



Technische Universität München  
Fakultät für Medizin

Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München

**Dexamethason-stimulierte *FKBP5*-Genexpression und ACTH- und  
Cortisol-suppression im Zeitverlauf**

Madita Claudia Beintner

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Bertram Müller-Myhsok
2. Prof. Dr. Thomas A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 19.05.2015 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.06.2016  
angenommen.



**INHALTSVERZEICHNIS**

Inhaltsverzeichnis .....	2
1. Einleitung .....	6
1.1 Die multifaktorielle Ätiopathogenese psychischer Störungen .....	6
1.2 Gen-Umwelt-Interaktion und Genexpression: Einfluss von Lebensereignissen auf die biologische Regulation .....	8
2. Theoretischer Hintergrund und Stand der aktuellen Forschung .....	10
2.1 Das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System .....	10
2.1.1 Die pathologische Hyperaktivität der HPA-Achse bei psychischen Störungen .....	11
2.1.2 Überprüfung der HPA-Achsenfunktion und ihre Modulation durch antidepressive Medikation .....	13
2.2 <i>FKBP5</i> – Der Cochaperon-Rezeptorkomplex .....	15
2.2.1 <i>FKBP5</i> -Polymorphismen und ihre Rolle bei der Entstehung von psychischen Störungen .....	17
2.3 Fragestellungen und Hypothesen .....	19
3. Material .....	21
3.1 Chemikalien .....	21
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	22
3.3 Antikörper .....	22
3.4 Kits und weitere Materialien .....	23
3.5 Instrumente .....	23
4. Methoden .....	25
4.1 Studiendesign .....	25
4.2 Probandenrekrutierung .....	25
4.3 Studiendurchführung .....	26
4.4 Proteinanalyse .....	27
4.4.1 Isolierung mononukleärer Zellen .....	27
4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration: BCA-Assay .....	28
4.4.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	28
4.4.4 Immunoblotting: Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran .....	29
4.4.5 Antigendetektion und Filmentwicklung .....	30
4.4.6 Normalisierung mit Actin .....	30
4.5 RNA-Extraktion und Realtime-PCR .....	31

---

4.6	DNA-Extraktion und Genotypisierung.....	32
4.7	Bestimmung der ACTH- und Cortisolkonzentration.....	32
4.8	Statistische Auswertung.....	32
5	Ergebnisse.....	33
5.2	Probandenkollektiv .....	33
5.2	Stresshormonsuppression und <i>FKBP5</i> -Genexpression .....	34
5.2.1	ACTH-Suppression nach Dexamethason-Stimulation.....	34
5.2.1	Cortisolsuppression nach Dexamethason-Stimulation.....	35
5.2.2	<i>FKBP5</i> -mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation.....	36
5.2.3	<i>FKBP51</i> -Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation.....	37
5.2.4	Methodenvergleich: Bewertung der verwendeten Methode zur Normalisierung mit Actin.....	37
5.3	Verläufe in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP5</i> -mRNA-Konzentration .....	39
5.3.1	<i>FKBP5</i> -mRNA-Expression in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP5</i> -mRNA-Konzentration .....	39
5.3.2	ACTH-Suppression in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP5</i> -mRNA-Konzentration .....	40
5.3.3	Cortisolsuppression in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP5</i> -mRNA-Konzentration .....	41
5.3.4	<i>FKBP51</i> -Proteinexpression in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP5</i> -mRNA-Konzentration .....	42
5.4	Verläufe in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP51</i> -Proteinkonzentration.....	43
5.4.1	<i>FKBP51</i> -Proteinexpression in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP51</i> -Proteinkonzentration.....	43
5.4.2	ACTH-Suppression in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP51</i> -Proteinkonzentration.....	44
5.4.3	Cortisolsuppression in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP51</i> -Proteinkonzentration.....	45
5.4.4	<i>FKBP5</i> -mRNA-Expression in Abhängigkeit der Höhe der basalen <i>FKBP51</i> -Proteinkonzentration.....	46
5.5	Verläufe in Abhängigkeit der Stärke der <i>FKBP5</i> -mRNA-Expressionsinduktion .....	47
5.5.1	<i>FKBP5</i> -mRNA-Expression in Abhängigkeit der Stärke der <i>FKBP5</i> -mRNA-Expressionsinduktion .....	47
5.5.2	ACTH-Suppression in Abhängigkeit der Stärke der <i>FKBP5</i> -mRNA-Expressionsinduktion .....	48
5.5.3	Cortisolsuppression in Abhängigkeit der Stärke der <i>FKBP5</i> -mRNA-Expressionsinduktion .....	49

---

5.5.4	FKBP51-Proteinexpression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP5-mRNA-Expressionsinduktion .....	50
5.6	Verläufe in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion .....	51
5.6.1	FKBP51-Proteinexpression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion.....	51
5.6.2	ACTH-Suppression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion .....	52
5.6.3	Cortisol-suppression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion.....	53
5.6.4	FKBP5-mRNA-Expression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion.....	54
5.7	Verläufe in Abhängigkeit des Genotyps.....	55
5.7.1	ACTH-Suppression in Abhängigkeit des Genotyps.....	55
5.7.2	Cortisol-suppression in Abhängigkeit des Genotyps.....	56
5.7.3	FKBP5-mRNA-Expression in Abhängigkeit des Genotyps .....	57
5.7.4	FKBP51-Proteinexpression in Abhängigkeit des Genotyps .....	59
6	Diskussion .....	63
6.1	Dexamethason-Stimulation: GR-Aktivierung und Genexpressionsinduktion.....	63
6.2	FKBP5 als Biomarker für GR-Sensitivität .....	64
6.2.1	Basale FKBP5-mRNA- und Proteinkonzentration als Indikator für GR-Sensitivität .....	65
6.2.2	<i>FKBP5</i> -Genexpressionsinduktion als Indikator für GR-Sensitivität .....	67
6.3	Bedeutung genetischer Variationen im SNP rs1360780 für die FKBP5-Genexpression und ACTH- und Cortisolreaktion.....	69
6.3.1	Einfluss genetischer Variationen im SNP rs1360780 auf die ACTH- und Cortisolreaktion .....	69
6.3.2	Einfluss genetischer Variationen im SNP rs1360780 auf die <i>FKBP5</i> -Genexpression .....	71
6.3.3	mRNA- und Proteinmengenanalyse: Posttranskriptionelle Genregulation und Proteinabbau .....	73
6.4	Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand: Die Rolle von <i>FKBP5</i> als Mediator von Gen-Umwelt-Interaktionen .....	75
6.5	Zusammenfassung .....	77
6.6	Ausblick.....	79
7	Abkürzungsverzeichnis .....	80
8	Abbildungsverzeichnis .....	83
9	Tabellenverzeichnis.....	85

10 Literaturverzeichnis..... 86

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Die multifaktorielle Ätiopathogenese psychischer Störungen

Die Frage nach Risikofaktoren und Bedingungen, die zur Entwicklung psychischer Erkrankungen beitragen, ist zentraler Gegenstand der modernen psychiatrischen Forschung. Resilienz beschreibt die Toleranz eines Systems gegenüber Störungen. Auf den Menschen übertragen bezeichnet Resilienz die Fähigkeit, Lebenskrisen wie schwere Krankheiten, Verlust von nahestehenden Personen oder lange Arbeitslosigkeit ohne anhaltende Beeinträchtigung durchzustehen. Diese Fähigkeit ist nicht bei jedem Individuum gleich stark ausgeprägt. So kommt es, dass manche Menschen nach einem Schicksalsschlag langfristig unter einer psychischen Störung leiden und andere ihn „wegstecken“ können. Warum entwickelt ein Kriegsheimkehrer eine schwere Belastungsstörung, wohingegen sein Kamerad sich wie ein Stehaufmännchen wieder aufzurichten weiß, obwohl sie dieselbe Schlacht gekämpft haben?

Das Diathese-Stress-Modell (auch: Vulnerabilität-Stress-Modell) integriert die organischen und psychologischen Faktoren, die zum Ausbruch psychischer Erkrankungen führen. Unter Diathese versteht man die Disposition für eine bestimmte Krankheit, das bedeutet die Neigung eines Menschen, auf eine bestimmte Weise auf Stressoren zu reagieren. Sie kann im biologischen Sinn als die genetische Ausstattung interpretiert werden, zum Beispiel eine gewisse genetische Risikokonstellation. Sind bei einem Menschen mit erhöhter Diathese unter Belastungseinwirkung alle Möglichkeiten der Stressbewältigung ausgeschöpft, kann es zur Symptombildung kommen (Miller et al., 2007).

Ausgehend von den psychischen Folgen bei Veteranen des Vietnamkriegs, gilt seit 1980 die Diagnose einer posttraumatischen Belastungsstörung (engl.: Posttraumatic stress disorder, PTSD) im DSM als eigene Störung. Ihr gehen definitionsgemäß ein oder mehrere belastende Ereignisse von außergewöhnlicher Bedrohung oder katastrophalem Ausmaß voran. Infolgedessen manifestiert sich innerhalb von sechs Monaten eine pathologische Symptomatik. Leitsymptome nach ICD10 bestehen in anhaltenden Erinnerungen oder quälendem Wiedererleben der Belastung, Vermeidungsverhalten, mnestischen Lücken, erhöhter psychischer Erregung und Reizbarkeit. Obwohl die Lebenszeitprävalenz eines Traumas zwischen 40 und 90 % liegt, tritt nur bei 7-12 % der Betroffenen eine PTSD auf (Breslau, 2001; Kessler et al., 1995). Bei Individuen mit einer spezifischen genetischen

Anfälligkeit besteht ein höheres Risiko zur Entwicklung einer PTSD. Familien- und Zwillingsstudien konnten Nachweise für eine genetische Komponente bringen (Koenen et al., 2003; Stein et al., 2002; True et al., 1993).

Die Depression ist mit einer Lebenszeitprävalenz von 15 – 17 % eine der häufigsten psychischen Erkrankungen (Kessler et al., 1994; Paykel et al., 2005). Frauen sind dabei etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer (Ebmeier et al., 2006; Levinson, 2006). Zur Behandlung stehen moderne Antidepressiva zur Verfügung, die vor allem in das monoaminerge Neurotransmittersystem eingreifen (z.B. Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer = SSRI, Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer = SSNRI). Trotzdem kann bei nur einem Drittel der Patienten nach der ersten Behandlung eine vollständige Remission erzielt werden. Die anderen zwei Drittel benötigen mehrere Behandlungsversuche oder sprechen überhaupt nicht auf die Medikamente an (Fava & Davidson, 1996; Trivedi et al., 2006). Trotz ausgedehnter Forschung, sind die bisher entdeckten Effekte genetischer Polymorphismen auf die Entstehung einer Depression oder das Ansprechen auf die Therapie jedoch gering oder ungenügend replizierbar (Ising et al., 2009; Keers & Aitchison, 2011).

Wie bei den meisten Störungen des psychiatrischen Formenkreises, geht man bei ihrer Entstehung von einem multifaktoriellen Prozess aus. Zwillings- und Familienstudien zeigen, dass die genetische Prädisposition, an einer Depression zu erkranken, mindestens 30 – 40 % beträgt (Kendler et al., 2006). Auch Stress und seine neurobiologischen Korrelate tragen zu einem wesentlichen Teil zur Entwicklung von affektiven Störungen bei. Vor Depressionen findet man in 10 bis 40 % der Fälle belastende psychosoziale Ereignisse. Häufig gehen der Symptomatik jahrelange verdeckt-widersprüchliche zwischenmenschliche Beziehungen oder Serien menschlicher oder beruflicher Enttäuschungen voraus (Kendler et al., 1999; Zimmermann et al., 2008). Seit Jahren ist bekannt, dass eine Reihe von Umweltfaktoren, besonders im Kindesalter, entscheidenden Einfluss auf das Depressionsrisiko nehmen (Heim et al., 2008; Kessler et al., 1997). Die Erkrankung entsteht durch vielseitige Interaktionen zwischen Genen untereinander und der Regulierung durch Umwelteinflüsse und epigenetischen Faktoren.

## **1.2 Gen-Umwelt-Interaktion und Genexpression: Einfluss von Lebensereignissen auf die biologische Regulation**

Gen-Umwelt-Interaktionsstudien untersuchen den gemeinsamen Beitrag von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen, eine bestimmte Störung zu entwickeln. Im Gegensatz zu anderen Modellen, die eine direkte Beziehung zwischen Genen und psychischen Krankheiten annehmen, gliedern Gen-Umwelt-Studien Informationen über die Umwelt ein und vermuten, dass die Anfälligkeit für pathogene Umwelteinflüsse durch genetische Faktoren moderiert wird (Mehta & Binder, 2012).

Die Aktivität eines Gens wird unter anderem durch eine Vielzahl von Hilfsmolekülen und über weit entfernte DNA-Sequenzen gesteuert. Hierdurch entstehen verschiedene Angriffspunkte, um das Genexpressionsmuster zu beeinflussen. Die DNA-Matrize enthält Regionen, an denen die RNA-Polymerase spezifisch bindet und somit bestimmen kann, wo die Transkription beginnt. Diese Promotoren (cis-aktive Elemente) bestehen aus Erkennungssequenzen, den sogenannten Konsensussequenzen (TATA-Box). Damit die RNA-Polymerase am Promotor binden kann, sind Hilfsproteine erforderlich, die man als Transkriptionsfaktoren bezeichnet (trans-aktive Elemente). Sie bestehen normalerweise aus mehreren Domänen, wobei die DNA-bindende Domäne an die Erkennungssequenz in der Promotorregion des Gens bindet.

In Eukaryoten wird die Aktivität vieler Promotoren durch cis-aktive Elemente eines anderen Typs erhöht, die man als Verstärker bezeichnet (engl.: Enhancer). So können die Transkriptionsfaktoren ihre stimulierende Wirkung auch dann ausüben, wenn ihre Bindungsstellen in beträchtlichem Abstand zum Promotor liegen, und zwar über Entfernungen von bis zu mehreren tausend Basenpaaren. Die dazwischen liegende DNA bildet Schleifen und bringt den am Verstärker gebundenen Aktivator zur Promotorstelle, wo er mit anderen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase interagieren kann (Berg et al., 2013; Lomvardas & Thanos, 2002; Mitchell et al., 2014).

Umwelteinflüsse wie Stress oder frühkindliche Traumaerfahrung können über epigenetische Mechanismen zu einer veränderten Gentranskription führen (Levenson & Sweatt, 2005; Maddox et al., 2013; C. A. Miller & Sweatt, 2007). Neben der Verpackung mit Histonen wird die Genaktivität vor allem durch den Methylierungsgrad der DNA gesteuert (McGowan et al., 2009; Meaney et al., 2010; Murgatroyd et al., 2009; Weaver et al., 2004). So wird durch Verknüpfung einer bestimmter Nukleinbase (Cytosin) mit Methylgruppen der Zugang zur

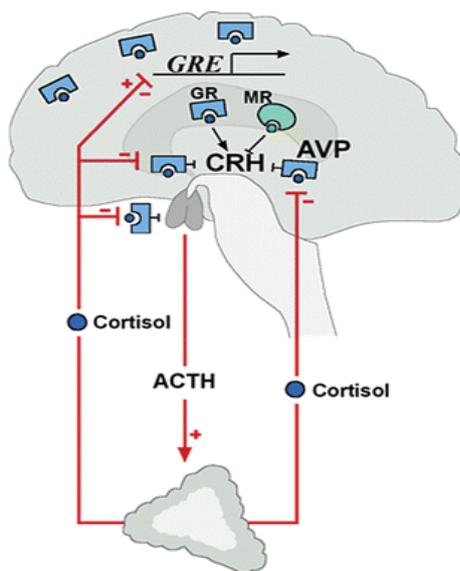
Genregulation erschwert und das Gen inaktiviert. Die Entfernung einer Methylgruppe (Demethylierung) bewirkt Gegenzliches (Novik et al., 2002). Bei der Untersuchung von Gewebeproben aus der Hippokampusregion wurden bei Suizidopfern im Vergleich zu Kontrollen höhere DNA-Methylierungsgrade festgestellt (Labonte et al., 2013). Mehta und Kollegen konnten anhand einer Analyse peripherer Blutproben zeigen, dass PTSD-Patienten ein verändertes Genexpressionsmuster aufweisen. Hervorzuheben ist hierbei, dass diese Unterschiede in der Transkription bei den Patienten, die in der Vorgeschichte einen Kindheitsmissbrauch erlebt haben, zu einem größeren Anteil mit DNA-Methylierungen assoziiert waren und somit wahrscheinlich auch infolgedessen entstanden. Verschiedene biologische Mechanismen spielen bei stressassoziierten Erkrankungen eine Rolle und scheinen sowohl vom Zeitpunkt als auch von der Art des Umwelteinflusses abzuhängen (Mehta et al., 2013).

Die aktuelle Erforschung von aktiven DNA-Demethylierungen eröffnet neue Aspekte der epigenetischen Reprogrammierung. Für meine Arbeit von besonderem Interesse sind die Auswirkungen auf *FKBP5*. *FKBP5* ist ein Gen, welches eine wichtige Rolle in der Regulierung der Stressantwort einnimmt. Seine Expression wird durch Glukokortikoide induziert und beeinflusst dadurch die Sensitivität der Glukokortikoidrezeptoren und somit auch den Cortisolhaushalt (Binder, 2009). Das macht es zu einem interessanten Kandidaten von Gen-Umwelt-Interaktionen bei affektiven Störungen. Die Gruppe um Klengel konnte zum ersten Mal einen Beweis für den epigenetischen Mechanismus liefern, der die kombinierten Effekte aus Belastung durch Umwelteinflüsse und genetischem Polymorphismus auf das Risiko, eine psychische Störung zu entwickeln, erklärt (Klengel et al., 2012). Selbst wenn Gen-Umwelt-Interaktionen kein direkter Forschungsgegenstand des vorliegenden Studiendesigns sind, ist es zum Verständnis der Rolle des Gens in der Ätiopathogenese psychischer Erkrankungen relevant, seine Rolle als Mediator bei Gen-Umwelt-Interaktionen darzustellen. Zum Schluss der Arbeit sollen diese Aspekte erneut aufgegriffen und die Ergebnisse unserer Studie in die aktuelle Forschungslage eingeordnet werden (vgl. 6.5). Im Folgenden werden Stressregulierungsmechanismen beim Menschen und die zentrale Rolle des *FKBP5* Gens hierbei genauer dargelegt.

## 2. THEORETISCHER HINTERGRUND UND STAND DER AKTUELLEN FORSCHUNG

### 2.1 Das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System

Zur Stressbewältigung hat sich beim Menschen in Laufe der Evolution eine fein abgestimmte Hormonkaskade entwickelt. Sie besteht aus Hypothalamus, Hypophyse und der Nebennierenrinde. Die auf den Menschen einwirkenden Stressoren werden im zentralen Nervensystem (ZNS) und dem peripheren endokrinen System verarbeitet. Die HPA-Achse stellt dabei die zentrale Schaltstelle zwischen den neuronalen Schaltkreisen im Gehirn, dem autonomen Nervensystem und dem peripheren Hormonsystem dar. Dieses neuroendokrine System, die sogenannte hypothalamo-hypophysäre-adrenokortikale Achse (engl.: hypothalamic-pituitary-adrenal = HPA), unterliegt einem komplexen Regulationsgefüge (Heuser, 1998).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der HPA-Achse**

Die HPA-Achse ist ein wichtiger Regulator der physiologischen Stressantwort. Nach Stresseinwirkung sezerniert der Hypothalamus das Hormon CRH (Corticotropin Releasing Hormon). Daraufhin schüttet die Hypophyse ACTH (adrenocorticotropes Hormon) aus, welches wiederum die Nebennierenrinde zur Freisetzung von Cortisol anregt. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird die ACTH- und CRH-Ausschüttung durch den erhöhten Serumcortisolspiegel gehemmt (Holsboer & Ising, 2010).

Stressbelastung stimuliert parvozelluläre Neurone im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus, CRH in das portale Gefäßsystem zu sezernieren (Kovacs & Sawchenko, 1996; Owens & Nemeroff, 1993). CRH (engl.: Corticotropin-releasing Hormone) ist das zentrale regulatorische Releasing-Hormon bei der Reaktion auf Stress (Heim et al., 1997). Es erreicht über den hypothalamo-hypophysären Pfortaderkreislauf die Zellen des Hypophysenvorderlappens. Hierdurch wird die Hypophyse zur Synthese und Sekretion von ACTH (Adrenocorticotropin) angeregt. Dieses bindet wiederum an Zellen der Zona

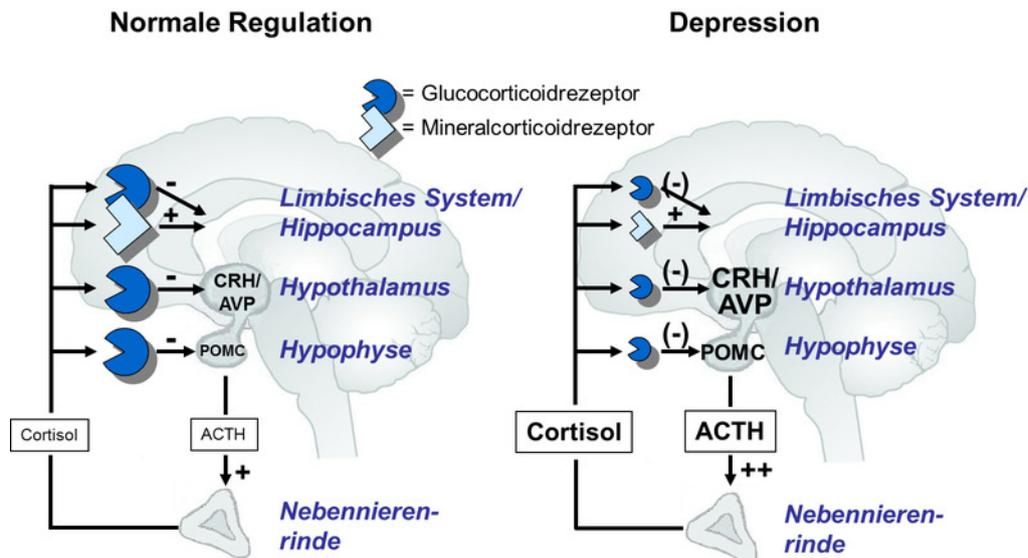
fasciculata in der Nebennierenrinde, was zur Glukokortikoidausschüttung führt. Über die Blut-Hirn-Schranke erreicht Cortisol den Hypothalamus und bindet an Glukokortikoidrezeptoren. Erhöhte Cortisolspiegel führen somit über negative Rückkopplung zur Suppression von CRH und ACTH und regulieren dadurch ihre eigene Synthese (Sapolsky & McEwen, 1985).

Die Freisetzung von Cortisol unterliegt einer zirkadianen Rhythmik. In den frühen Morgenstunden ist die pulsatile Sekretion von CRH am höchsten. Entsprechend erreicht der Cortisolspiegel in der Früh sein Maximum, wobei er bis Mitternacht wieder auf ein Viertel absinkt. Hinzu kommt die bedarfsangepasste Cortisolausschüttung, die vor allem durch Stressoren wie körperliche oder psychische Belastung ausgelöst wird (Levine, 2000; Umeda et al., 1981). Die Wirkung der Kortikosteroide wird über Glukokortikoidrezeptoren vermittelt (de Kloet et al., 1986). Es handelt sich um Kortikosteroid-abhängige Transkriptionsfaktoren (Mangelsdorf et al., 1995). Cortisol ist ein Steroidhormon, das aufgrund seiner lipophilen Struktur die Zellmembran durchqueren kann. In der Zelle angekommen, folgt die Bindung an den GR, bestehend aus Steroidrezeptor und einer Anordnung von Faltungsproteinen, einschließlich Hitzeschockproteine. Durch Glukokortikoidbindung erfolgt eine Konformationsänderung im Proteinkomplex. Faltungsproteine dissoziieren und ermöglichen die Translokation des aktivierten GR in den Nukleus. Der Ligand-Rezeptor-Komplex heftet sich an den hormonrezeptiven Abschnitt der DNA (GRE = glucocorticoid response element) und beeinflusst die Expression einzelner Gene. Über ionotrope und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sowie Ionenkanäle und -pumpen wird die Leitfähigkeit der Zellmembran beeinflusst. Hierdurch können die tiefgreifenden Auswirkungen von Cortisol auf die Immunabwehr und andere langfristige Effekte auf sämtliche biologische Funktionssysteme veranschaulicht werden (de Kloet et al., 2005; Holsboer, 2000).

### **2.1.1 Die pathologische Hyperaktivität der HPA-Achse bei psychischen Störungen**

Glukokortikoidrezeptoren (GR) sind die zentralen Regulationseinheiten der HPA-Achse (Barden et al., 1997; Erhardt et al., 2006; Plotsky et al., 1998). Die Sekretion von Glukokortikoiden (GK) induziert durch Aktivierung der Steroidrezeptoren ihrerseits eine negative Rückkopplungsschleife. Nach einem stressbedingten Cortisolausstoß findet auf diese Weise eine Autoregulation des HPA-Systems statt und die Ausschüttung von CRH und ACTH wird gehemmt (Sapolsky & McEwen, 1985).

Eine Einschränkung des GR-Signalwegs führt zur Abnahme der Feedback-Hemmung, was langfristig chronisch erhöhte Cortisolspiegel im Blut zur Folge hat.



**Abb. 2: Die pathologische Hyperaktivität der HPA-Achse bei Depression**

Patienten mit Depression weisen häufig eine gestörte Stressregulation auf. Ursächlich hierfür ist eine Funktionseinschränkung der Glukokortikoidrezeptoren, die aufgrund der gestörten Rückkopplungsschleife zu einer Überaktivität von CRH und ACTH führt (Ising et al., 2007).

Glukokortikoide erfüllen im menschlichen Körper eine Vielzahl von Funktionen, die notwendig sind, um sich an akute Stresssituationen anzupassen. Sie fördern die Glukoneogenese, wirken katabol auf Muskeln und Knochen sowie lipolytisch auf Fettzellen und mobilisieren hierdurch Energieträger für den Körper (Klinke et al., 2010). Als Medikamente werden sie aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung zur Behandlung zahlreicher Erkrankungen eingesetzt (Barnes, 1998). Bei langfristiger Überexposition können die Steroidhormone jedoch zu pathologischen Manifestationen führen (Riad, Mogos, Thangathurai, & Lumb, 2002).

Chronischer und akuter Stress führen zu Krankheitsanfälligkeit und triggern den Ausbruch psychischer Störungen (Charney & Manji, 2004; de Kloet et al., 2005; Heim & Nemeroff, 2001). Akute Krankheitszustände sind gekennzeichnet durch eine veränderte Stressantwort und eine gestörte Regulierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Die Hyperaktivität der HPA-Achse bei Patienten mit Depression resultiert in erhöhter CRH- und Cortisolabgabe (Nemeroff et al., 1984; Rubin et al., 1987).

Schon seit Jahren ist bekannt, dass depressive Patienten im Durchschnitt einen erhöhten basalen Serum-Cortisolspiegel aufweisen (Board et al., 1957; Butler & Besser, 1968; Rubin et al., 1987). Zudem ist die Anzahl der CRH-sezernierenden Neuronen in limbischen Hirnregionen erhöht (Raadsheer et al., 1994) und die CRH-Bindungsstellen im frontalen Kortex sind vermindert (Nemeroff, 1988; Nemeroff et al., 1988).

Diese Veränderungen können erklärt werden durch eine Funktionseinschränkung der Kortikosteroidrezeptoren. Nicht nur die Depression, sondern auch andere psychische Erkrankungen gehen mit einer Dysregulierung bzw. Hyperaktivität der HPA-Achsen systems einher (Holsboer et al., 1987; Roy-Byrne et al., 1986; Rybakowski & Twardowska, 1999). Studien zeigen, dass Antidepressiva die Induktion der GR-mRNA- und Proteinexpression erhöhen (Carvalho & Pariante, 2008; Funato et al., 2006; Vedder et al., 1999). Außerdem wird die Translokation des Rezeptors in den Nukleus und die Dexamethason-induzierte, GR-medierte Gentranskription gesteigert (Pariante et al., 2003; Pariante et al., 2001; Pariante et al., 1997; Pepin et al., 1992).

### **2.1.2 Überprüfung der HPA-Achsenfunktion und ihre Modulation durch antidepressive Medikation**

Ein sensitiver neuroendokrinologischer Test, um die HPA-Achsenfunktion zu untersuchen, ist der Dexamethason-Suppressionstest (Carroll et al., 1981). Dexamethason ist ein synthetisches Glukokortikoid. Nach Verabreichung von 1-2 mg Dexamethason wird bei gesunden Probanden die physiologische ACTH- und Cortisolsekretion inhibiert. Bei Patienten mit affektiven Störungen wie Depression, sinkt der Cortisolspiegel nach Dexamethason-Einnahme in einem geringeren Ausmaß ab (Carroll, 1982; Holsboer, 1989; Ribeiro et al., 1993). Dieses Phänomen verdeutlicht, dass die durch Cortisol vermittelte negative Rückkopplungsschleife gestört ist. Die Glukokortikoidrezeptoren sind in ihrer Funktion eingeschränkt und sprechen nicht adäquat auf Cortisolstimulation an (Holsboer, 2000).

Mit dem Dexamethason-Suppressions-CRH-Stimulations-Test (DEX/CRH-Test) ist eine noch genauere Überprüfung der HPA-Systemfunktion möglich. Hierfür erhalten die Patienten am Tag vor der Untersuchung 1,5 mg des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason. Am darauffolgenden Tag wird den Patienten 100 µg CRH intravenös appliziert, um mögliche zentrale Regulationsstörungen aufzudecken (Heuser et al., 1994).

Durch die Vorbehandlung mit Dexamethason, welches bei gesunden Probanden die physiologische ACTH- und Cortisolsekretion inhibiert, wird eine vermehrte Ausschüttung von ACTH und Cortisol nach Gabe von CRH supprimiert. Patienten mit depressiver Störung dagegen, reagieren mit einer überschießenden Cortisolantwort. Die ACTH- und Cortisolsekretion nach CRH-Stimulation wird durch die geringere Empfindlichkeit des GR weniger supprimiert und fällt folglich höher aus als bei gesunden Kontrollpersonen (Horstmann et al., 2009; Ising et al., 2007; Ising et al., 2005; Kunugi et al., 2006).

Beim CRH-Stimulationstest wird ohne vorausgegangene Gabe von Dexamethason mit CRH stimuliert. Hierbei weisen Patienten mit Panikattacken, Alkoholabhängigkeit und Depression eine verminderte ACTH-Ausschüttung bei etwa gleichbleibender Cortisolkonzentration auf (Holsboer et al., 1987; Roy-Byrne et al., 1986).

