nicht gegeben. Allerdings ist Serotonin als Immunmodulator bekannt und bei depressiven Patienten wurden

deutlich geringere Serotonin-Konzentrationen als bei Kontrollpersonen nachgewiesen (Li et al., 2010; Martino et al., 2012). Depressive Symptomatik war mit Veränderungen der Aktivität des Immunsystems assoziiert worden. Als diskutabel ist anzusehen, ob eine Blockade der Serotonin-Aufnahme in periphere Immunzellen direkt zu einer Normalisierung von Cytokin-Konzentrationen beiträgt und Fos in diese Vorgänge involviert ist. Es ist bekannt, dass Venlafaxin-Applikation einen reduzierenden Einfluss auf die Cytokin-Konzentrationen des Blutes ausübt (Kubera et al., 2001; Vollmar et al., 2008; Vollmar et al., 2009). Dies könnte durch Fos-Reduktion vermittelt und damit ein spezifischer Ausgangspunkt für weiterführende, funktionelle Untersuchungen beim Menschen sein.

Ziel der hiesigen Untersuchung war neben der Grundlagenforschung zum Wirkmechanismus von Venlafaxin die Schaffung von Ansätzen für die Entwicklung neuer Antidepressiva. Die ubiquitäre Präsenz und Aktivität von Fos lässt es allerdings fraglich erscheinen, dass gezielte pharmazeutische Herunterregulation der Fos-Aktivität praktikabel ist.

Weiterführende Untersuchungen sollten daher primär andere im Microarray differentiell reguliert gefundene Gene im Hinblick auf ihre Relevanz beim Menschen zum Inhalt haben. Immerhin waren in der Microarray-Analyse mehr als 120 Gene als differentiell exprimiert identifiziert worden, von denen bisher nur neun weiter untersucht worden sind.

2. Personalisierte Pharmakotherapie mit Venlafaxin

Die Untersuchung konnte keine Assoziation des im Promotorbereich des Noradrenalin-Transportergens (*SLC6A2*) liegenden SNP rs28386840 mit der Therapie-Antwort feststellen. Auch in den nach Serumkonzentration an aktiver Substanz stratifizierten Untergruppen war ein Effekt nicht zu finden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass rs28386840 keinen Einfluss auf die Therapie-Antwort bei Venlafaxin hat. Ein vergleichbares Resultat erzielte eine im Jahr 2010 von Baffa et al. durchgeführte Studie, in der rs28386840 in klinisch-naturalistischem Design bezüglich seiner Assoziation mit dem therapeutischen Effekt untersucht worden war. Die Patienten dieser Stichprobe waren allerdings mit diversen Antidepressiva behandelt worden.

Jeweils etwa 50 % der hier untersuchten Patienten waren Träger des zu hoher beziehungsweise niedriger präsynaptischer Noradrenalin-Transporter-Dichte führenden Genotyps. Nahezu 80 % der Patienten hatten einen hohen oder supra-empfohlenen Serumspiegel aus Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin. Es kann daher angenommen werden, dass zumindest bei einem großen Teil der Patienten die noradrenerge Komponente zum Tragen kam. Daher hätte ein Effekt von rs28386840 nachweisbar sein sollen.

Die Genotypisierung von rs28386840 scheint folglich nicht hilfreich für eine Therapiesteuerung.

Im Gegensatz dazu war der untersuchte *SLC6A4*-Polymorphismus mit dem Ansprechen auf Venlafaxin assoziiert. Träger des hochexprimierenden Genotyps 1A1A zeigten signifikant häufiger ein schlechtes Ansprechen. Dies war im Gesamtkollektiv sowie in dem Subkollektiv der Patienten mit hoher Konzentration aktiver Substanzen nachzuweisen. Bei Patienten mit niedrigem Spiegel und jenseits der empfohlenen Konzentration besteht scheinbar kein Einfluss des Polymorphismus, da sowohl bei niedrig- als auch hochexprimierenden Genotypen gute und schlechte Therapie-Antwort in nahezu gleich ausgeprägten Anteilen zu verzeichnen waren.

Neben dem angesichts der prinzipiell möglichen Einflussfaktoren auf Erfolg einer antidepressiven Therapie geringen Umfang der untersuchten Stichprobe, der deren Einbeziehung in die statistische Analyse nicht erlaubte, müssen einige weitere Einschränkungen der Aussagekraft dieser Befunde erwähnt werden.

Die zur Evaluierung der symptomatischen Veränderung genutzte CGI-I-Skala ermöglicht eine rasche und effiziente Erfassung dieses Parameters, gleichzeitig aber sind mit ihr einige Einschränkungen verbunden. Die sechs aussagekräftigen Klassifikationen ermöglichen keine tiefergehende Unterscheidung psychopathologischer Veränderung. Allerdings konnten Jiang und Ahmed (2009) zeigen, dass zwischen der CGI-I-Skala und differenzierenderen Evaluierungsinstrumenten wie der Hamilton Rating Scale for Depression (HAM-D) oder der Montgomery Åsberg Depression Rating Scale (MADRS) zu allen verglichenen Zeitpunkten einer Venlafaxin-Pharmakotherapie signifikante Korrelation besteht. Die CGI-I-Skala erfasst den Gesamtzustand des Patienten ("Global Impression"), sodass die Beurteilung nicht exklusiv auf den Effekt einer einzelnen therapeutischen Intervention bezogen werden kann. Die primäre Diagnose depressiver Symptome und die alleinige Verwendung von Venlafaxin in der antidepressiven Pharmakotherapie richten die CGI-I-Skala jedoch auf diese Parameter aus. Die Beurteilung der Patienten oblag mehreren Psychiatern beziehungsweise Ärzten und diese wurden nicht explizit bezüglich der Konformität ihrer Beurteilungen geschult oder geprüft. Da allerdings lediglich sechs aussagekräftige Kategorien zur Verfügung standen und insbesondere durch Dichotomisierung in gutes oder schlechtes Ansprechen diametrale Kategorien geschaffen wurden, dürfen diese limitierenden Faktoren als entschärft angesehen werden.

Als weitere Limitation bei der Evaluierung des therapeutischen Effektes in Bezug auf Venlafaxin ist die großenteils polypharmazeutische Behandlung der Patienten zu erwähnen. In Abhängigkeit von ihrem Alter beziehungsweise ihren Komorbiditäten nahmen die Patienten in unterschiedlichen Dosierungen und Kombinationen weitere, teils auch psychotrope Medikamente wie Stimmungsstabilisierer und Antipsychotika zur Augmentation ein, die den klinischen Effekt moduliert haben können. Allerdings fanden sich zwischen den Genotyp-Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Periphere Arzneimittelinteraktionen oder Phänokonversionsphänomene können durch die Verwendung der Serumkonzentrationen von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin als ausgeglichen gelten.

Der Befund einer in $1A1A$ -Trägern geringeren Reduktion der depressiven Symptomatik ist diskrepant zu einem Großteil der Ergebnisse bisheriger Therapie-Studien, allerdings weisen diese zahlreiche Unterschiede zu der hiesigen auf. Speziell die Verwendung von Serumkonzentrationen anstatt der Dosierung darf als wichtige Innovation gelten und wurde nur in einzelnen vorherigen Untersuchungen herangezogen.

Allgemein wird angenommen, dass sich höhere Serumkonzentrationen aktiver Substanz (bei Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen) günstiger auf den Therapie-Effekt auswirken (Gex-Fabry et al., 2004; Haji et al., 2011). Allerdings wurden bei Patienten, die einen gewünschten therapeutischen Effekt zeigten, Venlafaxin-Serumspiegel zwischen 25 und 400 ng / ml gemessen, wodurch eine beachtliche effektive Breite demonstriert wird (Charlier et al., 2000) und was wiederum ein Hinweis auf andere, eventuell pharmakogenetische Faktoren von Relevanz ist.

In Studien zum Einfluss des *5-HTTLPR* auf den therapeutischen Effekt von Antidepressiva kamen diverse sSRIs zum Einsatz. Zahlreiche Ergebnisse schreiben dem hetero- oder homozygoten Tragen des l- beziehungsweise l_A-Allels besseres Ansprechen im Vergleich zu den übrigen Genotypen zu (Pollock et al., 2000; Zanardi et al., 2001; Arias et al., 2003; Bozina et al., 2008; Illi et al., 2010). Andere Arbeitsgruppen wiederum berichten keinen Zusammenhang zwischen Genotyp und Therapie-Antwort (Kirchheiner et al., 2007; Hu et al., 2007; Kraft et al., 2007; Dogan et al., 2008; Baffa et al., 2010). Eine Metaanalyse von 15 Studien mit insgesamt 1435 Patienten in sSRI-Pharmakotherapie offenbarte eine signifikant geringere Remissionsrate bei Vorliegen des homozygoten s-Allels sowie bei homo- und heterozygoten s-Allel-Trägern eine geringere Wahrscheinlichkeit für ein grundsätzliches Ansprechen im Sinne eines therapeutischen Effektes (Serretti et al., 2007). Diese Metaanalyse berücksichtigte allerdings den SNP rs25531 nicht.

Einige andere Studien berichten allerdings einen positiven Effekt des niedrig-exprimierenden s-Allels auf die angestrebte therapeutische Antwort von sSRIs. In einem Kollektiv von Europäern ("Caucasians") waren nach chronischer sSRI-Applikation positive Therapie-Antwort und Remission signifikant häufiger bei homozygoten s-Allel-Trägern zu verzeichnen als bei heterozygoten s-Allel-Trägern und homozygoten l-Allel-Trägern (Wilkie et al., 2009). Koreanische Patienten zeigten signifikant höhere Response-Raten, sofern sie homo- oder heterozygot Träger des s-Allels waren (Won et al., 2012).

Eine Untersuchung der Auswirkung des *5-HTTLPR* auf den Effekt einer antidepressiven Kurzzeit-Behandlung mit Venlafaxin in einem asiatischen Patientenkollektiv assoziierte das l-Allel mit besserem Ansprechen (Lee et al., 2010). Diese Untersuchung beinhaltete allerdings weder Serumkonzentrationen noch rs25531.

Lediglich eine weitere Studie konnte identifiziert werden in der ein grob-vergleichbares Prozedere verfolgt wurde (Dreimüller et al., 2011). Die Resultate der beiden Untersuchungen sind nicht einheitlich. Dreimüller et al. hatten gezeigt, dass das l_A-Allel in Verbindung mit einem hohen sSRI-Serumspiegel eine erwünschte Therapie-Antwort begünstigt. Die Studie

von Dreimüller et al. weist allerdings mehrere methodische Unterschiede zu der hiesigen auf. Ein klinisches Design wurde verwendet, jedoch Patienten mit bipolarer affektiver Symptomatik nicht eingeschlossen. Die Symptom-Evaluierung wurde wöchentlich über einen Zeitraum von fünf Wochen mittels HAM-D durchgeführt. Dreimüller et al. untersuchten drei positive Kategorien (leichte Verbesserung der Symptomatik, "improvers"; ausgeprägte positive therapeutische Antwort, "responders"; Remission, "remitters"), wohingegen hier auf die diametralen Kategorien "gutes Ansprechen" oder "schlechtes Ansprechen" fokussiert wurde. Die Feststellung der symptomatischen Veränderung und die Quantifizierung der Serumkonzentration waren für die vorliegende Arbeit synchron erfolgt, bei Dreimüller et al. jedoch wurde der Spiegel nach zweiwöchiger Therapie gemessen und unter der Annahme, dass bei gleichbleibender Dosierung keine Konzentrationsveränderungen auftreten, für die statistische Analyse mit den HAM-D-Resultaten nach fünfwöchiger Therapie kombiniert. Statt einer Beschränkung auf ein Medikament (hier: Venlafaxin) hatten die Patienten bei Dreimüller et al. verschiedene sSRIs erhalten. Das für Citalopram stratifizierte Unterkollektiv, bei dem das zur vorliegenden Untersuchung konträre Ergebnis erhalten wurde, umfasste 36 Patienten. Auch die Aufbereitung der genetischen Daten für die statistische Analyse weist einen gravierenden Unterschied auf. Während in der vorliegenden Arbeit die diploiden Genotypen in den resultierenden Phänotyp umgeformt wurden, hatten Dreimüller et al. eine Spaltung der Genotypen in Einzelallele vorgenommen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass trotz sehr ähnlicher Fragestellung ein direkter Vergleich der Resultate aufgrund deutlicher methodischer Diskrepanzen unter grundsätzlichem Vorbehalt betrachtet werden muss.

Als interessantester Befund in Verbindung mit der hier durchgeführten pharmakogenetischen Untersuchung darf eine Studie der Arbeitsgruppe um Reimherr aus dem Jahr 2010 gelten. Patienten, deren depressive Symptomatik anhand der HAM-D-Skala als schwer evaluiert worden war, erhielten zunächst über acht Wochen eine Pharmakotherapie mit klinisch üblichen Dosierungen des sSRIs Sertralin. Bei *per definitionem* vorliegender Therapie-Resistenz, gemessen anhand der HAM-D-Punktezah-Reduktion nach acht Wochen, wurde diesen Patienten in einem randomisierten und doppelt-verblindeten Verfahren zusätzlich zu Sertralin entweder der sNRI Atomoxetin oder ein Placebo gegeben. Eine anschließende Analyse des therapeutischen Effektes (allerdings ohne Berücksichtigung der Serumkonzentrationen) und des 5-HTTLPR zeigte, dass zum ersten unter Monotherapie mit dem sSRI keine Assoziation festzustellen war, und dass zum zweiten jedoch nach zusätzlicher Gabe des sNRIs Träger des homozygoten s-Allels signifikant häufiger remittierten als Träger

der übrigen Genotypen. Eine Beurteilung unter Einbeziehung des rs25531 wurde aufgrund der zu jener Zeit unbekanntem Existenz desselben nicht durchgeführt.

