

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Deckert**

**DNA-Methylierung und Genexpression von *FKPB5* als Teil des  
Stresshormonsystems bei von Depressionen und Herzinsuffizienz Betroffenen  
sowie gesunden Kontrollen**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Felix Marcel Das (geb. Nitschke)  
aus Würzburg**

**Würzburg, Januar 2024**



Referent: Professor Dr. med. Jürgen Deckert  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Beyersdorf  
Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2024

Der Promovend ist Arzt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSEN-NEBENNIERENRINDEN-ACHSE .....	1
1.1.1 Grundlagen .....	1
1.1.2 Die Rolle der HPA-Achse in der Pathogenese der Depression .....	2
Klinische Symptomatik und Epidemiologie der Depression .....	2
GR-Resistenz Theorie der Depression und Dexamethasontest .....	3
1.1.3 Die Rolle der HPA-Achse in der Pathogenese der Herzinsuffizienz.....	6
Definition, Klassifikation, Schweregradeinteilung, Epidemiologie, diagnostische Kriterien und Ursachen der Herzinsuffizienz .....	6
Bidirektionaler Zusammenhang von Herzinsuffizienz und Depression.....	7
1.2 FKBP5.....	10
1.2.1 Grundlagen und Proteinfunktion .....	10
1.2.3 FKBP5 und Depression .....	13
1.2.3 FKBP5 und Herzinsuffizienz .....	15
1.3 FRAGESTELLUNGEN.....	17
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
2.1 MATERIAL.....	18
2.1.1 Chemikalien und Produkte .....	18
2.1.2 Lösungen und Puffer .....	18
2.1.3 Kitsysteme.....	19
2.1.4 Laborbedarf und Verbrauchsgegenstände .....	19
2.1.5 Geräte .....	20
2.1.6 Software.....	21
2.2 METHODEN.....	22
2.2.1 Studiendesgin und Studienablauf .....	22
Ethikvotum .....	25
Kohorten der Studienpatienten.....	25
2.2.2 Psychometrie .....	26
2.2.3 Bestimmung kardiologischer Parameter .....	27
2.2.4 Durchführung mDST, Gewinnung und Verarbeitung der Blutproben .....	27
2.2.5 Übersicht der laborexperimentellen Schritte .....	29
2.2.6 Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung .....	29
Theoretischer Hintergrund .....	29
Bisulfitkonversion .....	31
Primer-Design .....	32
Polymerase Kettenreaktion .....	34
Agarosegel-Elektrophorese .....	35
Pyrosequenzierung .....	36
Qualitätskontrolle.....	37
2.2.7 Expressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....	38
Theoretischer Hintergrund .....	38
cDNA-Synthese .....	40
Primer-Design und Vorarbeit der Arbeitsgruppe.....	40
Durchführung der qPCR.....	42
Datenaufbereitung und Berechnung der CNRQ .....	42
Qualitätskontrolle.....	43
2.2.8 Genotypisierung von rs1360780 .....	44
2.2.9 Statistische Auswertung .....	45

### **3 ERGEBNISSE ..... 49**

3.1 FKBP5 UND HERZINSUFFIZIENZ .....	49
3.1.1 Deskriptive Statistik der Kohorten .....	49
3.1.2 Baselinemethylierung .....	50
3.1.3 Änderung der Methylierung durch mDST .....	51
3.1.4 Änderung der mRNA-Expression durch mDST.....	53
3.2 FKBP5 UND DEPRESSION VS. GESUNDE KONTROLLEN .....	54
3.2.1 Deskriptive Statistik der Kohorten .....	54
3.2.2 Änderung der mRNA-Expression durch mDST.....	55
3.3 FKBP5 UND DEPRESSION .....	56
3.3.1 Deskriptive Statistik der Kohorte .....	56
3.3.2 Genotyp .....	58
3.3.3 Therapieansprechen .....	59
Methylierung .....	60
mRNA-Expression .....	64
Regressionsanalyse.....	66
3.3.4 Korrelationen .....	66
Herzinsuffizienz .....	66
Depression.....	68

### **4 DISKUSSION ..... 73**

4.1 EINORDNUNG DER ERGEBNISSE .....	73
4.1.1 FKBP5 und Herzinsuffizienz .....	73
4.1.2 FKBP5 und Depression .....	75
Vergleich der mRNA-Expression bei Depressiven und Gesunden .....	75
rs1360780 Genotyp .....	76
FKBP5 als Biomarker für das Therapieansprechen .....	77
4.2 ALLGEMEINE LIMITATIONEN .....	82
4.2.1. Zusammensetzung der Gruppen .....	82
Alter .....	82
Geschlecht .....	84
4.2.2 Fallzahl.....	84
4.2.3 Fehlende Werte.....	85
4.2.4 Naturalistisches Studiendesign .....	86
4.2.5 Untersuchtetes Gewebe .....	87
4.3 AUSBLICK.....	88