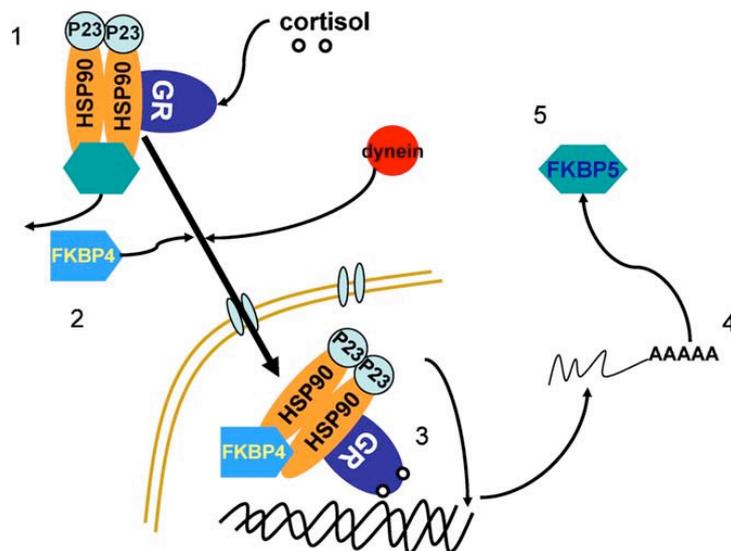
Klinische Studien über die Wirkung von Antidepressiva ergaben verschiedene Einflüsse auf die HPA-Achsenregulierung. Mirtazapineinnahme führte bei Gesunden zu einer signifikanten Abnahme der ACTH- und Cortisolsekretion sowie zu erniedrigten Cortisolspiegeln im Urin bei depressiven Patienten (Schule et al., 2002; Schule et al., 2003). Für Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI) konnten ähnliche Wirkungen nachgewiesen werden (Nickel et al., 2003). Eine Behandlung mit Fluvoxamin bei Patientinnen mit Borderline-Persönlichkeitsstörung und erlebtem Kindheitsmissbrauch führte zur signifikanten Reduktion der ACTH- und Cortisolantwort im DEX/CRH-Test (Rinne et al., 2003). Die verminderte Hormonantwort im Dex-CRH Test konnte auch für trizyklische Antidepressiva nachgewiesen werden (Deuschle et al., 1997; Frieboes et al., 2003; Heuser, 1998; Holsboer et al., 1991). Es ist also möglich, mit Hilfe des DEX/CRH-Tests Aussagen über den Verlauf der Erkrankung zu treffen (A. W. Zobel et al., 2001). Bei der Untersuchung von Patienten mit Depression ergab sich für diejenigen, deren HPA-Aktivität sich nach antidepressiver Behandlung nicht normalisiert hatte, ein erhöhtes Risiko für einen Rückfall innerhalb von sechs Monaten (Zobel et al., 1999).

Die Wiederherstellung der physiologischen HPA-Achsenaktivität scheint Voraussetzung für das klinische Ansprechen auf die antidepressive Behandlung zu sein. Dies hebt die Bedeutung einer eingeschränkten GR-Funktion für die Ätiopathogenese psychischer Störungen hervor (Holsboer et al., 1991; Papiol et al., 2007).

## 2.2 *FKBP5* – Der Cochaperon-Rezeptorkomplex

Ist eine ausreichende Menge an Glukokortikoiden im Blut vorhanden, wird die Stressreaktion physiologischerweise durch die negative Rückkopplungsschleife über Aktivierung der Glukokortikoidrezeptoren beendet. Die Funktion des GR ist durch sogenannte Chaperone gesteuert. Chaperone sind Hilfsproteine für Faltungsprozesse und garantieren eine möglichst hohe Ausbeute an funktionellen Proteinen (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Unter zellulärer Stresseinwirkung wie zum Beispiel Hitze, steigt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von falsch gefalteten Proteinen. Als Reaktion auf die veränderten Bedingungen erhöht sich die Expression der Chaperone. Man bezeichnet sie deshalb als Hitzeschockproteine (Hsp) (Georgopoulos & Welch, 1993; Gething & Sambrook, 1992). Sie bilden einen molekularen Komplex, der für korrekte Ligandenbindung, Rezeptoraktivierung und transkriptionelle Regulierung der GR-Zielgene notwendig ist (Cheung & Smith, 2000; Schiene-Fischer & Yu, 2001).

FKBP51 (FK506-Bindungsprotein, FKBP51-Protein, codiert durch das FKBP5-Gen) ist ein Co-Chaperon Molekül und gehört zur Familie der Immunophilen. Diese sind nach der Fähigkeit benannt, bestimmte Immunsuppressiva zu binden. Die hohe Bindungsaffinität von FK506 (Tacrolimus) war hierfür namensgebend (Sinars et al., 2003). FKBP51 ist ein wichtiger funktioneller Regulator der Rezeptoren und beeinflusst die Steroidsignaltransduktion des GR. Im hormonfreien Zustand liegt der GR im Komplex mit dem Hitzeschockprotein 90 (Hsp 90) vor. FKBP51 und eine Reihe weiterer Hilfsproteine interagieren mit dem inaktiven Hsp-Rezeptor-Komplex. Wenn ein Glukokortikoid an den GR bindet, ist der Rezeptorkomplex aktiviert und FKBP51 wird durch einen positiven Regulator des GR-Signalweges, dem FK506-Bindeprotein 52 (FKBP52 oder FKBP4) ersetzt (Riggs et al., 2003). Dadurch wird Dynein in den Komplex rekrutiert, wodurch die nukleäre Translokation und Transkription ermöglicht wird (Davies et al., 2002). FKBP51 ist ein funktioneller Antagonist des Glukokortikoidrezeptors. Durch Bindung von Cortisol an den GR, wird die *FKBP5*-Genexpression induziert, welches wiederum durch eine negative Rückkopplungsschleife („ultra-short feedback loop“) seine Bindungsaffinität für Cortisol reduziert (Binder et al., 2004; Vermeer et al., 2003). Der Transport des GK-Rezeptorkomplexes in den Nukleus wird durch Blockierung der Dyneinbindung verzögert, was zu einer abgeschwächten Wirkung des Cortisols führt (Wohnik et al., 2005).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Interaktion von *FKBP5* mit dem GR-Komplex**

(1) Nach Bindung von *FKBP5* via HSP90 an den GR-Komplex sinkt die Affinität des Rezeptors zu Cortisol. (2) Wenn der Rezeptor Cortisol gebunden hat, wird *FKBP5* durch *FKBP4* ersetzt, welches dadurch Dynein binden kann. (3) Dies ermöglicht die Translokation des GR-Komplexes in den Nucleus. (4) Der GR bindet an die DNA und kann über intronische Response Elemente die *FKBP5*-Transkription und -Translation erhöhen. (5) Erhöhtes *FKBP5* führt zu höherer GR-Resistenz und beeinflusst durch eine negative Rückkopplungsschleife (engl.: ultra-short feedback loop activation) die GR-Sensitivität (Binder, 2009).

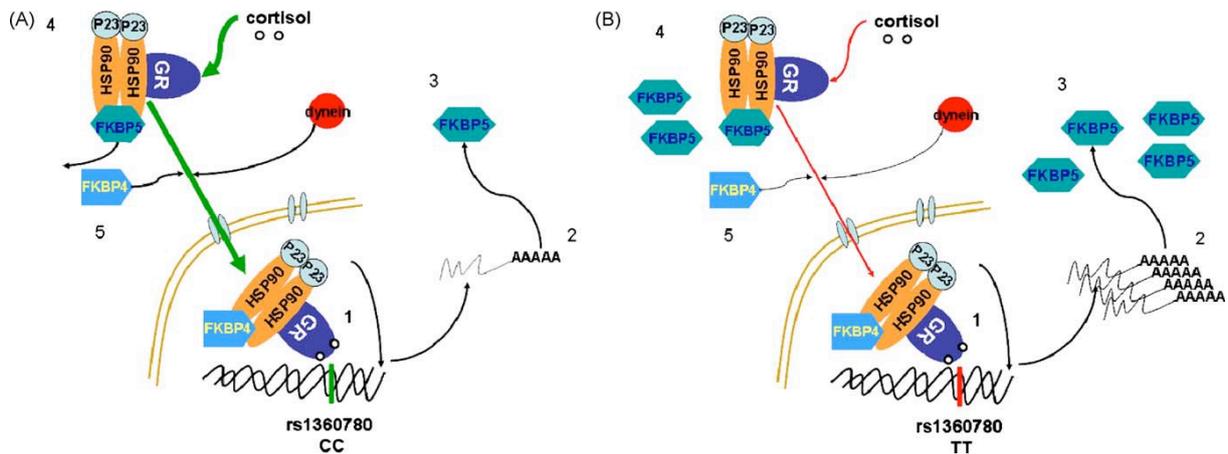
Aus den Zusammenhängen zwischen GR-Empfindlichkeit und *FKBP5*-Induktion lässt sich schließen, dass die für die Dysregulierung der HPA-Achse verantwortliche GR-Resistenz teilweise durch eine Überexpression von *FKBP5* bedingt ist (Denny et al., 2005; Denny et al., 2000). Die Bedeutung von *FKBP5* im GR-Signalweg wurde erstmals bei Studien mit Totenkopffaffen (New World Monkeys) entdeckt. Im Vergleich zu anderen Affen und Menschen weisen sie zwar einen erhöhten Plasmacortisonspiegel auf, dabei aber keinerlei Zeichen eines Hypercortisolismus. Man konnte zeigen, dass diese GR-Resistenz durch eine natürlich vorkommende Überexpression von *FKBP5* verursacht wird, die zu einer GR-Resistenz in den Zielorganen führt (Reynolds et al., 1998; Scammell et al., 2001; Westberry et al., 2006).

Die Gruppe um Scharf zeigten anhand von Analysen von Hirngewebeproben aus Mäusen, dass *FKBP5* unter unstimulierten Bedingungen vor allem in Hirnregionen exprimiert wird, welche auch für eine GR-Expression bekannt sind (Lein et al., 2007; Pryce, 2008). Das ist vor allem im Hippokampus (Navailles et al. 2010) und im Corpus mamillare (Sousa et al., 1989), also in Teilen des limbischen Systems der Fall. Diese Zusammenhänge unterstreichen die wichtige Rolle von *FKBP5* bei der Modulierung der GR-Empfindlichkeit (Scharf et al., 2011).

### 2.2.1 *FKBP5*-Polymorphismen und ihre Rolle bei der Entstehung von psychischen Störungen

Im Rahmen des vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie initiierten M.A.R.S. Projekts (Munich-Antidepressant-Response-Signature Project) wurden Gene untersucht, die die Aktivität der HPA-Achse regulieren, darunter auch *FKBP5*. Durch Genotypisierung wurden Korrelationen der Gene mit Erkrankungsrisiko sowie Therapieerfolg untersucht (Binder, 2009; Hennings et al., 2009; Horstmann et al., 2009; Ising et al., 2009; Menke et al., 2013).

Die Ergebnisse zeigten, dass es eine Assoziation bezüglich des Therapieerfolgs einer antidepressiven Behandlung und genetischen Variationen von einzelnen Basenpaaren (Single nucleotide polymorphisms = SNPs) in der *FKBP5*-Genregion gibt. Die Gruppe um Binder war die Erste, die diesen Zusammenhang aufzeigen konnten (Binder et al., 2004). Der SNP rs1360780, der auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, kann in drei verschiedenen Ausprägungsformen vorliegen (C/C, C/T und T/T). C ist hierbei der Wildtyp und T die Variante, bei der man vom Risikoallel spricht. Die genetischen Variationen im *FKBP5*-Genlocus sind mit unterschiedlich starker Proteinexpression assoziiert. In Lymphozyten von Probanden, die homozygot für das T-Allel waren, wurden doppelt so hohe *FKBP5*-Proteinkonzentrationen nachgewiesen wie bei den Trägern der anderen Allelkombinationen. Man spricht beim T-Allel deshalb vom „high induction allele“. Die Forschergruppe zeigte, dass Probanden die homozygot für das T Allel des SNPs rs1360780 waren, mehr als doppelt so häufig depressive Episoden erleben als diejenigen mit den beiden anderen Allelkombinationen CC und CT. Im Dex-CRH-Test wiesen unter depressiven Patienten die homozygoten Träger des T-Allels eine signifikant niedrigere ACTH-Antwort auf.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der SNP-abhängigen molekularen Unterschiede im negativen Rückkopplungsmechanismus**

(A) Ablauf bei homozygoten Trägern des protektiven Allels, welches mit weniger *FKBP5*-Expressionsinduktion einhergeht

(B) Ablauf bei homozygoten Trägern des Hochrisikoallels, welches mit hoher *FKBP5*-Expressionsinduktion verbunden ist („GR-Resistenz“)

Der aktivierte GR-Komplex führt durch Bindung am GRE (1) zu mehr (B) oder weniger (A) *FKBP5*-mRNA- (2) und Proteininduktion (3). Wenn nach GR-Aktivierung viel *FKBP5* vorhanden ist (B), wird mehr *FKBP5* und weniger *FKBP4* gebunden (4). Dies führt zu einer geringeren Rezeptoraffinität für Cortisol und zu weniger GR-Translokation in den Nucleus (5) (Binder et al., 2009).

Klinisch hochinteressant sind die Korrelationen der Genotypen mit einer beschleunigten Erholung und rascherem Ansprechen auf eine antidepressive Therapie. Beim Ansprechen nach zwei Wochen wurden starke Zusammenhänge bei den SNPs rs1360780, rs4713916 und rs3800373 nachgewiesen. Ähnliche Muster konnten für die Antwort nach fünf Wochen und für Komplettremission aufgezeigt werden. Patienten, die im SNP rs1360780 homozygot für das T-Allel waren, sprachen über einen Zeitraum von fünf Wochen im Vergleich zu CT- und CC-Allelträgern besser auf eine antidepressive Therapie an (Binder et al., 2004). Weitere Studien konnten die Zusammenhänge bestätigen (Kirchheiner et al., 2008; Lekman et al., 2008).

Darüber hinaus beeinflussen Polymorphismen im *FKBP5*-Gen das Auftreten von PTSD im Erwachsenenalter (Binder et al., 2008; Koenen et al., 2005; Mehta et al., 2011; Zimmermann et al., 2011). PTSD ist assoziiert mit Veränderungen der HPA-Achse. Unter anderem finden sich eine erhöhte Aktivität des CRH-Systems, veränderte Cortisolgrundspiegel und eine erhöhte GR-Sensitivität. Diese veränderte Ansprechbarkeit spiegelt eine bereits existierende Verwundbarkeit wider, die die Wahrscheinlichkeit, nach Traumaexposition an PTSD zu

erkranken, erhöht (Yehuda et al., 2009). Individuen, die eine große Anzahl an Glukokortikoidrezeptoren aufweisen, unterliegen einem höheren Risiko, an PTSD zu erkranken (van Zuiden et al., 2011). Außerdem korreliert die Höhe der FKBP5-mRNA-Expressionsinduktion in mononukleäre Zellen nach Traumaexposition mit dem Risiko, nach vier Monaten eine PTSD zu entwickeln (Segman et al., 2005).

Die Gruppe um Binder zeigte, dass vier SNPs im *FKBP5*-Genlocus (rs1360780, rs9296158, rs3800373, und rs9470080) mit dem Ausmaß des Kindheitsmissbrauchs interagieren und den Schweregrad der PTSD-Symptome im Erwachsenenalter beeinflussen. Außerdem war nur bei Patienten mit *FKBP5*-Risikoallel, eine PTSD mit erhöhter GR-Sensitivität assoziiert (Binder et al., 2008). Entsprechende Ergebnisse zeigten sich bei anderen Untersuchungen: Nur die Träger des Risikoallels A des SNP rs9296158 im *FKBP5*-Gen zeigten in der Dex-Suppression eine gesteigerte GR-Empfindlichkeit. Demgegenüber war eine reduzierte Cortisol-Ausgangskonzentration nur bei PTSD-Patienten feststellbar, die homozygot für das protektive Allel waren (Metha 2011). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die *FKBP5*-Polymorphismen, die Einfluss auf die GR-Sensitivität nehmen, zu ganz spezifischen Arten von HPA-Achsen Dysregulierung und entsprechend unterschiedlichen Subtypen der PTSD führen (Metha, Gonik, 2011). Diese Beobachtungen unterstreichen die Rolle des *FKBP5*-Gens als Regulator der GR-Empfindlichkeit und der Stresshormonkaskade.

### 2.3 Fragestellungen und Hypothesen

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, die endokrine Stressreaktion sowie die Induktion der FKBP5-mRNA- und Proteinexpression gesunder Probanden nach Dexamethason-Stimulation über einen Zeitverlauf zu charakterisieren und unter Berücksichtigung des Genotyps zu vergleichen. So sollen Zusammenhänge zwischen der *FKBP5*-Genexpression und der GR-Funktionalität, sowie ihre Auswirkungen auf die endokrine Reaktion in Form von ACTH- und Cortisolsuppression herausgearbeitet werden. Die Arbeit sollte einen Beitrag leisten, um eine mögliche genetische Komponente im Bereich der Co-Chaperone zu beleuchten, die bei der Entstehung und Behandlung von psychischen Störungen von Bedeutung sein könnte. Man erhofft sich durch DNA-Genotypisierung und Analyse des mRNA-Expressionsprofils mit den resultierenden Proteinen nützliche Biomarker für Erkrankungen aus dem neuropsychiatrischen Formenkreis zu finden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Fragestellung (F1): *Wie lässt sich die ACTH- und Cortisolreaktion sowie die Veränderung von FKBP5-mRNA- und Proteinexpression auf Dexamethason-Stimulation über einen Zeitraum charakterisieren?*
2. Fragestellung (F2): *Kann die Höhe der basalen FKBP5-mRNA- und Proteinkonzentration sowie die Stärke der FKBP5-Expressionsinduktion als Indikator für GR-Sensitivität dienen?*
3. Fragestellung (F3): *Unterscheiden sich Probanden mit einer bestimmten genetischen Variation im SNP rs1360780 in der ACTH- und Cortisolreaktion und der FKBP5-Expression?*

Ausgehend von den Forschungsergebnissen lassen sich zu den oben genannten Fragestellungen folgende Hypothesen generieren:

- (F1) *1.Hypothese (H1): Die Induktion der FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation ist schneller reversibel als die Suppression der ACTH- und Cortisolkonzentration.*
- (F2) *2.Hypothese (H2): Die Höhe der basalen FKBP5-mRNA- und Proteinkonzentration vor Dexamethason-Stimulation dient als Indikator für die GR-Sensitivität.*
- 3.Hypothese (H3): Die Stärke der FKBP5-Expressionsinduktion nach Dexamethason-Stimulation dient als Indikator für die GR-Sensitivität.*
- (F3) *4.Hypothese (H4): Genetische Variationen im SNP rs1360780 beeinflussen die ACTH- und Cortisolsuppression.*
- 5.Hypothese (H5): Genetische Variationen im SNP rs1360780 beeinflussen den basalen FKBP5-mRNA- und Proteinspiegel.*
- 6.Hypothese (H6): Genetische Variationen im SNP rs1360780 beeinflussen die Induktion der FKBP5-mRNA- und Proteinexpression.*

### 3 MATERIAL

#### 3.1 Chemikalien

Name	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Acrylamid	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
APS	Biorad (München)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Cortisolderivat	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Danazol	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Immobilon Western HRP Substrat	Millipore (Eschborn)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
MESb-Puffer	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, USA)
Protease-Inhibitor (EDTA-frei)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Stripping-Puffer	Pierce (Bonn)
Sulfosalicylsäure	Merck (Darmstadt)
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen (USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Trichloressigsäure	Merck (Darmstadt)
Tween 20	Sigma Aldrich (USA)

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
Filterpapier 3 MM Whatman	Schleicher und Schuell (Dassel)
Membran-Adapter	Sarstedt (Nümbrecht)
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell (Dassel)
ProteinLoBind Tubes	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
PAXgene™ Blood RNA- Blutentnahmeröhrchen mit Adapter	BD Biosciences (Heidelberg)
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Peske (Aindling)
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Röntgenfilme	Fujifilm (Düsseldorf)
S-Monovette, Serum, 7,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
S-Monovette, Kalium-EDTA, 7,5 ml/2,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugationsröhrchen 50 ml; 15 ml	TPP (Schweiz)

### 3.3 Antikörper

Name	Bezugsquelle
Anti-Actin	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, USA)
Anti-FKBP51	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
Anti-Rabbit-IgG (HRP)	Mabtechnologies (Danvers, USA)
Anti-Goat-IgG	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Biotinylierter polyklonaler anti-Cortisol Antikörper (Schaf)	Roche (USA)
Biotinylierter monoklonaler anti- ACTH Antikörper (Maus)	Roche (USA)

### 3.4 Kits und weitere Materialien

Name	Bezugsquelle
ACCUSPIN™ System-Histopaque®-1077	Sigma (USA)
ACTH Elecsys cobas e 411	Roche (USA)
Albumin Standard	Thermo Scientific (Passau)
BSA (100x) for restriction of DNA	NEB (Frankfurt)
Cortisol Elecsys cobas e 100	Roche (USA)
ExGen 500	Fermentas (St. Leon-Rot)
Generation Capture Column	Qiagen
Kodak GBX Developer and Fixer	Kodak (USA)
LightCycler RNA Amplification Kit	Roche Applied Science (Mannheim)
NucleoBond AX100 Columns	Macherey-Nagel (Düren)
PAXgene Blood RNA Kit	Qiagen (Hilden)
Powdered milk Rapidlait	Migros (Switzerland)
Protease inhibitor cocktail (PI)	Sigma Aldrich (USA)

### 3.5 Instrumente

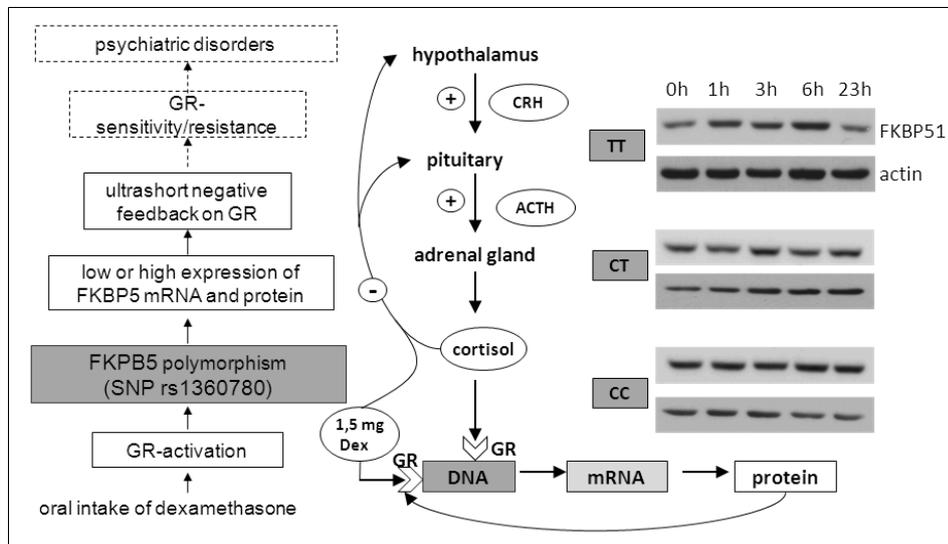
Name	Bezugsquelle
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
Gefrierschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Gelträger Agarosegele	Biorad (München)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Nanophotometer	Implen, Munich, Germany
Pipette Eppendorf	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Roche 480 LightCycler	Roche Applied Science (Mannheim)
Sonifikator, Cell Disruptor B15	Branson (USA)
Vortexer MS2	IKA Labortechnik (Staufen)
Varifuge 3.0R	Heraeus (Mannheim)

---

Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Zentrifuge Allegra 21	Beckman (Krefeld)
Zentrifuge Allegra X-22R	Beckman (Krefeld)
Biofuge pico	Heraeus (Mannheim)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus (Mannheim)
Tischkühl-Zentrifuge Rotina 35R	Hettich (Tuttlingen)

## 4 METHODEN

### 4.1 Studiendesign



**Abb. 5: FKBP5-Genexpression und GR-Resistenz**

Die Dexamethason-Einnahme löst eine kontrollierte Stressreaktion aus, die im Zeitverlauf von 23 Stunden charakterisiert wird. Neben Genotypisierung, werden FKBP5-mRNA-Expression, die daraus resultierenden Proteine, sowie die ACTH- und Cortisolreaktion analysiert.

Genetische Varianten sind als entscheidende Faktoren im Entstehen und Verlauf von affektiven Störungen zu betrachten. Ziel der Studie war es, durch Gabe von Dexamethason eine kontrollierte Stressreaktion auszulösen, die im Zeitverlauf von 23 Stunden entsprechend der Genotypen verglichen wurde. Dies erfolgte durch DNA-Genotypisierung, Messung der ACTH- und Cortisolkonzentrationen sowie der FKBP5-mRNA- und Proteinexpression zu fünf Zeitpunkten. Erster Blutentnahmepunkt war vor der Einnahme von Dexamethason. Weitere Blutentnahmen erfolgten eine, drei, sechs und 23 Stunden nach der Gabe von Dexamethason.

### 4.2 Probandenrekrutierung

Für die Studie wurden 26 männliche kaukasische Freiwillige im Alter zwischen 19 und 30 Jahren rekrutiert. Voraussetzungen für die Teilnahme waren körperliche und psychische Gesundheit, keine regelmäßige Einnahme von Medikamenten, sowie mäßiger Koffein- und

Alkoholkonsum. Der Konsum von anderen Drogen außer Alkohol und Zigaretten innerhalb der zwei Wochen vor Studienantritt führte zum Ausschluss. Zwei Stunden vor Blutentnahme wurde auf Essen, Koffein, Nikotin und körperliche Verausgabung verzichtet. Für die Teilnahme an der Studie wurde eine Entschädigung in Höhe von 150 Euro gewährt.

Um eine psychiatrische Vorgeschichte auszuschließen, wurden alle Probanden mit Hilfe des International Diagnostic Interviews (CIDI), der Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D) und dem Beck-Depressions-Inventar BDI gescreent. Die HAM-D-Version besteht aus 21 Fragen, bei denen der Untersucher auf einer Punkteskala die Ausprägung bestimmter Symptome einer Depression beurteilt (Hamilton, 1960).

Als weiteres Werkzeug zur Ermittlung der Schwere einer depressiven Störung kam der BDI zum Einsatz (Beck, Ward, Mendelson, Mock, & Erbaugh, 1961). Hier beantwortet der Proband eigenhändig 21 Fragen darüber, wie er sich in der letzten Woche gefühlt hat, wobei vier Antwortmöglichkeiten zu Verfügung stehen.

Der CIDI dient als letztes Instrument zur objektiven Prüfung einer psychiatrischen Vorgeschichte. Hierbei handelt es sich um ein umfassendes Interview mit Fragen zu sämtlichen ICD-10- und DSM-IV-Kriterien für psychische Störungen (Robins et al., 1988).

### 4.3 Studiendurchführung

Die Untersuchungen fanden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen statt. Der Zeitaufwand betrug am ersten Tag sechseinhalb Stunden (11:30-18:00) und am zweiten Tag eine halbe Stunde (12:00-12:30).

Std. nach Dex.-Gabe	0	1	3	6	23	Monovette	Anzahl	ml	gesamt (ml)
Protein	x	x	x	x	x	EDTA	5	7,5	37,5
mRNA	x	x	x	x	x	PAXGene	5	2,5	12,5
DNA/Chip/Meth.	x	x	x	x	x	EDTA	5	2,7	13,5
Cort/ACTH	x	x	x	x	x	EDTA	5	7,5	37,5
Blutbild	x					EDTA	1	2,7	2,7
DNA, genome wide	x					EDTA	1	7,5	7,5

**Tab. 1: Ablaufprotokoll der Blutentnahme**

Im Studienverlauf fanden fünf Blutentnahmen statt. Insgesamt wurde eine Menge von 111,2 ml Blut entnommen.

Am ersten Tag wurde nach Ankunft der Freiwilligen um 11:30 Uhr von allen Probanden demographische Daten aufgenommen und ein diagnostisches Interview geführt, um die

Teilnahmevoraussetzungen zu überprüfen. Des Weiteren wurden Blutdruck, Puls, Gewicht und Größe der Probanden schriftlich festgehalten.

Nach Aufklärung durch Studienärzte wurde eine Venenverweilkanüle gelegt, aus der im weiteren Verlauf fünf Blutabnahmen erfolgten. Nach der ersten Blutentnahme um 12:00 Uhr nahmen die Probanden 1,5 mg eines synthetischen Cortisolabkömmlings (Dexamethason) oral ein. Stimulierte Blutproben wurden um 13:00 Uhr, 15:00 Uhr, 18:00 Uhr und 11:00 Uhr am Folgetag gewonnen. Zu jedem Zeitpunkt wurden FKBP5-mRNA- und Proteinkonzentration, sowie die ACTH- und Cortisolkonzentration analysiert. Insgesamt wurde den Probanden eine Menge von 111,2 ml Blut abgenommen. Die PAX-gene-tubes wurden für zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

## **4.4 Proteinanalyse**

### **4.4.1 Isolierung mononukleärer Zellen**

Mononukleäre Zellen wurden mithilfe des Sigma-Aldrich HISTOPAQUE® - 1077-Präparates isoliert. EDTA-antikoaguliertes venöses Blut wurde auf HISTOPAQUE®- 1077 geschichtet. Beim Zentrifugieren wurden Granulozyten und Erythrozyten durch Polysaccharose aggregiert und sedimentiert, wohingegen Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen an der Plasma-HISTOPAQUE®-1077 Grenzfläche verbleiben. Die Erythrozytenkontamination war dabei vernachlässigbar und Thrombozyten wurden während der Waschschriffe durch Zentrifugieren bei niedriger Geschwindigkeit zum Großteil entfernt. HISTOPAQUE®-1077 ist eine gebrauchsfertige Lösung und wurde im Kühlschrank gelagert ( $2 - 8\text{ °C}$ ). Vor der Verwendung wurde die Lösung lichtgeschützt auf  $18 - 26\text{ °C}$  erwärmt.

In 15-ml konische Zentrifugenröhrchen mit eingebautem Filterpapier wurden 3,0 ml der HISTOPAQUE®-1077-Lösung gegeben und kurz zentrifugiert. Anschließend befand sich die Lösung am Boden des Röhrchens und reichte genau bis zum Filter. Nach der Blutentnahme wurden 7,5 ml EDTA-antikoaguliertes Vollblut vorsichtig auf die zwei vorbereiteten HISTOPAQUE®-1077 geschichtet und bei  $800 \times G$  15 Minuten bei Raumtemperatur ungebremst zentrifugiert. Danach wurde die obere Schicht mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig bis 0,5 cm oberhalb der opaken Grenzfläche aspiriert und verworfen. Die in der Grenzfläche enthaltenen mononukleären Zellen wurden vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette in ein sauberes konisches Zentrifugenröhrchen übertragen und eingefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Röhrchen auf Raumtemperatur gebracht, erneut 1 ml der Histopaque-Lösung

hinzugefügt und wieder 15 Minuten ungebremst zentrifugiert. Die trübe Lösung wurde in ein frisches Zentrifugationsröhrchen umpipettiert und so von den am Boden sedimentierten Erythrozyten getrennt. Nach darauffolgender Wiederholung dieses Schrittes wurde dem Röhrchen 10 ml isotone phosphatgepufferte Kochsalzlösung zugegeben, durch behutsames Aspirieren gemischt und 15 Min. zentrifugiert. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde lichtgeschützt gearbeitet. Der Überstand wurde aspiriert und verworfen und das Zellpellet erneut mit 10 ml Puffer resuspendiert und 15 Min. zentrifugiert. Dieser Schritt wurde, falls das Proteinpellet nicht eindeutig abgrenzbar war, wiederholt. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 0,5 ml PBS resuspendiert und in ein Mikrozentrifugenröhrchen umpipettiert. Nach Hinzugabe von weiteren 0,5 ml PBS wurde das Röhrchen 20 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Um die Proteine zu lysieren wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet je nach Größe mit 0,1 – 0,3 ml Lysepuffer (21 mM Tris /HCl (pH 6.8); 0,66 % SDS und 3,33 % Sucrose) gründlich resuspendiert und nach Zugabe von 0,6 ml Proteinaseinhibitor (Roche, Germany) mit mindestens 30 Stößen sonifiziert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß umpipettiert und weggefroren.