Die kombinierte Applikation des sSRIs Sertralin mit dem sNRI Atomoxetin kann als dem sSNRI Venlafaxin vom primären pharmakodynamischen Effekt ähnlich bis gleichwertig interpretiert werden. Es kann daraus geschlussfolgert werden, dass eine Kombination von Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibition bei s-Allel-Trägern die Wahrscheinlichkeit für ein positives pharmakotherapeutisches Ansprechen begünstigt. Gravierende Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungen sind, dass zum einen bei Reimherr et al. lediglich homozygote s-Allel-Träger signifikant von der kombinierten Intervention profitierten und zum anderen der sNRI erst nach einer mehrere Wochen dauernden sSRI-Applikation augmentativ gegeben wurde. Die Gabe des augmentativen Placebos allerdings begünstigte die Remission der gegenüber sSRI-Therapie resistenten Symptomatik der homozygoten s-Allel-Träger nicht. Sertralin und Atomoxetin wurden in Dosierungen gegeben, die als klinisch effektiv gelten, wohingegen bei Gabe von Venlafaxin eine Beurteilung des zusätzlichen noradrenergen Effektes aufgrund der geringeren Affinität der aktiven Substanzen für den Noradrenalin-Transporter im ZNS bei entsprechender Dosierung zwar angenommen, jedoch weniger eindeutig gezielt angestrebt werden kann. Eine Erklärung mag die Theorie bieten, dass die bei homozygoten s-Allel-Trägern im Vergleich geringere Serotonin-Wiederaufnahmekapazität durch ihre Blockade einen nur mäßigen Effekt auf die interagierenden monoaminergen Transmissionssysteme ausübt und in Folge eine zusätzliche, direkte Inhibition der Noradrenalin-Wiederaufnahme einen stärkeren Effekt auf die physiologischen Gegebenheiten hat.

Bezogen auf das Gesamtkollektiv und einen prinzipiellen Effekt des hier untersuchten *SLC6A4*-Polymorphismus in antidepressiver Venlafaxin-Therapie könnte die Empfehlung ausgesprochen werden, für diese Substanz bei Trägern des hochexprimierenden Genotyps eine Summenserumkonzentration aktiver Substanz über 400 ng / ml anzustreben, da dieser Genotyp im vorliegenden Fall bei geringeren Konzentrationen im Bereich der sSNRI-Aktivität des Pharmakons signifikant mit einer ungenügenden Therapie-Antwort assoziiert wurde, oberhalb der Grenze jedoch offensichtlich seinen Einfluss verliert.

Aufgrund der angeführten Limitationen, insbesondere des geringen Stichprobenumfanges, müssen die Resultate jedoch als nicht ausreichend gesichert angesehen werden, um im

klinischen Alltag Einzug zu halten. Allerdings kann die vorliegende Studie als erster, vielversprechender Schritt in diese Richtung betrachtet werden.

In sich anschließenden prospektiven Untersuchungen könnte anhand deutlich größerer Stichproben, ausgefeilterer Evaluierungsmethoden, Einbeziehung weiterer genetischer Varianten und unter Berücksichtigung von neben Venlafaxin in der Therapie vorhandenen antidepressiven Faktoren ein reliabel prädiktiver Zusammenhang identifiziert werden. Randomisiert kontrolliert klinisches Studiendesign könnte dazu beitragen Faktoren geringer Ausprägung zu identifizieren, die unter naturalistischen Bedingungen "verschüttet" bleiben und aufbauend auf eventuellen Befunden könnte wiederum die Replikation im klinischen Alltag angestrebt werden.

V. Zusammenfassung

Depressive Erkrankungen verursachen sowohl das persönliche Leid der erkrankten Individuen als auch volkswirtschaftlichen Schaden durch krankheitsbedingten Arbeitsausfall und Belastung der Gesundheitsversorgungssysteme. Therapeutische Konzepte wie die Anwendung pharmakotherapeutischer Intervention sind in unterschiedlichem Maß von Erfolg gekrönt.

Zahlreiche somatische Faktoren wurden mit der Ätiologie depressiver Störungen in Verbindung gebracht. Die primär verfolgten pharmakologischen Ansätze basieren nach wie vor auf Erkenntnissen aus der Mitte des vergangenen Jahrhunderts. In erster Linie setzt die Pharmakotherapie Substanzen ein, die die Wiederaufnahme monoaminerger Neurotransmitter (Serotonin, Noradrenalin, zum Teil auch Dopamin) aus dem synaptischen Spalt inhibieren und nach einer allerdings meist mehrwöchigen, regelmäßigen Einnahme des Präparates zu einem Rückgang der depressiven Symptomatik führen. Andererseits kann jedoch bei zahlreichen Erkrankten auch nach fortgesetzter Therapie mit verschiedenen Behandlungsansätzen keine Remission verzeichnet werden und es stellt sich die Frage nach der Ursache dieser Diskrepanz.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand der als Antidepressivum eingesetzte selektive Serotonin- / Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitor Venlafaxin. Durch Blockade des präsynaptischen Serotonin- und Noradrenalin-Transporters führt Venlafaxin initial zu einer intensivierten Neurotransmission. Die Zielstrukturen von Venlafaxin sind der präsynaptische Serotonin- und der Noradrenalin-Transporter, wobei aufgrund unterschiedlicher Affinität eine geringe Dosis beziehungsweise Konzentration als rein serotonerg betrachtet wird und bei einer hohen Dosis beziehungsweise Konzentration sowohl die Wiederaufnahme von Serotonin als auch Noradrenalin inhibiert wird.

Es wurden in dieser Arbeit zwei Ziele verfolgt. Im ersten Teil wurde mittels Genexpressionsuntersuchungen nach potentiellen Effektoren von Venlafaxin gesucht, um prinzipielle Mechanismen der antidepressiven Wirkung zu identifizieren und auf ihrer Basis die Entwicklung spezifischerer Intervention zu ermöglichen.

Der zweite Teil beinhaltet eine pharmakogenetische Untersuchung am Menschen. Ziel war zu evaluieren, inwieweit die Expressionsaktivität von *SLC6A2* und *SLC6A4* und damit die präsynaptische Transportkapazität in Kombination mit der Serumkonzentration aktiver Substanz als Prädiktor des therapeutischen Effektes dienen kann. Die Kenntnis dieser

Zusammenhänge würde bei Vorliegen eines bestimmten Genotyps eine gezieltere Titration der individuell benötigten Konzentration ermöglichen und könnte die Effektivität der Therapie steigern.

Für die Genexpressionsuntersuchungen erhielten DBA/2-Mäuse über einen Zeitraum von 30 Tagen Venlafaxin in verschiedenen Dosierungen über das Trinkwasser. Anschließend wurden die Hippokampi der Tiere mittels genomweiter Microarray-Analyse hypothesenfrei auf zwischen den Dosisgruppen differentiell exprimierte Gene hin untersucht. Der Hippokampus wird als zentrales Element der Steuerung, Ausbildung und Veränderung von Verhaltensmustern gesehen. Signifikant differentiell exprimierte Gene, die in vorherigen Studien mit depressiver Erkrankung beziehungsweise einem Effekt psychiatrischer Medikation assoziiert worden waren, wurden mittels qRT-PCR-Analyse validiert. Im Anschluss an die Analyse im Tier wurden als differentiell exprimiert bestätigte Gene per qRT-PCR analog in humanen Leukozyten untersucht. Die Blutproben waren in einem klinisch-naturalistischen Design während der ersten und der fünften Woche einer Venlafaxin-Pharmakotherapie von Patienten der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg gewonnen worden, das heißt vor und nach potentiell dem Eintreten der antidepressiven Wirkung. Trotz der unterschiedlichen Herkunft der analysierten Gewebe könnten auf diesem Weg Hinweise auf Vorgänge im menschlichen Gehirn gefunden werden, wie in vergleichenden *post mortem* Untersuchungen zwischen peripherem und zentralem humanem Material erkannt worden war.

Die in der Tierstudie identifizierten Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren sowie Proteine die als Teil von *second messenger*-Kaskaden bekannt sind. Von statistischer Signifikanz erwies sich in der Analyse der humanen Leukozyten die Expressionsreduktion der mRNA der Transkriptionsfaktor-Untereinheit Fos.

Befunde zu einer Funktion von Fos, die eine Interpretation im Bezug auf den antidepressiven Effekt von Venlafaxin ermöglichen, liegen lediglich aus Tierstudien vor. *Fos*-ko im Hippokampus von Mäusen wurde mit reduziertem Angstverhalten und höherer Exzitabilität von hippokampalen Neuronen assoziiert. Auch wurde eine Assoziation mit Vorgängen bei synaptischer Plastizität und damit potentiell bei Lernvorgängen gefunden. Auf der anderen Seite wurde depressions-ähnliches Verhalten bei Ratten mit niedriger hippokampaler *Fos*-Expression und dessen erfolgreiche pharmakologische "Therapie" mit einer Induktion der

Fos-Expression assoziiert. Es scheinen also bereits zwischen nicht-menschlichen Spezies ausgeprägte Unterschiede der Rolle von *Fos* beziehungsweise Fos zu bestehen.

Aufgrund der unterschiedlichen Spezies und Gewebe in den hier durchgeführten Untersuchungen sowie den uneinheitlichen Befunden bezüglich der Rolle von *Fos* beziehungsweise Fos in vorangegangenen Studien kann abschließend lediglich konstatiert werden, dass Fos vermutlich an der Entstehung depressionsbegünstigender Physiologie beteiligt ist und auch, dass eine antidepressive Pharmakotherapie mit Venlafaxin ihre Wirkung vermutlich unter Beteiligung von Fos entfaltet.

Die Entwicklung innovativer Antidepressiva die unter Umgehung der monoaminergen Transmissionssysteme durch gezielte Reduktion der Fos-Abundanz das therapeutische Ziel erreichen lassen, könnte auf Basis der vorliegenden Studie angedacht werden, scheint allerdings aufgrund der ubiquitären Mediatorentätigkeit des Proteins und insbesondere aufgrund seiner nicht endgültig definierten Rolle bei der Entstehung von Krebs nicht praktikabel. Zukünftige Untersuchungen sollten daher auf andere im Microarray differentiell exprimiert gefundene Gene fokussieren.

In die Untersuchung der Expressionsaktivität der für die primären Zielstrukturen von Venlafaxin (Serotonin- beziehungsweise Noradrenalin-Transporter) kodierenden Gene (*SLC6A4* beziehungsweise *SLC6A2*) und der Serumkonzentration an aktiver Substanz nach Venlafaxin-Applikation im Hinblick auf deren Prädiktivität des therapeutischen Effektes, wurden in einem klinisch-naturalistischen Design Patienten der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg eingeschlossen. Genotypisiert wurden für *SLC6A2* der SNP rs28386840 und für *SLC6A4* der Polymorphismus *5-HTTLPR*. Die Genotypen wurden jeweils in niedrig- und hoch-exprimierend unterteilt und damit auf die phänotypische Transportkapazität der präsynaptischen Membran Bezug genommen. Der therapeutische Erfolg wurde anhand der CGI-I-Skala evaluiert und für die Analysen in "gutes Ansprechen" und "schlechtes Ansprechen" dichotomisiert.

Der *SLC6A2*-Polymorphismus zeigte sich als nicht mit dem therapeutischen Effekt assoziiert. Der hochexprimierende *SLC6A4*-Genotyp wurde signifikant mit einem schlechteren Ansprechen assoziiert. Dies war in den nach Serumkonzentration aktiver Substanz stratifizierten Unterkollektiven insbesondere in dem Bereich zwischen 200 und 400 ng / ml zu erkennen, wohingegen unter- und oberhalb dieses Bereiches keine Assoziation zu finden war.

Aus diesen Resultaten kann gefolgert werden, dass sich aus der Genotypisierung von rs28386840 keine therapeutischen Instruktionen ableiten lassen. Bei Kenntnis des *5-HTTLPR*-Genotyps könnte für den klinischen Alltag die Empfehlung ergehen, falls Venlafaxin als sSNRI bei Patienten mit hochexprimierendem Genotyp eingesetzt werden soll, eine Serumsummenkonzentration jenseits des durch die AGNP empfohlenen Bereiches (100 - 400 ng / ml) anzustreben.

Da hier jedoch lediglich eine Stichprobe von 56 Patienten untersucht und insbesondere, da zahlreiche potentielle Kofaktoren des therapeutischen Effektes nicht in die Analyse einbezogen werden konnten, ist die Assoziation vor Anwendung in der Therapiesteuerung anhand umfassenderer prospektiver kontrollierter Studien zu validieren.

VI. Summary

Depressive disorders not only lead to the suffering of the affected individuals but also to economic losses by incapacitating them to fulfill social demands and by utilization of health care systems. Therapeutic intervention via pharmacotherapy is successful in variable degrees. Etiological research revealed a diversity of somatic factors to be associated with the illness. Primary pharmacological treatment is using substances that inhibit the reuptake of monoaminergic neurotransmitters (serotonin, norepinephrine, in part also dopamine) into the presynaptic terminals. Continued application, sometimes for weeks, leads to a reduction of depressive symptoms (lag of onset). On the other hand for a number of patients various pharmacotherapeutic drugs do not result in symptomatic relief or remission. A reason for these discrepancies to date has not been determined but it is to assume, that pharmacokinetic and pharmacodynamic variations between patients bear the responsibility.

In the thesis at hand venlafaxine, an inhibitor of serotonin- respectively serotonin- and norepinephrine-reuptake, was used. Venlafaxine's pharmacodynamic activity is dependent on its concentration in the target compartment as the affinity for the serotonin-transporter is 30 times that for the norepinephrine-transporter.

Two goals were targeted here. Comparative gene expression analysis was performed to identify potential effectors of antidepressive effectiveness. On this basis a more specific pharmacological intervention than increasing monoaminergic transmission might be facilitated.

The second part of the thesis was dedicated to pharmacogenetic research. In it the predictiveness of the expression activity of the genes coding for venlafaxine's primary targets (*SLC6A2*, norepinephrine-transporter; *SLC6A4*, serotonin-transporter) in combination with serum concentrations of active moiety (venlafaxine and its equally active metabolite o-desmethylvenlafaxine) towards the therapeutic effect was investigated. Knowledge on such an association might improve efficacy of future pharmacological intervention with venlafaxine, as serum concentrations necessary for patients' desired improvement in the light of a respective genotype could be individually targeted.

For gene expression analysis, first, mice (DBA/2 strain) were given venlafaxine in different dosages via the oral route for one month and their hippocampi were analyzed by hypothesis-free genome wide microarray analysis for genes differentially expressed between treatment

groups. For candidate genes identified that way, differential expression was validated via qRT-PCR. In the second step validated genes were investigated via qRT-PCR for differential expression in leucocytes of patients who had received antidepressive venlafaxine treatment for one month. Expression was compared between leucocytes after one week and during the fifth week of treatment, that is, before and after potential onset of antidepressive effect. *Post mortem* comparison between human central and peripheral tissue had to a certain degree shown congruence of expression patterns and thus leucocyte analysis can give hints towards events in the central nervous system.