### **5 ZUSAMMENFASSUNG ..... 89**

### **6 LITERATURVERZEICHNIS ..... 91**

## **APPENDIX**

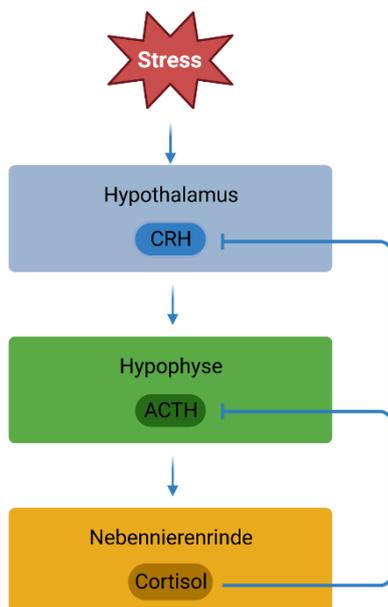
I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS
III TABELLENVERZEICHNIS
IV DANKSAGUNG
V EIGENE PUBLIKATIONEN/KONGRESSTEILNAHMEN

# 1 Einleitung

## 1.1 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

### 1.1.1 Grundlagen

„Stress“ ist vereinfacht gesagt im beruflichen wie privaten Kontext ein Begriff, der eine besondere Belastung, nämlich über das Alltägliche hinaus, zum Ausdruck bringt. Im biologischen Kontext kann er im weitesten Sinne als die Konfrontation mit herausfordernden Umweltfaktoren bezeichnet werden, die es erforderlich macht die biochemischen Prozesse eines Organismus schnell auf diese einzustellen. Dem Menschen stehen zu diesem Zweck im Wesentlichen zwei Wege zur Verfügung: Das vegetative Nervensystem mit Sympathikus und Parasympathikus sowie die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse ist dabei die gängige Bezeichnung des englischen Fachbegriffs: Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Axis). Ersteres beeinflusst über die Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin sowie das Hormon Adrenalin unter anderem die Durchblutung, Atmung, Herzfähigkeit und den Kreislauf. Die HPA-Achse wiederum, deren Endprodukt Cortisol darstellt,



**Abbildung 1: HPA-Achse.** Erstellt mit BioRender.com

sichert durch Anpassung des Glucose- und Fettstoffwechsels die Bereitstellung von Energie in der erwarteten Krisensituation. Außerdem erfolgte eine Suppression des zellulären und humoralen Immunsystems sowie eine Verstärkung der Adrenalin- und Noradrenalin-Wirkung. Darüber hinaus ermöglicht die zirkadiane Hormonausschüttung im Hypothalamus eine Anpassung der Stoffwechsellage an tageszeitliche Gegebenheiten. Um eine Regulation und zeitnahe Beendigung der Stressreaktion zu gewährleisten, unterliegt auch die HPA-Achse einem negativen Rückkopplungsmechanismus, wie Abbildung 1 zeigt (Geckle et al., 2010;

Holsboer & Barden, 1996; Spencer & Deak, 2017). Ausgelöst durch eine Stressexposition wird im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus die Ausschüttung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) gesteigert, das nach Weitertransport über den Hypophysenstiel die Bildung von Adrenocorticotropin (ACTH) in der

Adenohypophyse stimuliert. Dieses wiederum induziert nach Ausschüttung ins Blut die Bildung von Cortisol in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Die anschließende negative Rückkopplung umfasst sowohl eine Hemmung der CRH-Expression als auch eine Reduktion der ACTH-Sekretion (Geckle et al., 2010).

Das FK506-Binding-Protein-(FKBP)5 nimmt innerhalb der HPA-Achse durch die Beeinflussung der Sensitivität des Glukokortikoidrezeptors (GR) eine zentrale Rolle ein, auf die später ausführlich eingegangen wird. Zusammenfassend bewirkt dessen inhibitorischer Effekt am GR sowohl eine Veränderung der Wirkung von Cortisol an seinen Zielorganen als auch der negativen Rückkopplung innerhalb der HPA-Achse selbst. Dies bildet eine der Grundlagen für die mit einer Dysregulation der HPA-Achse assoziierten Erkrankungen, auf die im Weiteren eingegangen werden soll (Fries et al., 2017).