#### **4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration: BCA-Assay**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein BCA-Kit von Pierce verwendet. Das Reaktionsschema umfasst als ersten Schritt die Biuretreaktion, bei der zweiwertige Kupferionen in Anwesenheit von Protein in alkalischer Lösung zu einwertigen Ionen reduziert werden. Daraufhin interagieren diese mit einer spezifischen Nachweisreagenz für Cu<sup>+</sup>, dem Natriumsalz der Bicinochninsäure (BCA). Das entstandene violette Reaktionsprodukt mit Absorptionsmaximum bei 562 nm kann photometrisch quantifiziert werden.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:5 in dH<sub>2</sub>O verdünnt und entsprechend der Angaben des Herstellers in einer Mikrotiterplatte mit der BCA-Reagenz vermengt. Nach Inkubation bei 37 °C für 20 bis 30 Min. erfolgte die Absorptionsmessung in einem Mikroplattenreader (Dynatech). Die Berechnung des Proteingehaltes der Lysate erfolgte anhand einer Eichkurve mit einer definierten Konzentration an Rinderserum-Albumin.

#### **4.4.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode, um Proteine in einem elektrischen Feld der Größe nach aufzutrennen. Das Polyacrylamid-Gel setzt sich aus einem

Sammelgel im oberen Teil und einem darunter liegenden Trenngel zusammen. Als erstes wurde das Trenngel (10 - 15 %) zwischen zwei abgedichtete Glasplatten (1 mm Abstand, BioRad) gegossen und sofort mit Isopropanol bedeckt um einen lückenlosen und waagrechten Übergang zwischen den Gelen sicherzustellen. Nach Polymerisation (20 - 30 Min.) wurde Isopropanol entfernt und das Sammelgel aufgegossen. Zur Bildung der Taschen für die Proteinproben wurde ein 15er-Kamm in das Sammelgel eingeführt.

Die Proteinlysate wurden entsprechend der gemessenen Proteinkonzentration mit Lysepuffer verdünnt (13 µg Gesamtprotein für FKBP51, 1,6 µg für Actin) und zusammen mit Laemmli-Auftragspuffer fünf Min. bei 95 °C gekocht. Durch die Denaturierung lagerte sich die SDS-Detergenz an die Proteine an, die dadurch, proportional zu ihrem Molekulargewicht, eine negative Ladung erhielten. Nach Konzentrierung der Proteine im Sammelgel zu einer scharfen Lauffront wurden sie mithilfe der SDS-Reagenz im Trenngel, unabhängig von der Eigenladung, entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurden die Gele in die vorgesehenen Apparaturen eingespannt und in eine Elektrophoresekammer gesetzt, die mit Laemmli-Laufpuffer aufgefüllt wurde. Nun konnten die Lysate (15 µl pro Tasche) und ein bis zwei Spuren Protein-Marker PeqGold IV (3 - 5 µl pro Tasche) geladen werden. Die Elektrophorese wurde zu Beginn 20 – 30 Min. bei 80 V und anschließend bei 140 V durchgeführt.

#### **4.4.4 Immunoblotting: Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um sie mithilfe von spezifischen Antikörpern detektieren zu können. Dieser Transfer wurde mittels des sogenannten Nassblot-Verfahrens durchgeführt. Hierbei werden die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode vom Gel auf die Membran gezogen.

Zwischen zwei Graphitelektroden der Transferapparatur wurden von der Kathode beginnend ein Blot-Schwamm, zwei Whatman-3MM-Filterpapiere, das SDS-Gel, die Nitrocellulosemembran, erneut zwei Whatman-3MM-Filterpapiere und ein Blot-Schwamm übereinander angeordnet. Sämtliche Materialien wurden vorher in Transferpuffer äquilibriert und Luftblasen zwischen Gel und Membran durch Ausstreichen entfernt. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 90 Min. mit Kühlakkus im - 4 °C-Kühlraum.

Um eine gelungene Übertragung sicherzustellen wurden die Proteine mittels Ponceau-Lösung 5 - 10 Min. angefärbt. Aminogruppen werden so reversibel gebunden und die Proteinbanden durch abspülen mit dH<sub>2</sub>O sichtbar gemacht.

#### 4.4.5 Antigen-detektion und Filmentwicklung

Antigen	Erstantikörper	Zweitantikörper
FKBP51	1:1 000 in TBS-T + 2,5 % Milch über Nacht bei 4 °C	Rabbit 1:10 000 in TBS-T + 2,5 % Milch 3 Std. bei Raumtemperatur
Actin	1:30 000 in TBS-T + 2,5 % Milch über Nacht bei 4 °C	Donkey 1:10 000 in TBS-T + 2,5 % Milch 3 Std. bei Raumtemperatur

**Tab. 2: Nassblot-Inkubationen**

Zeit- und Verdünnungsschema der Nassblot-Inkubationen mit FKBP51 und Actin

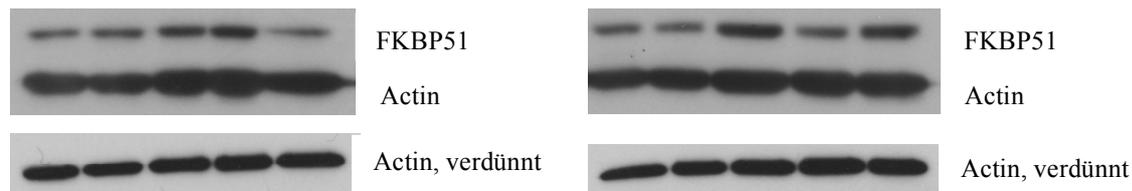
Nach erfolgter Übertragungskontrolle wurde die Membran eine Stunde mit 5 % Milchpulver in TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht im Kühlraum bei - 4 °C geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Nitrocellulose dreimal für 10 Min. in TBS-T gewaschen und drei Stunden mit dem Zweitantikörper inkubiert. Der Waschgang wurde erneut dreimal durchgeführt und die Nassblots zur Detektion mit Immobilon Western HRP Substrat für 1 - 2 Min. inkubiert und in einer Entwicklungskassette mit Klarsichtfolie abgedeckt. Nach Ausstreichen der Luftblasen wurden Röntgenfilme in der Dunkelkammer aufgelegt und maschinell entwickelt. Proben, die durch zu geringe Konzentration durch diese Methodik nicht exakt detektiert werden konnten, wurden durch den Biorad Analyser nachgemessen.

#### 4.4.6 Normalisierung mit Actin

Um einen zur Normalisierung geeigneten Antikörper zu finden wurden GAP-DH, Hsc 70 und Actin auf Probelysaten getestet. Hierfür wurde die Membran mit 15 µg Protein beladen. Dies entspricht der Konzentration, bei der die FKBP51-Proteinbanden optimal dargestellt werden konnten. GAP-DH lieferte trotz höher geladener Proteinkonzentration und niedriger Ak-Verdünnungen (1:1000, 1:500) nur unbefriedigende Ergebnisse ohne deutlich abgrenzbare Banden. Hsc 70 erzielte das beste Ergebnis in der Versuchsreihe. Es war mithilfe dieses Antikörpers möglich, FKBP51 und Hsc 70 gemeinsam auf einer Membran deutlich

darzustellen. Da Hsc 70 allerdings unter Verdacht steht, GR-reguliert zu sein und dies im Zusammenhang mit der in der Studie durchgeführten GR-Aktivierung denkbar ungünstig ist, konnte der Antikörper für eine Normalisierung nicht verwendet werden.

Nach Ladung der benötigten Proteinkonzentration für die adäquate Darstellung der FKBP51-Banden auf einer Membran, war Actin nach Filmentwicklung stellenweise überexprimiert und der Sättigungsbereich wurde überschritten.



**Abb. 6: Normalisierung mit Actin**

Obere Reihe: Actin, überexprimiert bei Auswertung auf gemeinsamer Membran

Untere Reihe: Actin, verdünnt aufgetragen

Um sowohl Actin, als auch FKBP51 adäquat darstellen zu können, wurden aus dem zur FKBP51-Detektion geladenen Proteinlysat 20  $\mu$ l entnommen und mit LAP und Lysepuffer neu gemischt und letztendlich im Verhältnis 2:3:10 (Proteinlysat : Laemmli-Auftragspuffer : Lysepuffer) verdünnt.

#### 4.5 RNA-Extraktion und Realtime-PCR

Das Blut wurde in PAXgene tubes abgenommen, für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei - 20 °C gelagert. RNA-Extraktion und quantitative Realtime-PCR wurde von der klinischen Chemie des MPI für Psychiatrie in München durchgeführt. Die RNA wurde mit Hilfe des PaxGene Blood RNA Kit (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers extrahiert. Die Qualität der RNA wurde mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) gemessen. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der UV-Absorption (Maximum: 260 nm) im Verhältnis der Extinktion von 260 nm / 280 nm beurteilt (Nanophotometer, Implen, Munich, Germany). Es wurde ausschließlich intakte RNA mit einer RNA-Integritätsnummer von mindestens sieben verwendet.

Im Anschluss erfolgte die reverse Transkription der RNA mithilfe der Superscript II Reversen Transkriptase (Invitrogen). Mit der hergestellten cDNA wurde die Echtzeit-PCR mit dem

LightCycler RNA Amplification Kit (Roche Applied Science) mit Hybridisierungsproben am LightCycler Gerät (Roche Applied Science) durchgeführt. Die qPCR-Proben wurden mit Hilfe der Roche universal probe library erstellt (<http://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>). Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen.

#### **4.6 DNA-Extraktion und Genotypisierung**

Die DNA wurde von klinischen Chemie des MPI für Psychiatrie in München mit einem von Qiagen produzierten Kit (Generation Capture Column) extrahiert. Dabei wurden 200 µl von jedem „genomwide DNA“-Vollblut-Röhrchen für die DNA-Extraktion verwendet. In zwei Reinigungs- und Auswaschschritten wurden die Zellen lysiert, die DNA extrahiert und am Ende in 100 µl klarer Flüssigkeit isoliert. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Hersteller-Protokoll durchgeführt.

Die Genotypisierung der Proben wurde von der klinischen Chemie des MPI unter Verwendung eines LightCycler® 480 und Hybridization Probe Assay von Roche durchgeführt. Dabei wurde DNA aus EDTA-Vollblut-Röhrchen der Studienprobanden isoliert und für das SNP rs1360780 des FKBP5-Gens genotypisiert.

#### **4.7 Bestimmung der ACTH- und Cortisolkonzentration**

Die neuroendokrinen Parameter wurden vom Labor des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München bestimmt. Hierfür wurden die kits „ACTH Elecsys cobas e 411“ und „Cortisol Elecsys cobas e 100“ von Roche verwendet. Dabei wurde entsprechend der Anweisungen des Hersteller-Protokolls vorgegangen.

#### **4.8 Statistische Auswertung**

Die statistischen Analysen wurden mithilfe von SigmaPlot 11.0 und SPSS 18.0 durchgeführt. Beim Vergleich von Unterschieden zwischen zwei Messzeitpunkten wurde der T-Test durchgeführt. Interaktions- und Haupteffekte wurden im allgemeinen linearen Modell durch Varianzanalyse mit Messwiederholung mithilfe von SPSS 18.0 berechnet. Hierdurch erfolgte auch die deskriptive Statistik. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant betrachtet. Signifikante Ergebnisse sind unter den jeweiligen Graphen angegeben. Die Fehlerbalken in den Diagrammen entsprechen dem Standardfehler.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.2 Probandenkollektiv

Probe	rs1360780	Alter	BDI	HAMD	BD	Puls	Größe	Gewicht	BMI
PROC0005FZ	CT	24	2	3	107/49	63	1,86	63	18
PROC0006PB	CT	27	1	1	116/63	76	1,9	85	23,5
PROC0007PE	TT	24	7	0	120/80	60	1,85	92	27
PROC0008RH	CT	24	3	0	135/90	76	1,87	145	41,5
PROC0009BB	CC	30	5	1	120/70	72	1,82	70	21
PROC0010JK	CT	24	5	0	100/70	60	1,8	75	23
PROC0011AK	CC	27	0	0	130/90	68	1,86	80	23
PROC0012SG	CC	30	0	2	140/90	60	1,88	80	22,5
PROC0013CD	CT	24	0	2	140/90	68	1,86	72	20,8
PROC0014DB	TT	24	0	1	120/80	64	1,84	80	23,5
PROC0015SK	CC	21	0	0	120/80	72	1,73	65	22
PROC0016FK	CT	19	0	0	120/80	60	1,85	78	23
PROC0017MA	TT	25	3	1	120/80	64	1,9	85	23,5
PROC0018GG	CC	24	0	0	130/80	72	1,8	80	25
PROC0019RF	CC	24	0	0	135/80	60	1,93	80	21,5
PROC0020FS	TT	23	0	1	130/70	72	1,9	72	20
PROC0021TB	TT	24	4	0	110/70	72	1,73	70	23,5
PROC0022AH	CC	25	6	0	130/80	68	1,86	88	25,5
PROC0023SD	CC	22	7	0	120/80	76	1,9	74	20,5
PROC0024MG	CT	26	0	0	105/70	72	1,9	83	23
PROC0025NG	CT	29	0	0	120/80	72	1,8	73	22,5
PROC0026FH	TT	20	1	0	110/70	64	1,86	75	22
PROC0027MS	CC	25	0	0	120/80	64	1,9	78	21,5
PROC0028CF	CT	25	0	0	120/80	63	1,86	75	22
PROC0029MS	TT	29	1	0	135/80	68	1,78	76	24
PROC0030AZ	CT	26	0	1	120/80	64	1,8	72	22

**Tab. 3: Probandenkollektiv**

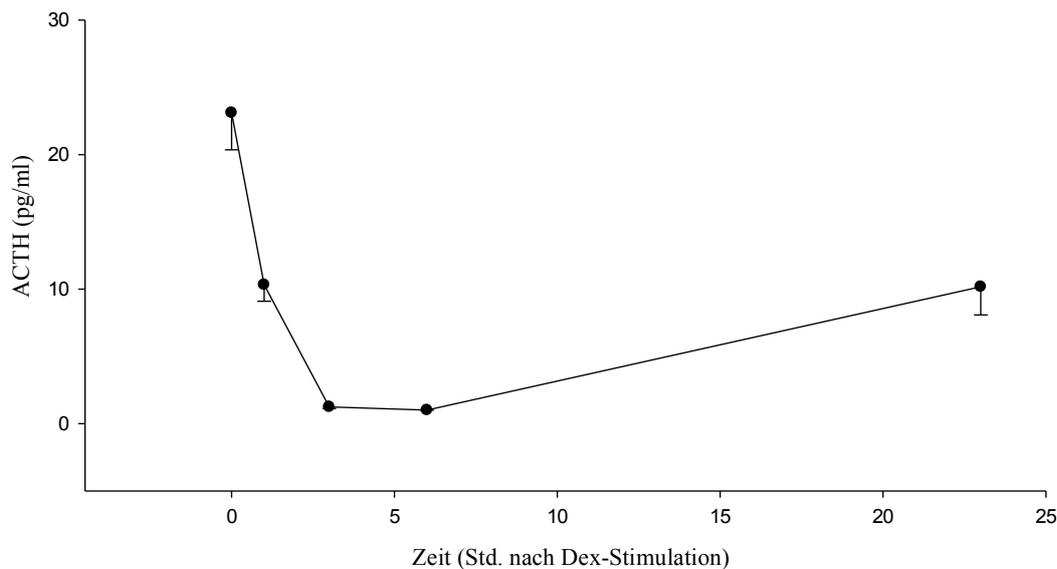
Auflistung von Genotyp, Alter, BDI, HAM-D, Blutdruck, Puls, Größe, Gewicht und BMI

Die *FKBP5*-Genotypisierung für das SNP rs1360780 erbrachte folgende Verteilung: Bei zehn Probanden wurde der heterozygote Genotyp CT nachgewiesen. Der Genotyp CC trat bei neun Probanden auf und sieben Probanden wiesen den TT-Genotyp auf. Die Proben wurden anschließend entsprechend des T-Allel-Trägerstatus in zwei Gruppen eingeteilt (rs1360780: n (CC) = 9; n (CT/TT) = 17, n = 26). Die für die Studie zugelassenen Probanden waren im Durchschnitt 24,8 Jahre alt (SEM= 0,53), schnitten im BDI mit durchschnittlich zwei Punkten (SEM = 0,5), im HAM-D-21 mit durchschnittlich null Punkten ab (SEM = 0,2) und wiesen im CIDI keine psychischen Störungen auf. Die durchschnittliche Herzfrequenz vor Beginn der Studie betrug 67/Min (SEM = 1,1), der Mittelwert des systolischen Blutdrucks betrug 122,04

mmHg (SEM = 2,1), für den diastolischen Blutdruck ergab sich ein Mittelwert von 77,4 mmHg (SEM = 1,8). Der Mittelwert des BMI der Probanden lag im normalgewichtigen Bereich (MW = 23,3 kg/m<sup>2</sup>; SEM = 0,9).

## 5.2 Stresshormonsuppression und *FKBP5*-Genexpression

### 5.2.1 ACTH-Suppression nach Dexamethason-Stimulation

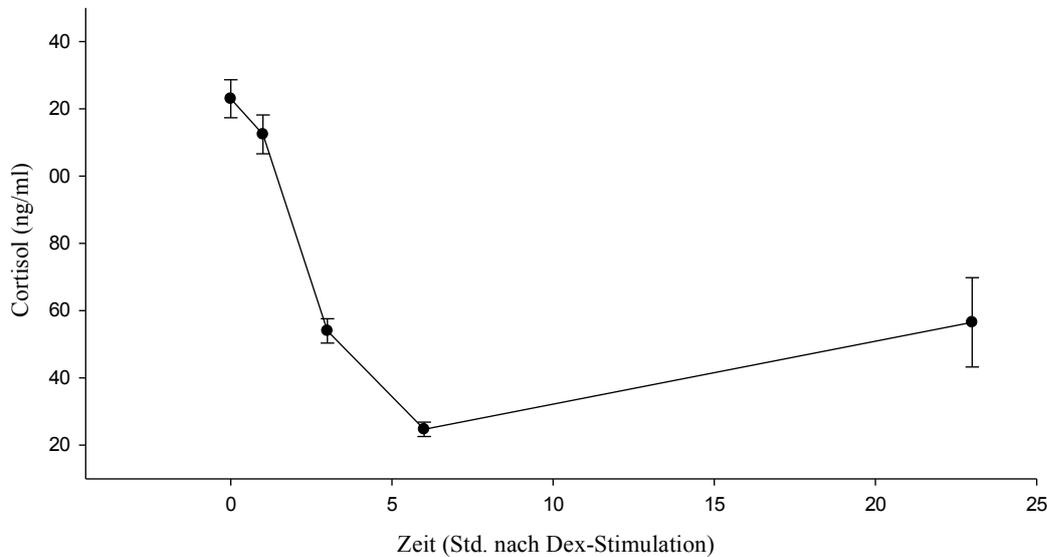


**Abb. 7: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Signifikante Veränderung der ACTH-Konzentration über den Zeitverlauf;  $F(1,851; 46,269) = 42,928$ ;  $p < 0,001$ ; statistisch signifikante Suppression nach einer Stunde ( $p < 0,001$ );  $n = 26$

Nach Dexamethason-Stimulation ergab sich eine signifikante Veränderung der ACTH-Konzentration über den Zeitverlauf (Repeated Measures Effekt (Faktor1):  $F(1,851; 46,269) = 42,928$ ). Das durchschnittliche Basislevel der ACTH-Konzentration betrug 23,11 pg/ml (SEM = 2,8). Bereits eine Stunde nach Dexamethason-Einnahme erfolgte eine statistisch signifikante Suppression auf einen Mittelwert von 10,33 pg/ml (SEM = 1,2;  $p < 0,001$ ). Drei Stunden nach Stimulation sank der Wert auf 1,25 pg/ml (SEM = 0,1) und war nach sechs Stunden auf 1,01 pg/ml (SEM = 0,01;  $p = 0,008$ ) supprimiert. Der letzte Messwert nach 23 Stunden betrug 10,18 pg/ml (SEM = 2,1). Der ACTH-Mittelwert am Folgetag war somit, im Vergleich zum sechsten Messzeitpunkt, wieder signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ) und verglichen zum Ausgangswert weiterhin supprimiert ( $p < 0,001$ ).

### 5.2.1 Cortisol-suppression nach Dexamethason-Stimulation

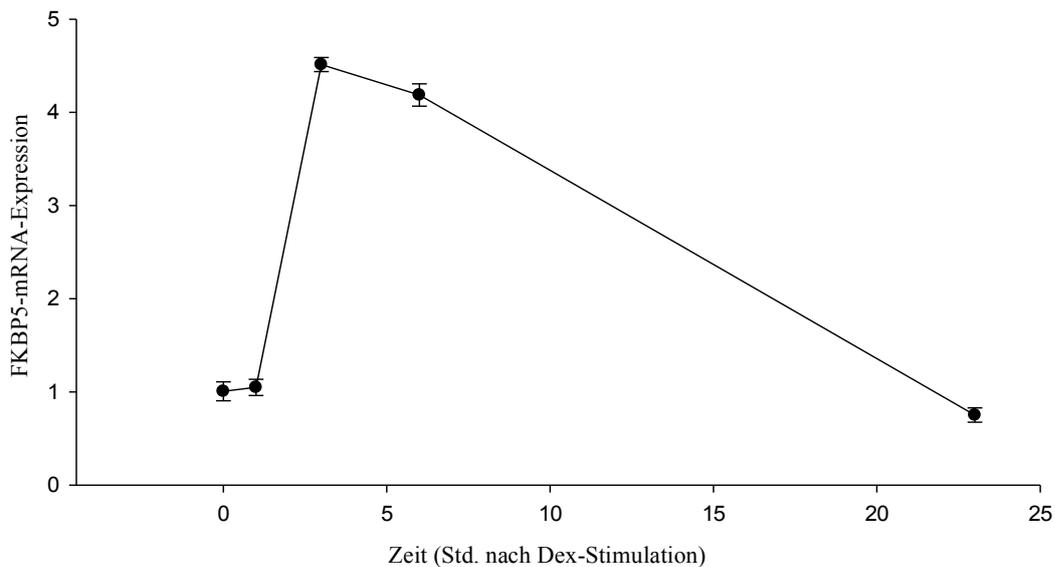


**Abb. 8: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Signifikante Veränderung der Cortisolkonzentration über den Zeitverlauf;  $F(1,542; 38,546) = 47,15$ ;  $p < 0,001$ ; statistisch signifikante Suppression nach 3 Stunden ( $p < 0,001$ );  $n = 26$

Auf Dexamethason-Stimulation erfolgte eine signifikante Veränderung der Cortisolkonzentration über den Zeitverlauf (Repeated Measures Effekt (Faktor1):  $F(1,542; 38,546) = 47,15$ ). Die durchschnittliche basale Cortisolkonzentration betrug 123,0 ng/ml (SEM = 5,7). Eine Stunde nach Dexamethason-Einnahme ergab sich ein Mittelwert von 112,4 ng/ml (SEM = 5,8;  $p = 0,052$ ). Drei Stunden nach Dexamethason-Stimulation sank der Wert statistisch signifikant auf 54,0 ng/ml (SEM = 3,6) und fiel weitere drei Stunden später zum Zeitpunkt Sechs auf sein Minimum von 24,7 ng/ml ab (SEM = 2,1;  $p < 0,001$ ). Die letzte Messung 23 Stunden nach Dexamethason-Stimulation ergab einen Wert von 56,5 ng/ml (SEM = 13,2) und war somit im Vergleich zum Mittelwert nach sechs Stunden signifikant erhöht ( $p = 0,035$ ). Verglichen zu dem basalen Ausgangswert, blieb die Cortisolkonzentration nach 23 Stunden signifikant supprimiert ( $p < 0,001$ ).

### 5.2.2 FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation

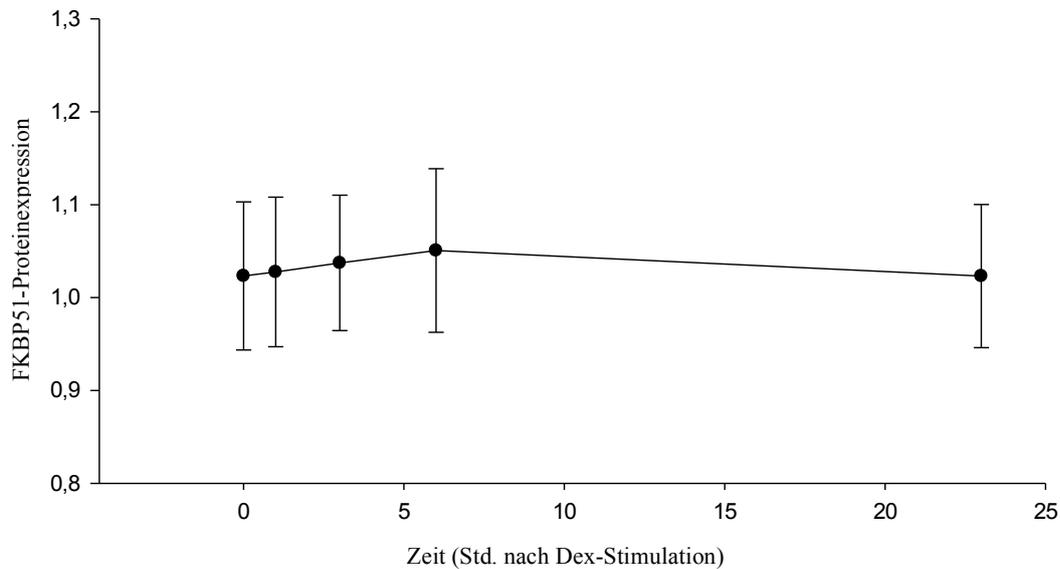


**Abb. 9: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation**

Signifikante Veränderung der mRNA-Expression über den Zeitverlauf;  $F(2,827; 70,680) = 236,942$ ;  $p < 0,001$ ; statistisch signifikante Erhöhung der mRNA-Konzentration nach drei Stunden ( $p < 0,001$ );  $n = 26$

Über den Zeitverlauf ergab sich eine signifikante Veränderung der mRNA-Expression (Repeated Measures Effekt (Faktor1):  $F(2,827; 70,680) = 236,942$ ,  $p < 0,001$ ). Der Mittelwert des unstimulierten FKBP5-mRNA-Levels betrug 1,0 (SEM = 0,1). Eine Stunde nach Dexamethason-Einnahme war noch kein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ( $t(1)$ : FKBP5-mRNA = 1,09; SEM = 0,09;  $p = 0,564$ ). Die statistisch signifikante und zugleich maximale Erhöhung der mRNA-Expression erfolgte drei Stunden nach Dexamethason-Stimulation auf einen Mittelwert von 4,37 (SEM = 0,08;  $p < 0,001$ ). Darauf folgte ein statistisch grenzwertig signifikanter Abfall der mRNA-Konzentration weitere drei Stunden später bei Zeitpunkt Sechs ( $t(6)$ : FKBP5-mRNA = 4,18; SEM = 0,1;  $p = 0,055$ ). 23 Stunden nach Dexamethason-Stimulation sank die mRNA-Konzentration auf 0,78 (SEM = 0,08), wobei kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zum Ausgangslevel festzustellen war ( $p = 0,077$ ).

### 5.2.3 FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation



**Abb. 10: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation**

Keine signifikante Veränderung der Proteinexpression über den Zeitverlauf;

Repeated Measures Effekt (Faktor1):  $F(2,251; 45,013) = 1,183$ ;  $p = 0,32$ ;  $n = 23$

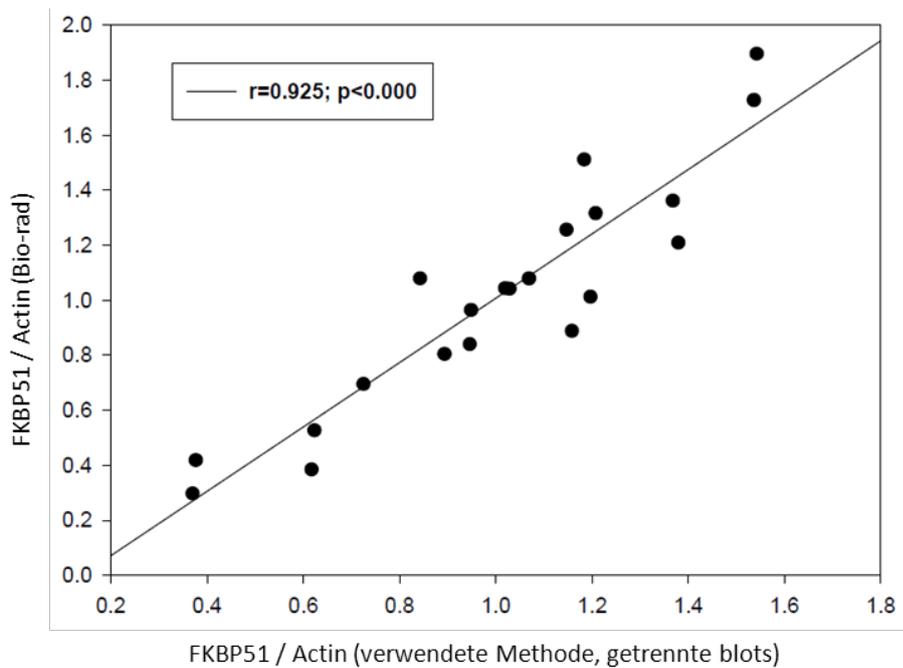
Auf Proteinebene variiert der Verlauf der FKBP51-Expression zwischen den Probanden ( $n = 23$ ). So ergaben sich bei der Verlaufsanalyse zwischen den Mittelwerten aller Probanden keine statistisch signifikanten Unterschiede über den Zeitverlauf (Repeated Measures Effekt (Faktor1):  $F(2,251; 45,013) = 1,183$ ,  $p = 0,32$ ). Die Werte pendelten im Verlauf um den Mittelwert vor Dexamethason-Stimulation um 1,0 ( $SEM = 0,08$ ).

### 5.2.4 Methodenvergleich: Bewertung der verwendeten Methode zur Normalisierung mit Actin

Die zur Quantifizierung von FKBP51 verwendeten Proteinlysate wurden für die Detektion von Actin im Verhältnis 2:13 verdünnt, wobei aufgrund des begrenzten Restvolumens nur 20  $\mu$ l des Lysats entnommen werden konnten. Im Gegensatz zur Normalisierung auf einer Membran erhöht sich aufgrund der zusätzlichen Pipettieringsschritte die Wahrscheinlichkeit einer Messwertverfälschung durch das Auftreten von Pipettierfehlern.