Candidate genes identified in the animal study code for transcription factors respectively proteins mediating in *second messenger* cascades. In human leucocytes statistical significance was reached for the reduced mRNA abundance of *Fos* after one month of treatment. Fos is a transcription factor subunit that after heterodimerization with Jun influences expression of effector genes.

Association of Fos with depressive disorder and its role in an antidepressive effect had been shown in animal studies. Hippocampal knock-out (ko) of *Fos* in mice had been associated with reduced fear behaviour and higher excitability of the neurons in this region. Also an association with synaptic plasticity and thus with learning behaviour had been shown. On the other hand, in rats depression-like behaviour had been associated with low hippocampal *Fos* expression and following successful pharmacological "therapy" expression had been found to be induced. Thus already between non-human species pronounced differences in the role of *Fos* respectively Fos can be seen.

Regarding the different species and tissues investigated as well as the heterogeneous reports on the role of *Fos*, it can thus only be concluded that the gene respectively its protein product is part of the development and the venlafaxine-induced relief of depressive symptoms.

New antidepressant drugs based on an interaction with Fos, e.g. by decreasing its abundance, might in theory be considered. However, due to its far-reaching activity in a number of various processes throughout the organism and especially its role as a proto-oncogene, systemic inhibition of Fos does not seem a proper basis for innovative therapeutic intervention.

Future studies should therefore focus on other differentially expressed genes found in the microarray analysis.

For evaluating the predictive power of the expression activity of the genes *SLC6A2* respectively *SLC6A4* which code for venlafaxine's primary targets (serotonin- respectively norepinephrine-transporter) and the serum concentration of active moiety with regard to the achieved antidepressive effect in a naturalistic clinical design patients from the Department of Psychiatry, Psychosomatics and Psychotherapy (University Hospital of Würzburg) were analyzed. *SLC6A2* was genotyped for rs28386840 and *SLC6A4* for 5-HTTLPR. To investigate phenotypical conditions, patients were dichotomized into carriers of "low-expressing" and "high-expressing" genotypes. Results of the pharmacological intervention were evaluated using the CGI-I-scale and symptom changes after one month of venlafaxine application were dichotomized into "good response" and "bad response".

rs28386840 was found not to be associated with therapeutic outcome. The high-expressing genotype of *SLC6A4* was found to be significantly associated with insufficient response. After stratifying the collective for serum concentrations this especially held true in the subcollective with high concentration (200 - 400 ng / ml). Below and above this range 5-HTTLPR was not significantly associated with the response.

It can be concluded that genotyping rs28386840 will not be useful for instruction of therapeutic intervention with venlafaxine. However, information on patients' 5-HTTLPR might instruct psychiatrists, if venlafaxine is considered for treatment, to use serum concentrations which exceed the range recommended by the AGNP (> 400 ng / ml) in patients with the high-expressing genotype of *SLC6A4*.

The study at hand analyzed only 56 patients and inclusion of a variety of cofactors as well as regression analysis incorporating both polymorphisms to evaluate their potential and probable synergistic effect was not possible. Thus, before application of the present findings into clinical practice, validation and confirmation of the potentially causal relationship in larger samples using a prospective controlled design is necessary.

VII. Literaturverzeichnis

- Aghajanian, G.K.**, 1985. Modulation of a transient outward current in serotonergic neurones by alpha 1-adrenoceptors. *Nature* 315, 501–503.
- Akhtar, M.W.**, Kim, M.-S., Adachi, M., Morris, M.J., Qi, X., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2012. In Vivo Analysis of MEF2 Transcription Factors in Synapse Regulation and Neuronal Survival. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034863
- Alberi, L.**, Liu, S., Wang, Y., Badie, R., Smith-Hicks, C., Wu, J., Pierfelice, T.J., Abazyan, B., Mattson, M.P., Kuhl, D., Pletnikov, M., Worley, P.F., Gaiano, N., 2011. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. *Neuron* 69, 437–444. doi:10.1016/j.neuron.2011.01.004
- Albert, T.**, Saxena, M., Lelievre, V., 2009. CDK5. *Cell Adh Migr* 3, 319–321.
- ALTMAN, J.**, 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127–1128.
- Angelucci, F.**, Croce, N., Spalletta, G., Dinallo, V., Gravina, P., Bossù, P., Federici, G., Caltagirone, C., Bernardini, S., 2011. Paroxetine rapidly modulates the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in a human glioblastoma-astrocytoma cell line. *Pharmacology* 87, 5–10. doi:10.1159/000322528
- Anisman, H.**, Sklar, L.S., 1979. Catecholamine depletion in mice upon reexposure to stress: mediation of the escape deficits produced by inescapable shock. *J Comp Physiol Psychol* 93, 610–625.
- Arias, B.**, Catalán, R., Gastó, C., Gutiérrez, B., Fañanás, L., 2003. 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene predicts non-remission in major depression patients treated with citalopram in a 12-weeks follow up study. *J Clin Psychopharmacol* 23, 563–567. doi:10.1097/01.jcp.0000095350.32154.73
- Artigas, F.**, Romero, L., de Montigny, C., Blier, P., 1996. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists. *Trends Neurosci.* 19, 378–383. doi:10.1016/S0166-2236(96)10037-0
- Aryal, B.**, Aryal, D., Kim, E.-J., Kim, H.-G., 2012. Pharmacokinetics of venlafaxine and its major metabolite o-desmethylvenlafaxine in freely moving mice using automated dosing/sampling system. *Indian J Pharmacol* 44, 20–25. doi:10.4103/0253-7613.91861
- Augustyn, M.**, Otczyk, M., Budziszewska, B., Jagła, G., Nowak, W., Basta-Kaim, A., Jaworska-Feil, L., Kubera, M., Tetich, M., Leśkiewicz, M., Lasoń, W., 2005. Effects of some new antidepressant drugs on the glucocorticoid receptor-mediated gene transcription in fibroblast cells. *Pharmacol Rep* 57, 766–773.
- Aydemir, C.**, Yalcin, E.S., Aksaray, S., Kisa, C., Yildirim, S.G., Uzbay, T., Goka, E., 2006. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) changes in the serum of depressed women. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 1256–1260. doi:10.1016/j.pnpbp.2006.03.025
- Aydemir, O.**, Deveci, A., Taneli, F., 2005. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 261–265. doi:10.1016/j.pnpbp.2004.11.009
- Bachmeier, C.**, Levin, G.M., Beaulieu-Abdelahad, D., Reed, J., Mullan, M., 2013. Effect of Venlafaxine and Desvenlafaxine on Drug Efflux Protein Expression and Biodistribution In Vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences* n/a–n/a. doi:10.1002/jps.23680
- Bachmeier, C.J.**, Beaulieu-Abdelahad, D., Ganey, N.J., Mullan, M.J., Levin, G.M., 2011. Induction of drug efflux protein expression by venlafaxine but not desvenlafaxine. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 32, 233–244. doi:10.1002/bdd.753
- Baes, C. von W.**, Martins, C.M.S., Tofoli, S.M. de C., Jurueña, M.F., 2014. Early Life Stress in Depressive Patients: HPA Axis Response to GR and MR Agonist. *Front Psychiatry* 5. doi:10.3389/fpsy.2014.00002
- Baffa, A.**, Hohoff, C., Baune, B.T., Müller-Tidow, C., Tidow, N., Freitag, C., Zwanzger, P., Deckert, J., Arolt, V., Domschke, K., 2010. Norepinephrine and Serotonin Transporter Genes: Impact on Treatment Response in Depression. *Neuropsychobiology* 62, 121–131. doi:10.1159/000317285
- Barbosa, A.C.**, Kim, M.-S., Ertunc, M., Adachi, M., Nelson, E.D., McAnally, J., Richardson, J.A., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2008. MEF2C, a transcription factor that facilitates learning and memory by negative regulation of synapse numbers and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9391–9396. doi:10.1073/pnas.0802679105
- Barbosa, I.G.**, Vale, T.C., de Macedo, D.L., Gomez, R.S., Teixeira, A.L., 2012. Neurosyphilis presenting as mania. *Bipolar Disord* 14, 309–312. doi:10.1111/j.1399-5618.2012.01007.x
- Barton, D.A.**, Esler, M.D., Dawood, T., Lambert, E.A., Haikerwal, D., Brenchley, C., Socratous, F., Hastings, J., Guo, L., Wiesner, G., Kaye, D.M., Bayles, R., Schlaich, M.P., Lambert, G.W., 2008. Elevated brain serotonin turnover in patients with depression: effect of genotype and therapy. *Arch. Gen. Psychiatry* 65, 38–46. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2007.11

- Baumann, P.**, Hiemke, C., Ulrich, S., Eckermann, G., Gaertner, I., Gerlach, M., Kuss, H.-J., Laux, G., Müller-Oerlinghausen, B., Rao, M.L., Riederer, P., Zernig, G., Arbeitsgemeinschaft für neuropsychopharmakologie und pharmakopsychiatrie, 2004. The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry* 37, 243–265. doi:10.1055/s-2004-832687
- Baune, B.T.**, Hohoff, C., Mortensen, L.S., Deckert, J., Arolt, V., Domschke, K., 2008. Serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) association with melancholic depression: a female specific effect? *Depression and Anxiety* 25, 920–925. doi:10.1002/da.20433
- Becker, C.**, Riedmaier, I., Pfaffl, M., 2009. RNA Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik [WWW Document]. URL <http://www.gene-quantification.de/becker-riedmaier-pfaffl-biospektrum-2009.pdf> (accessed 6.13.13).
- Becker, N.**, Wierenga, C.J., Fonseca, R., Bonhoeffer, T., Nägerl, U.V., 2008. LTD Induction Causes Morphological Changes of Presynaptic Boutons and Reduces Their Contacts with Spines. *Neuron* 60, 590–597. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.018
- Becker, S.**, Wojtowicz, J.M., 2007. A model of hippocampal neurogenesis in memory and mood disorders. *Trends in Cognitive Sciences* 11, 70–76. doi:10.1016/j.tics.2006.10.013
- Béique, J.C.**, Blier, P., de Montigny, C., Debonnel, G., 2000. Potentiation by (-)Pindolol of the activation of postsynaptic 5-HT(1A) receptors induced by venlafaxine. *Neuropsychopharmacology* 23, 294–306. doi:10.1016/S0893-133X(00)00112-3
- Benjamini, Y.**, Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289–300.
- Bertoux, M.**, Delavest, M., Souza, L.C. de, Funkiewiez, A., Lépine, J.-P., Fossati, P., Dubois, B., Sarazin, M., 2012. Social Cognition and Emotional Assessment differentiates frontotemporal dementia from depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83, 411–416. doi:10.1136/jnnp-2011-301849
- Bessa, J.M.**, Ferreira, D., Melo, I., Marques, F., Cerqueira, J.J., Palha, J.A., Almeida, O.F.X., Sousa, N., 2009. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol. Psychiatry* 14, 764–773, 739. doi:10.1038/mp.2008.119
- Bi, G.**, Poo, M., 1998. Synaptic Modifications in Cultured Hippocampal Neurons: Dependence on Spike Timing, Synaptic Strength, and Postsynaptic Cell Type. *J. Neurosci.* 18, 10464–10472.
- Birkmayer, W.**, Riederer, P., 1975. Biochemical post-mortem findings in depressed patients. *J. Neural Transm.* 37, 95–109.
- Blier, P.**, Saint-André, E., Hébert, C., de Montigny, C., Lavoie, N., Debonnel, G., 2007. Effects of different doses of venlafaxine on serotonin and norepinephrine reuptake in healthy volunteers. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 10, 41–50. doi:10.1017/S1461145705006395
- Bliss, T.V.**, Lømo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* 232, 331–356.
- BOARD, F.**, PERSKY, H., HAMBURG, D.A., 1956. Psychological stress and endocrine functions; blood levels of adrenocortical and thyroid hormones in acutely disturbed patients. *Psychosom Med* 18, 324–333.
- Boldrini, M.**, Santiago, A.N., Hen, R., Dwork, A.J., Rosoklija, G.B., Tamir, H., Arango, V., John Mann, J., 2013. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology* 38, 1068–1077. doi:10.1038/npp.2013.5
- Bosker, F.J.**, Gladkevich, A.V., Pietersen, C.Y., Kooi, K.A., Bakker, P.L., Gerbens, F., den Boer, J.A., Korf, J., te Meerman, G., 2012. Comparison of brain and blood gene expression in an animal model of negative symptoms in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 38, 142–148. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.03.003
- Bozina, N.**, Mihaljevic Peles, A., Sagud, M., Bilusic, H., Jakovljevic, M., 2008. Association study of paroxetine therapeutic response with SERT gene polymorphisms in patients with major depressive disorder. *World Journal of Biological Psychiatry* 9, 190–197. doi:10.1080/15622970701308397
- Breton, J.**, Robertson, E.M., 2013. Memory Processing: The Critical Role of Neuronal Replay during Sleep. *Current Biology* 23, R836–R838. doi:10.1016/j.cub.2013.07.068
- Bridges, P.K.**, Bartlett, J.R., Sepping, P., Kantamaneni, B.D., Curzon, G., 1976. Precursors and metabolites of 5-hydroxytryptamine and dopamine in the ventricular cerebrospinal fluid of psychiatric patients. *Psychol Med* 6, 399–405.
- Brown, G.W.**, Ban, M., Craig, T.K.J., Harris, T.O., Herbert, J., Uher, R., 2013. Serotonin Transporter Length Polymorphism, Childhood Maltreatment, and Chronic Depression: A Specific Gene–Environment Interaction. *Depression and Anxiety* 30, 5–13. doi:10.1002/da.21982
- Buchheim, A.**, Viviani, R., Kessler, H., Kachele, H., Cierpka, M., Roth, G., George, C., Kernberg, O.F., Bruns, G., Taubner, S., 2012. Changes in Prefrontal-Limbic Function in Major Depression after 15 Months of Long-Term Psychotherapy. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0033745
- Busner, J.**, Targum, S.D., 2007. The Clinical Global Impressions Scale. *Psychiatry (Edgmont)* 4, 28–37.