### 1.1.2 Die Rolle der HPA-Achse in der Pathogenese der Depression

#### *Klinische Symptomatik und Epidemiologie der Depression*

Das depressive Syndrom ist charakterisiert durch ein Vorhandensein der Hauptsymptome: Freud-/Interessenlosigkeit, gedrückte Stimmung und Antriebsdefizit. Gleichzeitig existieren eine Reihe von Zusatzsymptomen auf kognitiver (Konzentrationsstörungen, Selbstzweifel und Schuldgefühle), vegetativer (Schlafstörungen, Appetitstörungen) und psychomotorischer Ebene (Agitation oder Hemmung), deren Konstellation und Ausprägung sich zwischen den Betroffenen teilweise erheblich unterscheidet. Depressive Erkrankungsbilder besitzen daher eine Vielzahl möglicher Erscheinungsformen (BfArM et al., 2022). Dabei stellt die Suizidalität das in der klinischen Praxis gefürchtetste Symptom dar. Das Statistische Bundesamt in Deutschland verzeichnete 2021 9215 Tode durch Suizid, von denen je nach Quelle etwa die Hälfte auf Depressionen zurückzuführen sind (Holma et al., 2014; Lönnqvist, 2000; Statistisches Bundesamt, 2021; Wulsin et al., 1999).

Mittels des Klassifikationssystems der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten (ICD) der WHO, deren 10. Revision zum Zeitpunkt der Datenerhebung dieser Arbeit die in Deutschland gültige Version darstellte, erfolgt nach Erfüllung eines Zeitkriteriums von zwei Wochen die Diagnose einer depressiven Episode. Auch eine Schweregradeinteilung der Episoden in leicht, mittel und schwer, je nach Ausprägung der oben aufgeführten Symptome, ist anhand der ICD-10 möglich. Abschließend liefert

der Längsschnitt des Erkrankungsverlaufs Informationen zur Zuordnung und Kodierung des exakten Erkrankungsbildes. So treten depressive Episoden im Rahmen unipolarer Depressionen einzeln oder rezidivierend auf, sind aber auch Bestandteil der Bipolaren Erkrankung (BfArM et al., 2022; Möller et al., 2015).

Der Einfluss von Depressionen auf die Gesundheit der Bevölkerung spiegelt sich auch im Global Burden of Disease Report von 2019 wider. Weltweit nehmen depressive Erkrankungen den 13. Rang in der Verursachung von Disability-adjusted-Life-Years ein (GBD 2019 Mental Disorders Collaborators, 2020). Sie liefern hier nicht nur den größten Beitrag aller psychischen Erkrankungen, sondern gewannen im Vergleich zu Rang 19 im Jahr 1990 weiter weltweit an Relevanz. In den Industrienationen, in denen Infektionskrankheiten eine eher untergeordnete Rolle spielen, ist ihr Anteil an der Krankheitslast der Bevölkerung ungleich höher (GBD 2019 Mental Disorders Collaborators, 2022). Die Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland erfasste in den Jahren 2008-2011 eine 12-Monatsprävalenz für das Vorliegen einer diagnostizierten Depression von 6% entsprechend knapp 5 Millionen Erkrankten jährlich sowie eine Lebenszeitprävalenz von 11,6% im Alter zwischen 18 bis 79 Jahren (Busch et al., 2013). Obwohl die Autoren in dieser Studie im Vergleich zur vorherigen Untersuchung im Rahmen des Bundesgesundheitsurvey 1998 gleichbleibende Prävalenzen beobachteten, weisen neuere Daten aus der vertragsärztlichen Abrechnung auf eine Zunahme der Diagnoseprävalenz um über 20% zwischen 2009 und 2017 hin, wobei hier alle Altersgruppen berücksichtigt wurden (Steffen et al., 2019).

#### *GR-Resistenz Theorie der Depression und Dexamethasontest*

Psychosoziale Untersuchungen in den 1970 Jahren lieferten erste Hinweise für den Einfluss von Stress auf die Entstehung von Depressionen (Brown & Harris, 1978; Palazidou, 2012). Zeitgleich konnten Veränderungen der HPA-Achse auf unterschiedlichen Ebenen beobachtet werden, die eine neurobiologische Grundlage für diese Verknüpfung zur Verfügung stellen. Neben einem erhöhten Cortisolspiegel im Urin sowie Liquor depressiv Erkrankter zeigte sich auch eine verminderte Suppression der ACTH- und Cortisol-Ausschüttung nach Gabe von Dexamethason als Hinweis auf eine Dysregulation des negativen Feedbackmechanismus der HPA-Achse (Carroll, 1980; Carroll & Curtis, 1976; Carroll, Curtis, Davies, et al., 1976; Carroll, Curtis, & Mendels, 1976; Carroll et al., 1968). Bei normwertiger Funktion dieser bedingt die Einnahme des hochaffinen GR-Liganden Dexamethason eine Reduktion der CRH-Expression sowie