Mit dem Bio-rad Imaging System ist eine Normalisierung auf einem Blot möglich, wodurch Pipettierfehler in den Hintergrund geraten und Antikörper auf exakt derselben Proteinmenge reagieren wodurch das Ergebnis genauer wird. Das Gerät zur Analyse stand erst zum Ende

der Studiendurchführung zur Verfügung. Verbliebene unstimulierte Lysate wurden im Rahmen einer anderen Studie erneut geladen und normalisiert, wodurch ein Vergleich der Methoden zur Bandenquantifizierung möglich wurde, um Ungenauigkeiten auszuschließen. Die ermittelten Korrelationen zwischen den Ergebnissen im Methodenvergleich ( $r = 0,925$ ;  $p < 0,000$ ) bestätigen die Messgenauigkeit der in der vorliegenden Studie verwendeten Methode zur Normalisierung.



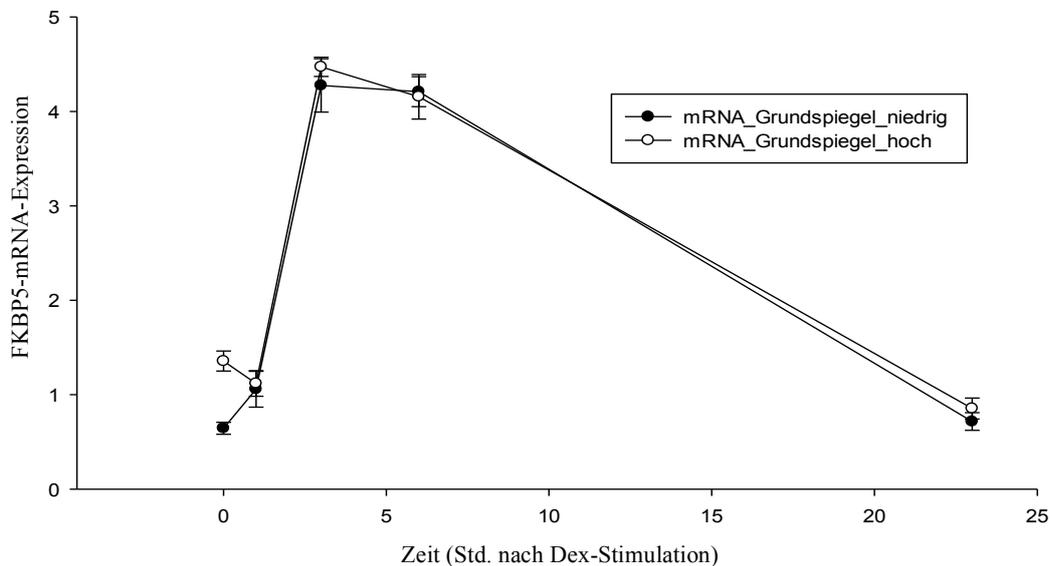
**Abb. 11 Methodenvergleich: Korrelation zwischen Analyse mit der verwendeten Methode und dem Bio-rad Imaging System**

X-Achse: Actin und FKBP51-Signale auf separaten Blots (Duplikate), mit HRP-konjugierten Zweitantikörpern (Lumineszenz) und Röntgenfilm.

Y-Achse: Actin und FKBP51-Signale auf einem Blot (Duplikate), mit Alexa 488-konjugierten Zweitantikörpern (Fluoreszenz) und Bio-rad Imaging System.

### 5.3 Verläufe in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP5-mRNA-Konzentration

#### 5.3.1 FKBP5-mRNA-Expression in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP5-mRNA-Konzentration

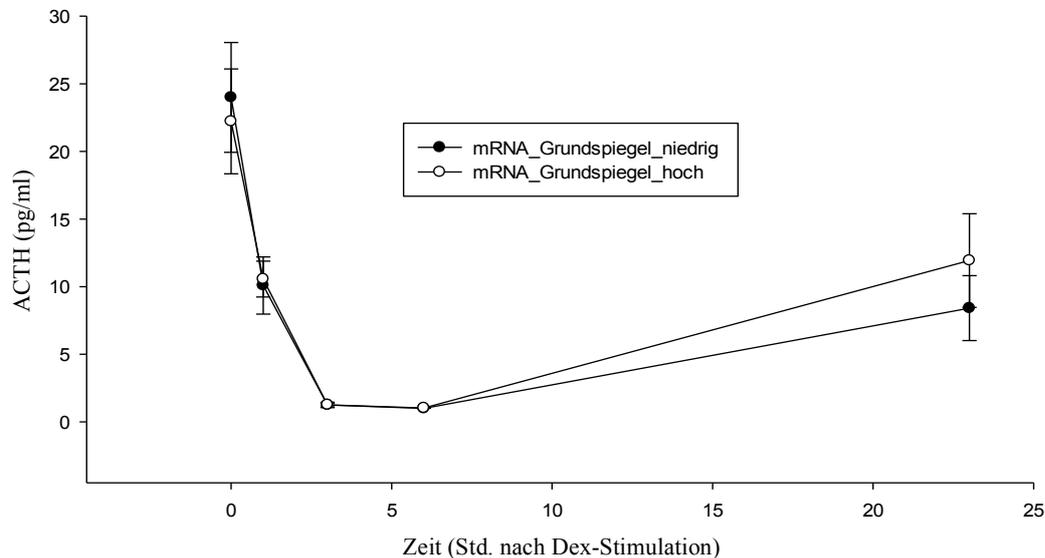


**Abb. 12: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des unstimulierten mRNA-Grundspiegels; signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,026$ ); kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,220$ );  $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_niedrig) = 13;  $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_hoch) = 13

Die Probanden wurden anhand ihrer unstimulierten FKBP5-mRNA-Grundspiegel vor Dexamethason-Einnahme in Niedrig- und Hochexprimierer eingeteilt ( $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_niedrig) = 13,  $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_hoch) = 13). Daraus ergab sich ein signifikanter Haupteffekt des mRNA-Grundspiegels über den Zeitverlauf ( $p = 0,026$ ), jedoch kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,220$ ). Im Durchschnitt betrug der Wert der Niedrigexprimierer 0,64 (SEM = 0,06). Der Mittelwert der Probanden mit hohem mRNA-Spiegel betrug 1,34 (SEM = 0,1).

### 5.3.2 ACTH-Suppression in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP5-mRNA-Konzentration

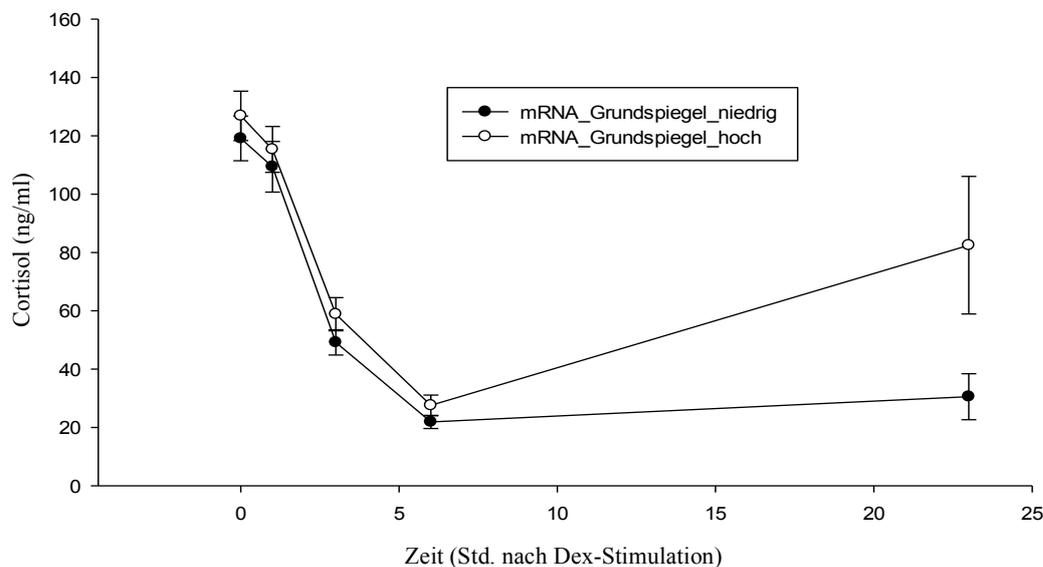


**Abb. 13: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des unstimulierten mRNA-Grundspiegels; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,844$ ) und kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,614$ );  $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_niedrig) = 13;  $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_hoch) = 13

Der Mittelwert der unstimulierten ACTH-Konzentration der Gruppe mit niedriger FKBP5-mRNA-Expression betrug 24,0 pg/ml (SEM = 4,1). Der Mittelwert der Gruppe mit hoher FKBP5-mRNA-Expression betrug 22,3 pg/ml (SEM = 3,9). Im Verlauf verhielten sich die Gruppen vergleichbar. 23 Stunden nach Dexamethason-Einnahme stieg die ACTH-Konzentration in der Gruppe mit hoher mRNA-Konzentration schneller an. Zum Zeitpunkt 23 blieb die Gruppe mit niedrigem Ausgangsspiegel auf 8,42 pg/ml (SEM = 2,4) supprimiert, wohingegen bei der Gruppe mit hoher basaler Konzentration ein Wiederanstieg bis auf 11,94 ng/ml (SEM = 3,5) zu verzeichnen war. Hier war jedoch kein signifikanter Unterschied festzustellen ( $p = 0,422$ ).

### 5.3.3 Cortisol-suppression in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP5-mRNA-Konzentration

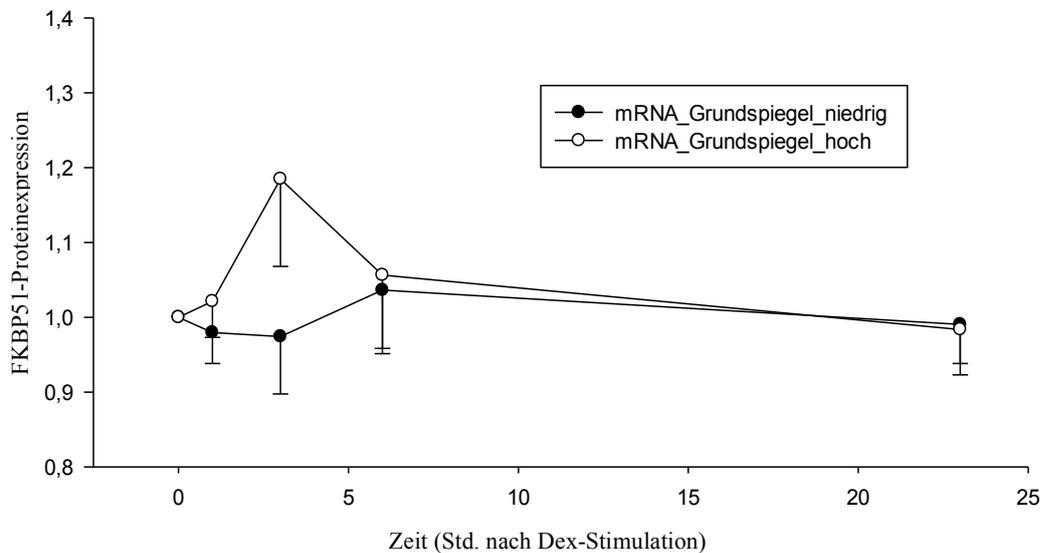


**Abb. 14: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des unstimulierten mRNA-Grundspiegels; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,092$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,070$ );  $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_niedrig) = 13;  $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_hoch) = 13

Der Mittelwert der unstimulierten Cortisolkonzentration der Gruppe mit niedrigem FKBP5-mRNA-Ausgangslevel betrug 119,1 ng/ml (SEM = 7,7). Die Basiskonzentration der Gruppe mit hoher FKBP5-mRNA-Expression ergab einen Wert von 126,9 ng/ml (SEM = 8,5). Im Verlauf verhielten sich die Gruppen vergleichbar, wobei zum Zeitpunkt 23, während dem Wiederanstieg der Cortisolkonzentration, ein signifikanter Unterschied festzustellen war. Der Mittelwert der Gruppe mit niedriger mRNA-Ausgangskonzentration blieb mit einer Konzentration von 29,95 ng/ml (SEM = 7,9) am Folgetag im Vergleich zu der Gruppe der FKBP5-mRNA-Hochexprimierer (MW = 83,09 ng/ml; SEM = 23,6) länger supprimiert ( $p = 0,047$ ). Es ergab sich ein im Trend signifikanter Haupteffekt des FKBP5-mRNA-Grundspiegels über die Zeit ( $p = 0,092$ ).

### 5.3.4 FKBP51-Proteinexpression in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP5-mRNA-Konzentration



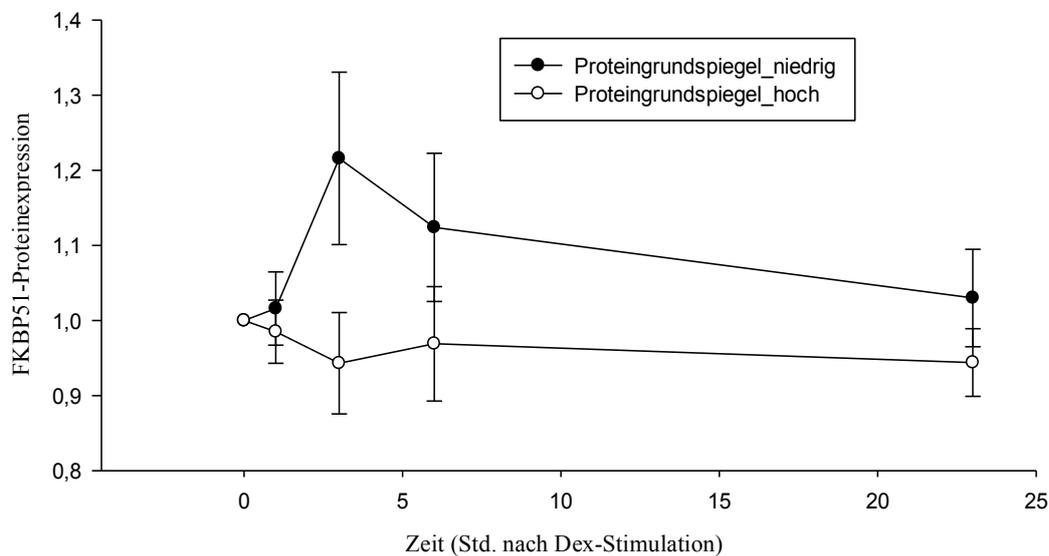
**Abb. 15: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des unstimulierten mRNA-Grundspiegels; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,499$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,291$ );  $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_niedrig) = 10;  $n$  (mRNA\_Grundspiegel\_hoch) = 10; n-fache Stimulation in Abhängigkeit des Grundspiegels

Bei der Analyse der FKBP51-Konzentrationen über den Zeitverlauf war bzgl. der Gruppe mit hohem FKBP5-mRNA-Grundspiegel im Gegensatz zu der Gruppe mit niedrigerem mRNA-Level eine deutliche Expressionsinduktion nach drei Stunden zu erkennen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten zu den gemessenen Zeitpunkten.

## 5.4 Verläufe in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP51-Proteinkonzentration

### 5.4.1 FKBP51-Proteinexpression in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP51-Proteinkonzentration

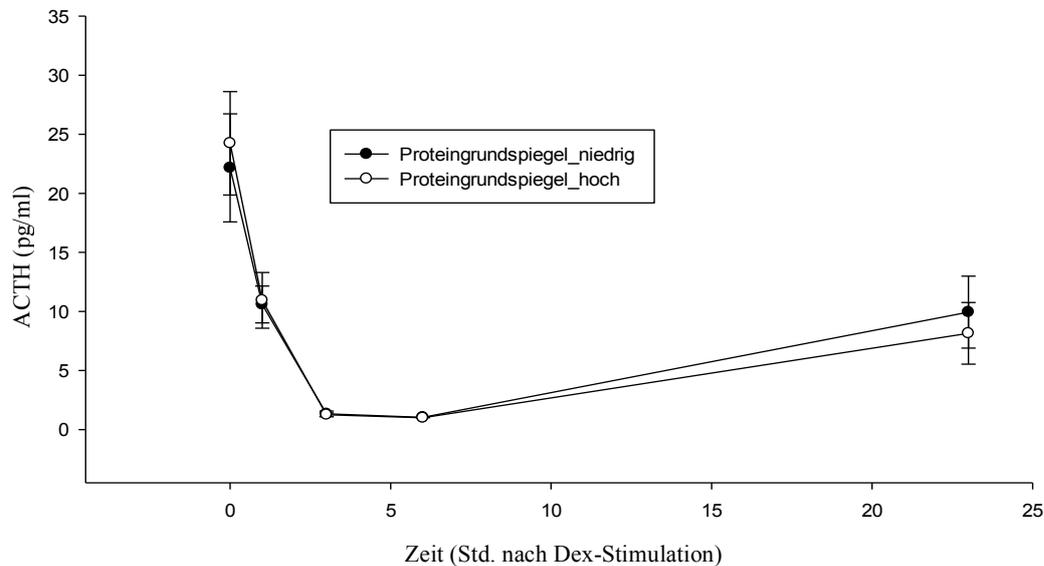


**Abb. 16: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des Proteingrundspiegels vor Dexamethason-Stimulation; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,119$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,115$ );  $n$  (Proteingrundspiegel\_niedrig) = 11;  $n$  (Proteingrundspiegel\_hoch) = 11;  $n$ -fache Stimulation in Abhängigkeit des Grundspiegels

Die Probanden wurden anhand der Höhe ihres FKBP51-Proteingrundspiegels vor Dexamethason-Stimulation in zwei Gruppen eingeteilt. Daraus ergab sich weder ein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,119$ ), noch ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,115$ ). Zu Zeitpunkt Drei bestand ein signifikanter Unterschied im Mittelwert der beiden Gruppen, wobei ein niedriger Proteinspiegel zu erhöhter Proteinexpressionsinduktion führte (MW (Proteingrundspiegel\_niedrig) = 1,225; SEM = 0,104; MW (Proteingrundspiegel\_hoch) = 0,955; SEM = 0,063;  $p = 0,038$ ). Hierbei ergab sich zwischen erstem und drittem Messzeitpunkt innerhalb der Gruppe mit niedrigem Ausgangslevel eine signifikante Veränderung der FKBP51-Proteinkonzentrationen ( $t(0)$ : MW (Proteingrundspiegel\_niedrig) = 0,75; SEM = 0,09;  $t(3)$ : MW (Proteingrundspiegel\_niedrig) = 1,23; SEM = 0,1;  $p = 0,002$ ).

### 5.4.2 ACTH-Suppression in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP51-Proteinkonzentration

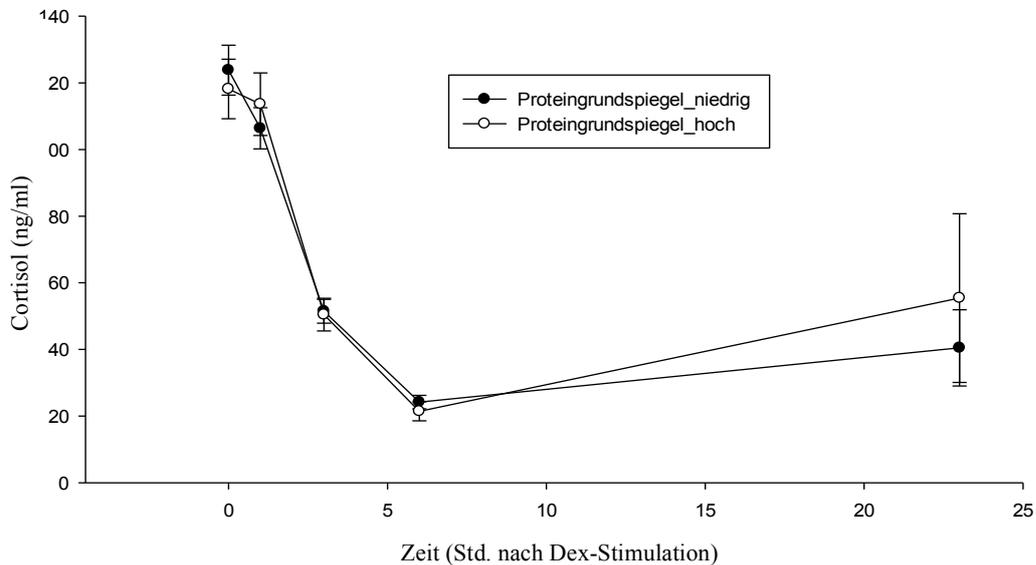


**Abb. 17 Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des Protein-Grundspiegels vor Dexamethason-Stimulation; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,967$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,731$ );  $n$  (Proteingrundspiegel\_niedrig) = 11;  $n$  (Proteingrundspiegel\_hoch) = 11

Bei der Untersuchung der Suppression der ACTH-Konzentration ergab sich, nach Aufteilung nach Höhe des basalen FKBP51-Proteinspiegels, weder ein signifikanter Haupteffekt der Proteinkonzentration über den Zeitverlauf ( $p = 0,967$ ), noch ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,731$ ).

### 5.4.3 Cortisolsuppression in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP51-Proteinkonzentration

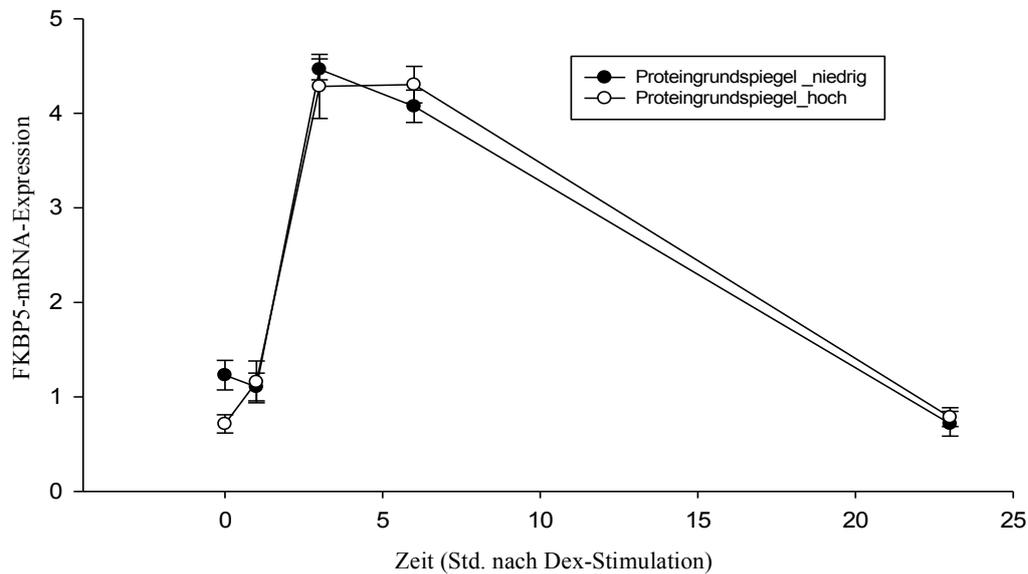


**Abb. 18: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des Protein-Grundspiegels vor Dexamethason-Stimulation; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,762$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,637$ );  $n$  (Proteingrundspiegel\_niedrig) = 11;  $n$  (Proteingrundspiegel\_hoch) = 11

Bezüglich der Cortisolsuppression, aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des FKBP51-Protein-Grundspiegels vor Dexamethason-Stimulation, ergab sich kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,762$ ) und kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,637$ ).

#### 5.4.4 FKBP5-mRNA-Expression in Abhängigkeit der Höhe der basalen FKBP5-Proteinkonzentration



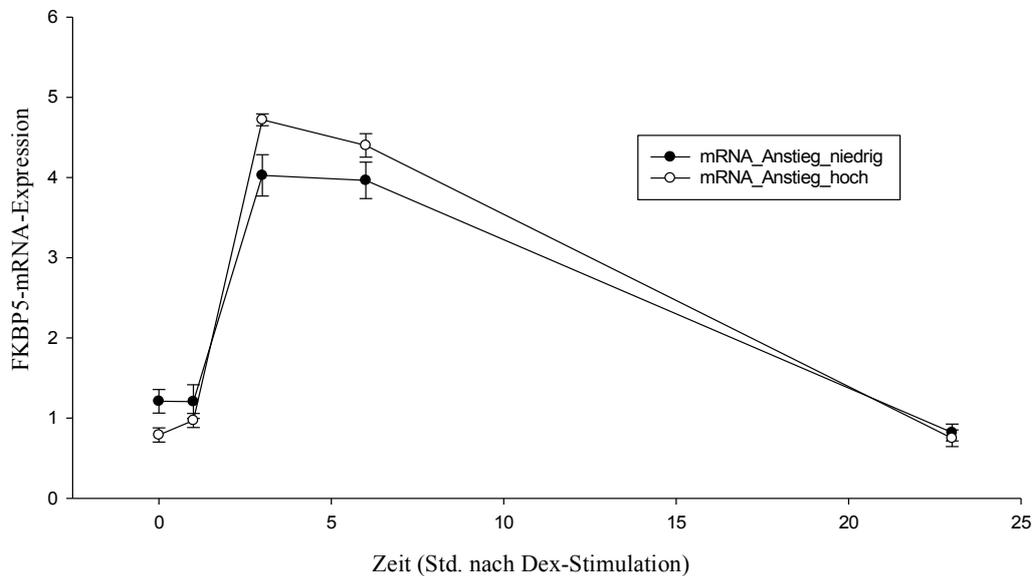
**Abb. 19: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des Protein-Grundspiegels vor Dexamethason-Stimulation; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,864$ ); grenzwertig signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,05$ );  $n$  (Proteingrundspiegel\_niedrig) = 11;  $n$  (Proteingrundspiegel\_hoch) = 11

Bei der FKBP5-mRNA-Expression, aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des Proteingrundspiegels vor Dexamethason-Stimulation, ergab sich kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,864$ ), allerdings ein grenzwertig signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,05$ ). Zum Zeitpunkt vor der Dexamethason-Einnahme bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den mRNA-Konzentrationen (mRNA (Proteingrundspiegel\_niedrig) = 1,216; SEM = 0,1; mRNA (Proteingrundspiegel\_hoch) = 0,71; SEM = 0,1;  $p = 0,01$ ).

## 5.5 Verläufe in Abhängigkeit der Stärke der FKBP5-mRNA-Expressionsinduktion

### 5.5.1 FKBP5-mRNA-Expression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP5-mRNA-Expressionsinduktion

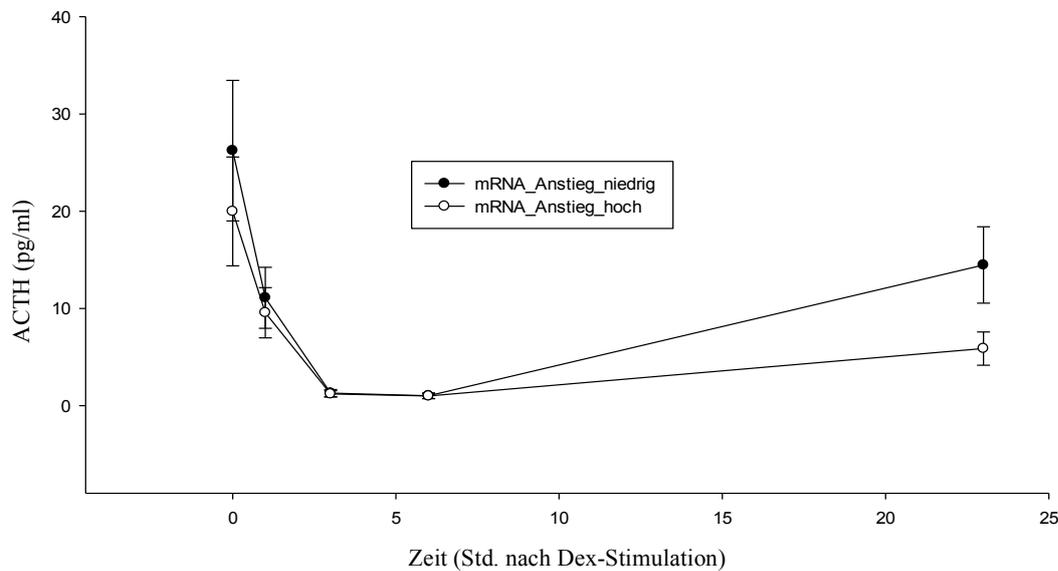


**Abb. 20: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen mRNA-Anstiegs; kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,642$ ); signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,007$ );  $n(\Delta\text{mRNA}_{\text{niedrig}}) = 13$ ;  $n(\Delta\text{mRNA}_{\text{hoch}}) = 13$

Um die FKBP5-mRNA-Induktion vergleichen zu können wurde jeweils vom Maximalwert zum dritten Messzeitpunkt der unstimulierte Ausgangswert abgezogen ( $\Delta\text{mRNA}(t(3), t(0)) = \text{niedrig, falls } \leq 3,5$ ;  $\Delta\text{mRNA}(t(3), t(0)) = \text{hoch, falls } > 3,5$ ). Es besteht ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,007$ ). Der höchste Wert der mRNA-Expression im Zeitverlauf stellte sich drei Stunden nach Dexamethason-Stimulation ein. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied zu Zeitpunkt Drei (MW (mRNA\_Anstieg\_niedrig) = 4,03; SEM = 0,3; MW (mRNA\_Anstieg\_hoch) = 4,72; SEM = 0,07;  $p = 0,016$ ). Beim ersten Messzeitpunkt ergab sich ein signifikanter Unterschied. Der unstimulierte Mittelwert der Gruppe mit niedrigem mRNA-Anstieg war signifikant höher als der Mittelwert der Gruppe mit hohem Anstieg (MW (mRNA\_Anstieg\_niedrig) = 1,21; SEM = 0,2; MW (mRNA\_Anstieg\_hoch) = 0,79; SEM = 0,09;  $p = 0,022$ ).