- Caspi, A.**, Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R., 2003. Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene. *Science* 301, 386–389. doi:10.1126/science.1083968
- Charlier, C.**, Pinto, E., Anseau, M., Plomteux, G., 2000. Relationship between clinical effects, serum drug concentration, and concurrent drug interactions in depressed patients treated with citalopram, fluoxetine, clomipramine, paroxetine or venlafaxine. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 15, 453–459. doi:10.1002/1099-1077(200008)15:6<453::AID-HUP228>3.0.CO;2-F
- Chen, B.**, Dowlatshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., Young, L.T., 2001. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol. Psychiatry* 50, 260–265.
- Cheung, V.C.K.**, DeBoer, C., Hanson, E., Tunesi, M., D’Onofrio, M., Arisi, I., Brandi, R., Cattaneo, A., Goosens, K.A., 2013. Gene Expression Changes in the Motor Cortex Mediating Motor Skill Learning. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0061496
- Chiang, C.**, Aston-Jones, G., 1993. A 5-hydroxytryptamine₂ agonist augments γ -aminobutyric acid and excitatory amino acid inputs to noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 54, 409–420. doi:10.1016/0306-4522(93)90262-E
- Chiu, R.**, Boyle, W.J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T., Karin, M., 1988. The c-fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54, 541–552. doi:10.1016/0092-8674(88)90076-1
- Cobb, J.A.**, Simpson, J., Mahajan, G.J., Overholser, J.C., Jurjus, G.J., Dieter, L., Herbst, N., May, W., Rajkowska, G., Stockmeier, C.A., n.d. Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder. *Journal of Psychiatric Research*. doi:10.1016/j.jpsychires.2012.10.020
- Czéh, B.**, Lucassen, P.J., 2007. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257, 250–260. doi:10.1007/s00406-007-0728-0
- Czubak, A.**, Nowakowska, E., Kus, K., Burda, K., Metelska, J., Baer-Dubowska, W., Cichocki, M., 2009. Influences of chronic venlafaxine, olanzapine and nicotine on the hippocampal and cortical concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Rep* 61, 1017–1023.
- De Montigny, C.**, Chaput, Y., Blier, P., 1990. Modification of serotonergic neuron properties by long-term treatment with serotonin reuptake blockers. *J Clin Psychiatry* 51 Suppl B, 4–8.
- Debonnel, G.**, Saint-André, E., Hébert, C., de Montigny, C., Lavoie, N., Blier, P., 2007. Differential physiological effects of a low dose and high doses of venlafaxine in major depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 10, 51–61. doi:10.1017/S1461145705006413
- Deckert, J.**, Catalano, M., Heils, A., Di Bella, D., Friess, F., Politi, E., Franke, P., Nöthen, M.M., Maier, W., Bellodi, L., Lesch, K.P., 1997. Functional promoter polymorphism of the human serotonin transporter: lack of association with panic disorder. *Psychiatr. Genet.* 7, 45–47.
- Denham, M.J.**, Borisjuk, R.M., 2000. A model of theta rhythm production in the septal-hippocampal system and its modulation by ascending brain stem pathways. *Hippocampus* 10, 698–716. doi:10.1002/1098-1063(2000)10:6<698::AID-HIPO1008>3.0.CO;2-Z
- Desai, U.J.**, Pfaffle, P.K., 1995. Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *BioTechniques* 19, 780–782, 784.
- Dhir, A.**, Kulkarni, S.K., 2007. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 921–925. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.02.008
- Dhir, A.**, Kulkarni, S.K., 2008. Venlafaxine reverses chronic fatigue-induced behavioral, biochemical and neurochemical alterations in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 89, 563–571. doi:10.1016/j.pbb.2008.02.011
- Dogan, O.**, Yuksel, N., Ergun, M.A., Yilmaz, A., Ilhan, M.N., Karslioglu, H.E., Koc, A., Menevse, A., 2008. Serotonin transporter gene polymorphisms and sertraline response in major depression patients. *Genet. Test.* 12, 225–231. doi:10.1089/gte.2007.0089
- Dong, M.**, Wu, Y., Fan, Y., Xu, M., Zhang, J., 2006. c-fos modulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampal CA3 and dentate gyrus neurons. *Neuroscience Letters* 400, 177–180. doi:10.1016/j.neulet.2006.02.063
- Dreimüller, N.**, Tadić, A., Dragicevic, A., Boland, K., Bondy, B., Lieb, K., Laux, G., Maier, W., Müller, M., Rao, M., Rietschel, M., Röschke, J., Zill, P., Hiemke, C., 2011. The Serotonin Transporter Promoter Polymorphism (5-HTTLPR) Affects the Relation between Antidepressant Serum Concentrations and Effectiveness in Major Depression. *Pharmacopsychiatry* 45, 108–113. doi:10.1055/s-0031-1291347
- Du, L.**, Faludi, G., Palkovits, M., Demeter, E., Bakish, D., Lapierre, Y.D., Sótónyi, P., Hrdina, P.D., 1999. Frequency of long allele in serotonin transporter gene is increased in depressed suicide victims. *Biological Psychiatry* 46, 196–201. doi:10.1016/S0006-3223(98)00376-X
- Duric, V.**, Banasr, M., Licznarski, P., Schmidt, H.D., Stockmeier, C.A., Simen, A.A., Newton, S.S., Duman, R.S., 2010. Negative Regulator of MAP Kinase is Increased in Depression and Is Necessary and Sufficient for Expression of Depressive Behavior. *Nat Med* 16, 1328–1332. doi:10.1038/nm.2219

- Eisch, A.J.**, Petrik, D., 2012. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* 338, 72–75. doi:10.1126/science.1222941
- Eriksson, P.S.**, Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317. doi:10.1038/3305
- Ezzati, A.**, Zimmerman, M.E., Katz, M.J., Lipton, R.B., 2013. Hippocampal correlates of depression in healthy elderly adults. *Hippocampus* n/a–n/a. doi:10.1002/hipo.22185
- Fahrner, T.J.**, Carroll, S.L., Milbrandt, J., 1990. The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Mol Cell Biol* 10, 6454–6459.
- Flavell, S.W.**, Kim, T.-K., Gray, J.M., Harmin, D.A., Hemberg, M., Hong, E.J., Markenscoff-Papadimitriou, E., Bear, D.M., Greenberg, M.E., 2008. Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron* 60, 1022–1038. doi:10.1016/j.neuron.2008.11.029
- Fogelman, S.M.**, Schmitter, J., Venkatakrishnan, K., von Moltke, L.L., Harmatz, J.S., Shader, R.I., Greenblatt, D.J., 1999. O- and N-demethylation of venlafaxine in vitro by human liver microsomes and by microsomes from cDNA-transfected cells: effect of metabolic inhibitors and SSRI antidepressants. *Neuropsychopharmacology* 20, 480–490. doi:10.1016/S0893-133X(98)00113-4
- Fosnaugh, J.S.**, Bhat, R.V., Yamagata, K., Worley, P.F., Baraban, J.M., 1995. Activation of arc, a Putative “Effector” Immediate Early Gene, by Cocaine in Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* 64, 2377–2380. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64052377.x
- Galea, L.A.**, McEwen, B.S., Tanapat, P., Deak, T., Spencer, R.L., Dhabhar, F.S., 1997. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience* 81, 689–697.
- Gambarana, C.**, Masi, F., Tagliamonte, A., Scheggi, S., Ghiglieri, O., Graziella De Montis, M., 1999. A Chronic Stress that Impairs Reactivity in Rats Also Decreases Dopaminergic Transmission in the Nucleus Accumbens: A Microdialysis Study. *Journal of Neurochemistry* 72, 2039–2046. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0722039.x
- Gelernter, J.**, Pakstis, A.J., Kidd, K.K., 1995. Linkage mapping of serotonin transporter protein gene SLC6A4 on chromosome 17. *Hum. Genet.* 95, 677–680.
- Gervais, J.**, Soghomonian, J.-J., Richard, D., Rouillard, C., 1999. Dopamine and serotonin interactions in the modulation of the expression of the immediate-early transcription factor, nerve growth factor-inducible B, in the striatum. *Neuroscience* 91, 1045–1054. doi:10.1016/S0306-4522(98)00688-5
- Gex-Fabry, M.**, Balant-Gorgia, A.E., Balant, L.P., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Bertschy, G., 2004. Time course of clinical response to venlafaxine: relevance of plasma level and chirality. *Eur J Clin Pharmacol* 59, 883–891. doi:10.1007/s00228-003-0710-3
- Ghose, K.**, Turner, P., 1975. Intravenous tyramine pressor response in depression. *Lancet* 1, 1317–1318.
- Gibbons, R.D.**, Hur, K., Brown, C.H., Davis, J.M., Mann, J.J., 2012. Benefits from antidepressants: synthesis of 6-week patient-level outcomes from double-blind placebo-controlled randomized trials of fluoxetine and venlafaxine. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 572–579. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.2044
- Gonul, A.S.**, Akdeniz, F., Taneli, F., Donat, O., Eker, C., Vahip, S., 2005. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255, 381–386. doi:10.1007/s00406-005-0578-6
- Greenberg, B.D.**, Tolliver, T.J., Huang, S.-J., Li, Q., Bengel, D., Murphy, D.L., 1999. Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. *American Journal of Medical Genetics* 88, 83–87. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19990205)88:1<83::AID-AJMG15>3.0.CO;2-0
- Greenberg, M.E.**, Ziff, E.B., 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311, 433–438.
- Greenlund, L.J.**, Deckwerth, T.L., Johnson, E.M., Jr, 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14, 303–315.
- Gutiérrez, B.**, Arranz, M.J., Collier, D.A., Vallès, V., Guillamat, R., Bertranpetit, J., Murray, R.M., Fañanás, L., 1998. Serotonin Transporter Gene and Risk for Bipolar Affective Disorder: An Association Study in a Spanish Population. *Biological Psychiatry* 43, 843–847. doi:10.1016/S0006-3223(97)00540-4
- Guy, W.**, National Institute of Mental Health (U. S.). Psychopharmacology Research Branch. Division of Extramural Research Programs, 1976. ECDEU assessment manual for psychopharmacology. Rockville, Md. : U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration, National Institute of Mental Health, Psychopharmacology Research Branch, Division of Extramural Research Programs.
- Hahn, M.K.**, Blackford, J.U., Haman, K., Mazei-Robison, M., English, B.A., Prasad, H.C., Steele, A., Hazelwood, L., Fentress, H.M., Myers, R., Blakely, R.D., Sanders-Bush, E., Shelton, R., 2008. Multivariate permutation analysis associates multiple polymorphisms with subphenotypes of major depression. *Genes Brain Behav.* 7, 487–495. doi:10.1111/j.1601-183X.2007.00384.x

- Haji, E.O.**, Tadić, A., Wagner, S., Dragicevic, A., Müller, M.J., Boland, K., Rao, M.-L., Fric, M., Laux, G., Hiemke, C., 2011. Association Between Citalopram Serum Levels and Clinical Improvement of Patients With Major Depression: *Journal of Clinical Psychopharmacology* 31, 281–286. doi:10.1097/JCP.0b013e318218f503
- Halazonetis, T.D.**, Georgopoulos, K., Greenberg, M.E., Leder, P., 1988. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55, 917–924. doi:10.1016/0092-8674(88)90147-X
- Han, J.**, Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J., 1997. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386, 296–299. doi:10.1038/386296a0
- Handelsman, L.**, Aronson, M.J., Ness, R., Cochrane, K.J., Kanof, P.D., 1992. The dysphoria of heroin addiction. *Am J Drug Alcohol Abuse* 18, 275–287.
- Hariri, A.R.**, Mattay, V.S., Tessitore, A., Kolachana, B., Fera, F., Goldman, D., Egan, M.F., Weinberger, D.R., 2002. Serotonin Transporter Genetic Variation and the Response of the Human Amygdala. *Science* 297, 400–403. doi:10.1126/science.1071829
- Hasegawa, S.**, Nishi, K., Watanabe, A., Overstreet, D.H., Diksic, M., 2006. Brain 5-HT synthesis in the Flinders Sensitive Line rat model of depression: An autoradiographic study. *Neurochemistry International* 48, 358–366. doi:10.1016/j.neuint.2005.11.012
- Haskins, J.T.**, Moyer, J.A., Muth, E.A., Sigg, E.B., 1985. DMI, Wy-45,030, Wy-45,881 and cimamadol inhibit locus coeruleus neuronal activity. *Eur. J. Pharmacol.* 115, 139–146.
- Hébert, C.**, Habimana, A., Elie, R., Reader, T.A., 2001. Effects of chronic antidepressant treatments on 5-HT and NA transporters in rat brain: an autoradiographic study. *Neurochem. Int.* 38, 63–74.
- Heils, A.**, Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, K.P., 1996. Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression. *Journal of Neurochemistry* 66, 2621–2624. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66062621.x
- Heim, C.**, Newport, D.J., Mletzko, T., Miller, A.H., Nemeroff, C.B., 2008. The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 33, 693–710. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.03.008
- Hermann, M.**, Hendset, M., Fosaas, K., Hjerpsset, M., Refsum, H., 2008. Serum concentrations of venlafaxine and its metabolites O-desmethylvenlafaxine and N-desmethylvenlafaxine in heterozygous carriers of the CYP2D6*3, *4 or *5 allele. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 64, 483–487. doi:10.1007/s00228-007-0453-7
- Heumann** et al., 1987. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 104, 1623–1631.
- Hewett, K.**, Gee, M.D., Krishen, A., Wunderlich, H.-P., Clus, A.L., Evoniuk, G., Modell, J.G., 2010. Double-blind, placebo-controlled comparison of the antidepressant efficacy and tolerability of bupropion XR and venlafaxine XR. *J Psychopharmacol* 24, 1209–1216. doi:10.1177/0269881109106953
- Hicks, J.K.**, Swen, J.J., Thorn, C.F., Sangkuhl, K., Kharasch, E.D., Ellingrod, V.L., Skaar, T.C., Muller, D.J., Gaedigk, A., Stingl, J.C., 2013. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Tricyclic Antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 93, 402–408. doi:10.1038/clpt.2013.2
- Hiemke, C.**, Baumann, P., Bergemann, N., Conca, A., Dietmaier, O., Egberts, K., Fric, M., Gerlach, M., Greiner, C., Gründer, G., Haen, E., Havemann-Reinecke, U., Jaquenoud Sirot, E., Kirchherr, H., Laux, G., Lutz, U., Messer, T., Müller, M., Pfuhlmann, B., Rambeck, B., Riederer, P., Schoppek, B., Stingl, J., Uhr, M., Ulrich, S., Waschgler, R., Zernig, G., 2011. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry* 44, 195–235. doi:10.1055/s-0031-1286287
- Howell, S.R.**, Husbands, G.E., Scatina, J.A., Sisenwine, S.F., 1993. Metabolic disposition of ¹⁴C-venlafaxine in mouse, rat, dog, rhesus monkey and man. *Xenobiotica* 23, 349–359. doi:10.3109/00498259309057023
- Hu X**, Rush A, Charney D, et al, 2007. Association between a functional serotonin transporter promoter polymorphism and citalopram treatment in adult outpatients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* 64, 783–792. doi:10.1001/archpsyc.64.7.783
- Hu, X.-Z.**, Lipsky, R.H., Zhu, G., Akhtar, L.A., Taubman, J., Greenberg, B.D., Xu, K., Arnold, P.D., Richter, M.A., Kennedy, J.L., Murphy, D.L., Goldman, D., 2006. Serotonin Transporter Promoter Gain-of-Function Genotypes Are Linked to Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Hum Genet* 78, 815–826.
- Huber, W.**, von Heydebreck, A., Sültmann, H., Poustka, A., Vingron, M., 2002. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S96–104.
- Huezo-Diaz, P.**, Uher, R., Smith, R., Rietschel, M., Henigsberg, N., Marušič, A., Mors, O., Maier, W., Hauser, J., Souery, D., Placentino, A., Zobel, A., Larsen, E.R., Czernski, P.M., Gupta, B., Hoda, F., Perroud, N., Farmer, A., Craig, I., Aitchison, K.J., McGuffin, P., 2009. Moderation of antidepressant response by the serotonin transporter gene. *BJP* 195, 30–38. doi:10.1192/bjp.bp.108.062521
- Hughes, Z.**, Stanford, S.C., 1996. Increased noradrenaline efflux induced by local infusion of fluoxetine in the rat frontal cortex. *European Journal of Pharmacology* 317, 83–90. doi:10.1016/S0014-2999(96)00715-7

- Huotari, M.**, Gogos, J.A., Karayiorgou, M., Koponen, O., Forsberg, M., Raasmaja, A., Hyttinen, J., Männistö, P.T., 2002. Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficient mice. *European Journal of Neuroscience* 15, 246–256. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01856.x
- Ide, S.**, Fujiwara, S., Fujiwara, M., Sora, I., Ikeda, K., Minami, M., Uhl, G.R., Ishihara, K., 2010. Antidepressant-like effect of venlafaxine is abolished in μ -opioid receptor-knockout mice. *J. Pharmacol. Sci.* 114, 107–110.
- Illi, A.**, Poutanen, O., Setälä-Soikkeli, E., Kampman, O., Viikki, M., Huhtala, H., Mononen, N., Haraldsson, S., Koivisto, P.A., Leinonen, E., Lehtimäki, T., 2010. Is 5-HTTLPR linked to the response of selective serotonin reuptake inhibitors in MDD? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 261, 95–102. doi:10.1007/s00406-010-0126-x
- Iritani, S.**, Tohgi, M., Arai, T., Ikeda, K., 2006. Immunohistochemical study of the serotonergic neuronal system in an animal model of the mood disorder. *Experimental Neurology* 201, 60–65. doi:10.1016/j.expneurol.2006.03.013
- Irizarry, R.A.**, Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B., Speed, T.P., 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31, e15.
- Izquierdo, I.**, Medina, J.H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68, 285–316. doi:10.1006/nlme.1997.3799
- Jacobs, B.L.**, van Praag, H., Gage, F.H., 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry* 5, 262–269.
- Jessberger, S.**, Aigner, S., Clemenson, G.D., Toni, N., Lie, D.C., Karalay, O., Overall, R., Kempermann, G., Gage, F.H., 2008. Cdk5 Regulates Accurate Maturation of Newborn Granule Cells in the Adult Hippocampus. *PLoS Biol* 6. doi:10.1371/journal.pbio.0060272
- Jiang, Q.**, Ahmed, S., 2009. An analysis of correlations among four outcome scales employed in clinical trials of patients with major depressive disorder. *Ann Gen Psychiatry* 8, 4. doi:10.1186/1744-859X-8-4
- Joseph, L.J.**, Le Beau, M.M., Jamieson, G.A., Acharya, S., Shows, T.B., Rowley, J.D., Sukhatme, V.P., 1988. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with “zinc-binding finger” structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7164–7168.
- Joung, Y.**, Kim, C.-H., Moon, J., Jang, W.-S., Yang, J., Shin, D., Lee, S., Kim, K.-S., 2010. Association studies of –3081(A/T) polymorphism of norepinephrine transporter gene with attention deficit/hyperactivity disorder in Korean population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 153B, 691–694. doi:10.1002/ajmg.b.31012
- Joyce, P.R.**, Mulder, R.T., Luty, S.E., McKenzie, J.M., Miller, A.L., Rogers, G.R., Kennedy, M.A., 2003. Age-dependent antidepressant pharmacogenomics: polymorphisms of the serotonin transporter and G protein $\beta 3$ subunit as predictors of response to fluoxetine and nortriptyline. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 6, 339–346. doi:10.1017/S1461145703003663
- Juruena, M.F.**, n.d. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy & Behavior*. doi:10.1016/j.yebeh.2013.10.020
- Kálmán, J.**, Palotás, A., Juhász, A., Rimanóczy, A., Hügycz, M., Kovács, Z., Galsi, G., Szabó, Z., Pákási, M., Fehér, L.Z., Janka, Z., Puskás, L.G., 2005. Impact of venlafaxine on gene expression profile in lymphocytes of the elderly with major depression--evolution of antidepressants and the role of the “neuro-immune” system. *Neurochem. Res.* 30, 1429–1438. doi:10.1007/s11064-005-8513-9
- Kaplan, M.S.**, Hinds, J.W., 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092–1094.
- Karlsson, L.**, Hiemke, C., Carlsson, B., Josefsson, M., Ahlner, J., Bengtsson, F., Schmitt, U., Kugelberg, F.C., 2011. Effects on enantiomeric drug disposition and open-field behavior after chronic treatment with venlafaxine in the P-glycoprotein knockout mice model. *Psychopharmacology (Berl.)* 215, 367–377. doi:10.1007/s00213-010-2148-5
- Karlsson, L.**, Schmitt, U., Josefsson, M., Carlsson, B., Ahlner, J., Bengtsson, F., Kugelberg, F.C., Hiemke, C., 2010. Blood-brain barrier penetration of the enantiomers of venlafaxine and its metabolites in mice lacking P-glycoprotein. *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 632–640. doi:10.1016/j.euroneuro.2010.04.004
- Karmarkar, U.R.**, Buonomano, D.V., 2002. A Model of Spike-Timing Dependent Plasticity: One or Two Coincidence Detectors? *J Neurophysiol* 88, 507–513.
- Katzman, M.A.**, Jacobs, L., 2007. Venlafaxine in the treatment of panic disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3, 59–67.
- Kemp, A.**, Tischmeyer, W., Manahan-Vaughan, D., 2013. Learning-facilitated long-term depression requires activation of the immediate early gene, c-fos, and is transcription dependent. *Behavioural Brain Research* 254, 83–91. doi:10.1016/j.bbr.2013.04.036
- Kendler, K.S.**, Karkowski, L.M., Prescott, C.A., 1999. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156, 837–841.

- Kendler, K.S.**, Sheth, K., Gardner, C.O., Prescott, C.A., 2002. Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychol Med* 32, 1187–1194.
- Khoutorsky, A.**, Yanagiya, A., Gkogkas, C.G., Fabian, M.R., Prager-Khoutorsky, M., Cao, R., Gamache, K., Bouthiette, F., Parsyan, A., Sorge, R.E., Mogil, J.S., Nader, K., Lacaille, J.-C., Sonenberg, N., 2013. Control of Synaptic Plasticity and Memory via Suppression of Poly(A)-Binding Protein. *Neuron* 78, 298–311. doi:10.1016/j.neuron.2013.02.025
- Kim, B.-N.**, Kim, J.-W., Hong, S.B., Cho, S.-C., Shin, M.-S., Yoo, H.-J., 2010. Possible association of norepinephrine transporter -3081(A/T) polymorphism with methylphenidate response in attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct* 6, 57. doi:10.1186/1744-9081-6-57
- Kim, C.-H.**, Hahn, M.K., Joung, Y., Anderson, S.L., Steele, A.H., Mazei-Robinson, M.S., Gizer, I., Teicher, M.H., Cohen, B.M., Robertson, D., Waldman, I.D., Blakely, R.D., Kim, K.-S., 2006. A polymorphism in the norepinephrine transporter gene alters promoter activity and is associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *PNAS* 103, 19164–19169. doi:10.1073/pnas.0510836103
- Kirchheiner, J.**, Nickchen, K., Sasse, J., Bauer, M., Roots, I., Brockmüller, J., 2007. A 40-basepair VNTR polymorphism in the dopamine transporter (DAT1) gene and the rapid response to antidepressant treatment. *Pharmacogenomics J.* 7, 48–55. doi:10.1038/sj.tpj.6500398
- Klamerus, K.J.**, Moloney, K., Rudolph, R.L., Sisenwine, S.F., Jusko, W.J., Chiang, S.T., 1992. Introduction of a Composite Parameter to the Pharmacokinetics of Venlafaxine and its Active O-Desmethyl Metabolite. *The Journal of Clinical Pharmacology* 32, 716–724. doi:10.1002/j.1552-4604.1992.tb03875.x
- Klauke, B.**, Deckert, J., Reif, A., Pauli, P., Zwanzger, P., Baumann, C., Arolt, V., Glöckner-Rist, A., Domschke, K., 2011. Serotonin transporter gene and childhood trauma — a G × E effect on anxiety sensitivity. *Depression and Anxiety* 28, 1048–1057. doi:10.1002/da.20840
- Kornhuber, J.**, Quack, G., Danysz, W., Jellinger, K., Danielczyk, W., Gsell, W., Riederer, P., 1995. Therapeutic brain concentration of the NMDA receptor antagonist amantadine. *Neuropharmacology* 34, 713–721. doi:10.1016/0028-3908(95)00056-C
- Kornhuber, J.**, Schultz, A., Wiltfang, J., Meineke, I., Gleiter, C.H., Zöchling, R., Boissl, K.W., Leblhuber, F., Riederer, P., 1999. Persistence of haloperidol in human brain tissue. *Am J Psychiatry* 156, 885–890.
- Kraft, J.B.**, Peters, E.J., Slager, S.L., Jenkins, G.D., Reinalda, M.S., McGrath, P.J., Hamilton, S.P., 2007. Analysis of Association Between the Serotonin Transporter and Antidepressant Response in a Large Clinical Sample. *Biological Psychiatry* 61, 734–742. doi:10.1016/j.biopsych.2006.07.017
- Kraft, J.B.**, Slager, S.L., McGrath, P.J., Hamilton, S.P., 2005. Sequence Analysis of the Serotonin Transporter and Associations with Antidepressant Response. *Biological Psychiatry* 58, 374–381. doi:10.1016/j.biopsych.2005.04.048
- Krishna, V.N.**, Thunga, R., Unnikrishnan, B., Kanchan, T., Bukelo, M.J., Mehta, R.K., Venugopal, A., 2013. Association between bipolar affective disorder and thyroid dysfunction. *Asian Journal of Psychiatry* 6, 42–45. doi:10.1016/j.ajp.2012.08.003
- Kubera, M.**, Lin, A.H., Kenis, G., Bosmans, E., van Bockstaele, D., Maes, M., 2001. Anti-Inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio. *J Clin Psychopharmacol* 21, 199–206.
- Larsen, M.H.**, Mikkelsen, J.D., Hay-Schmidt, A., Sandi, C., 2010. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J Psychiatr Res* 44, 808–816. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.01.005
- Lazary, J.**, Lazary, A., Gonda, X., Benko, A., Molnar, E., Juhasz, G., Bagdy, G., 2008. New Evidence for the Association of the Serotonin Transporter Gene (SLC6A4) Haplotypes, Threatening Life Events, and Depressive Phenotype. *Biological Psychiatry* 64, 498–504. doi:10.1016/j.biopsych.2008.03.030
- Lee, B.-H.**, Myint, A.M., Kim, Y.-K., 2010. Psychotropic drugs on in vitro brain-derived neurotrophic factor production in whole blood cell cultures from healthy subjects. *J Clin Psychopharmacol* 30, 623–627. doi:10.1097/JCP.0b013e3181f13f0b
- Lee, H.-Y.**, Kim, Y.-K., 2008. Plasma brain-derived neurotrophic factor as a peripheral marker for the action mechanism of antidepressants. *Neuropsychobiology* 57, 194–199. doi:10.1159/000149817
- Lee, S.-H.**, Choi, T.K., Lee, E., Seok, J.-H., Lee, S.H., Lee, H.S., Kim, S.J., 2010. Serotonin Transporter Gene Polymorphism Associated with Short-Term Treatment Response to Venlafaxine. *Neuropsychobiology* 62, 198–206. doi:10.1159/000319362
- Lesch, K.-P.**, Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Müller, C.R., Hamer, D.H., Murphy, D.L., 1996. Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region. *Science* 274, 1527–1531. doi:10.1126/science.274.5292.1527
- Lesch, K.P.**, Wolozin, B.L., Murphy, D.L., Reiderer, P., 1993. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J. Neurochem.* 60, 2319–2322.
- Lessard, E.**, Yessine, M.A., Hamelin, B.A., O'Hara, G., LeBlanc, J., Turgeon, J., 1999. Influence of CYP2D6 activity on the disposition and cardiovascular toxicity of the antidepressant agent venlafaxine in humans. *Pharmacogenetics* 9, 435–443.