### 5.5.2 ACTH-Suppression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP5-mRNA-Expressionsinduktion

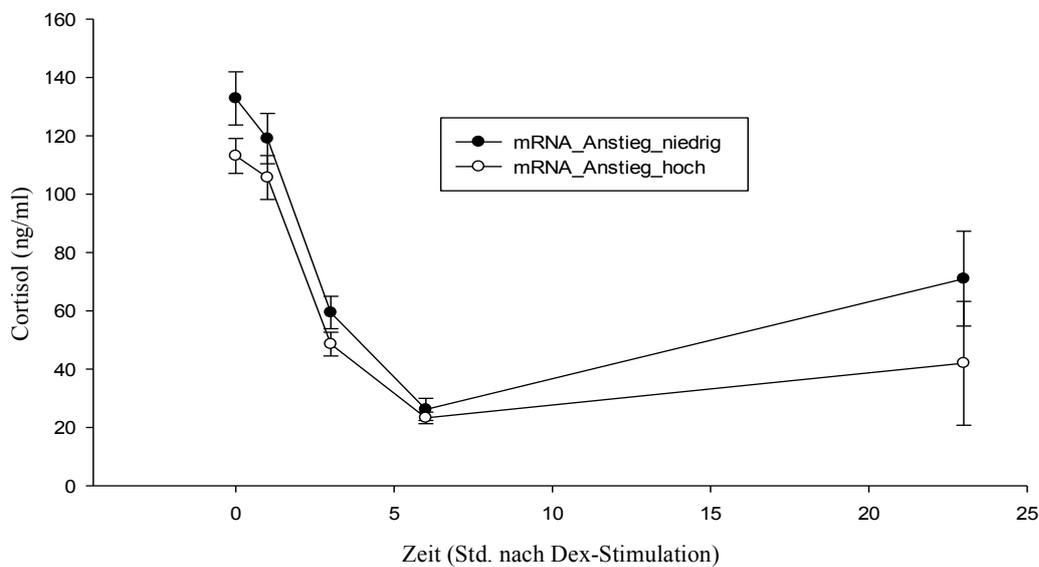


**Abb. 21: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen mRNA-Anstiegs; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,151$ ) und kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,163$ );  $n(\Delta\text{mRNA\_niedrig}) = 13$ ;  $n(\Delta\text{mRNA\_hoch}) = 13$

Bezüglich der Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Einnahme, ergab sich zu Zeitpunkt 23 ein signifikanter Unterschied im Mittelwert der beiden Gruppen (ACTH (mRNA\_Anstieg\_hoch) = 6,1 pg/ml; SEM = 1,4; ACTH (mRNA\_Anstieg\_niedrig) = 14,2 pg/ml; SEM = 3,7;  $p = 0,047$ ). Die Probanden, die eine hohe mRNA-Induktion aufwiesen, blieben nach Dexamethason-Stimulation signifikant länger supprimiert. Die Konzentration der Gruppe mit niedriger mRNA-Induktion, war 23 Stunden nach Einnahme bereits wieder um mehr als das Doppelte erhöht, im Vergleich zur Gruppe mit hoher mRNA-Induktion.

### 5.5.3 Cortisol-suppression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP5-mRNA-Expressionsinduktion



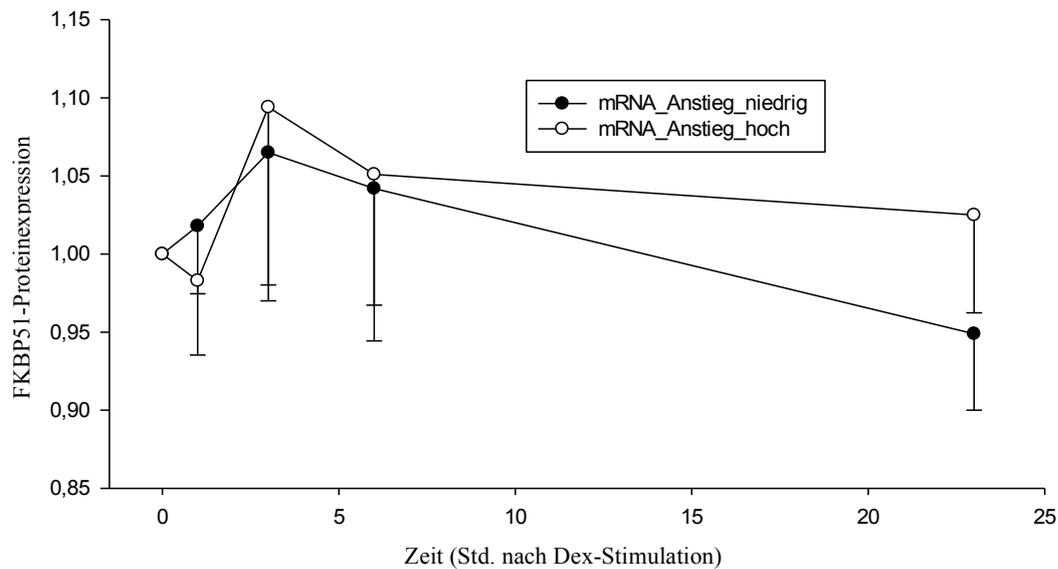
**Abb. 22: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen mRNA-Anstiegs; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,126$ ) und kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,502$ );  $n$  (mRNA\_Anstieg\_niedrig) = 13;  $n$  (mRNA\_Anstieg\_hoch) = 13

Bezüglich der Suppression der Cortisolkonzentration ergab sich bei Aufteilung in zwei Gruppen nach Höhe des relativen mRNA-Anstiegs kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,126$ ) und kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,502$ ).

Zu Zeitpunkt Null (MW ( $\Delta$ mRNA\_niedrig) = 132,2 ng/ml; SEM = 9,1; MW (mRNA\_Anstieg\_hoch) = 113,8 ng/ml; SEM = 6,0) und zu Zeitpunkt 23 (MW (mRNA\_Anstieg\_niedrig) = 67,12 ng/ml; SEM = 16,3; MW (mRNA\_Anstieg\_hoch) = 45,94 ng/ml; SEM = 21,3) ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Cortisolkonzentration.

#### 5.5.4 FKBP51-Proteinexpression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP5-mRNA-Expressionsinduktion



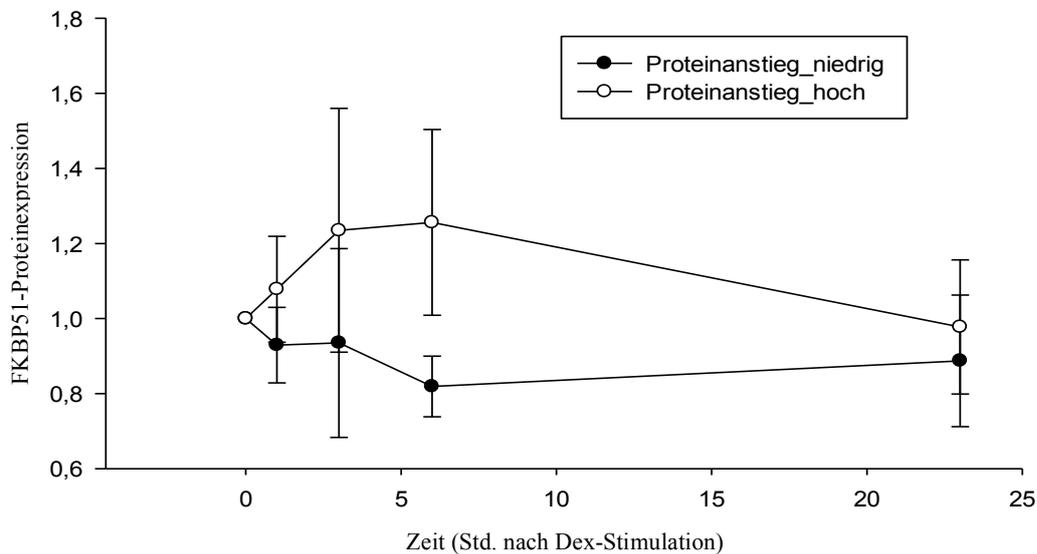
**Abb. 23: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen mRNA-Anstiegs; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,831$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,778$ );  $n(\Delta\text{mRNA\_niedrig}) = 10$ ;  $n(\Delta\text{mRNA\_hoch}) = 10$ ; n-fache Stimulation in Abhängigkeit des Grundspiegels

Bezüglich der FKBP51-Proteinexpression ergab sich kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,831$ ) und kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,778$ ).

## 5.6 Verläufe in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion

### 5.6.1 FKBP51-Proteinexpression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion

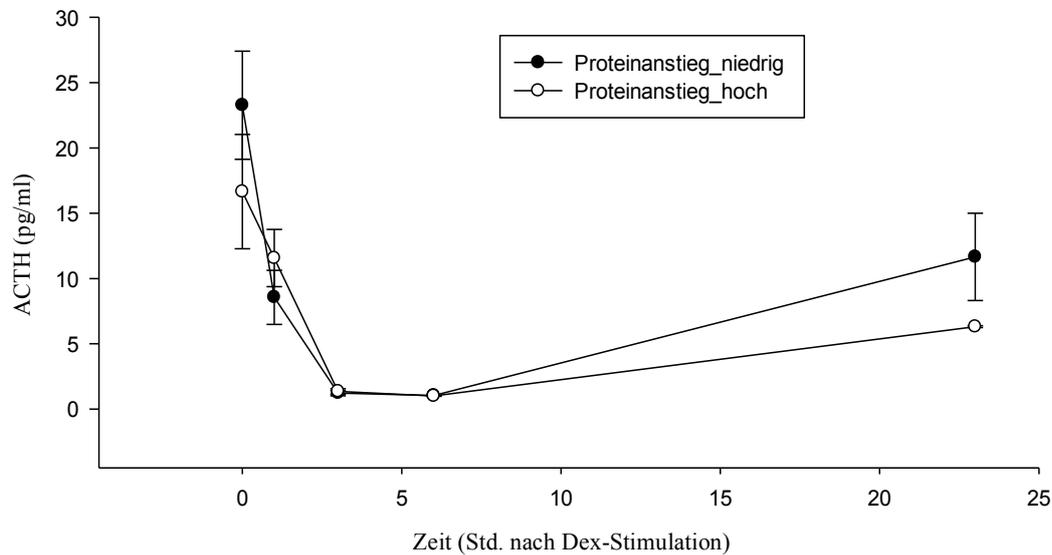


**Abb. 24: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen Proteinanstiegs; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,285$ ); kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,363$ );  $n$  (Proteinstieg\_niedrig) = 10;  $n$  (Proteinstieg\_hoch) = 10

Um den Einfluss der Höhe der FKBP51-Proteininduktion vergleichen zu können, wurde jeweils vom maximalen Rohwert zum Zeitpunkt Sechs der unstimulierte Ausgangswert abgezogen und hieraus zwei Gruppen gebildet. Der höchste Wert der Proteinexpression im Zeitverlauf stellte sich sechs Stunden nach Dexamethason-Stimulation ein (MW (Proteinstieg\_niedrig) = 1,05; SEM = 0,1; MW (Proteinstieg\_hoch) = 1,13; SEM = 0,1). Daraus ergab sich kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,285$ ) und kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,363$ ).

### 5.6.2 ACTH-Suppression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion

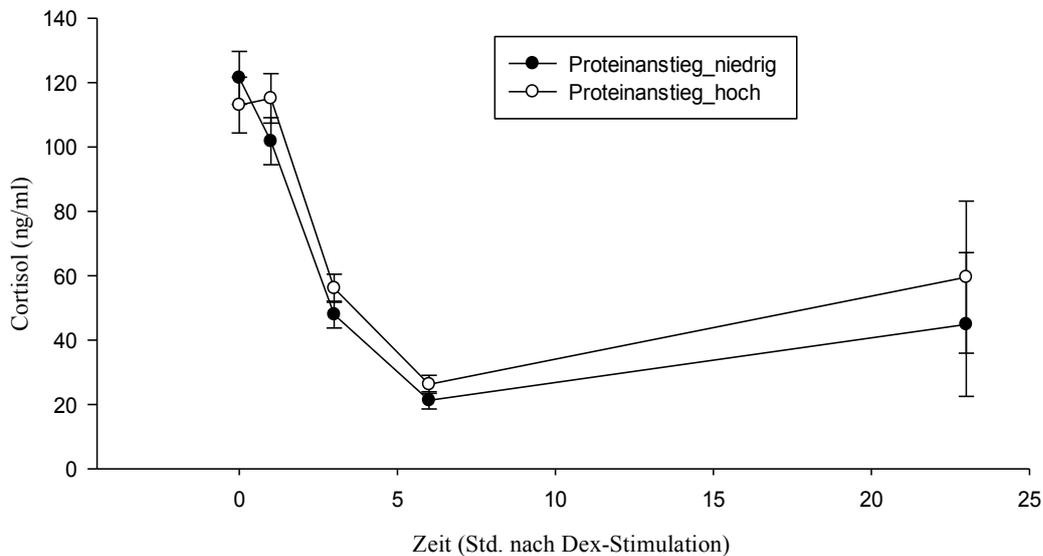


**Abb. 25: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen Proteinanstiegs; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,260$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,392$ );  $n$  (Proteinanstieg\_niedrig) = 10;  $n$  (Proteinanstieg\_hoch) = 10

Bei der Analyse der ACTH-Suppression, aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen Proteinanstiegs, ergab sich kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,260$ ) und kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,392$ ).

### 5.6.3 Cortisol-suppression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion

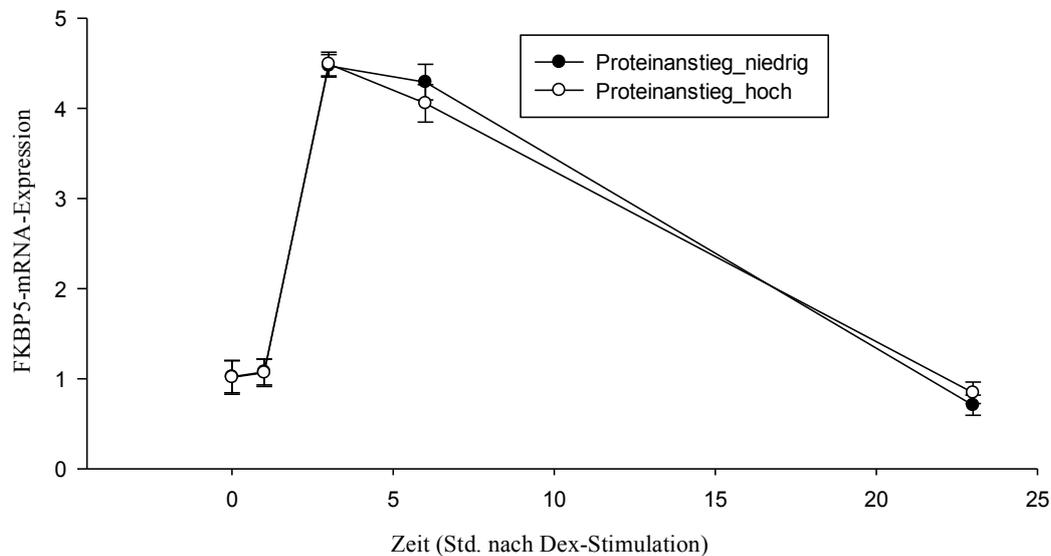


**Abb. 26: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen Proteinanstiegs; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,824$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,590$ );  $n$  (Proteinanstieg\_niedrig) = 10;  $n$  (Proteinanstieg\_hoch) = 10

Bezüglich der Cortisol-suppression, aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen FKBP51-Proteinanstiegs, ergab sich kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,824$ ) und kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,590$ ).

#### 5.6.4 FKBP5-mRNA-Expression in Abhängigkeit der Stärke der FKBP51-Proteinexpressionsinduktion



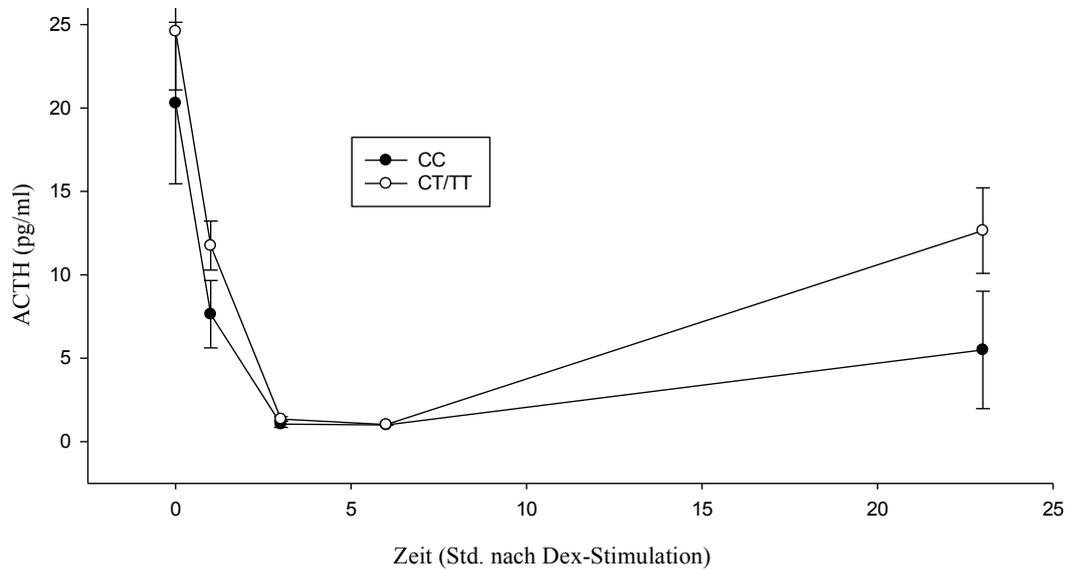
**Abb. 27: FKBP5-mRNA Expression nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt in zwei Gruppen nach Höhe des relativen Proteinstiegs; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,460$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,927$ );  $n$  (Proteinstieg\_niedrig) = 10;  $n$  (Proteinstieg\_hoch) = 10

Die FKBP5-mRNA-Expression ergab nach Aufteilung in zwei Gruppen nach Höhe des relativen Proteinstiegs weder einen signifikante Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,460$ ) noch einen signifikanten Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,927$ ).

## 5.7 Verläufe in Abhängigkeit des Genotyps

### 5.7.1 ACTH-Suppression in Abhängigkeit des Genotyps

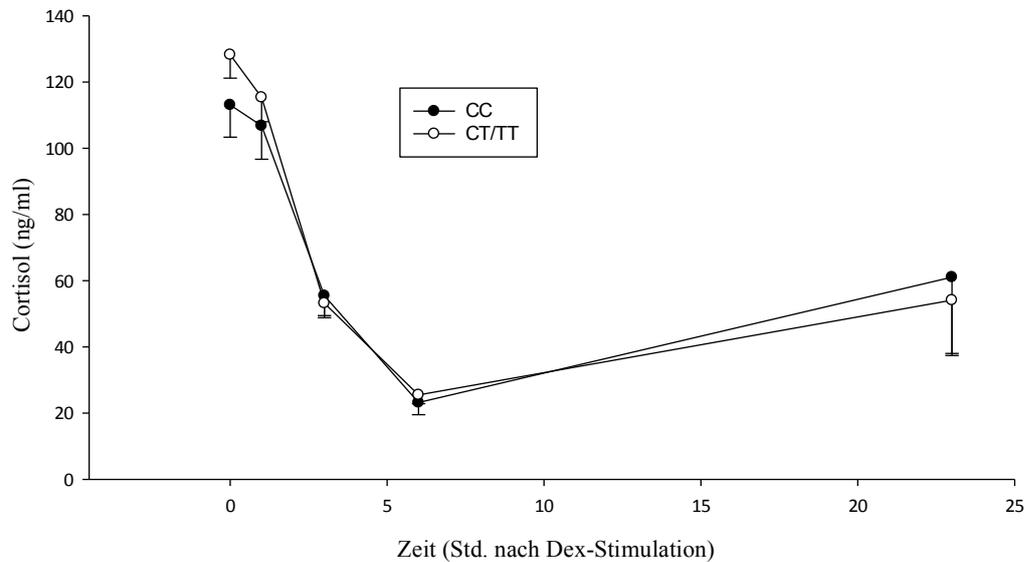


**Abb. 28: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt nach Genotyp; kein sig. Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,36$ ) und kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,18$ );  $n$  (CC) = 9;  $n$  (CT/TT) = 17

Bezüglich der Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Einnahme ergab sich kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,36$ ) und kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,18$ ). T-Träger Status führte tendenziell zu einer erhöhten mittleren Ausgangskonzentration von ACTH, sowie zu einem schnelleren Rückgang der Suppression bis zum Zeitpunkt 23 ( $p = 0,112$ ), allerdings jeweils ohne statistische Signifikanz.

### 5.7.2 Cortisol-suppression in Abhängigkeit des Genotyps



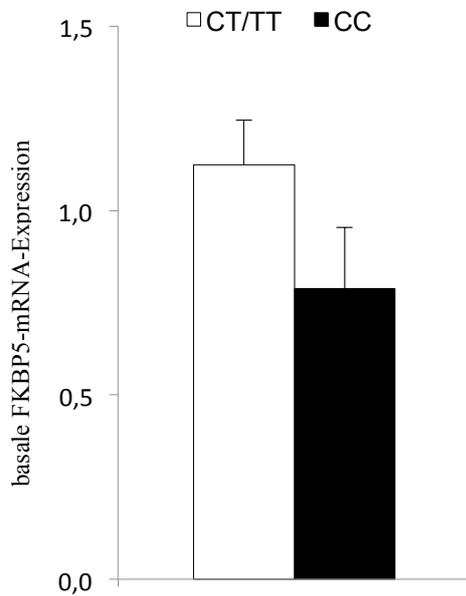
**Abb. 29: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt nach Genotyp; kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,747$ ) und kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,582$ );  $n$  (CC) = 9;  $n$  (CT/TT) = 17

Bezüglich der Suppression der Cortisolkonzentration konnte kein signifikanter Haupteffekt des Genotyps über den Zeitverlauf ( $p = 0,747$ ) und kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,582$ ) festgestellt werden.

### 5.7.3 FKBP5-mRNA-Expression in Abhängigkeit des Genotyps

#### 5.7.3.1 Basale FKBP5-mRNA-Konzentration in Abhängigkeit des Genotyps



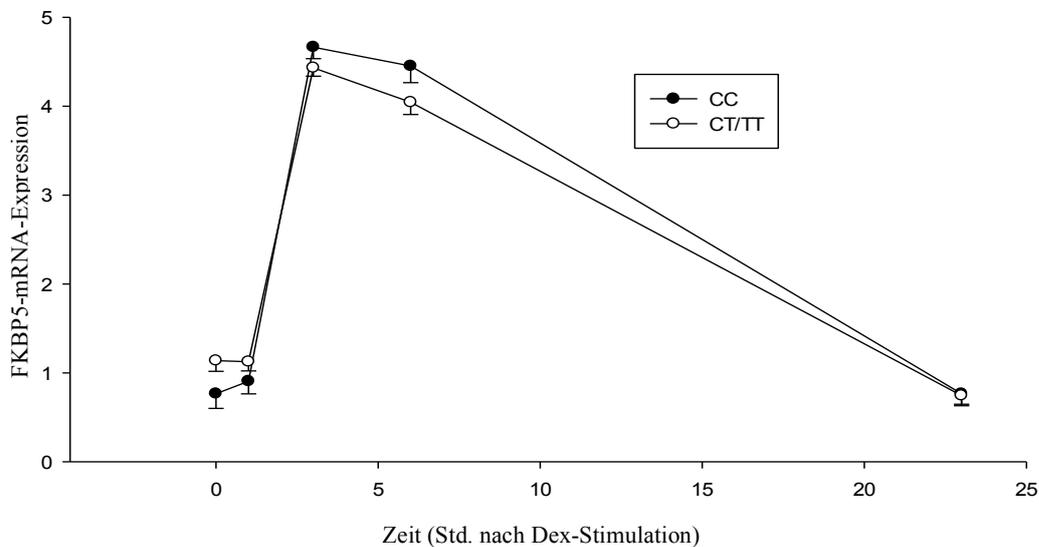
**Abb. 30: Basale FKBP5-mRNA-Konzentration**

Aufgeteilt nach Genotyp; n (CC) = 8; n (CT/TT) = 15;

p = 0,09

Die basale FKBP5-mRNA-Konzentration war bei den Probanden, die homozygot für das C-Allel sind (mRNA (CC) = 0,79; SEM = 0,2), im Vergleich zu den Probanden mit T-Allel (mRNA (CT/TT) = 1,12; SEM = 0,1) im Trend niedriger. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden (p = 0,09).

### 5.7.3.1 FKBP5-mRNA-Expressionsinduktion in Abhängigkeit des Genotyps



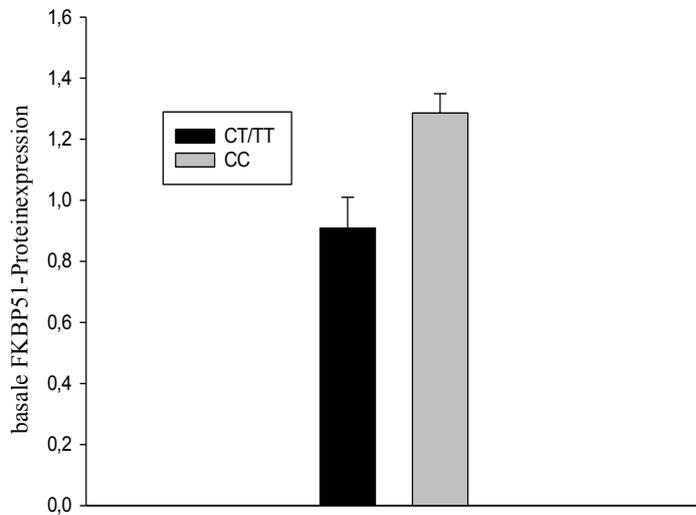
**Abb. 31: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation**

Aufgeteilt nach Genotyp; kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,885$ ); signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,038$ );  $n$  (CC) = 8;  $n$  (CT/TT) = 15

Auf Stimulation mit Dexamethason folgte ein signifikanter Interaktionseffekt des Genotyps auf die FKBP5-mRNA-Expression zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,038$ ). Eine niedrige FKBP5-mRNA-Ausgangskonzentration führte zu einer im Vergleich höheren mRNA-Expressionsinduktion. Es war kein signifikanter Haupteffekt über den Zeitverlauf ( $p = 0,885$ ) und kein signifikanter Unterschied im Mittelwert zu Zeitpunkt Sechs erkennbar ( $p = 0,097$ ).

## 5.7.4 FKBP51-Proteinexpression in Abhängigkeit des Genotyps

### 5.7.4.1 Basale FKBP51-Proteinkonzentration in Abhängigkeit des T-Trägerstatus

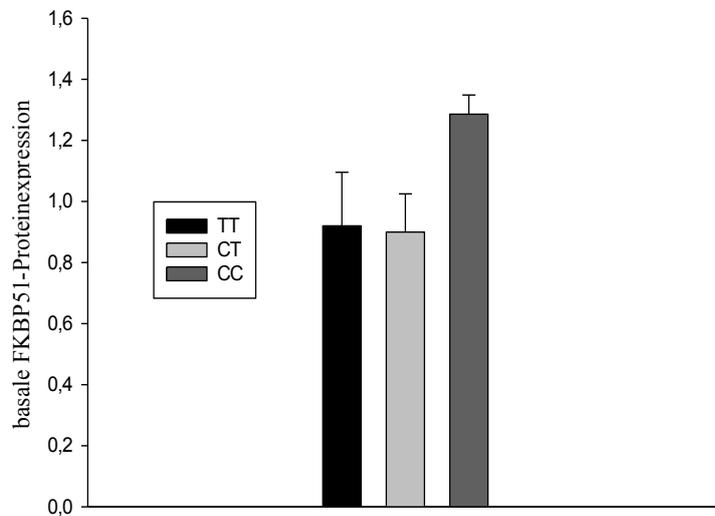


**Abb. 32: Basale FKBP51-Proteinkonzentration**

Aufgeteilt nach T-Allel-Trägerstatus; n (CC) = 8; n (CT/TT) = 13;  $p = 0,01$

Der basale FKBP51-Proteinspiegel war bei den Probanden, die homozygot für das C-Allel sind, mit einem Mittelwert von 1,29 (SEM = 0,06) im Vergleich zu den Probanden mit T-Allel (MW = 0,90; SEM = 0,1), um etwa 41 %, signifikant erhöht ( $p = 0,01$ ).

### 5.7.4.2 Basale FKBP51-Proteinkonzentration in Abhängigkeit des Genotyps

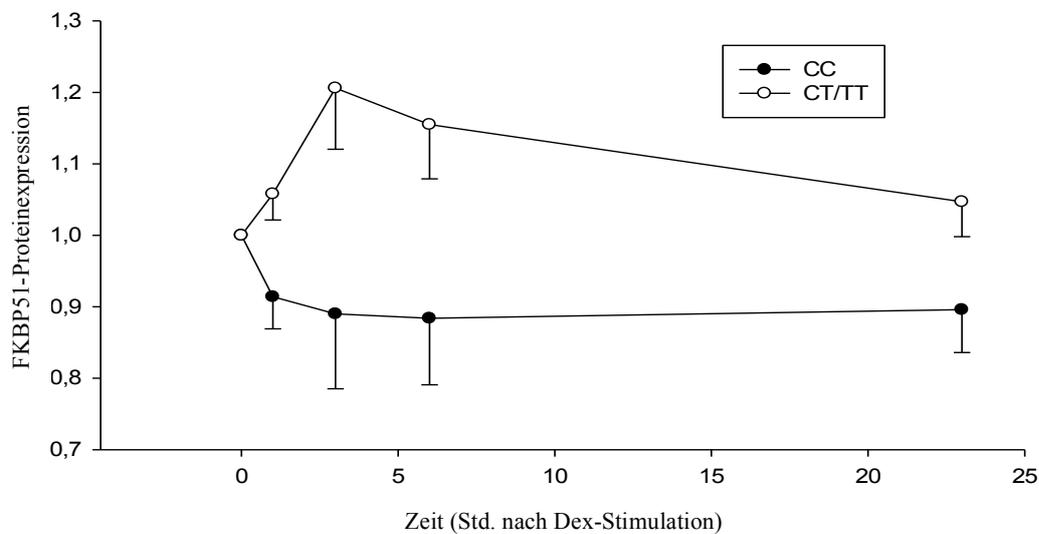


**Abb. 33: Basale FKBP51-Proteinkonzentration**

Aufgeteilt nach Genotyp; n (CC-Genotyp) = 8; n (CT) = 7; n (TT) = 6;  $p = 0,926$

Die Aufteilung nach Genotyp (MW (CC) = 1,29; SEM = 0,06; MW (CT) = 0,90; SEM = 0,13; MW (TT) = 0,92; SEM = 0,18) erbrachte zwischen den T-Trägergruppen CT und TT keinen signifikanten Unterschied bezüglich der basalen Proteinkonzentration ( $p = 0,926$ ).

### 5.7.4.3 FKBP51-Proteinexpression in Abhängigkeit des Genotyps



**Abb. 34: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation**

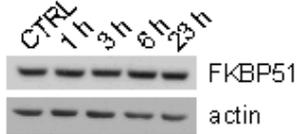
Aufgeteilt nach Genotyp (T-Träger-Allelstatus); signifikanter Haupteffekt des Genotyps über den Zeitverlauf ( $p = 0,013$ ); kein sig. Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,068$ ); n-fache Stimulation in Abhängigkeit des Grundspiegels  $n$  (CC) = 8;  $n$  (CT/TT) = 12

Auf Stimulation mit Dexamethason folgte ein signifikanter Haupteffekt des Genotyps auf die FKBP51-Proteinexpression ( $p = 0,01$ ). GR-Aktivierung führte nach drei Stunden zu einer deutlichen Induktion der FKBP51-Expression bei den Trägern des T-Allels, wohingegen Probanden mit CC-Genotyp keine signifikanten Veränderungen aufwiesen. Es bestehen signifikante Unterschiede in den Zeitverläufen der beiden Kurven zu Zeitpunkt Null, Eins und Drei ( $t(1)$ : MW (CC) = 0,92; SEM = 0,04; MW (CT/TT) = 1,06; SEM = 0,03;  $p = 0,024$ ;  $t(3)$ : MW (CC) = 0,9; SEM = 0,1; MW (CT/TT) = 1,2; SEM = 0,08;  $p = 0,023$ ).

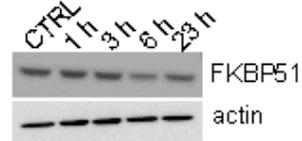
#### 5.7.4.4 FKBP51-Proteinanalyse auf Western Blots in Abhängigkeit des Genotyps

##### CC genotype

No 23, CC

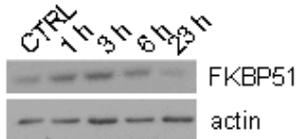


No 9, CC

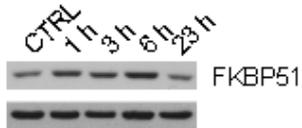


##### TT genotype

No 17, TT

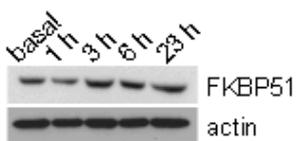


No 29, TT

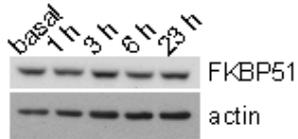


##### CT genotype

No 24, CT



No 28, CT



#### Abb. 35: Antigen-detektion auf Western Blots

Beispiele für Proteinanalysen durch Filmentwicklung auf Western Blots für CC-, TT- und CT-Genotyp.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Dexamethason-Stimulation: GR-Aktivierung und Genexpressionsinduktion

*(F1): Wie lässt sich die ACTH- und Cortisolreaktion sowie die Veränderung von FKBP5-mRNA- und Proteinexpression auf Dexamethason-Stimulation über einen Zeitraum charakterisieren?*

Stress und traumatische Erfahrungen können langanhaltende psychische Störungen, wie Depression oder PTSD nach sich ziehen (Kendler et al., 1999; Kessler et al., 1997; Molnar et al., 2001). Eine gestörte Regulierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse ist charakteristisch für psychische Krankheitszustände (Charney & Manji, 2004; de Kloet et al., 2005; Heim & Nemeroff, 2001; Holsboer, 2000; Nemeroff, 2002). Zwei Mechanismen scheinen von besonderer Bedeutung für die Achsenhyperaktivität zu sein: Eine erhöhte Sekretion von CRH und Vasopressin führt zur Stimulation der ACTH- und Cortisolabgabe (Muller et al., 2003; Nemeroff et al., 1984; Purba et al., 1996). Außerdem ist die Autoregulation des HPA-Systems, die essentiell für eine physiologische Stressantwort ist, durch eine eingeschränkte GR-Sensitivität gestört (Pariante & Miller, 2001).

In der vorliegenden Studie vermittelte die Verabreichung von 1,5 mg des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason über eine GR-medierte negative Rückkopplungsschleife erwartungsgemäß die Hemmung der ACTH-Ausschüttung und führte folglich zu einer Suppression der Cortisolproduktion (Carroll et al., 1981; Heuser et al., 1994). So wurde bei allen Probanden ein signifikanter Abfall des ACTH-Blutwertes nach einer Stunde ( $p < 0,001$ ), und des Cortisolwertes nach drei Stunden ( $p < 0,001$ ) nachgewiesen. Im Vergleich zum Ausgangswert hielt die Suppression der ACTH- und Cortisolausschüttung bis zum letzten Messzeitpunkt an ( $p < 0,001$ ). Bei Patienten mit affektiven Störungen wie der Depression, sinkt der Cortisolspiegel nach Dexamethason-Einnahme im Mittelwert in einem geringeren Ausmaß ab (Carroll, 1982; Holsboer, 1989; Ribeiro et al., 1993). Sind die GR-Rezeptoren in ihrer Funktion eingeschränkt, spricht man von Rezeptor-Resistenz (Holsboer, 2000). Hierdurch können erhöhte Cortisolspiegel bei Patienten mit depressiver Störung erklärt werden (Board et al., 1957; Rubin et al., 1987).

GR-Aktivierung durch Dexamethason-Stimulation führt zur Induktion der FKBP5-Genexpression in vitro und in vivo (Binder et al., 2004; Vermeer et al., 2004). In unserer Studie erfolgte die statistisch signifikante und zugleich maximale Erhöhung der mRNA-

Expression drei Stunden nach Dexamethason-Einnahme ( $p < 0,001$ ). 23 Stunden nach GR-Stimulation war die mRNA-Konzentration wieder auf ihrem ursprünglichen Level und es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zum Ausgangslevel.

Auf Proteinebene variiert der Verlauf der *FKBP5*-Expression zwischen den einzelnen Probanden. So zeigten sich bei der Verlaufsanalyse zwischen Mittelwerten aller Probanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten. Der höchste Mittelwert der Proteinexpression im Zeitverlauf stellte sich sechs Stunden nach Dexamethason-Einnahme ein. Die Induktion der Proteinexpression scheint individuell variabel zu sein und muss differenziert unter spezifischen Gesichtspunkten analysiert werden. Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass die ACTH- und Cortisolsuppression nach Dexamethason-Stimulation über einen längeren Zeitraum anhält als die induzierte Erhöhung der *FKBP5*-mRNA-Konzentration. Die mRNA-Expression weist eine schnellere Dynamik auf als die endokrine Stressreaktion der HPA-Achse und kann somit sehr sensitive Auskünfte über den GR-Status beim Patienten geben. Dies unterstreicht die klinische Relevanz der Messung Dexamethason-stimulierter *FKBP5*-mRNA-Expression im Blut als Marker für GR-Resistenz (Menke et al., 2012).

*Die erste Hypothese (H1), dass die Induktion der FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation schneller reversibel ist, als die Suppression der ACTH- und Cortisolkonzentration, konnte bestätigt werden.*

## **6.2 FKBP5 als Biomarker für GR-Sensitivität**

*F2: Kann die Höhe der basalen FKBP5-mRNA- und Proteinkonzentration sowie die Stärke der FKBP5-Expressionsinduktion als Indikator für GR-Sensitivität dienen?*

Einer am Max-Planck-Institut für Psychiatrie getroffenen Übereinkunft zufolge sind Biomarker Ergebnisse von Laboruntersuchungen, die wie ein "Schnappschuss" die augenblickliche biologische Konstellation des Patienten abbilden (Holsboer, 2009). Es handelt sich bei biologischen Markern um Laborparameter, die als Entscheidungshilfe für die Diagnosestellung und die Therapieentscheidung herangezogen werden können. Im Fall von psychischen Störungen spielt die genaue Untersuchung der HPA-Achsenaktivität eine zentrale Rolle. Wohingegen der Tierversuch die direkte Analyse von Hirngewebe erlaubt, benötigt man bei der Forschung am Menschen einen Ersatzstoff, mit dem man Rückschlüsse

auf Vorgänge im ZNS ziehen kann. Hier bietet sich Blut als gut zugängliche und ausreichend vorhandene Quelle an. Untersucht man, wie in der vorliegenden Studie, die durch Dexamethason stimulierte *FKBP5*-Induktion in peripheren Blutzellen, stellt sich also zunächst die Frage, ob man hierdurch Rückschlüsse auf den GR-Status in den relevanten Gehirnregionen ziehen kann.

GR-Aktivierung durch Dexamethason-Stimulation führt zur Induktion der *FKBP5*-Genexpression und lässt sich sowohl in Hirnzellen, als auch in peripherem Blut aufzeigen (Menke et al., 2012). *FKBP5* nimmt Einfluss auf die GR-Sensitivität und dient gleichzeitig als sensitiver Biomarker für die GR-Induktion (Binder, 2009).

Der Glukokortikoidrezeptor findet sich in weiten Bereichen des Gehirns, vor allem in Hippokampus und in der Amygdala. Er wird aber auch in nahezu allen anderen Organen, wie Leber, Lunge, Knochenmark und im Immunsystem exprimiert (Evans, 1988; Schmid et al., 1995). Sowohl Neurone, als auch Lymphozyten weisen Glukokortikoidrezeptoren mit zugehörigen Chaperonen wie *FKBP51* auf (Gladkevich et al., 2004). Die GR-Resistenz bei Depression und bipolarer Störung im ZNS sowie die Funktionsnormalisierung durch eine antidepressive Therapie ist auch bei T-Zellen und Monozyten bekannt (Pariante & Miller, 2001). Die Gruppe um Binder berichtet von *FKBP5*-Polymorphismen, die sowohl mit erhöhten *FKBP51*-Proteinwerten in Lymphozyten, als auch mit einer veränderten Stressantwort einhergehen. Die funktionellen Wirkungen dieser genetischen Polymorphismen sind also nicht auf Immunzellen begrenzt, sondern betreffen auch die Hirnfunktion (Binder et al., 2004). Man kann demnach auf eine vergleichbare Funktionseinschränkung des Glukokortikoidrezeptors bei Immun- und ZNS-Zellen schließen.

Der GR wird in beiden Systemen exprimiert und durch *FKBP5* sehr ähnlich reguliert, was das Gen zu einem interessanten Kandidaten als Biomarker für die GR-Funktion macht (Binder, 2009; Gladkevich et al., 2004).

### **6.2.1 Basale *FKBP5*-mRNA- und Proteinkonzentration als Indikator für GR-Sensitivität**

Auf der Suche nach Erklärungsmodellen für die Einschränkung der Bindungsaffinität der Glukokortikoidrezeptoren konnten bisher für die meisten affektiven Erkrankungen keine Mutationen am GR nachgewiesen werden (Huizenga et al., 2000; Moutsatsou et al., 2000). So gerät die Rolle der mit den Rezeptoren verknüpften Kofaktoren bei der Entstehung von Resistenzen ins Augenmerk (Wohnik et al., 2005). Aus Untersuchungen an Mäusen ging

hervor, dass die Hirnregionen mit niedriger basaler FKBP5-Expression auf die Dexamethason-Stimulation hin, einen deutlicheren Anstieg der FKBP5-mRNA-Expression aufzeigten, als Hirnregionen mit einer von vornherein hohen *FKBP5*-Expression (Scharf et al., 2011).

Die Probanden unserer Studie wurden anhand der basalen FKBP51-Proteinkonzentration vor Dexamethason-Stimulation in Niedrig- und Hochexprimierer eingeteilt. Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied im Mittelwert der beiden Gruppen zum dritten Messzeitpunkt ( $p = 0,038$ ). Ein niedriger Proteinspiegel führt zu einer gesteigerten Proteinexpressionsinduktion. Zwischen dem ersten und dritten Messzeitpunkt bestand innerhalb der Gruppe mit niedrigem Ausgangslevel eine deutliche Erhöhung der FKBP51-Proteinkonzentrationen ( $p = 0,002$ ), wohingegen bei der Gruppe mit hoher basaler FKBP51-Konzentration kein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war. Ein bereits erhöhter FKBP51-Proteingrundspiegel führt, zu einer verminderten FKBP5-Expressionsinduktion.

Bezüglich der Gruppenaufteilung nach Höhe des basalen FKBP5-mRNA-Spiegels ergab sich ein signifikanter Haupteffekt der mRNA-Ausgangskonzentration über den Zeitverlauf ( $p = 0,026$ ). Bei der Untersuchung, ob die Höhe des FKBP5-mRNA-Grundspiegels Einfluss auf die GR-Empfindlichkeit nimmt, konnte ein interessanter Unterschied bezüglich der Cortisolsuppression festgestellt werden. Beim Wiederanstieg der Cortisolkonzentration 23 Stunden nach Dexamethason-Einnahme, blieb der Mittelwert der Gruppe mit niedriger mRNA-Ausgangskonzentration im Vergleich zur Gruppe der FKBP5-mRNA-Hochexprimierer signifikant länger supprimiert ( $p = 0,047$ ). Für die Einteilung nach der Proteinmenge ergab sich bezüglich der Cortisolsuppression im Mittelwert ein ähnliches Muster, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Der Cortisolspiegel der Probanden mit niedriger basaler FKBP5-mRNA-Expression bleibt als Reaktion auf die Dexamethason-Stimulation signifikant länger supprimiert. Hieraus ist zu schließen, dass der Glukokortikoidrezeptor sensibler auf den Stimulus reagiert. Die hohe basale mRNA-Konzentration hat dagegen eine niedrigere Effizienz der negativen Rückkopplungsschleife der Stresshormonachse zur Folge und führt zu einem vergleichsweise rascheren Wiedereinsetzen der Cortisolsekretion. Damit unterstreichen unsere Daten die entscheidende Rolle von *FKBP5* bei der Beendigung der Stresshormonantwort.

Bei Patienten mit depressiver Störung wurden erhöhte FKBP5-mRNA- und Proteinexpressionslevel im Frontalkortex nachgewiesen (Tatro et al., 2009). Eine relative GR-Resistenz führt zu unzureichender Erholung nach Stress und kann den Ausbruch psychischer

Störungen triggern (Charney & Manji, 2004; de Kloet et al., 2005; Heim & Nemeroff, 2001). Eine gestörte HPA-Achsenregulierung mit erhöhten Cortisolspiegeln im Blut ist ein typisches Merkmal bei Depression (Appelhof et al., 2006; Aubry et al., 2007; Holsboer, 2000) und kann sich nach medikamentöser Therapie wieder normalisieren (Butler & Besser, 1968). Chronische Behandlung mit Kortikosteroiden führt langfristig zu erhöhter FKBP5-mRNA-Expression im Hypothalamus, im Hippokampus sowie in peripheren Blutzellen (Lee et al., 2010). Mit Hilfe des Tiermodells wird die Bedeutung einer Enthemmung von *FKBP5* für Angststörungen und affektive Erkrankungen unterlegt. Bei Mäusen ist eine verstärkte *FKBP5*-Transkription in der Amygdala Voraussetzung, um ängstliches Verhalten zu induzieren (Attwood et al., 2011). Mäuser mit *FKBP5*-knockout-Gen weisen dagegen eine gestörte Ansprechbarkeit auf Stress auf (O'Leary et al., 2011; Touma et al., 2011).

Die Ergebnisse unserer Studie unterstützen die These, dass *FKBP5* in der GR-Regulierung involviert ist und höhere mRNA-Ausgangskonzentrationen in einer höheren GR-Resistenz münden (Scharf et al., 2011). Der *FKBP5*-mRNA-Grundspiegel moderiert die Cortisolreaktion und kann als Marker für GR-Funktionalität dienen.

*Die zweite Hypothese (H2), dass die Höhe der basalen FKBP5-mRNA- und Proteinkonzentration vor Dexamethason-Stimulation als Indikator für die GR-Sensitivität dient, konnte für die FKBP5-mRNA-Konzentration bestätigt werden.*

## **6.2.2 *FKBP5*-Genexpressionsinduktion als Indikator für GR-Sensitivität**

Rezeptoraktivierung durch Glukokortikoidstimulation führt zur Induktion der *FKBP5*-mRNA-Expression in vitro und in vivo (Binder et al., 2004; Hubler & Scammell, 2004; Menke et al., 2012; Paakinaho et al., 2010; Scharf et al., 2011; Vermeer et al., 2003). So lässt sich anhand der Stärke der *FKBP5*-mRNA-Induktion nach Dexamethason-Stimulation auf die Glukokortikoidrezeptor-Sensitivität schließen (Jaaskelainen et al., 2011; Vermeer et al., 2004). Um die Höhe der *FKBP5*-mRNA-Induktion vergleichen zu können, wurde jeweils vom durchschnittlichen Maximalwert der mRNA-Expression zum dritten Messzeitpunkt, der unstimulierte Ausgangswert abgezogen, wodurch zwei Gruppen gebildet wurden. Hieraus ergab sich ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den beiden Gruppen über den Zeitverlauf ( $p = 0,007$ ). Die Gruppe mit hoher *FKBP5*-mRNA-Induktion wies eine basale Ausgangskonzentration auf, die signifikant niedriger war als der basale Mittelwert der Gruppe mit hoher mRNA-Induktion ( $p = 0,022$ ). Dies bestätigt die Erkenntnis, dass eine niedrige

basale FKBP5-mRNA-Konzentration zu einer höheren mRNA-Induktion nach Dexamethason-Stimulation führt und eine bereits erhöhte mRNA-Ausgangskonzentration die FKBP5-Expressionsinduktion hemmt (Scharf et al., 2011).

Die Probanden, bei denen eine hohe FKBP5-mRNA-Induktion zu verzeichnen war, wiesen eine länger anhaltende Suppression der ACTH-Konzentration auf. Zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme bestand bezüglich der ACTH-Konzentration ein signifikanter Unterschied im Mittelwert der beiden Gruppen. Im Vergleich zur Gruppe mit hoher mRNA-Induktion, war die ACTH-Konzentration der Gruppe mit niedriger FKBP5-mRNA-Induktion 23 Stunden nach Dexamethason-Stimulation bereits wieder um mehr als das Doppelte erhöht ( $p = 0,047$ ). Die Wirkdauer der Suppression hielt in der Gruppe mit starker FKBP5-mRNA-Induktion länger an.

Die vorliegenden Daten bestätigen die Tatsache, dass die GR-medierte Induktion der FKBP5-mRNA-Expression als Readout für die GR-Sensitivität dienen kann (Menke et al., 2012; Scharf et al., 2011; Vermeer et al., 2004; Woodruff et al., 2007). Eine niedrige FKBP5-mRNA-Induktion spiegelt sich in erhöhter GR-Resistenz wider. Das kann als Prädisposition zu einem chronisch erhöhten Cortisollevel als Antwort auf Stress interpretiert werden und langfristig zu schädlichen Wirkungen führen. Chronischer Stress stellt einen Hauptrisikofaktor für viele Krankheiten aus dem affektiven Formenkreis dar (Juster et al., 2010; Pahwa & Karunanayake, 2009). Etwa 50 % der an einer Depression erkrankten Patienten weisen erhöhte Cortisolspiegel auf, deren Pathogenese durch derartige Mechanismen der HPA-Achsenhyperaktivität in Zukunft stufenweise erschlossen werden könnte (Checkley, 1996).

*Die dritte Hypothese (H3), dass die Stärke der FKBP5-Expressionsinduktion als Indikator für die GR-Sensitivität dient, konnte für die FKBP5-mRNA-Induktion bestätigt werden.*

### **6.3 Bedeutung genetischer Variationen im SNP rs1360780 für die FKBP5-Genexpression und ACTH- und Cortisolreaktion**

*(F3): Unterscheiden sich Probanden mit einer bestimmten genetischen Variation im SNP rs1360780 in der ACTH- und Cortisolreaktion und der FKBP5-Expression?*

#### **6.3.1 Einfluss genetischer Variationen im SNP rs1360780 auf die ACTH- und Cortisolreaktion**

Bei stressbedingten psychischen Störungen wie Depression und PTSD spielt die Dysregulierung des Stresshormonsystems mit Veränderungen der GR-Funktionalität eine bedeutsame Rolle. Studien deuten darauf hin, dass biologische Veränderungen in der Sollwert-Regulation der HPA-Achse mit genetischen Faktoren assoziiert sind (Binder et al., 2009; de Kloet et al., 2005; Heim & Nemeroff, 2001; Holsboer, 2000; Pariante & Miller, 2001; Vreeburg et al., 2009). Bei den gesunden Probanden der vorliegenden Studie war hinsichtlich der ACTH- und Cortisolreaktion kein signifikanter Haupteffekt des Genotyps und kein Interaktionseffekt zwischen den Gruppen über den Zeitverlauf feststellbar.

Träger des TT-Genotyps weisen mehr als doppelt so viele depressive Episoden auf und reagieren schneller auf eine antidepressive Therapie als Individuen mit CC- oder CT-Allelkombinationen (Binder et al., 2004; Lekman et al., 2008). Die Forschergruppe um Binder wies bei depressiven Patienten mit TT-Genotyp im Vergleich zu Trägern der anderen Genotypen eine niedrigere ACTH-Antwort im Dex/CRH-Test nach (Binder et al., 2004). Kompensatorisch aktivierte, alternative Wege in der GR- und HPA-Regulation scheinen der HPA-Hyperaktivität entgegenzuarbeiten.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, bei denen das Risikoallel mit erhöhter GR-Empfindlichkeit assoziiert war, zeigte sich bei der Untersuchung von Dexamethason-simulierter FKBP5-mRNA-Expression, dass depressive Patienten mit positivem T-Allel-Status im Vergleich zu Patienten mit CC-Genotyp eine reduzierte Suppression der Plasma ACTH- und Cortisolkonzentration und somit eine relative GR-Resistenz aufwiesen (Menke et al., 2013). Die Patienten mit protektivem CC-Genotyp zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den gesunden Probanden. Diese Tatsache verdeutlicht, warum nicht jeder Patient mit Depression eine gestörte HPA-Achsenregulierung aufweist (Anacker et al., 2011; Carpenter et al., 2009; Menke et al., 2012). Andererseits war der *FKBP5*-

Risikogenotyp, der mit erhöhter GR-Resistenz assoziiert ist, mit einem reduzierten Cortisollevel im Tagesverlauf in einer Gruppe von Menschen im höheren Lebensalter verknüpft (Velders et al., 2011). Das führt zur Annahme, dass der Genotyp auf den Grundspiegel einen anderen Effekt haben könnte, als auf stimulierte endokrine Parameter. In unserer Studie mit gesunden Probanden konnten keine genotypabhängigen Unterschiede bezüglich der Cortisolkonzentrationen nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit der Studie der Gruppe um Menke (Menke et al., 2013).

Andere Studien deuten darauf hin, dass *FKBP5*-Risikoallele auch bei gesunden Individuen mit einer GR-Resistenz verknüpft sind. Wohingegen bei depressiven Patienten, die Träger des T-Allels waren, eine GR-Hypersensitivität nachgewiesen werden konnte (Binder 2004), waren in gesunden Kontrollen die Allele, die zur hohen Proteininduktion führen, mit einer relativen GR-Resistenz assoziiert (Binder et al., 2008; Ising et al., 2008). Probanden mit Risikoallel zeigten eine verlängerte Cortisolantwort auf psychologische Stressoren, was für eine GR-Resistenz spricht (Ising et al., 2008; Luijk et al., 2010). Gesunde Individuen mit Risikoallel im SNP rs1360780 wiesen zudem eine eingeschränkte Dex-Suppression auf (Touma et al., 2011).

Womöglich sind die Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen unserer Studie durch verschiedene molekulare Startbedingungen zu erklären. Unterschiedliche basale *FKBP5*-mRNA- und Proteinausgangskonzentrationen beeinflussen die GR-Empfindlichkeit und folglich die ACTH- und Cortisol-suppression, was zu unterschiedlichen Antworten auf einen Stressor führt. Außerdem könnte die Tatsache, dass Dexamethason als künstlicher Stressor verabreicht, und nicht mithilfe von psychologischen Methoden gestresst wurde, eine Rolle spielen. Relevant zu erwähnen ist darüber hinaus die relativ geringe Anzahl von teilnehmenden Probanden, wodurch die Power der Studie beeinträchtigt wird. Das recht homogene Probandenkollektiv, bestehend aus jungen Männer in kleinem Altersintervall und der Stimulationszeitpunkt um 12 Uhr mittags könnte zudem Einfluss genommen haben.

*Die vierte Hypothese (H4), dass genetische Variationen im rs1360780 die ACTH- und Cortisol-suppression beeinflussen, konnte nicht bestätigt werden.*

### **6.3.2 Einfluss genetischer Variationen im SNP rs1360780 auf die *FKBP5*-Genexpression**

#### **6.3.2.1 Einfluss genetischer Variationen im SNP rs1360780 auf die basale *FKBP5*-Genexpression**

Polymorphismen im *FKBP5*-Gen sind mit einer unterschiedlichen Induktionsstärke von *FKBP5*-mRNA nach GR-Aktivierung assoziiert und interferieren somit mit der negativen Rückkopplungshemmung des Stresshormonsystems (Binder et al., 2004). Die veränderte Reaktion auf Stress scheint zu einer erhöhten Anfälligkeit für psychische Störungen zu führen. Es bestehen Zusammenhänge zwischen *FKBP5*-Polymorphismen und Depression (Lavebratt et al. 2010; Lekman et al., 2008; Zimmermann et al., 2008; A. Zobel et al., 2010), bipolarer Störung (Willour et al., 2009), PTSD (Appel et al., 2011; Binder et al., 2008; Mehta et al., 2011; Sarapas et al., 2011; Xie et al., 2010) und erhöhtem Suizidrisiko, besonders im Zusammenhang mit früher Traumaerfahrung (Brent et al., 2010; Roy et al., 2012; Supriyanto et al., 2011).

In einer Studie der Forschergruppe um Binder wiesen die Probanden mit TT-Genotyp *FKBP51*-Proteinspiegel auf, die fast doppelt so hoch waren wie bei denjenigen, die homozygot für das C-Allel sind. Die Träger des CT-Genotyps wiesen das niedrigste Proteinlevel auf (Binder, 2009). Gegenläufig hierzu war der basale *FKBP51*-Proteinspiegel bei den Probanden unserer Studie mit CC-Genotyp, verglichen zu den Probanden mit T-Allel, signifikant erhöht (um ca. 41 %;  $p = 0,014$ ). Der Proteinhaushalt scheint komplexen Regulationsmechanismen zu unterliegen, die den Einfluss einzelner Allele übermalen bzw. kompensieren können.

Die sogenannten Neuweltaffen weisen eine natürliche Überexpression von *FKBP5* auf, wodurch die GR-Empfindlichkeit herabgesetzt wird. Dies führt bei den Primaten zu einem erhöhten Plasmacortisolspiegel (Reynolds et al., 1998; Scammell et al., 2001; Westberry et al., 2006). Die erhöhte *FKBP51*-Proteinkonzentration der Probanden, die homozygot für das C-Allel sind, war in unserer Studie nicht mit einer erhöhten Cortisolkonzentration assoziiert. Beim Menschen wird eine *FKBP5*-Überexpression, die mit eingeschränkter Hormonbindungsaffinität des GR verbunden ist, über alternative Wege kompensiert. So kann eine Glukokortikoidresistenz mit gestörter Stressregulation vermieden werden.

Um die Mechanismen des erhöhten *FKBP51*-Proteinlevels zu untersuchen, wurden die *FKBP5*-mRNA-Konzentrationen quantifiziert. Hierbei konnte kein Effekt des Genotyps auf

die mRNA-Konzentration nachgewiesen werden. Die Korrelation zwischen basaler Protein- und mRNA-Konzentration vor Dexamethason-Stimulation betrug  $-0,42$  ( $p = 0,051$ ). Eine hohe Proteinkonzentration ist mit einer tendenziell verringerten mRNA-Expression assoziiert. Dies deckt sich mit der Studie der Gruppe um Binder. In der Gruppe der Probanden mit CT-Genotyp und niedrigem Proteinlevel, war die mRNA-Konzentration nicht geringer als diejenige, der Gruppe mit TT-Genotyp, die wiederum mit dem höchsten Proteinspiegel assoziiert war. Auch hier zeigten sich keine Wirkungen des Genotyps auf die mRNA-Ausgangskonzentration.

Bei der Untersuchung der FKBP51-Proteinkonzentrationen ist davon auszugehen, dass nicht nur Transkription, sondern auch Faktoren wie Proteinstabilität und der Transkription nachgeschaltete Genregulationsmechanismen von Bedeutung sind (vgl. 6.4.1).

*Die fünfte Hypothese (H5), dass genetische Variationen im SNP rs1360780 Einfluss auf den basalen FKBP5-mRNA- und Proteinspiegel nehmen, konnte für die Proteinkonzentration bestätigt werden.*

#### **6.3.2.2 Einfluss genetischer Variationen im SNP rs1360780 auf die FKBP5-Expression nach Dexamethason-Stimulation**

Auf Stimulation mit Dexamethason erfolgte in unserer Studie ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Gruppen auf die FKBP5-mRNA-Expression über die Zeit ( $p = 0,038$ ). Probanden mit T-Risikoallel wiesen eine im Vergleich zu den Trägern des CC-Genotyps niedrigere mRNA-Induktion über den Zeitverlauf auf. Die Probanden mit weniger mRNA-Induktion zeigten dabei aber kein verändertes GR-Ansprechen in der ACTH- und Cortisolantwort.

Bezüglich der FKBP51-Proteinexpression folgte auf Stimulation mit Dexamethason ein signifikanter Haupteffekt des Genotyps über den Zeitverlauf ( $p = 0,01$ ). GR-Aktivierung führte nach drei Stunden zu einer deutlichen Induktion der FKBP51-Proteinexpression bei den Trägern des T-Allels, wohingegen Probanden mit CC-Genotyp keine signifikanten Veränderungen aufwiesen.

Bei T-Trägern korrelieren Plasmacortisolkonzentration und FKBP5-mRNA-Expression stärker als bei Trägern des protektiven Allels (Binder et al., 2004). Das deutet darauf hin, dass der GR-Signalweg und die HPA-Achsenaktivität enger durch die beschriebene Interaktion von GR und FKBP5 kontrolliert sind (Denny et al., 2000; Reynolds et al., 1998; Vermeer et

al., 2003). Dies könnte Folge einer adaptiv veränderten Zusammensetzung des GR-Chaperon-Heterokomplexes sein, was zu einer erhöhten Empfindlichkeit führen würde, auch in Bezug auf sehr kleine Veränderungen in der *FKBP5*-Expression. Es wäre also denkbar, dass die stärkere Induktion der FKBP51-Proteinexpression bei den T-Trägern über GR-Resistenzmechanismen ein höheres Risiko für Stresshormonhyperaktivität nach stressreichen Lebensereignissen darstellt und mehr depressiven Episoden zur Folge haben könnte.

Interessant hierbei erscheint die Tatsache, dass die Probanden mit T-Allel, die mit vermehrter Proteininduktion auf den Stressor reagierten, vor Stimulation einen niedrigeren Proteingrundspiegel aufwiesen. So wäre andererseits denkbar, dass ein Proteinlevel, welches basal bereits erhöht ist, den Induktionseffekt der Proteinexpression nach GR-Aktivierung verringert.

Der aktuelle Forschungsstand spricht dafür, dass die Allele des SNP rs1360780 nach GR-Aktivierung mit einer unterschiedlich starken *FKBP5*-Genexpressionsinduktion assoziiert sind und so Einfluss auf die GR-Rezeptorsensitivität nehmen. Es ist davon auszugehen, dass genotypabhängige Adaptationsprozesse in einem Organismus aktiviert werden, die bei gesunden Individuen ein Gleichgewicht zwischen *FKBP5*-Genexpression und GR-Empfindlichkeit erhalten. Wie diese Prozesse genau aussehen, und inwiefern sie bei der Entstehung von psychischen Störungen involviert sind, wird derzeit genauer erforscht. Die Zusammenhänge zwischen dem *FKBP5*-Gen und stressassoziierten Erkrankungen sprechen für das Vorliegen einer Gen-Umwelt-Interaktion, die mit einem protektiven Effekt bei C-Allel-Trägern im untersuchten SNP einhergeht (vgl. 6.5).