- Leucht, C., Huhn, M., Leucht, S., 2012.** Amitriptyline versus placebo for major depressive disorder. *Cochrane Database Syst Rev* 12, CD009138. doi:10.1002/14651858.CD009138.pub2
- Leventhal, A.M., Ameringer, K.J., Osborn, E., Zvolensky, M.J., Langdon, K.J., n.d.** Anxiety and depressive symptoms and affective patterns of tobacco withdrawal. *Drug and Alcohol Dependence*. doi:10.1016/j.drugalcdep.2013.06.015
- Levkovitz, Y., Tedeschini, E., Papakostas, G.I., 2011.** Efficacy of antidepressants for dysthymia: a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *J Clin Psychiatry* 72, 509–514. doi:10.4088/JCP.09m05949blu
- Li, H., Radford, J.C., Ragusa, M.J., Shea, K.L., McKercher, S.R., Zaremba, J.D., Soussou, W., Nie, Z., Kang, Y.-J., Nakanishi, N., Okamoto, S., Roberts, A.J., Schwarz, J.J., Lipton, S.A., 2008.** Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9397–9402. doi:10.1073/pnas.0802876105
- Li, J.-M., Kong, L.-D., Wang, Y.-M., Cheng, C.H., Zhang, W.-Y., Tan, W.-Z., 2003.** Behavioral and biochemical studies on chronic mild stress models in rats treated with a Chinese traditional prescription Banxia-houpu decoction. *Life Sciences* 74, 55–73. doi:10.1016/j.lfs.2003.06.030
- Li, P.P., Warsh, J.J., Godse, D.D., 1984.** Formation and Clearance of Norepinephrine Glycol Metabolites in Mouse Brain. *Journal of Neurochemistry* 43, 1425–1433. doi:10.1111/j.1471-4159.1984.tb05404.x
- Li, X.M., Chlan-Fourney, J., Juorio, A.V., Bennett, V.L., Shrikhande, S., Bowen, R.C., 2000.** Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1). *J Psychiatry Neurosci* 25, 43–47.
- Li, Y., Xiao, B., Qiu, W., Yang, L., Hu, B., Tian, X., Yang, H., 2010.** Altered expression of CD4+CD25+ regulatory T cells and its 5-HT1a receptor in patients with major depression disorder. *Journal of Affective Disorders* 124, 68–75. doi:10.1016/j.jad.2009.10.018
- Lloyd, K.G., Farley, I.J., Deck, J.H., Hornykiewicz, O., 1974.** Serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete areas of the brainstem of suicide victims and control patients. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 11, 387–397.
- Lombroso, P., Ogren, M., 2009.** Learning and Memory, Part II: Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 48, 5–9. doi:10.1097/CHI.0b013e318190c4b3
- Lucki, I., Dalvi, A., Mayorga, A., 2001.** Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology* 155, 315–322. doi:10.1007/s002130100694
- Lundmark, J., Bengtsson, F., Nordin, C., Reis, M., Wälinder, J., 2000.** Therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors influences clinical dosing strategies and reduces drug costs in depressed elderly patients. *Acta Psychiatr Scand* 101, 354–359.
- Lynch, G.S., Dunwiddie, T., Gribkoff, V., 1977.** Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266, 737–739.
- Lyons, M.R., Schwarz, C.M., West, A.E., 2012.** Members of the MEF2 transcription factor family differentially regulate Bdnf transcription in response to neuronal depolarization. *J Neurosci* 32, 12780–12785. doi:10.1523/JNEUROSCI.0534-12.2012
- MacGillavry, H.D., Stam, F.J., Sassen, M.M., Kegel, L., Hendriks, W.T.J., Verhaagen, J., Smit, A.B., Kesteren, R.E. van, 2009.** NFIL3 and cAMP Response Element-Binding Protein Form a Transcriptional Feedforward Loop that Controls Neuronal Regeneration-Associated Gene Expression. *J. Neurosci.* 29, 15542–15550. doi:10.1523/JNEUROSCI.3938-09.2009
- Maller, J.J., Daskalakis, Z.J., Fitzgerald, P.B., 2007.** Hippocampal volumetrics in depression: the importance of the posterior tail. *Hippocampus* 17, 1023–1027. doi:10.1002/hipo.20339
- Marchesi, C., De Panfilis, C., Tonna, M., Ossola, P., 2013.** Is placebo useful in the treatment of major depression in clinical practice? *Neuropsychiatr Dis Treat* 9, 915–920. doi:10.2147/NDT.S44519
- Martino, M., Rocchi, G., Escelsior, A., Fornaro, M., 2012.** Immunomodulation Mechanism of Antidepressants: Interactions between Serotonin/Norepinephrine Balance and Th1/Th2 Balance. *Curr Neuropharmacol* 10, 97–123. doi:10.2174/157015912800604542
- Matsuura, K., Nakamura-Hirota, T., Takano, M., Otani, M., Kadoyama, K., Matsuyama, S., n.d.** Proteomic analysis of time-dependent changes in proteins expressed in mouse hippocampus during synaptic plasticity induced by GABAA receptor blockade. *Neuroscience Letters*. doi:10.1016/j.neulet.2013.07.036
- McAskill, R., Mir, S., Taylor, D., 1998.** Pindolol augmentation of antidepressant therapy. *Br J Psychiatry* 173, 203–208.
- McKenzie, S., Robinson, N.T.M., Herrera, L., Churchill, J.C., Eichenbaum, H., 2013.** Learning Causes Reorganization of Neuronal Firing Patterns to Represent Related Experiences within a Hippocampal Schema. *J. Neurosci.* 33, 10243–10256. doi:10.1523/JNEUROSCI.0879-13.2013
- McQuade, J.M.S., Tamashiro, K.L.K., Wood, G.E., Herman, J.P., McEwen, B.S., Sakai, R.R., Zhang, J., Xu, M., 2006.** Deficient hippocampal c-fos expression results in reduced anxiety and altered response to chronic stress in female mice. *Neuroscience Letters* 403, 125–130. doi:10.1016/j.neulet.2006.04.022

- Mendez-David, I.**, Hen, R., Gardier, A.M., David, D.J., 2013. Adult hippocampal neurogenesis: an actor in the antidepressant-like action. *Ann Pharm Fr* 71, 143–149. doi:10.1016/j.pharma.2013.02.006
- Mendlewicz, J.**, 1995. Pharmacologic profile and efficacy of venlafaxine. *Int Clin Psychopharmacol* 10 Suppl 2, 5–13.
- Miller, S.A.**, Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215.
- Mirza, N.R.**, Nielsen, E.Ø., Troelsen, K.B., 2007. Serotonin transporter density and anxiolytic-like effects of antidepressants in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31, 858–866. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.01.020
- Mitsui, S.**, Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., Okamura, H., 2001. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev* 15, 995–1006. doi:10.1101/gad.873501
- Molnár, E.**, 2011. Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22, 506–513. doi:10.1016/j.semcdb.2011.07.017
- Mongeau, R.**, Blier, P., de Montigny, C., 1993. In vivo electrophysiological evidence for tonic activation by endogenous noradrenaline of alpha 2-adrenoceptors on 5-hydroxytryptamine terminals in the rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 347, 266–272.
- Montgomery, S.A.**, 2008. Tolerability of serotonin norepinephrine reuptake inhibitor antidepressants. *CNS Spectr* 13, 27–33.
- Morgan, J.I.**, Curran, T., 1991. Stimulus-Transcription Coupling in the Nervous System: Involvement of the Inducible Proto-Oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience* 14, 421–451. doi:10.1146/annurev.ne.14.030191.002225
- Mrazek, D. a.**, Rush, A. j., Biernacka, J. m., O’Kane, D. j., Cunningham, J. m., Wieben, E. d., Schaid, D. j., Drews, M. s., Courson, V. l., Snyder, K. a., Black, J. l., Weinshilboum, R. m., 2009. SLC6A4 variation and citalopram response. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 150B, 341–351. doi:10.1002/ajmg.b.30816
- Müller, H.K.**, Wegener, G., Popoli, M., Elfving, B., 2011. Differential expression of synaptic proteins after chronic restraint stress in rat prefrontal cortex and hippocampus. *Brain Res.* 1385, 26–37. doi:10.1016/j.brainres.2011.02.048
- Munafò, M.R.**, Durrant, C., Lewis, G., Flint, J., 2009. Gene X environment interactions at the serotonin transporter locus. *Biol. Psychiatry* 65, 211–219. doi:10.1016/j.biopsych.2008.06.009
- Muneoka, K.**, Shirayama, Y., Takigawa, M., Shioda, S., 2009. Brain region-specific effects of short-term treatment with duloxetine, venlafaxine, milnacipran and sertraline on monoamine metabolism in rats. *Neurochem. Res.* 34, 542–555. doi:10.1007/s11064-008-9818-2
- Muramoto, O.**, Ando, K., Kanazawa, I., 1982. Central noradrenaline metabolism in cerebellar ataxic mice. *Brain Research* 237, 387–395. doi:10.1016/0006-8993(82)90450-4
- Muth, E.A.**, Haskins, J.T., Moyer, J.A., Husbands, G.E.M., Nielsen, S.T., Sigg, E.B., 1986. Antidepressant biochemical profile of the novel bicyclic compound Wy-45,030, an ethyl cyclohexanol derivative. *Biochemical Pharmacology* 35, 4493–4497. doi:10.1016/0006-2952(86)90769-0
- Nakamura, M.**, Ueno, S., Sano, A., Tanabe, H., 2000. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Molecular Psychiatry* 5, 32–38. doi:10.1038/sj.mp.4000698
- Nutt, D.J.**, 2002. The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int Clin Psychopharmacol* 17 Suppl 1, S1–12.
- Ohno, T.**, Onishi, Y., Ishida, N., 2007. A novel E4BP4 element drives circadian expression of mPeriod2. *Nucleic Acids Res* 35, 648–655. doi:10.1093/nar/gkl868
- Oliveira, J.F.**, Dias, N.S., Correia, M., Gama-Pereira, F., Sardinha, V.M., Lima, A., Oliveira, A.F., Jacinto, L.R., Ferreira, D.S., Silva, A.M., Reis, J.S., Cerqueira, J.J., Sousa, N., 2013. Chronic stress disrupts neural coherence between cortico-limbic structures. *Front Neural Circuits* 7. doi:10.3389/fncir.2013.00010
- Olton, D.S.**, Walker, J.A., Wolf, W.A., 1982. A disconnection analysis of hippocampal function. *Brain Research* 233, 241–253. doi:10.1016/0006-8993(82)91200-8
- Owens, M.J.**, Krulewicz, S., Simon, J.S., Sheehan, D.V., Thase, M.E., Carpenter, D.J., Plott, S.J., Nemeroff, C.B., 2008. Estimates of serotonin and norepinephrine transporter inhibition in depressed patients treated with paroxetine or venlafaxine. *Neuropsychopharmacology* 33, 3201–3212. doi:10.1038/npp.2008.47
- Owens, M.J.**, Nemeroff, C.B., 1993. The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. *Ciba Found. Symp.* 172, 296–308; discussion 308–316.
- Pariante, C.M.**, Miller, A.H., 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological Psychiatry* 49, 391–404. doi:10.1016/S0006-3223(00)01088-X
- Park, J.-K.**, Lee, S.-J., Oh, C.-S., 2013. Treadmill exercise exerts ameliorating effect on isolation-induced depression via neuronal activation. *J Exerc Rehabil* 9, 234–242. doi:10.12965/jer.130005

- Patat, A.**, Troy, S., Burke, J., Trocherie, S., Danjou, P., Coz, F.L., Allain, H., Gandon, J.-M., 1998. Absolute Bioavailability and Electroencephalographic Effects of Conventional and Extended-Release Formulations of Venlafaxine in Healthy Subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology* 38, 256–267. doi:10.1002/j.1552-4604.1998.tb04423.x
- Paylor, R.**, Johnson, R.S., Papaioannou, V., Spiegelman, B.M., Wehner, J.M., 1994. Behavioral assessment of c-fos mutant mice. *Brain Research* 651, 275–282. doi:10.1016/0006-8993(94)90707-2
- Pearen, M.A.**, Muscat, G.E.O., 2010. Minireview: Nuclear Hormone Receptor 4A Signaling: Implications for Metabolic Disease. *Molecular Endocrinology* 24, 1891–1903. doi:10.1210/me.2010-0015
- Peebles, C.L.**, Yoo, J., Thwin, M.T., Palop, J.J., Noebels, J.L., Finkbeiner, S., 2010. Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18173–18178. doi:10.1073/pnas.1006546107
- Plath, N.**, Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S.F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bösl, M.R., Lipp, H.-P., Grant, S.G.N., Bliss, T.V.P., Wolfer, D.P., Kuhl, D., 2006. Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and Memories. *Neuron* 52, 437–444. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.024
- Poirier, R.**, Cheval, H., Mailhes, C., Charnay, P., Davis, S., Laroche, S., 2007. Paradoxical Role of an Egr Transcription Factor Family Member, Egr2/Krox20, in Learning and Memory. *Front Behav Neurosci* 1. doi:10.3389/neuro.08.006.2007
- Pollock, B.G.**, Ferrell, R.E., Mulsant, B.H., Mazumdar, S., Miller, M., Sweet, R.A., Davis, S., Kirshner, M.A., Houck, P.R., Stack, J.A., Reynolds Iii, C.F., Kupfer, D.J., 2000. Allelic Variation in the Serotonin Transporter Promoter Affects Onset of Paroxetine Treatment Response in Late-Life Depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 587–590. doi:10.1016/S0893-133X(00)00132-9
- Praschak-Rieder, N.**, Kennedy, J., Wilson, A.A., Hussey, D., Boovariwala, A., Willeit, M., Ginovart, N., Tharmalingam, S., Masellis, M., Houle, S., Meyer, J.H., 2007. Novel 5-HTTLPR Allele Associates with Higher Serotonin Transporter Binding in Putamen: A [11C] DASB Positron Emission Tomography Study. *Biological Psychiatry* 62, 327–331. doi:10.1016/j.biopsych.2006.09.022
- Preskorn, S.H.**, Fast, G.A., 1991. Therapeutic drug monitoring for antidepressants: efficacy, safety, and cost effectiveness. *J Clin Psychiatry* 52 Suppl, 23–33.
- Preskorn, S.H.**, Kane, C.P., Lobello, K., Nichols, A.I., Fayyad, R., Buckley, G., Focht, K., Guico-Pabia, C.J., 2013. Cytochrome P450 2D6 phenoconversion is common in patients being treated for depression: implications for personalized medicine. *J Clin Psychiatry* 74, 614–621. doi:10.4088/JCP.12m07807
- Ramiro-Cortes, Y.**, Israely, I., 2013. Long Lasting Protein Synthesis- and Activity-Dependent Spine Shrinkage and Elimination after Synaptic Depression. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0071155
- Reed, K.**, Watkins, M., Dobson, H., 1983. Mania in Cushing's syndrome: case report. *J Clin Psychiatry* 44, 460–462.
- Reimherr, F.**, Amsterdam, J., Dunner, D., Adler, L., Zhang, S., Williams, D., Marchant, B., Michelson, D., Nierenberg, A., Schatzberg, A., Feldman, P., 2010. Genetic polymorphisms in the treatment of depression: Speculations from an augmentation study using atomoxetine. *Psychiatry Research* 175, 67–73. doi:10.1016/j.psychres.2009.01.005
- Renner, T.J.**, Nguyen, T.T., Romanos, M., Walitza, S., Röser, C., Reif, A., Schäfer, H., Warnke, A., Gerlach, M., Lesch, K.P., 2011. No evidence for association between a functional promoter variant of the Norepinephrine Transporter gene SLC6A2 and ADHD in a family-based sample. *Atten Defic Hyperact Disord* 3, 285–289. doi:10.1007/s12402-011-0060-4
- Richter, D.**, Berger, K., Reker, T., 2008. Nehmen psychische Störungen zu? Eine systematische Literaturübersicht. *Psychiatrische Praxis* 35, 321–330. doi:10.1055/s-2008-1067570
- Ripoll, N.**, David, D.J.P., Dailly, E., Hascoët, M., Bourin, M., 2003. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behavioural Brain Research* 143, 193–200. doi:10.1016/S0166-4328(03)00034-2
- Risch, N.**, Herrell, R., Lehner, T., Liang, K.-Y., Eaves, L., Hoh, J., Griem, A., Kovacs, M., Ott, J., Merikangas, K.R., 2009. Interaction Between the Serotonin Transporter Gene (5-HTTLPR), Stressful Life Events, and Risk of Depression. *JAMA* 301, 2462–2471. doi:10.1001/jama.2009.878
- Ruhé, H.G.**, Ooteman, W., Booij, J., Michel, M.C., Moeton, M., Baas, F., Schene, A.H., 2009. Serotonin transporter gene promoter polymorphisms modify the association between paroxetine serotonin transporter occupancy and clinical response in major depressive disorder. *Pharmacogenet. Genomics* 19, 67–76. doi:10.1097/FPC.0b013e32831a6a3a
- Sapolsky, R.M.**, Krey, L.C., McEwen, B.S., 1986. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr. Rev.* 7, 284–301. doi:10.1210/edrv-7-3-284
- Sarvey, J.M.**, Burgard, E.C., Decker, G., 1989. Long-term potentiation: studies in the hippocampal slice. *Journal of Neuroscience Methods* 28, 109–124. doi:10.1016/0165-0270(89)90016-2
- Segal, M.**, 1979. A potent inhibitory monosynaptic hypothalamo-hippocampal connection. *Brain Research* 162, 137–141. doi:10.1016/0006-8993(79)90762-5

- Seivewright, N.**, Dougal, W., 1993. Withdrawal symptoms from high dose benzodiazepines in poly drug users. *Drug and Alcohol Dependence* 32, 15–23. doi:10.1016/0376-8716(93)90018-L
- Sengupta, S.M.**, Grizenko, N., Thakur, G.A., Bellingham, J., DeGuzman, R., Robinson, S., TerStepanian, M., Poloskia, A., Shaheen, S.M., Fortier, M.-E., Choudhry, Z., Joober, R., 2012. Differential association between the norepinephrine transporter gene and ADHD: role of sex and subtype. *J Psychiatry Neurosci* 37, 129–137. doi:10.1503/jpn.110073
- Serretti, A.**, Kato, M., De Ronchi, D., Kinoshita, T., 2007. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with selective serotonin reuptake inhibitor efficacy in depressed patients. *Mol. Psychiatry* 12, 247–257. doi:10.1038/sj.mp.4001926
- Sesack, S.R.**, Grace, A.A., 2010. Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35, 27–47. doi:10.1038/npp.2009.93
- Shaw, D.M.**, Camps, F.E., Eccleston, E.G., 1967. 5-Hydroxytryptamine in the hind-brain of depressive suicides. *Br J Psychiatry* 113, 1407–1411.
- Sheline, Y.I.**, Wang, P.W., Gado, M.H., Csernansky, J.G., Vannier, M.W., 1996. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3908–3913.
- Simmons, S.A.**, Perry, P.J., Rickert, E.D., Browne, J.L., 1985. Cost-benefit analysis of prospective pharmacokinetic dosing of nortriptyline in depressed inpatients. *J Affect Disord* 8, 47–53.
- Smith, D.**, Jensen, P., Gee, A., Hansen, S., Danielsen, E., Andersen, F., Saiz, P.-A., Gjedde, A., 1997. PET neuroimaging with [¹¹C]venlafaxine: serotonin uptake inhibition, biodistribution and binding in living pig brain. *European Neuropsychopharmacology* 7, 195–200. doi:10.1016/S0924-977X(97)00403-3
- Smyth, G.K.**, 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3. doi:10.2202/1544-6115.1027
- Stahl, S.M.**, Grady, M.M., Moret, C., Briley, M., 2005. SNRIs: their pharmacology, clinical efficacy, and tolerability in comparison with other classes of antidepressants. *CNS Spectr* 10, 732–747.
- Stout, S.C.**, Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2002. Regulation of Corticotropin-Releasing Factor Neuronal Systems and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity by Stress and Chronic Antidepressant Treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 1085–1092. doi:10.1124/jpet.300.3.1085
- Sugimoto, Y.**, Kajiwara, Y., Hirano, K., Yamada, S., Tagawa, N., Kobayashi, Y., Hotta, Y., Yamada, J., 2008. Mouse strain differences in immobility and sensitivity to fluvoxamine and desipramine in the forced swimming test: Analysis of serotonin and noradrenaline transporter binding. *European Journal of Pharmacology* 592, 116–122. doi:10.1016/j.ejphar.2008.07.005
- Sullivan, P.F.**, Fan, C., Perou, C.M., 2006. Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 141B, 261–268. doi:10.1002/ajmg.b.30272
- Swaab, D.F.**, Bao, A.-M., Lucassen, P.J., 2005. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews, Stress, Neuropeptides and Age-Related Diseases* 4, 141–194. doi:10.1016/j.arr.2005.03.003
- Tamai, S.**, Imaizumi, K., Kurabayashi, N., Nguyen, M.D., Abe, T., Inoue, M., Fukada, Y., Sanada, K., 2013. Neuroprotective Role of the Basic Leucine Zipper Transcription Factor NFIL3 in Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* jbc.M113.524389. doi:10.1074/jbc.M113.524389
- Tapos, D.**, Sivaswamy, L., 2013. Mood Disorder as the Presenting Manifestation of Demyelination. *Case Reports in Neurology* 5, 104–109. doi:10.1159/000351282
- Thoenen, H.**, Barde, Y.A., Edgar, D., 1981. The role of nerve growth factor (NGF) and related factors for the survival of peripheral neurons. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 28, 263–273.
- Troy, S.M.**, Parker, V.P., Hicks, D.R., Pollack, G.M., Chiang, S.T., 1997. Pharmacokinetics and effect of food on the bioavailability of orally administered venlafaxine. *J Clin Pharmacol* 37, 954–961.
- Turner, A.D.**, Furey, M., Drevets, W.C., Zarate, C., Nugent, A., 2012. Association Between Subcortical Volumes and Verbal Memory in Unmedicated Depressed Patients and Healthy Controls. *Neuropsychologia* 50, 2348–2355. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2012.06.003
- Ueda, H.R.**, Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M., Hashimoto, S., 2005. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat. Genet.* 37, 187–192. doi:10.1038/ng1504
- Van Heerden, J.H.**, Conesa, A., Stein, D.J., Montaner, D., Russell, V., Illing, N., 2009. Parallel changes in gene expression in peripheral blood mononuclear cells and the brain after maternal separation in the mouse. *BMC Res Notes* 2, 195. doi:10.1186/1756-0500-2-195
- Van Praag, H.**, Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030–1034. doi:10.1038/4151030a
- Vandesompele, J.**, Preter, K.D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N.V., Paepe, A.D., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, research0034. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Veefkind, A.H.**, Haffmans, P.M., Hoencamp, E., 2000. Venlafaxine serum levels and CYP2D6 genotype. *Ther Drug Monit* 22, 202–208.

- Vertes, R.P.**, 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142, 1–20. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.06.027
- Vollmar, P.**, Haghikia, A., Dermietzel, R., Faustmann, P.M., 2008. Venlafaxine exhibits an anti-inflammatory effect in an inflammatory co-culture model. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11, 111–117. doi:10.1017/S1461145707007729
- Vollmar, P.**, Nessler, S., Kalluri, S.R., Hartung, H.-P., Hemmer, B., 2009. The antidepressant venlafaxine ameliorates murine experimental autoimmune encephalomyelitis by suppression of pro-inflammatory cytokines. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 12, 525–536. doi:10.1017/S1461145708009425
- Wang, Z.**, Baker, D.G., Harrer, J., Hamner, M., Price, M., Amstadter, A., 2011. THE RELATIONSHIP BETWEEN COMBAT-RELATED POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER AND THE 5-HTTLPR/rs25531 POLYMORPHISM. *Depress Anxiety* 28, 1067–1073. doi:10.1002/da.20872
- Watanabe, Y.**, Gould, E., McEwen, B.S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* 588, 341–345.
- Weber, B.**, Lewicka, S., Deuschle, M., Colla, M., Vecsei, P., Heuser, I., 2000. Increased diurnal plasma concentrations of cortisone in depressed patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1133–1136. doi:10.1210/jcem.85.3.6469
- Weiss, J.**, Dormann, S.-M.G., Martin-Facklam, M., Kerpen, C.J., Ketabi-Kiyanvash, N., Haefeli, W.E., 2003. Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 197–204. doi:10.1124/jpet.102.046532
- Weiss, J.M.**, Goodman, P.A., Losito, B.G., Corrigan, S., Charry, J.M., Bailey, W.H., 1981. Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: Relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. *Brain Research Reviews* 3, 167–205. doi:10.1016/0165-0173(81)90005-9
- Wendland, J.R.**, Martin, B.J., Kruse, M.R., Lesch, K.-P., Murphy, D.L., 2006. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol Psychiatry* 11, 224–226. doi:10.1038/sj.mp.4001789
- Wijnen, P.A.H.M.**, Limantoro, I., Drent, M., Bekers, O., Kuijpers, P.M.J.C., Koek, G.H., 2009. Depressive effect of an antidepressant: therapeutic failure of venlafaxine in a case lacking CYP2D6 activity. *Ann. Clin. Biochem.* 46, 527–530. doi:10.1258/acb.2009.009003
- Wilkie, M.J.V.**, Smith, G., Day, R.K., Matthews, K., Smith, D., Blackwood, D., Reid, I.C., Wolf, C.R., 2009. Polymorphisms in the SLC6A4 and HTR2A genes influence treatment outcome following antidepressant therapy. *Pharmacogenomics J.* 9, 61–70. doi:10.1038/sj.tpj.6500491
- Williams, J.**, Draganow, M., Lawlor, P., Mason, S., Abraham, W.C., Leah, J., Bravo, R., Demmer, J., Tate, W., 1995. Krox20 may play a key role in the stabilization of long-term potentiation. *Molecular Brain Research* 28, 87–93. doi:10.1016/0169-328X(94)00187-J
- Wittchen, H.U.**, Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jönsson, B., Olesen, J., Allgulander, C., Alonso, J., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Jennum, P., Lieb, R., Maercker, A., van Os, J., Preisig, M., Salvador-Carulla, L., Simon, R., Steinhausen, H.-C., 2011. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology* 21, 655–679. doi:10.1016/j.euroneuro.2011.07.018
- Won, E.-S.**, Chang, H.-S., Lee, H.-Y., Ham, B.-J., Lee, M.-S., 2012. Association between Serotonin Transporter-Linked Polymorphic Region and Escitalopram Antidepressant Treatment Response in Korean Patients with Major Depressive Disorder. *Neuropsychobiology* 66, 221–229. doi:10.1159/000341876
- Yamajuku, D.**, Shibata, Y., Kitazawa, M., Katakura, T., Urata, H., Kojima, T., Takayasu, S., Nakata, O., Hashimoto, S., 2011. Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator. *FEBS Letters* 585, 2217–2222. doi:10.1016/j.febslet.2011.05.038
- Yang, Y.**, Zhou, Q., 2009. Spine Modifications Associated with Long-Term Potentiation. *Neuroscientist* 15, 464–476. doi:10.1177/1073858409340800
- Yankner, B.A.**, Shooter, E.M., 1982. The Biology and Mechanism of Action of Nerve Growth Factor. *Annual Review of Biochemistry* 51, 845–868. doi:10.1146/annurev.bi.51.070182.004213
- Yasoshima, Y.**, Sako, N., Senba, E., Yamamoto, T., 2006. Acute suppression, but not chronic genetic deficiency, of c-fos gene expression impairs long-term memory in aversive taste learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7106–7111. doi:10.1073/pnas.0600869103
- Yoshimura, R.**, Mitoma, M., Sugita, A., Hori, H., Okamoto, T., Umene, W., Ueda, N., Nakamura, J., 2007. Effects of paroxetine or milnacipran on serum brain-derived neurotrophic factor in depressed patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 1034–1037. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.03.001
- Zanardi, R.**, Serretti, A., Rossini, D., Franchini, L., Cusin, C., Lattuada, E., Dotoli, D., Smeraldi, E., 2001. Factors affecting fluvoxamine antidepressant activity: influence of pindolol and 5-httlpr in delusional and nondelusional depression. *Biological Psychiatry* 50, 323–330. doi:10.1016/S0006-3223(01)01118-0

- Zhang, Y.**, Gu, F., Chen, J., Dong, W., 2010. Chronic antidepressant administration alleviates frontal and hippocampal BDNF deficits in CUMS rat. *Brain Res.* 1366, 141–148. doi:10.1016/j.brainres.2010.09.095
- Zhao, Y.**, Bruemmer, D., 2010. NR4A Orphan Nuclear Receptors: Transcriptional Regulators of Gene Expression in Metabolism and Vascular Biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1535–1541. doi:10.1161/ATVBAHA.109.191163
- Zhao, Z.**, Zhang, H.-T., Bootzin, E., Millan, M.J., O'Donnell, J.M., 2009. Association of changes in norepinephrine and serotonin transporter expression with the long-term behavioral effects of antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology* 34, 1467–1481. doi:10.1038/npp.2008.183
- Zhou, S.-F.**, 2009. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet* 48, 689–723. doi:10.2165/11318030-000000000-00000