*Die sechste Hypothese (H6), dass genetische Variationen im SNP rs1360780 Einfluss auf die Induktion der FKBP5-mRNA und Proteinexpression nehmen, konnte bestätigt werden.*

### **6.3.3 mRNA- und Proteinmengenanalyse: Posttranskriptionelle Genregulation und Proteinabbau**

Die vorliegenden Mengenanalysen von mRNA und Protein zeigen, dass die Proteinmenge nur teilweise durch die mRNA-Transkripte erklärt werden kann. Genexpression kann auch noch nach der Transkription auf Translationsebene kontrolliert und gesteuert werden (de Sousa Abreu, Penalva, Marcotte, & Vogel, 2009). Die Translation ist ein komplizierter Vorgang, der durch das koordinierte Zusammenspiel von über 100 Makromolekülen bewerkstelligt wird, darunter mRNA, rRNA, tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Dabei sind eine Vielzahl

von Proteinfaktoren beteiligt, die an zahlreichen Stellen regulierend in den Proteinsyntheseprozess eingreifen können (Lackner & Bahler, 2008; Lackner et al., 2007). Die Möglichkeiten der Regulation sind angesichts des komplizierten Wechselspiels der Initiationsfaktoren vielfältig. Auch Antisense-RNAs, RNA-bindende Proteine (RBP), microRNAs, die Länge der mRNA und alternative Splicingvorgänge spielen bei der Translationsregulation eine Rolle (Abaza & Gebauer, 2008; Drummond et al., 2005; Gebauer & Hentze, 2004; Valencia-Sanchez et al., 2006).

Im Allgemeinen korrelieren die Konzentrationen von mRNA und korrespondierendem Protein nicht stark. Bei Untersuchungen an Bakterien und Eukaryonten ergab sich im Durchschnitt ein Pearson-Korrelationskoeffizient von etwa 0,4. Das bedeutet, dass 40 % der Proteinkonzentration durch die bekannte mRNA-Menge erklärt werden kann (de Sousa Abreu et al., 2009; Maier et al., 2009; Schwanhauser et al., 2011). Bei humanen Zellen berichten Studien von einer Fraktion zwischen etwa 30 – 40 % (Vogel et al., 2010). Um die restliche Variabilität erklären zu können, müssen posttranskriptionelle Regulation, Translationsregulation und Proteinabbau berücksichtigt werden. Auch die Halbwertszeit der mRNA kann eine Rolle spielen. Studien zeigen, dass mRNA- und Proteinkonzentrationen metabolischer Gene eher stabil sind und hohe Korrelationen aufweisen. Im Gegensatz dazu werden Proteine, die zuständig für die transkriptionelle Regulierung und Organisation der Chromatinstruktur sind, rascher abgebaut (Schwanhauser et al., 2011; Tuller et al., 2007; Yagil, 1975). Die Regulation der vorhandenen Proteinmenge spiegelt die spezifische biologische Aufgabe wider. Strukturelle Proteine oder Housekeeperproteine sind langlebiger, wohingegen regulatorische Proteine schnell auf- und abgebaut werden, um adäquat auf einen Stimulus reagieren zu können (de Sousa Abreu et al., 2009; Vogel & Marcotte, 2012).

Zahlreiche Faktoren wirken auf die posttranskriptionelle Genregulierung ein und müssen hinsichtlich der FKBP51-Proteinsynthese noch exakter untersucht werden, um den Weg von der DNA zum Protein genauer nachvollziehen zu können.

#### **6.4 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand: Die Rolle von *FKBP5* als Mediator von Gen-Umwelt-Interaktionen**

Die multifaktorielle Natur von psychischen Störungen erklärt, warum individuelle Gene nur einen bescheidenen Effekt ausüben. Entscheidend für die Bestimmung des Phänotyps ist die Interaktion von mehreren Genen untereinander und mit der Umwelt (Caspi & Moffitt, 2006; Clarke et al., 2009; Gillespie et al., 2009; Newton-Cheh & Hirschhorn, 2005).

Polymorphismen im *FKBP5*-Gen und frühe Trauma- oder Missbrauchserfahrung stehen in Wechselwirkung zueinander und beeinflussen das Auftreten von PTSD, Depression und Suizidversuchen im Erwachsenenalter (Appel et al., 2011; Binder et al., 2008; Koenen et al., 2005; Mehta et al., 2011; Roy et al., 2010; Zimmermann et al., 2011). Anhand der Interaktion von *FKBP5*-Polymorphismen und einem erlebten Kindheitstrauma lässt sich auf die Schwere von PTSD-Symptomen im Erwachsenenalter schließen. Der Risikogenotyp, der in unserer Studie mit erhöhter FKBP51-Proteininduktion assoziiert war, weist auch die höchste Verwundbarkeit bezüglich der Entwicklung von PTSD-Symptomen nach Kindheitstrauma auf (Binder et al., 2008).

Gesunde Träger des Risikoallels wiesen in Studien eine relative GR-Resistenz mit weniger ausgeprägter Dexamethason-Suppression auf. Bei Patienten mit PTSD-Symptomen scheint sich diese Zusammenwirkung zu verändern: Dieselben Allele sind mit einer stärkeren Dexamethason-Suppression, also einer erhöhten GR-Sensitivität verknüpft, wohingegen der protektive Genotyp mit einer GR-Resistenz bei PTSD-Patienten verbunden ist (Yehuda et al., 2004). Es findet eine von Umwelteinflüssen abhängige, funktionelle Umkehr statt. Analoge Vorgänge sind bei Patienten mit depressiver Störung zu beobachten. Weniger Cortisolantwort beim Dex-CRH-Test, also eine erhöhte GR-Sensitivität, wurde bei den Allelen beobachtet, die bei Gesunden mit mehr FKBP51-Protein einher gehen und folglich mit einer relativen GR-Resistenz verbunden sind (Binder et al., 2008; Binder et al., 2004). Es scheint hierbei die Rolle der Traumaerfahrung entscheidend. Gegensätzliche Effekte des Genotyps übertragen sich in Abhängigkeit des Stress-Expositionslevels auf eine Gen-Umwelt-Interaktion.

Die Vorstellung, dass genetische Prädisposition und Umwelteinflüsse durch Interaktion auf die Entwicklung und Funktion des Gehirns einwirken und das Risiko von psychischen Störungen beeinflussen, ist durch zahlreiche Studien belegt (Binder, 2009; Caspi et al., 2010; Heim et al., 2009; Xie et al., 2010). Die Forschergruppe um Klengel konnte hierfür erstmals die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der Gen-Umwelt Interaktion beim

Menschen beschreiben (Klengel et al., 2013). Der Polymorphismus rs1360780, der mit einer frühen Traumaerfahrung interagiert, ist auch mit einer veränderten Induktion von FKBP5-mRNA nach GR-Stimulation assoziiert (Binder et al., 2004). Der GR entfaltet seine transkriptionelle Regulierung vor allem über distale intrinsische GREs (Paakinaho et al., 2010). Der SNP im *FKBP5*-Genlocus verändert als Antwort zu einem erlebten Kindheitsmissbrauch die Chromatininteraktion zwischen der Transkriptionsstartstelle und der long-range-enhancer. Es kommt zu einer Allel-spezifischen DNA-Demethylierung in Intron 7 des distalen *FKBP5*-GREs. Diese Demethylierung führt zu verstärktem Ansprechen des Promotors auf GR-Aktivierung und zu einer erhöhten stressinduzierten Gentranskription, besonders bei den Risikoallelen. Die negative Rückkopplungsschleife zwischen *FKBP5* und dem Glukokortikoidrezeptor wird hierdurch verschärft. Erhöhtes *FKBP5*-Ansprechen und die daraus resultierende GR-Resistenz führt langfristig zur Dysregulierung des Stresshormonsystems und der Funktion der Immunzellen (Klengel & Binder, 2012, 2013). Geschieht dies in einer kritischen Entwicklungsperiode, bleiben die Veränderungen über die Zeit stabil und greifen umfassend in neuronale Netzwerke ein, was sich in strukturellen Veränderungen in den mit der Stressregulation assoziierten Gehirnarealen, wie z.B. dem Hippokampus, widerspiegelt.

Die gesunden Probanden unserer Studie haben kein Kindheitstrauma erlebt und sind von diesen epigenetischen Veränderungen nicht betroffen. Sie scheinen Kompensationsmechanismen aufzuweisen, die eine regelrechte HPA-Achsenregulierung unabhängig vom Genotyp gewährleisten. Eine eingeschränkte GR-Sensitivität war in unserer Studie nicht mit dem T-Allel-Status, sondern mit der Höhe des FKBP5-mRNA Grundspiegels und der Stärke der FKBP5-mRNA-Induktion verknüpft. Die Probanden mit Risikoallel wiesen einen niedrigeren basalen Proteingrundspiegel auf und reagierten auf die Dexamethason-Stimulation mit verstärkter Induktion der Proteinexpression. Es ist vorstellbar, dass sich eine HPA-Achsenhyperaktivität im Fall von milden nicht-traumatisierenden Stresserfahrungen durch Mobilisierung individueller Ressourcen positiv ausübt, weil hierdurch eine längerfristige Bewältigung von Stress auf niedriger Ebene ermöglicht wird. Im Fall von traumatisierendem Stress, könnten die negativen Effekte der hyperresponsiblen HPA-Achse dominieren und durch chronisch erhöhte Cortisollevel langfristig schädlich auf den Organismus einwirken.

## 6.5 Zusammenfassung

Neuroendokrinologische Veränderungen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung psychischer Erkrankungen (Heuser et al., 1994; Modell et al., 1997; Schreiber et al., 1996). Im Zentrum steht hierbei die Dysregulierung der HPA-Achsenaktivität (Holsboer, 2000; Plotsky et al., 1998; Steckler et al., 1999). Als zentrales Steuerelement der HPA-Achse kommt dem GR besondere Bedeutung zu (Holsboer et al., 1995; Pariante, 2006).

Damit der GR-Signalweg funktionieren kann, werden eine Vielzahl von Faltungsproteinen, akzessorischen Proteinen, Co-Regulatoren und interagierenden Transkriptionsfaktoren benötigt, die als großer molekularer Komplex die Transkription der Zielgene regulieren (Cheung & Smith, 2000; Pratt & Toft, 1997; Schmidt et al., 2003). *FKBP5* codiert für ein hsp90 Co-Chaperon im Hitzeschockprotein-90-Komplex und beeinflusst die Steroidsignaltransduktion des Glukokortikoidrezeptors (Binder, 2009; Denny et al., 2005; Jaaskelainen et al., 2011; Reynolds et al., 1999; Storer et al., 2011). GR-Aktivierung führt zur Induktion der *FKBP5*-mRNA- und Proteinexpression. Über eine negative Rückkopplungsschleife wird die Hormonbindefähigkeit des GR-Rezeptors herabgesetzt und die nukleäre Translokation des Rezeptors ist weniger effizient (Binder, 2009; Denny et al., 2000; Reynolds et al., 1999; Scammell et al., 2001; Wochnik et al., 2005). *FKBP5* fungiert somit als funktioneller Antagonist der GR-Aktion, indem es seine Bindungsaffinität für Cortisol reduziert (Binder et al., 2004; Vermeer et al., 2003).

Der aktuelle Forschungsstand deutet darauf hin, dass genetische Variationen im *FKBP5*-Gen im Entstehen und im Verlauf von psychischen Erkrankungen entscheidende Faktoren sein können (Binder, 2009; Binder et al., 2008; Binder et al., 2009; Binder et al., 2004; Koenen et al., 2005; Lavebratt et al., 2010; Menke et al., 2013; Vermeer et al., 2003).

In der vorliegenden Studie wurden *FKBP5*-Genaktivität in Form von mRNA- und Proteinexpression sowie die ACTH- und Cortisolsuppression nach Dexamethason-Stimulation bei gesunden Probanden über einen Zeitverlauf analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Höhe der *FKBP5*-mRNA-Ausgangskonzentration sowie die Stärke der mRNA-Expressionsinduktion Einfluss auf die GR-Sensitivität und die Beendigung der Stressantwort nehmen. Die Messung der durch Dexamethason stimulierten *FKBP5*-mRNA-Induktion stellt einen dynamischen Readout der GR-vermittelten Genaktivierung dar und kann als Biomarker für die HPA-Achsenfunktion dienen.

Unsere Daten deuten außerdem darauf hin, dass es bei gesunden Männern sowohl vor Dexamethason-Stimulation, wie auch als Antwort auf GR-Aktivierung substantielle Unterschiede in der FKBP5-Expression gibt, die durch *FKBP5*-Polymorphismen bedingt sind. Sie scheinen in verschiedene Richtungen auf gesunde Probanden und Patienten mit psychischen Störungen zu wirken. Es deuten aber alle Studien darauf hin, dass der *FKBP5*-Genotyp, vermutlich in Interaktion mit einem Stressor oder Traumaexposition, mit einer neuroendokrinen Dysregulierung bei stressassoziierten psychischen Erkrankungen und epigenetischen Faktoren in Verbindung steht.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit die grundsätzliche Bedeutung des *FKBP5*-Gens für die Stresshormonantwort und seine entscheidende Rolle in der HPA-Achsenregulierung. Die Ergebnisse könnten dabei helfen, den Einfluss des Genotyps auf die *FKBP5*-Genexpression und die GR-Funktionalität besser zu verstehen. Sie unterstreichen die Relevanz, biologische Messungen durchzuführen und genetische Marker zu finden, um den Vorhersagewert der Biomarker in der Diagnostik und Therapie von psychischen Störungen zu erhöhen.

## 6.6 Ausblick

In Zukunft werden mehr Untersuchungen mit Dexamethason-Stimulation an Kontrollprobanden und Patienten über einen längeren Zeitverlauf nötig sein, um die Auswirkungen der *FKBP5*-Polymorphismen auf die FKBP5-mRNA- und Proteinexpression sowie auf ACTH- und Cortisolsuppression genauer charakterisieren zu können. Möglicherweise auch in Form von ex-vivo-Experimenten und mit verschiedenen Dosierungen von Dexamethason. Darüber hinaus sollten auch Stresstests mit Stimulation der endogenen Kortikosteroide durch psychologische Stressoren durchgeführt werden. Besonderes Augenmerk sollte außerdem auf die Berücksichtigung epigenetischer Analysen gelegt werden. Um ein umfassendes Verständnis über die Entstehung von stressassoziierten Erkrankungen zu erhalten, müssen die Interaktionen zwischen Umwelteinflüssen und Genen der zu Grunde liegenden neuronalen Netzwerke weiter zergliedert und charakterisiert werden. Wegweisend hierfür sind die neuen Erkenntnisse der Forschergruppen des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie. Mit den modernen Methoden der molekularbiologischen Forschung haben wir heute die Möglichkeit, einzelne Gene genauer zu untersuchen, um festzustellen, ob eine bestimmte Genvariation mit einem erhöhten Krankheitsrisiko einhergeht oder mit unterschiedlich gutem Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie korreliert. In Zukunft könnte jeder Patient nach dem Konzept der personalisierten Medizin mit Gabe von maßgeschneiderten Medikamenten auf der Basis von Genotyp und Biomarkern entsprechend seiner individuellen Gegebenheiten behandelt werden.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AVP	Arginin-Vasopressin
BDI	Beck Depression Inventory
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CIDI	Composite International Diagnostic Interview
Cort	Kortison
CRH	corticotropin releasing hormone
Dex	Dexamethason
Dex-CRH-Test	dexamethasone-suppressed CRH test
d.h.	das heisst
DNA	deoxyribonucleic acid
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	und Andere (lat.: et alii/et aliae)
FKBP5	FK506 binding protein 5
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
GK	Glukokortikoid
GR	Glukokortikoidrezeptor
HAM-D	Hamilton Rating Scale for Depression

---

HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (engl.: Hypothalamus-Pituitary-Adrenal-axis)
ICD-10-Kriterien	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10. Auflage
konz.	konzentriert
MAO	Monoaminoxidase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
o.ä.	oder ähnliche(s)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTSD	posttraumatic stress disorder
p-Wert	Signifikanzwert ("probability"-value)
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	real time quantitative PCR
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: Single Nucleotide Peptide)
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
t	Zeitpunkt
Tab.	Tabelle
TBP	TATA binding protein
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil
%	Prozent
°C	Grad Celsius

$\mu\text{g}$  Mikrogramm

$\mu\text{l}$  Mikroliter

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung der HPA-Achse .....	10
Abb. 2: Die pathologische Hyperaktivität der HPA-Achse bei Depression .....	12
Abb. 3: Schematische Darstellung der Interaktion von <i>FKBP5</i> mit dem GR-Komplex .....	16
Abb. 4: Schematische Darstellung der SNP-abhängigen molekularen Unterschiede im negativen Rückkopplungsmechanismus .....	18
Abb. 5: FKBP5-Genexpression und GR-Resistenz .....	25
Abb. 6: Normalisierung mit Actin .....	31
Abb. 7: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	34
Abb. 8: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	35
Abb. 9: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation .....	36
Abb. 10: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation .....	37
Abb. 11 Methodenvergleich: Korrelation zwischen Analyse mit der verwendeten Methode und dem Bio-rad Imaging System .....	38
Abb. 12: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation .....	39
Abb. 13: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation .....	40
Abb. 14: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	41
Abb. 15: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation .....	42
Abb. 16: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation .....	43
Abb. 17 Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	44
Abb. 18: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	45
Abb. 19: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation .....	46
Abb. 20: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation .....	47
Abb. 21: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	48
Abb. 22: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	49
Abb. 23: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation .....	50
Abb. 24: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation .....	51
Abb. 25: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	52
Abb. 26: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	53
Abb. 27: FKBP5-mRNA Expression nach Dexamethason-Stimulation.....	54
Abb. 28: Suppression der ACTH-Konzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	55
Abb. 29: Suppression der Cortisolkonzentration nach Dexamethason-Stimulation.....	56
Abb. 30: Basale FKBP5-mRNA-Konzentration.....	57

---

Abb. 31: FKBP5-mRNA-Expression nach Dexamethason-Stimulation .....	58
Abb. 32: Basale FKBP51-Proteinkonzentration .....	59
Abb. 33: Basale FKBP51-Proteinkonzentration .....	60
Abb. 34: FKBP51-Proteinexpression nach Dexamethason-Stimulation .....	61
Abb. 35: Antigendetektion auf Western Blots .....	62

**9 TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1: Ablaufprotokoll der Blutentnahme.....	26
Tab. 2: Nassblot-Inkubationen.....	30
Tab. 3: Probandenkollektiv.....	33

**10 LITERATURVERZEICHNIS**

- Abaza, I., & Gebauer, F. (2008). Trading translation with RNA-binding proteins. *RNA*, 14(3), 404-409.
- Anacker, C., Zunszain, P. A., Carvalho, L. A., & Pariante, C. M. (2011). The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 36(3), 415-425.
- Appel, K., Schwahn, C., Mahler, J., Schulz, A., Spitzer, C., Fenske, K., Stender, J., Barnow, S., John, U., Teumer, A., Biffar, R., Nauck, M., Volzke, H., Freyberger, H. J., & Grabe, H. J. (2011). Moderation of adult depression by a polymorphism in the FKBP5 gene and childhood physical abuse in the general population. *Neuropsychopharmacology*, 36(10), 1982-1991.
- Appelhof, B. C., Huyser, J., Verweij, M., Brouwer, J. P., van Dyck, R., Fliers, E., Hoogendijk, W. J., Tijssen, J. G., Wiersinga, W. M., & Schene, A. H. (2006). Glucocorticoids and relapse of major depression (dexamethasone/corticotropin-releasing hormone test in relation to relapse of major depression). *Biol Psychiatry*, 59(8), 696-701.
- Attwood, B. K., Bourgeois, J. M., Patel, S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, A. E., Young, K. W., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., Przewlocki, R., & Pawlak, R. (2011). Neuropilin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature*, 473(7347), 372-375.
- Aubry, J. M., Gervasoni, N., Osiek, C., Perret, G., Rossier, M. F., Bertschy, G., & Bondolfi, G. (2007). The DEX/CRH neuroendocrine test and the prediction of depressive relapse in remitted depressed outpatients. *J Psychiatr Res*, 41(3-4), 290-294.
- Barden, N., Stec, I. S., Montkowski, A., Holsboer, F., & Reul, J. M. (1997). Endocrine profile and neuroendocrine challenge tests in transgenic mice expressing antisense RNA against the glucocorticoid receptor. *Neuroendocrinology*, 66(3), 212-220.
- Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*, 94(6), 557-572.
- Beck, A. T., Ward, C. H., Mendelson, M., Mock, J., & Erbaugh, J. (1961). An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*, 4, 561-571.
- Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L., Stryer, Lubert, & Gatto, Gregory J. (2013). *Biochemie* (7. Aufl. ed.). Berlin [u.a.]: Springer Spektrum.
- Binder, E. B. (2009). The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1, S186-195.
- Binder, E. B., Bradley, R. G., Liu, W., Epstein, M. P., Deveau, T. C., Mercer, K. B., Tang, Y., Gillespie, C. F., Heim, C. M., Nemeroff, C. B., Schwartz, A. C., Cubells, J. F., & Ressler, K. J. (2008). Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA*, 299(11), 1291-1305.
- Binder, E. B., Kunzel, H. E., Nickel, T., Kern, N., Pfennig, A., Majer, M., Uhr, M., Ising, M., & Holsboer, F. (2009). HPA-axis regulation at in-patient admission is associated with antidepressant therapy outcome in male but not in female depressed patients. *Psychoneuroendocrinology*, 34(1), 99-109.

- Binder, E. B., Salyakina, D., Lichtner, P., Wochnik, G. M., Ising, M., Putz, B., Papiol, S., Seaman, S., Lucae, S., Kohli, M. A., Nickel, T., Kunzel, H. E., Fuchs, B., Majer, M., Pfennig, A., Kern, N., Brunner, J., Modell, S., Baghai, T., Deiml, T., Zill, P., Bondy, B., Rupprecht, R., Messer, T., Kohnlein, O., Dabitz, H., Bruckl, T., Muller, N., Pfister, H., Lieb, R., Mueller, J. C., Lohmussaar, E., Strom, T. M., Bettecken, T., Meitinger, T., Uhr, M., Rein, T., Holsboer, F., & Muller-Myhsok, B. (2004). Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet*, 36(12), 1319-1325.
- Board, F., Wadson, R., & Persky, H. (1957). Depressive affect and endocrine functions; blood levels of adrenal cortex and thyroid hormones in patients suffering from depressive reactions. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 78(6), 612-620.
- Brent, D., Melhem, N., Ferrell, R., Emslie, G., Wagner, K. D., Ryan, N., Vitiello, B., Birmaher, B., Mayes, T., Zelazny, J., Onorato, M., Devlin, B., Clarke, G., DeBar, L., & Keller, M. (2010). Association of FKBP5 polymorphisms with suicidal events in the Treatment of Resistant Depression in Adolescents (TORDIA) study. *Am J Psychiatry*, 167(2), 190-197.
- Breslau, N. (2001). The epidemiology of posttraumatic stress disorder: what is the extent of the problem? *J Clin Psychiatry*, 62 Suppl 17, 16-22.
- Butler, P. W., & Besser, G. M. (1968). Pituitary-adrenal function in severe depressive illness. *Lancet*, 1(7554), 1234-1236.
- Carpenter, L. L., Ross, N. S., Tyrka, A. R., Anderson, G. M., Kelly, M., & Price, L. H. (2009). Dex/CRH test cortisol response in outpatients with major depression and matched healthy controls. *Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1208-1213.
- Carroll, B. J. (1982). The dexamethasone suppression test for melancholia. *Br J Psychiatry*, 140, 292-304.
- Carroll, B. J., Feinberg, M., Greden, J. F., Tarika, J., Albala, A. A., Haskett, R. F., James, N. M., Kronfol, Z., Lohr, N., Steiner, M., de Vigne, J. P., & Young, E. (1981). A specific laboratory test for the diagnosis of melancholia. Standardization, validation, and clinical utility. *Arch Gen Psychiatry*, 38(1), 15-22.
- Carvalho, L. A., & Pariante, C. M. (2008). In vitro modulation of the glucocorticoid receptor by antidepressants. *Stress*, 11(6), 411-424.
- Caspi, A., Hariri, A. R., Holmes, A., Uher, R., & Moffitt, T. E. (2010). Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry*, 167(5), 509-527.
- Caspi, A., & Moffitt, T. E. (2006). Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 7(7), 583-590.
- Charney, D. S., & Manji, H. K. (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE*, 2004(225), re5.
- Checkley, S. (1996). The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br Med Bull*, 52(3), 597-617.
- Cheung, J., & Smith, D. F. (2000). Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol*, 14(7), 939-946.
- Clarke, M. C., Tanskanen, A., Huttunen, M., Whittaker, J. C., & Cannon, M. (2009). Evidence for an interaction between familial liability and prenatal exposure to infection in the causation of schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 166(9), 1025-1030.
- Davies, T. H., Ning, Y. M., & Sanchez, E. R. (2002). A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem*, 277(7), 4597-4600.
- de Kloet, E. R., Joels, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6(6), 463-475.

- de Kloet, E. R., Reul, J. M., de Ronde, F. S., Bloemers, M., & Ratka, A. (1986). Function and plasticity of brain corticosteroid receptor systems: action of neuropeptides. *J Steroid Biochem*, 25(5B), 723-731.
- de Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M., & Vogel, C. (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*, 5(12), 1512-1526.
- Denny, W. B., Prapapanich, V., Smith, D. F., & Scammell, J. G. (2005). Structure-function analysis of squirrel monkey FK506-binding protein 51, a potent inhibitor of glucocorticoid receptor activity. *Endocrinology*, 146(7), 3194-3201.
- Denny, W. B., Valentine, D. L., Reynolds, P. D., Smith, D. F., & Scammell, J. G. (2000). Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology*, 141(11), 4107-4113.
- Deuschle, M., Schmider, J., Weber, B., Standhardt, H., Korner, A., Lammers, C. H., Schweiger, U., Hartmann, A., & Heuser, I. (1997). Pulse-dosing and conventional application of doxepin: effects on psychopathology and hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) system. *J Clin Psychopharmacol*, 17(3), 156-160.
- Drummond, D. A., Bloom, J. D., Adami, C., Wilke, C. O., & Arnold, F. H. (2005). Why highly expressed proteins evolve slowly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40), 14338-14343.
- Ebmeier, K. P., Donaghey, C., & Steele, J. D. (2006). Recent developments and current controversies in depression. *Lancet*, 367(9505), 153-167.
- Erhardt, A., Ising, M., Unschuld, P. G., Kern, N., Lucae, S., Putz, B., Uhr, M., Binder, E. B., Holsboer, F., & Keck, M. E. (2006). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in patients with panic disorder. *Neuropsychopharmacology*, 31(11), 2515-2522.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854), 889-895.
- Fava, M., & Davidson, K. G. (1996). Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. *Psychiatr Clin North Am*, 19(2), 179-200.
- Frieboes, R. M., Sonntag, A., Yassouridis, A., Eap, C. B., Baumann, P., & Steiger, A. (2003). Clinical outcome after trimipramine in patients with delusional depression - a pilot study. *Pharmacopsychiatry*, 36(1), 12-17.
- Funato, H., Kobayashi, A., & Watanabe, Y. (2006). Differential effects of antidepressants on dexamethasone-induced nuclear translocation and expression of glucocorticoid receptor. *Brain Res*, 1117(1), 125-134.
- Gebauer, F., & Hentze, M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10), 827-835.
- Georgopoulos, C., & Welch, W. J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol*, 9, 601-634.
- Gething, M. J., & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355(6355), 33-45.
- Gillespie, C. F., Phifer, J., Bradley, B., & Ressler, K. J. (2009). Risk and resilience: genetic and environmental influences on development of the stress response. *Depress Anxiety*, 26(11), 984-992.
- Gladkevich, A., Kauffman, H. F., & Korf, J. (2004). Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28(3), 559-576.
- Hamilton, M. (1960). A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 23, 56-62.
- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852-1858.

- Heim, C., Bradley, B., Mletzko, T. C., Deveau, T. C., Musselman, D. L., Nemeroff, C. B., Ressler, K. J., & Binder, E. B. (2009). Effect of Childhood Trauma on Adult Depression and Neuroendocrine Function: Sex-Specific Moderation by CRH Receptor 1 Gene. *Front Behav Neurosci*, 3, 41.
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry*, 49(12), 1023-1039.
- Heim, C., Newport, D. J., 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(6), 693-710.
- Heim, C., Owens, M. J., Plotsky, P. M., & Nemeroff, C. B. (1997). Persistent changes in corticotropin-releasing factor systems due to early life stress: relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacol Bull*, 33(2), 185-192.
- Hennings, J. M., Owashi, T., Binder, E. B., Horstmann, S., Menke, A., Kloiber, S., Dose, T., Wollweber, B., Spieler, D., Messer, T., Lutz, R., Kunzel, H., Bierner, T., Pollmacher, T., Pfister, H., Nickel, T., Sonntag, A., Uhr, M., Ising, M., Holsboer, F., & Lucae, S. (2009). Clinical characteristics and treatment outcome in a representative sample of depressed inpatients - findings from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) project. *J Psychiatr Res*, 43(3), 215-229.
- Heuser, I. (1998). Anna-Monika-Prize paper. The hypothalamic-pituitary-adrenal system in depression. *Pharmacopsychiatry*, 31(1), 10-13.
- Heuser, I., Yassouridis, A., & Holsboer, F. (1994). The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res*, 28(4), 341-356.
- Holsboer-Trachslar, E., Stohler, R., & Hatzinger, M. (1991). Repeated administration of the combined dexamethasone-human corticotropin releasing hormone stimulation test during treatment of depression. *Psychiatry Res*, 38(2), 163-171.
- Holsboer, F. (1989). Psychiatric implications of altered limbic-hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci*, 238(5-6), 302-322.
- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, 23(5), 477-501. doi: 10.1016/s0893-133x(00)00159-7
- Holsboer, F., & Ising, M. (2010). Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol*, 61, 81-109, C101-111.
- Holsboer, F., Lauer, C. J., Schreiber, W., & Krieg, J. C. (1995). Altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation in healthy subjects at high familial risk for affective disorders. *Neuroendocrinology*, 62(4), 340-347.
- Holsboer, F., von Bardeleben, U., Buller, R., Heuser, I., & Steiger, A. (1987). Stimulation response to corticotropin-releasing hormone (CRH) in patients with depression, alcoholism and panic disorder. *Horm Metab Res Suppl*, 16, 80-88.
- Holsboer, Florian. (2009). *Biologie für die Seele mein Weg zur personalisierten Medizin* (2., durchges. Aufl. ed.). München: Beck.
- Horstmann, S., Dose, T., Lucae, S., Kloiber, S., Menke, A., Hennings, J., Spieler, D., Uhr, M., Holsboer, F., & Ising, M. (2009). Suppressive effect of mirtazapine on the HPA system in acutely depressed women seems to be transient and not related to antidepressant action. *Psychoneuroendocrinology*, 34(2), 238-248.
- Hubler, T. R., & Scammell, J. G. (2004). Intronic hormone response elements mediate regulation of FKBP5 by progestins and glucocorticoids. *Cell Stress Chaperones*, 9(3), 243-252.