VIII. Publikationsliste

- Grünblatt, E.,** Proft, F., Apfelbacher, M., Deckert, J., Roggendorf, W., Riederer, P., Monoranu, C.M., 2010. Brain tryptophan rather than pH-value is altered as consequence of artificial postmortem interval and storage conditions. *Neurochemistry International* 57, 819–822. doi:10.1016/j.neuint.2010.08.020
- Gutknecht, L.,** Araragi, N., Merker, S., Waider, J., Sommerlandt, F.M.J., Mlinar, B., Baccini, G., Mayer, U., Proft, F., Hamon, M., Schmitt, A.G., Corradetti, R., Lanfumey, L., Lesch, K.-P., 2012. Impacts of Brain Serotonin Deficiency following Tph2 Inactivation on Development and Raphe Neuron Serotonergic Specification. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0043157
- Lange, M.,** Norton, W., Coolen, M., Chaminade, M., Merker, S., Proft, F., Schmitt, A., Vernier, P., Lesch, K.-P., Bally-Cuif, L., 2012a. The ADHD-linked gene *Lphn3.1* controls locomotor activity and impulsivity in zebrafish. *Mol Psychiatry* 17, 855–855. doi:10.1038/mp.2012.119
- Lange, M.,** Norton, W., Coolen, M., Chaminade, M., Merker, S., Proft, F., Schmitt, A., Vernier, P., Lesch, K.-P., Bally-Cuif, L., 2012b. The ADHD-susceptibility gene *lphn3.1* modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Mol Psychiatry* 17, 946–954. doi:10.1038/mp.2012.29
- Proft, F.,** Kopf, J., Olmes, D., Hempel, S., Schmidt, B., Riederer, P., Deckert, J., Pfuhlmann, B., Reif, A., Unterecker, S., 2014. SLC6A2 and SLC6A4 Variants interact with Venlafaxine Serum Concentrations to Influence Therapy Outcome. *Pharmacopsychiatry*. doi:10.1055/s-0034-1390412
- Unterecker, S.,** Proft, F., Riederer, P., Lauer, M., Deckert, J., Pfuhlmann, B., 2013. The Comparison of Brand-Name and Generic Formulations of Venlafaxine: A Therapeutic Drug Monitoring Analysis. *Ther Drug Monit*. doi:10.1097/FTD.0000000000000008
- Unterecker, S.,** Reif, A., Hempel, S., Proft, F., Riederer, P., Deckert, J., Pfuhlmann, B., n.d. Interaction of valproic acid and the antidepressant drugs doxepin and venlafaxine: analysis of therapeutic drug monitoring data under naturalistic conditions. *International Clinical Psychopharmacology*. doi:10.1097/YIC.0000000000000025
- Unterecker, S.,** Riederer, P., Proft, F., Maloney, J., Deckert, J., Pfuhlmann, B., 2012. Effects of gender and age on serum concentrations of antidepressants under naturalistic conditions. *Journal of Neural Transmission* 120, 1237–1246. doi:10.1007/s00702-012-0952-2
- Waider, J.,** Proft, F., Langlhofer, G., Asan, E., Lesch, K.-P., Gutknecht, L., 2012. GABA concentration and GABAergic neuron populations in limbic areas are differentially altered by brain serotonin deficiency in Tph2 knockout mice. *Histochemistry and Cell Biology* 139, 267–281. doi:10.1007/s00418-012-1029-x
- Wolz, M.,** Schleiffer, C., Klingelhöfer, L., Schneider, C., Proft, F., Schwanebeck, U., Reichmann, H., Riederer, P., Storch, A., 2012. Comparison of chocolate to cacao-free white chocolate in Parkinson's disease: a single-dose, investigator-blinded, placebo-controlled, crossover trial. *J. Neurol.* 259, 2447–2451. doi:10.1007/s00415-012-6527-1

IX. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (Seite 16): schematische Darstellung von Venlafaxin und durch CYP450-Isoenzyme gebildete Metaboliten

Abbildung 2 (Seite 32): vollständiges, gefrorenes Gehirn einer DBA/2-Maus auf Kälteplatte (eigene Aufnahme)

Abbildung 3 (Seite 32): Koronarschnitte von DBA/2-Mausgehirn in sagittaler Aufsicht (eigene Aufnahme)

Abbildung 4 (Seite 55): Konzentrationsmittelwerte der Monoamin-Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT) sowie deren Hauptmetaboliten 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-Dihydroxy-Phenylacetat (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindolacetat (5-HIAA) im Hirnstamm von DBA/2-Mäusen nach einmonatiger Venlafaxin-Applikation (p.o.) in verschiedenen Dosierungen

Abbildung 5 (Seite 56): Konzentrationsmittelwerte der Monoamin-Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT) sowie deren Hauptmetaboliten 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-Dihydroxy-Phenylacetat (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindolacetat (5-HIAA) im Cerebellum von DBA/2-Mäusen nach einmonatiger Venlafaxin-Applikation (p.o.) in verschiedenen Dosierungen

Abbildung 6 (Seite 57): Konzentrationsmittelwerte der Monoamin-Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT) sowie deren Hauptmetaboliten 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-Dihydroxy-Phenylacetat (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindolacetat (5-HIAA) im Kortex von DBA/2-Mäusen nach einmonatiger Venlafaxin-Applikation (p.o.) in verschiedenen Dosierungen

Abbildung 7 (Seite 59): Darstellung der zweidimensionalen Korrespondenzanalyse von Chip 1 - 6

Abbildung 8 (Seite 60): Darstellung der zweidimensionalen Korrespondenzanalyse nach Analyse weiterer Chips (finale Kombination an Chips)

Abbildung 9 (Seite 64): Vergleich der relativen Genexpression der per qRT-PCR analysierten Gene in den Hippokampi von DBA/2-Mäusen nach einmonatiger Venlafaxin-Applikation

Abbildung 10 (Seite 66): Vergleich der relativen Expression der Gene *Dusp1*, *Fos*, *Mef2c* und *Nfil3* in Leukozyten von weiblichen und männlichen Patienten zu zwei Zeitpunkten nach Beginn einer Venlafaxin-Pharmakotherapie

Abbildung 11 (Seite 67): Vergleich der relativen Expression der Gene *Dusp1*, *Fos*, *Mef2c* und *Nfil3* in Leukozyten von weiblichen und männlichen Patienten zu zwei Zeitpunkten nach Beginn einer Venlafaxin-Pharmakotherapie (Subkollektiv mit hohem Serumsummenspiegel zum Zeitpunkt BE XX)

Abbildung 12 (Seite 70): prozentuale Verteilung der *SLC6A4*-Expressionsaktivität bei gutem beziehungsweise schlechtem therapeutischem Ansprechen auf einmonatige Venlafaxin-Applikation beim Menschen

X. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 (Seite 29): Listung der für die Venlafaxin-Dosisfindung bei der Tierstudie herangezogenen Veröffentlichungen

Tabelle 2 (Seite 38): Liste der mittels qRT-PCR in murinem Hippokampusgewebe auf differentielle Expression hin untersuchten Zielgene

Tabelle 3 (Seite 39): Liste der für die Untersuchung der murinen Hippokampi per qRT-PCR in Frage kommenden und verwendeten Referenzgene

Tabelle 4 (Seite 41): Liste der für die qRT-PCR-Analyse muriner Hippokampus-RNA auf differentielle Expression hin getesteten und verwendeten Primerpaare der Zielgene

Tabelle 5 (Seite 42): Liste der für die qRT-PCR-Analyse muriner Hippokampus-RNA auf differentielle Expression hin in Frage kommenden und verwendeten Referenzgenprimerpaare

Tabelle 6 (Seite 43): qRT-PCR-Protokoll für die Expressionsanalysen in murinem Hippokampus und humanen Leukozyten mittels CFX384™ Real-Time System und C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad)

Tabelle 7 (Seite 45): HPLC-Bedingungen für Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin-Analyse in humanem Serum und Venlafaxin in Venlafaxin-Tablettenextrakten

Tabelle 8 (Seite 47): PCR-Bedingungen für Prüfung der cDNA mittels hs_Tph1_Intron-System

Tabelle 9 (Seite 48): Liste der mittels qRT-PCR in humanen Leukozyten auf differentielle Expression hin untersuchten Gene und in Frage kommender Referenzgene

Tabelle 10 (Seite 49): Liste der für die qRT-PCR-Analyse humaner Leukozyten auf differentielle Expression hin getesteten beziehungsweise verwendeten Zielgen-Primerpaare

Tabelle 11 (Seite 50): Liste der für die qRT-PCR-Analyse humaner Leukozyten auf differentielle Expression hin in Frage kommende Referenzgen-Primerpaare

Tabelle 12 (Seite 58): Pooling-Schema der RNA-Extrakte aus den Hippokampi der DBA/2-Mäuse für die ersten sechs Chips der Microarray-Untersuchung

Tabelle 13 (Seite 59): Pooling-Schema der RNA-Extrakte aus den Hippokampi von DBA/2-Mäusen für die Chips zur Microarray-Untersuchung der Genexpression nach Venlafaxin-Applikation

Tabelle 14 (Seite 61): Originaldaten (Auszug) des Vergleichs der Expression in Hippokampi der Kontroll- und der Niedrigdosistiere; gelistet sind Gene deren differentielle Expression mit einem $p < 0,05$ gefunden wurde

Tabelle 15 (Seite 62): Originaldaten (Auszug) des Vergleichs der Expression in Hippokampi der Kontroll- und der Hochdosistiere; gelistet sind Gene deren differentielle Expression mit einem $p < 0,05$ gefunden wurde

Tabelle 16 (Seite 68): deskriptive Statistik des Patienten-Kollektivs für die Untersuchung des Zusammenhanges von VEN + ODV-Serumkonzentration, *SLC6A2*- und *SLC6A4*-Genotyp und Therapie-Effekt; Geschlecht, Alter, Diagnose und dichotomisierte CGI-I-Werte der Patienten

Tabelle 17 (Seite 69): deskriptive Statistik des Patienten-Kollektivs für die Untersuchung des Zusammenhanges von VEN + ODV-Serumkonzentration, *SLC6A2*- und *SLC6A4*-Genotyp und Therapie-Effekt; Venlafaxin-Dosen, gemessene Summenserumkonzentrationen sowie in "niedrig-" und "hoch-exprimierend" dichotomisierte *SLC6A2*- und *SLC6A4*-Genotypen

Tabelle 18 (Seite 69): deskriptive Statistik des Patienten-Kollektivs für die Untersuchung des Zusammenhanges von VEN + ODV-Serumkonzentration, *SLC6A2*- und *SLC6A4*-Genotyp und Therapie-Effekt; von den Patienten neben Venlafaxin eingenommenen Medikation sowie der Häufigkeit beobachteter unerwünschter Nebenwirkungen

Tabelle 19 (Seite 71): deskriptive Statistik nach Kreuztabellenanalyse und Ergebnisse des Exakten Tests nach Fisher in serumkonzentrationsbasierten Subkollektiven bezüglich der Assoziation von *SLC6A4*-Expressionsaktivität und Therapieeffekt

XI. Danksagung

ich danke ...

Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Deckert für die Möglichkeit zu meiner Promotion und die Konzeptionierung der Arbeit, für sein herausragendes Engagement beim multiplen Korrekturlesen sowie in ausgedehnten Diskussionen und insbesondere für sein unermüdliches Bestreben mir die Kunst wissenschaftlichen Schreibens zu vermitteln.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Erich Buchner für die Zweitbegutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Reif für die Anleitung zur zielgerichteten Durchführung der praktischen Arbeiten.

Frau Dipl.-Psych. Antonia Post, Frau M. Sc. Sandy Popp und Frau Heike Wetzstein (TFA, TA) für die Betreuung der Studentiere und die Durchführung des Experimentes sowie für ihre Mitwirkung bei der terminalen Probennahme Herrn Dr. rer. nat. Sören Merker und Herrn Dr. rer. nat. Jonas Waider.

Frau PD Dr. rer. nat. Angelika Schmitt und Frau Dipl.-Psych. Antonia Post für die Anleitung zur Präparation der Regionen von Interesse aus den murinen Gehirnen.

Frau Margarete Göbel (TA) für die labor-praktische Durchführung der Microarray-Untersuchung des murinen Probenmaterials sowie Herrn Dr. biol. hum. Claus-Jürgen Scholz für die Supervision der Microarray-Untersuchung, die Auswertung und die geduldigen Erläuterungen zum Procedere derselben.

den Ärztinnen, Ärzten und dem Pflegepersonal der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg für die exzellente-kollegiale Zusammenarbeit bei Koordination und Gewinnung des humanen Probenmaterials.

den Patientinnen und Patienten der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg für ihre Bereitschaft zur Studienteilnahme.

Frau Dr. biol. hum. Heike Weber und Frau Dr. rer. nat. Lena Weissflog für Anleitung und Unterstützung im Rahmen des Primer-Designs sowie bei der Auswertung der qRT-PCR-Analysen von murinem und humanem Probenmaterial.

Frau Joyce Auer (MTA) und Frau Theresia Töppner (MTA) für die labor-praktische Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der qRT-PCR-Untersuchungen des murinen und humanen Probenmaterials.

Frau Inge Reck (MTA) für die labor-praktische Anleitung und Unterstützung im Rahmen der Genotypisierung des humanen Probenmaterials.

Frau Rosalinde Schreiner (MTA), Frau Margit Burger (TA, Chemielaborantin) und Herrn Rainer Burger (MTA, Chemielaborant) für die Quantifizierung der Konzentrationen an Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin im Patientenserum.

den Kolleginnen und Kollegen sämtlicher Professionen, die nicht direkt in die Generierung der Forschungsinhalte dieser Dissertation involviert waren, durch die Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre und damit ausgezeichneten Arbeitsbedingungen jedoch wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

XII. Curriculum Vitae

XIII. Ehrenwörtliche Erklärung

gemäß § 4, Abs. 3, Satz 3, 5, 8 Prom.-Ordn.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbstständig und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit bisher oder gleichzeitig keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe. Sämtliche aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommenen Erkenntnisse sind als solche kenntlich gemacht und nach Herkunft und Bezeichnung nachgewiesen. Die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben wurde mir nicht durch eine kommerzielle Organisation oder auf Basis kommerzieller Interessen vermittelt. Die Arbeit wurde unter Einhaltung der Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Universität Würzburg erstellt.

Ort, Datum

Unterschrift