- Huizenga, N. A., de Lange, P., Koper, J. W., de Herder, W. W., Abs, R., Kasteren, J. H., de Jong, F. H., & Lamberts, S. W. (2000). Five patients with biochemical and/or clinical generalized glucocorticoid resistance without alterations in the glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(5), 2076-2081.
- Ising, M., Depping, A. M., Siebertz, A., Lucae, S., Unschuld, P. G., Kloiber, S., Horstmann, S., Uhr, M., Muller-Myhsok, B., & Holsboer, F. (2008). Polymorphisms in the FKBP5 gene region modulate recovery from psychosocial stress in healthy controls. *Eur J Neurosci*, 28(2), 389-398.
- Ising, M., Horstmann, S., Kloiber, S., Lucae, S., Binder, E. B., Kern, N., Kunzel, H. E., Pfennig, A., Uhr, M., & Holsboer, F. (2007). Combined dexamethasone/corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression - a potential biomarker? *Biol Psychiatry*, 62(1), 47-54.
- Ising, M., Kunzel, H. E., Binder, E. B., Nickel, T., Modell, S., & Holsboer, F. (2005). The combined dexamethasone/CRH test as a potential surrogate marker in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29(6), 1085-1093.
- Ising, M., Lucae, S., Binder, E. B., Bettecken, T., Uhr, M., Ripke, S., Kohli, M. A., Hennings, J. M., Horstmann, S., Kloiber, S., Menke, A., Bondy, B., Rupprecht, R., Domschke, K., Baune, B. T., Arolt, V., Rush, A. J., Holsboer, F., & Muller-Myhsok, B. (2009). A genomewide association study points to multiple loci that predict antidepressant drug treatment outcome in depression. *Arch Gen Psychiatry*, 66(9), 966-975.
- Jaaskelainen, T., Makkonen, H., & Palvimo, J. J. (2011). Steroid up-regulation of FKBP51 and its role in hormone signaling. *Curr Opin Pharmacol*, 11(4), 326-331.
- Juster, R. P., McEwen, B. S., & Lupien, S. J. (2010). Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*, 35(1), 2-16.
- Keers, R., & Aitchison, K. J. (2011). Pharmacogenetics of antidepressant response. *Expert Rev Neurother*, 11(1), 101-125.
- Kendler, K. S., Gatz, M., Gardner, C. O., & Pedersen, N. L. (2006). A Swedish national twin study of lifetime major depression. *Am J Psychiatry*, 163(1), 109-114.
- 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(6), 837-841.
- Kessler, R. C., Davis, C. G., & Kendler, K. S. (1997). Childhood adversity and adult psychiatric disorder in the US National Comorbidity Survey. *Psychol Med*, 27(5), 1101-1119.
- Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Zhao, S., Nelson, C. B., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, H. U., & Kendler, K. S. (1994). Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*, 51(1), 8-19.
- Kessler, R. C., Sonnega, A., Bromet, E., Hughes, M., & Nelson, C. B. (1995). Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*, 52(12), 1048-1060.
- Kirchheiner, J., Lorch, R., Lebedeva, E., Seeringer, A., Roots, I., Sasse, J., & Brockmoller, J. (2008). Genetic variants in FKBP5 affecting response to antidepressant drug treatment. *Pharmacogenomics*, 9(7), 841-846.
- Klengel, T., & Binder, E. B. (2012). Gene x environment interactions in the prediction of response to antidepressant treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1-11.
- Klengel, T., & Binder, E. B. (2013). Gene-environment interactions in major depressive disorder. *Can J Psychiatry*, 58(2), 76-83.

- Klengel, T., Mehta, D., Anacker, C., Rex-Haffner, M., Pruessner, J. C., Pariante, C. M., Pace, T. W., Mercer, K. B., Mayberg, H. S., Bradley, B., Nemeroff, C. B., Holsboer, F., Heim, C. M., Ressler, K. J., Rein, T., & Binder, E. B. (2012). Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nat Neurosci*.
- Klengel, T., Mehta, D., Anacker, C., Rex-Haffner, M., Pruessner, J. C., Pariante, C. M., Pace, T. W., Mercer, K. B., Mayberg, H. S., Bradley, B., Nemeroff, C. B., Holsboer, F., Heim, C. M., Ressler, K. J., Rein, T., & Binder, E. B. (2013). Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nat Neurosci*, 16(1), 33-41.
- Klinke, Rainer, Pape, Hans-Christian, Kurtz, Armin, Silbernagl, Stefan, Baumann, Rosemarie, Brenner, Bernhard, Gay, Rüdiger, & Rothenburger, Astried. (2010). *Physiologie* (6., vollständig überarb. Aufl. ed.). Stuttgart: Thieme.
- Koenen, K. C., Lyons, M. J., Goldberg, J., Simpson, J., Williams, W. M., Toomey, R., Eisen, S. A., True, W., & Tsuang, M. T. (2003). Co-twin control study of relationships among combat exposure, combat-related PTSD, and other mental disorders. *J Trauma Stress*, 16(5), 433-438.
- Koenen, K. C., Saxe, G., Purcell, S., Smoller, J. W., Bartholomew, D., Miller, A., Hall, E., Kaplow, J., Bosquet, M., Moulton, S., & Baldwin, C. (2005). Polymorphisms in FKBP5 are associated with peritraumatic dissociation in medically injured children. *Mol Psychiatry*, 10(12), 1058-1059.
- Kovacs, K. J., & Sawchenko, P. E. (1996). Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. *J Mol Neurosci*, 7(2), 125-133.
- Kunugi, H., Ida, I., Owashi, T., Kimura, M., Inoue, Y., Nakagawa, S., Yabana, T., Urushibara, T., Kanai, R., Aihara, M., Yuuki, N., Otsubo, T., Oshima, A., Kudo, K., Inoue, T., Kitaichi, Y., Shirakawa, O., Isogawa, K., Nagayama, H., Kamijima, K., Nanko, S., Kanba, S., Higuchi, T., & Mikuni, M. (2006). Assessment of the dexamethasone/CRH test as a state-dependent marker for hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis abnormalities in major depressive episode: a Multicenter Study. *Neuropsychopharmacology*, 31(1), 212-220.
- Labonte, B., Suderman, M., Maussion, G., Lopez, J. P., Navarro-Sanchez, L., Yerko, V., Mechawar, N., Szyf, M., Meaney, M. J., & Turecki, G. (2013). Genome-wide methylation changes in the brains of suicide completers. *Am J Psychiatry*, 170(5), 511-520.
- Lackner, D. H., & Bahler, J. (2008). Translational control of gene expression from transcripts to transcriptomes. *Int Rev Cell Mol Biol*, 271, 199-251.
- Lackner, D. H., Beilharz, T. H., Marguerat, S., Mata, J., Watt, S., Schubert, F., Preiss, T., & Bahler, J. (2007). A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast. *Mol Cell*, 26(1), 145-155.
- Lavebratt, C., Aberg, E., Sjöholm, L. K., & Forsell, Y. (2010). Variations in FKBP5 and BDNF genes are suggestively associated with depression in a Swedish population-based cohort. *J Affect Disord*, 125(1-3), 249-255.
- Lee, R. S., Tamashiro, K. L., Yang, X., Purcell, R. H., Harvey, A., Willour, V. L., Huo, Y., Rongione, M., Wand, G. S., & Potash, J. B. (2010). Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinology*, 151(9), 4332-4343.

- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T. A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan, B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glattfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramee, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C. D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wohnoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., Yaylaoglu, M. B., Young, R. C., Youngstrom, B. L., Yuan, X. F., Zhang, B., Zwingman, T. A., & Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168-176.
- Lekman, M., Laje, G., Charney, D., Rush, A. J., Wilson, A. F., Sorant, A. J., Lipsky, R., Wisniewski, S. R., Manji, H., McMahon, F. J., & Paddock, S. (2008). The FKBP5-gene in depression and treatment response--an association study in the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR\*D) Cohort. *Biol Psychiatry*, 63(12), 1103-1110.
- Levenson, J. M., & Sweatt, J. D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*, 6(2), 108-118.
- Levine, S. (2000). Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol*, 405(1-3), 149-160.
- Levinson, D. F. (2006). The genetics of depression: a review. *Biol Psychiatry*, 60(2), 84-92.
- Lomvardas, S., & Thanos, D. (2002). Opening chromatin. *Mol Cell*, 9(2), 209-211.
- Luijk, M. P., Velders, F. P., Tharner, A., van Ijzendoorn, M. H., Bakermans-Kranenburg, M. J., Jaddoe, V. W., Hofman, A., Verhulst, F. C., & Tiemeier, H. (2010). FKBP5 and resistant attachment predict cortisol reactivity in infants: gene-environment interaction. *Psychoneuroendocrinology*, 35(10), 1454-1461.
- Maddox, S. A., Schafe, G. E., & Ressler, K. J. (2013). Exploring epigenetic regulation of fear memory and biomarkers associated with post-traumatic stress disorder. *Front Psychiatry*, 4, 62.
- Maier, T., Guell, M., & Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*, 583(24), 3966-3973.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83(6), 835-839.
- McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., Turecki, G., & Meaney, M. J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci*, 12(3), 342-348.
- Meaney, M. J., & Ferguson-Smith, A. C. (2010). Epigenetic regulation of the neural transcriptome: the meaning of the marks. *Nat Neurosci*, 13(11), 1313-1318.
- Mehta, D., & Binder, E. B. (2012). Gene x environment vulnerability factors for PTSD: the HPA-axis. *Neuropharmacology*, 62(2), 654-662.

- Mehta, D., Gonik, M., Klengel, T., Rex-Haffner, M., Menke, A., Rubel, J., Mercer, K. B., Putz, B., Bradley, B., Holsboer, F., Ressler, K. J., Muller-Myhsok, B., & Binder, E. B. (2011). Using polymorphisms in FKBP5 to define biologically distinct subtypes of posttraumatic stress disorder: evidence from endocrine and gene expression studies. *Arch Gen Psychiatry*, 68(9), 901-910.
- Mehta, D., Klengel, T., Conneely, K. N., Smith, A. K., Altmann, A., Pace, T. W., Rex-Haffner, M., Loeschner, A., Gonik, M., Mercer, K. B., Bradley, B., Muller-Myhsok, B., Ressler, K. J., & Binder, E. B. (2013). Childhood maltreatment is associated with distinct genomic and epigenetic profiles in posttraumatic stress disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(20), 8302-8307.
- Menke, A., Arloth, J., Putz, B., Weber, P., Klengel, T., Mehta, D., Gonik, M., Rex-Haffner, M., Rubel, J., Uhr, M., Lucae, S., Deussing, J. M., Muller-Myhsok, B., Holsboer, F., & Binder, E. B. (2012). Dexamethasone stimulated gene expression in peripheral blood is a sensitive marker for glucocorticoid receptor resistance in depressed patients. *Neuropsychopharmacology*, 37(6), 1455-1464.
- Menke, A., Klengel, T., Rubel, J., Bruckl, T., Pfister, H., Lucae, S., Uhr, M., Holsboer, F., & Binder, E. B. (2013). Genetic variation in FKBP5 associated with the extent of stress hormone dysregulation in major depression. *Genes Brain Behav*, 12(3), 289-296.
- Miller, C. A., & Sweatt, J. D. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53(6), 857-869.
- Miller, G. E., Chen, E., & Zhou, E. S. (2007). If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull*, 133(1), 25-45.
- Mitchell, A. C., Bharadwaj, R., Whittle, C., Krueger, W., Mirnics, K., Hurd, Y., Rasmussen, T., & Akbarian, S. (2014). The Genome in Three Dimensions: A New Frontier in Human Brain Research. *Biol Psychiatry*, 75(12), 961-969.
- Modell, S., Yassouridis, A., Huber, J., & Holsboer, F. (1997). Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology*, 65(3), 216-222.
- Molnar, B. E., Buka, S. L., & Kessler, R. C. (2001). Child sexual abuse and subsequent psychopathology: results from the National Comorbidity Survey. *Am J Public Health*, 91(5), 753-760.
- Moutsatsou, P., Tsolakidou, A., Trikkas, G., Troungos, C., & Sekeris, C. E. (2000). Glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms are not mutated in bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry*, 5(2), 196-202.
- Muller, M. B., Zimmermann, S., Sillaber, I., Hagemeyer, T. P., Deussing, J. M., Timpl, P., Kormann, M. S., Droste, S. K., Kuhn, R., Reul, J. M., Holsboer, F., & Wurst, W. (2003). Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat Neurosci*, 6(10), 1100-1107.
- Murgatroyd, C., Patchev, A. V., Wu, Y., Micale, V., Bockmuhl, Y., Fischer, D., Holsboer, F., Wotjak, C. T., Almeida, O. F., & Spengler, D. (2009). Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci*, 12(12), 1559-1566.
- Navailles, S., Zimnisky, R., & Schmauss, C. (2010). Expression of glucocorticoid receptor and early growth response gene 1 during postnatal development of two inbred strains of mice exposed to early life stress. *Dev Neurosci*, 32(2), 139-148.
- Nemeroff, C. B. (1988). The role of corticotropin-releasing factor in the pathogenesis of major depression. *Pharmacopsychiatry*, 21(2), 76-82.
- Nemeroff, C. B. (2002). Recent advances in the neurobiology of depression. *Psychopharmacol Bull*, 36 Suppl 2, 6-23.

- Nemeroff, C. B., Owens, M. J., Bissette, G., Andorn, A. C., & Stanley, M. (1988). Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry*, 45(6), 577-579.
- Nemeroff, C. B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C. D., Loosen, P. T., & Vale, W. (1984). Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*, 226(4680), 1342-1344.
- Newton-Cheh, C., & Hirschhorn, J. N. (2005). Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res*, 573(1-2), 54-69.
- Nickel, T., Sonntag, A., Schill, J., Zobel, A. W., Ackl, N., Brunbauer, A., Murck, H., Ising, M., Yassouridis, A., Steiger, A., Zihl, J., & Holsboer, F. (2003). Clinical and neurobiological effects of tianeptine and paroxetine in major depression. *J Clin Psychopharmacol*, 23(2), 155-168.
- Novik, K. L., Nimmrich, I., Genc, B., Maier, S., Piepenbrock, C., Olek, A., & Beck, S. (2002). Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues Mol Biol*, 4(4), 111-128.
- O'Leary, J. C., 3rd, Dharia, S., Blair, L. J., Brady, S., Johnson, A. G., Peters, M., Cheung-Flynn, J., Cox, M. B., de Erausquin, G., Weeber, E. J., Jinwal, U. K., & Dickey, C. A. (2011). A new anti-depressive strategy for the elderly: ablation of FKBP5/FKBP51. *PLoS One*, 6(9), e24840.
- 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 308-216.
- Paakinaho, V., Makkonen, H., Jaaskelainen, T., & Palvimo, J. J. (2010). Glucocorticoid receptor activates poised FKBP51 locus through long-distance interactions. *Mol Endocrinol*, 24(3), 511-525.
- Pahwa, P., & Karunanayake, C. P. (2009). Modeling of longitudinal polytomous outcome from complex survey data--application to investigate an association between mental distress and non-malignant respiratory diseases. *BMC Med Res Methodol*, 9, 84.
- Papiol, S., Arias, B., Gasto, C., Gutierrez, B., Catalan, R., & Fananas, L. (2007). Genetic variability at HPA axis in major depression and clinical response to antidepressant treatment. *J Affect Disord*, 104(1-3), 83-90.
- Pariante, C. M. (2006). The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem? *J Psychopharmacol*, 20(4 Suppl), 79-84.
- Pariante, C. M., Hye, A., Williamson, R., Makoff, A., Lovestone, S., & Kerwin, R. W. (2003). The antidepressant clomipramine regulates cortisol intracellular concentrations and glucocorticoid receptor expression in fibroblasts and rat primary neurones. *Neuropsychopharmacology*, 28(9), 1553-1561.
- Pariante, C. M., Kim, R. B., Makoff, A., & Kerwin, R. W. (2003). Antidepressant fluoxetine enhances glucocorticoid receptor function in vitro by modulating membrane steroid transporters. *Br J Pharmacol*, 139(6), 1111-1118.
- Pariante, C. M., Makoff, A., Lovestone, S., Feroli, S., Heyden, A., Miller, A. H., & Kerwin, R. W. (2001). Antidepressants enhance glucocorticoid receptor function in vitro by modulating the membrane steroid transporters. *Br J Pharmacol*, 134(6), 1335-1343.
- Pariante, C. M., & Miller, A. H. (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, 49(5), 391-404.
- Pariante, C. M., Pearce, B. D., Pisell, T. L., Owens, M. J., & Miller, A. H. (1997). Steroid-independent translocation of the glucocorticoid receptor by the antidepressant desipramine. *Mol Pharmacol*, 52(4), 571-581.
- Paykel, E. S., Brugha, T., & Fryers, T. (2005). Size and burden of depressive disorders in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol*, 15(4), 411-423.

- Pepin, M. C., Govindan, M. V., & Barden, N. (1992). Increased glucocorticoid receptor gene promoter activity after antidepressant treatment. *Mol Pharmacol*, 41(6), 1016-1022.
- Plotsky, P. M., Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1998). Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatr Clin North Am*, 21(2), 293-307.
- Pratt, W. B., & Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, 18(3), 306-360.
- Pryce, C. R. (2008). Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: inter-species and intra-species differences. *Brain Res Rev*, 57(2), 596-605.
- Purba, J. S., Hoogendijk, W. J., Hofman, M. A., & Swaab, D. F. (1996). Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry*, 53(2), 137-143.
- Raadsheer, F. C., Hoogendijk, W. J., Stam, F. C., Tilders, F. J., & Swaab, D. F. (1994). Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology*, 60(4), 436-444.
- Reynolds, P. D., Roveda, K. P., Tucker, J. A., Moore, C. M., Valentine, D. L., & Scammell, J. G. (1998). Glucocorticoid-resistant B-lymphoblast cell line derived from the Bolivian squirrel monkey (*Saimiri boliviensis boliviensis*). *Lab Anim Sci*, 48(4), 364-370.
- Reynolds, P. D., Ruan, Y., Smith, D. F., & Scammell, J. G. (1999). Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(2), 663-669.
- Riad, M., Mogos, M., Thangathurai, D., & Lumb, P. D. (2002). Steroids. *Curr Opin Crit Care*, 8(4), 281-284.
- Ribeiro, S. C., Tandon, R., Grunhaus, L., & Greden, J. F. (1993). The DST as a predictor of outcome in depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 150(11), 1618-1629.
- Riggs, D. L., Roberts, P. J., Chirillo, S. C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., Gaber, R., Picard, D., & Smith, D. F. (2003). The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J*, 22(5), 1158-1167.
- Rinne, T., de Kloet, E. R., Wouters, L., Goekoop, J. G., de Rijk, R. H., & van den Brink, W. (2003). Fluvoxamine reduces responsiveness of HPA axis in adult female BPD patients with a history of sustained childhood abuse. *Neuropsychopharmacology*, 28(1), 126-132.
- Robins, L. N., Wing, J., Wittchen, H. U., Helzer, J. E., Babor, T. F., Burke, J., Farmer, A., Jablenski, A., Pickens, R., Regier, D. A., & et al. (1988). The Composite International Diagnostic Interview. An epidemiologic instrument suitable for use in conjunction with different diagnostic systems and in different cultures. *Arch Gen Psychiatry*, 45(12), 1069-1077.
- Roy-Byrne, P. P., Uhde, T. W., Post, R. M., Gallucci, W., Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1986). The corticotropin-releasing hormone stimulation test in patients with panic disorder. *Am J Psychiatry*, 143(7), 896-899.
- Roy, A., Gorodetsky, E., Yuan, Q., Goldman, D., & Enoch, M. A. (2010). Interaction of FKBP5, a stress-related gene, with childhood trauma increases the risk for attempting suicide. *Neuropsychopharmacology*, 35(8), 1674-1683.
- Roy, A., Hodgkinson, C. A., Deluca, V., Goldman, D., & Enoch, M. A. (2012). Two HPA axis genes, CRHBP and FKBP5, interact with childhood trauma to increase the risk for suicidal behavior. *J Psychiatr Res*, 46(1), 72-79.

- Rubin, R. T., Poland, R. E., Lesser, I. M., Winston, R. A., & Blodgett, A. L. (1987). Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. I. Cortisol secretory dynamics in patients and matched controls. *Arch Gen Psychiatry*, 44(4), 328-336.
- Rybakowski, J. K., & Twardowska, K. (1999). The dexamethasone/corticotropin-releasing hormone test in depression in bipolar and unipolar affective illness. *J Psychiatr Res*, 33(5), 363-370.
- Sapolsky, R. M., & McEwen, B. S. (1985). Down-regulation of neural corticosterone receptors by corticosterone and dexamethasone. *Brain Res*, 339(1), 161-165.
- Sarapas, C., Cai, G., Bierer, L. M., Golier, J. A., Galea, S., Ising, M., Rein, T., Schmeidler, J., Muller-Myhsok, B., Uhr, M., Holsboer, F., Buxbaum, J. D., & Yehuda, R. (2011). Genetic markers for PTSD risk and resilience among survivors of the World Trade Center attacks. *Dis Markers*, 30(2-3), 101-110.
- Scammell, J. G., Denny, W. B., Valentine, D. L., & Smith, D. F. (2001). Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates. *Gen Comp Endocrinol*, 124(2), 152-165.
- Scharf, S. H., Liebl, C., Binder, E. B., Schmidt, M. V., & Muller, M. B. (2011). Expression and regulation of the Fkbp5 gene in the adult mouse brain. *PLoS One*, 6(2), e16883.
- Schiene-Fischer, C., & Yu, C. (2001). Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *FEBS Lett*, 495(1-2), 1-6.
- Schmid, W., Cole, T. J., Blendy, J. A., & Schutz, G. (1995). Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53(1-6), 33-35.
- Schmidt, U., Wochnik, G. M., Rosenhagen, M. C., Young, J. C., Hartl, F. U., Holsboer, F., & Rein, T. (2003). Essential role of the unusual DNA-binding motif of BAG-1 for inhibition of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 278(7), 4926-4931.
- Schreiber, W., Lauer, C. J., Krumrey, K., Holsboer, F., & Krieg, J. C. (1996). Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in panic disorder. *Neuropsychopharmacology*, 15(1), 7-15.
- Schule, C., Baghai, T., Goy, J., Bidlingmaier, M., Strasburger, C., & Laakmann, G. (2002). The influence of mirtazapine on anterior pituitary hormone secretion in healthy male subjects. *Psychopharmacology (Berl)*, 163(1), 95-101.
- Schule, C., Baghai, T., Rackwitz, C., & Laakmann, G. (2003). Influence of mirtazapine on urinary free cortisol excretion in depressed patients. *Psychiatry Res*, 120(3), 257-264.
- Schwanhauser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., & Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337-342.
- Segman, R. H., Shefi, N., Goltser-Dubner, T., Friedman, N., Kaminski, N., & Shalev, A. Y. (2005). Peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles identify emergent post-traumatic stress disorder among trauma survivors. *Mol Psychiatry*, 10(5), 500-513, 425.
- Sinars, C. R., Cheung-Flynn, J., Rimerman, R. A., Scammell, J. G., Smith, D. F., & Clardy, J. (2003). Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3), 868-873.
- Sousa, R. J., Tannery, N. H., & Lafer, E. M. (1989). In situ hybridization mapping of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain. *Mol Endocrinol*, 3(3), 481-494.
- Steckler, T., Holsboer, F., & Reul, J. M. (1999). Glucocorticoids and depression. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 13(4), 597-614.
- Stein, M. B., Jang, K. L., & Livesley, W. J. (2002). Heritability of social anxiety-related concerns and personality characteristics: a twin study. *J Nerv Ment Dis*, 190(4), 219-224.

- Storer, C. L., Dickey, C. A., Galigniana, M. D., Rein, T., & Cox, M. B. (2011). FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease. *Trends Endocrinol Metab*, 22(12), 481-490.
- Supriyanto, I., Sasada, T., Fukutake, M., Asano, M., Ueno, Y., Nagasaki, Y., Shirakawa, O., & Hishimoto, A. (2011). Association of FKBP5 gene haplotypes with completed suicide in the Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35(1), 252-256.
- Tatro, E. T., Everall, I. P., Kaul, M., & Achim, C. L. (2009). Modulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation in neurons by immunophilins FKBP51 and FKBP52: implications for major depressive disorder. *Brain Res*, 1286, 1-12.
- Touma, C., Gassen, N. C., Herrmann, L., Cheung-Flynn, J., Bull, D. R., Ionescu, I. A., Heinzmann, J. M., Knapman, A., Siebertz, A., Depping, A. M., Hartmann, J., Hausch, F., Schmidt, M. V., Holsboer, F., Ising, M., Cox, M. B., Schmidt, U., & Rein, T. (2011). FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. *Biol Psychiatry*, 70(10), 928-936.
- Trivedi, M. H., Rush, A. J., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Warden, D., Ritz, L., Norquist, G., Howland, R. H., Lebowitz, B., McGrath, P. J., Shores-Wilson, K., Biggs, M. M., Balasubramani, G. K., & Fava, M. (2006). Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*, 163(1), 28-40.
- True, W. R., Rice, J., Eisen, S. A., Heath, A. C., Goldberg, J., Lyons, M. J., & Nowak, J. (1993). A twin study of genetic and environmental contributions to liability for posttraumatic stress symptoms. *Arch Gen Psychiatry*, 50(4), 257-264.
- Tuller, T., Kupiec, M., & Ruppin, E. (2007). Determinants of protein abundance and translation efficiency in *S. cerevisiae*. *PLoS Comput Biol*, 3(12), e248.
- Umeda, T., Hiramatsu, R., Iwaoka, T., Shimada, T., Miura, F., & Sato, T. (1981). Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin Chim Acta*, 110(2-3), 245-253.
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., & Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*, 20(5), 515-524.
- van Zuiden, M., Geuze, E., Willemen, H. L., Vermetten, E., Maas, M., Heijnen, C. J., & Kavelaars, A. (2011). Pre-existing high glucocorticoid receptor number predicting development of posttraumatic stress symptoms after military deployment. *Am J Psychiatry*, 168(1), 89-96.
- Vedder, H., Bening-Abu-Shach, U., Lanquillon, S., & Krieg, J. C. (1999). Regulation of glucocorticoid receptor-mRNA in human blood cells by amitriptyline and dexamethasone. *J Psychiatr Res*, 33(4), 303-308.
- Velders, F. P., Kuningas, M., Kumari, M., Dekker, M. J., Uitterlinden, A. G., Kirschbaum, C., Hek, K., Hofman, A., Verhulst, F. C., Kivimaki, M., Van Duijn, C. M., Walker, B. R., & Tiemeier, H. (2011). Genetics of cortisol secretion and depressive symptoms: a candidate gene and genome wide association approach. *Psychoneuroendocrinology*, 36(7), 1053-1061.
- Vermeer, H., Hendriks-Stegeman, B. I., van der Burg, B., van Buul-Offers, S. C., & Jansen, M. (2003). Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(1), 277-284.
- Vermeer, H., Hendriks-Stegeman, B. I., van Suylekom, D., Rijkers, G. T., van Buul-Offers, S. C., & Jansen, M. (2004). An in vitro bioassay to determine individual sensitivity to glucocorticoids: induction of FKBP51 mRNA in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Cell Endocrinol*, 218(1-2), 49-55.

- Vogel, C., Abreu Rde, S., Ko, D., Le, S. Y., Shapiro, B. A., Burns, S. C., Sandhu, D., Boutz, D. R., Marcotte, E. M., & Penalva, L. O. (2010). Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol Syst Biol*, 6, 400.
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*, 13(4), 227-232.
- Vreeburg, S. A., Hoogendijk, W. J., van Pelt, J., Derijk, R. H., Verhagen, J. C., van Dyck, R., Smit, J. H., Zitman, F. G., & Penninx, B. W. (2009). Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. *Arch Gen Psychiatry*, 66(6), 617-626.
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., & Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, 7(8), 847-854.
- Westberry, J. M., Sadosky, P. W., Hubler, T. R., Gross, K. L., & Scammell, J. G. (2006). Glucocorticoid resistance in squirrel monkeys results from a combination of a transcriptionally incompetent glucocorticoid receptor and overexpression of the glucocorticoid receptor co-chaperone FKBP51. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 100(1-3), 34-41.
- Willour, V. L., Chen, H., Toolan, J., Belmonte, P., Cutler, D. J., Goes, F. S., Zandi, P. P., Lee, R. S., MacKinnon, D. F., Mondimore, F. M., Schweizer, B., DePaulo, J. R., Jr., Gershon, E. S., McMahon, F. J., & Potash, J. B. (2009). Family-based association of FKBP5 in bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 14(3), 261-268.
- Wohnik, G. M., Ruegg, J., Abel, G. A., Schmidt, U., Holsboer, F., & Rein, T. (2005). FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem*, 280(6), 4609-4616.
- Woodruff, P. G., Boushey, H. A., Dolganov, G. M., Barker, C. S., Yang, Y. H., Donnelly, S., Ellwanger, A., Sidhu, S. S., Dao-Pick, T. P., Pantoja, C., Erle, D. J., Yamamoto, K. R., & Fahy, J. V. (2007). Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(40), 15858-15863.
- Xie, P., Kranzler, H. R., Poling, J., Stein, M. B., Anton, R. F., Farrer, L. A., & Gelernter, J. (2010). Interaction of FKBP5 with childhood adversity on risk for post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*, 35(8), 1684-1692.
- Yagil, G. (1975). Quantitative aspects of protein induction. *Curr Top Cell Regul*, 9, 183-236.
- Yehuda, R., Cai, G., Golier, J. A., Sarapas, C., Galea, S., Ising, M., Rein, T., Schmeidler, J., Muller-Myhsok, B., Holsboer, F., & Buxbaum, J. D. (2009). Gene expression patterns associated with posttraumatic stress disorder following exposure to the World Trade Center attacks. *Biol Psychiatry*, 66(7), 708-711.
- Yehuda, R., Golier, J. A., Yang, R. K., & Tischler, L. (2004). Enhanced sensitivity to glucocorticoids in peripheral mononuclear leukocytes in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 55(11), 1110-1116.
- Zimmermann, P., Bruckl, T., Lieb, R., Nocon, A., Ising, M., Beesdo, K., & Wittchen, H. U. (2008). The interplay of familial depression liability and adverse events in predicting the first onset of depression during a 10-year follow-up. *Biol Psychiatry*, 63(4), 406-414.
- Zimmermann, P., Bruckl, T., Nocon, A., Pfister, H., Binder, E. B., Uhr, M., Lieb, R., Moffitt, T. E., Caspi, A., Holsboer, F., & Ising, M. (2011). Interaction of FKBP5 gene variants and adverse life events in predicting depression onset: results from a 10-year prospective community study. *Am J Psychiatry*, 168(10), 1107-1116.

- Zobel, A., Schuhmacher, A., Jessen, F., Hofels, S., von Widdern, O., Metten, M., Pfeiffer, U., Hanses, C., Becker, T., Rietschel, M., Scheef, L., Block, W., Schild, H. H., Maier, W., & Schwab, S. G. (2010). DNA sequence variants of the FKBP5 gene are associated with unipolar depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13(5), 649-660.
- Zobel, A. W., Nickel, T., Sonntag, A., Uhr, M., Holsboer, F., & Ising, M. (2001). Cortisol response in the combined dexamethasone/CRH test as predictor of relapse in patients with remitted depression. a prospective study. *J Psychiatr Res*, 35(2), 83-94.
- Zobel, A. W., Yassouridis, A., Frieboes, R. M., & Holsboer, F. (1999). Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression. *Am J Psychiatry*, 156(6), 949-951.