ACTH-Sekretion. Die Anwendung eines Suppressionstest erlaubt hierbei eine bessere Beurteilbarkeit der Regulation und negativen Rückkopplung innerhalb der HPA-Achse, da durch die pulsatile Abgabe von CRH im Rahmen des zirkadianen Rhythmus die Serumspiegel von ACTH und Cortisol im Tagesverlauf schwanken (Geckle et al., 2010). Der Dexamethasontest (DST) stellt damit ein sowohl in der klinischen Praxis als auch Forschung gut etabliertes, für die ProbandInnen sicher anwendbares Verfahren zur medikamentösen Simulation von Stress und dessen Einfluss auf die HPA-Achse dar (Menke et al., 2016; Menke et al., 2014; Menke et al., 2012).

Pariante und KollegInnen erklärten die Dysregulation der HPA-Achse mit konsekutiver Glukokortikoidrezeptorresistenz bei Depressionen zu einem der robustesten Befunde der biologischen Psychiatrie (Pariante & Lightman, 2008; Pariante & Miller, 2001). Neben den bisher beschriebenen Auffälligkeiten auf hormoneller Ebene konnten im Weiteren auch strukturelle Alterationen in Form einer Größenzunahme der Hypophyse und Nebennierenrinde nachgewiesen werden (Gold et al., 1988; Holsboer & Barden, 1996; Nemeroff, 1996; Owens & Nemeroff, 1993). Darüber hinaus fanden Holsboer und Barden bereits 1996 Hinweise für genetische Varianten innerhalb der HPA-Achse, die eine erhöhte Anfälligkeit für Depressionen widerspiegeln (Holsboer & Barden, 1996). So reagieren Gesunde mit hoher familiärer Belastung für Depressionen in einem kombinierten Dexamethason/CRH-Test parallel zu depressiven Personen mit einer ebenfalls reduzierten Suppression von Cortisol und ACTH, wobei das Ausmaß des Effektes hinter dem der bereits klinisch an Depressionen Erkrankter zurückbleibt.

Die Unterschiede in der Stresshormonachse zwischen Gesunden und an Depressionen Erkrankten liefern wichtige Hinweise zur Differenzierung dieser beiden Gruppen und wurden seit Jahrzehnten als mögliche Biomarker der Depression diskutiert (Carroll & Curtis, 1976). Für die klinische Symptomausprägung ist aber auch der Effekt von Cortisol auf seine Zielstrukturen entscheidend. Besonders relevant ist hier die Assoziation von Hypercortisolismus und gesteigerter Inflammation, beispielsweise abgebildet durch die Konzentration von C-reaktivem Protein (CRP) im Serum, die wiederholt bei depressiven ProbandInnen repliziert werden konnte (Carroll & Curtis, 1976; Osimo et al., 2019; Osimo et al., 2020). Hierfür könnte einerseits eine auf die chronisch erhöhten Cortisolspiegel folgende Glukokortikoidrezeptorresistenz der Immunzellen, allen voran der Monozyten, verantwortlich sein (Amasi-Hartoonian et al., 2022; Weber et al., 2017). Andererseits legen weitere Studienergebnisse auf Basis einer gesteigerter HPA-Achsenaktivität eine gestörte Reaktion auf bestimmte Stressoren und eine in der Folge durch Cortisol selbst

vermittelte Zunahme proinflammatorischer Prozesse nahe (Munhoz et al., 2006; Munhoz et al., 2010). Beiden Modellen gemeinsam ist der Verlust der antiinflammatorischen Funktion von Cortisol in Verbindung mit einer Dysregulation der HPA-Achse im Rahmen der depressiven Erkrankung (Amasi-Hartoonian et al., 2022).

Zusammenfassend stellt die Hypothese einer fehlgeleiteten HPA-Achsen-Überaktivität mit gestörter negativer Rückkopplung und konsekutiver Glukokortikoidrezeptorresistenz, neben der mittlerweile vielfach modifizierten Monoamin-Mangel-Hypothese, eine wesentliche Säule der Pathophysiologie depressiver Erkrankungen dar (de Kloet et al., 2005; Holsboer, 2000; Massart et al., 2012; Pariante & Miller, 2001; Perez-Caballero et al., 2019; Pitsillou et al., 2020).

Erklärungsmodelle auf Basis eines Neurotransmittermangels scheiterten lange daran den verzögerten Wirkbeginn von Antidepressiva zu erklären. Ein möglicher Effekt der Medikation auf die HPA-Achse könnte diese Erklärungslücke schließen. Von Bedeutung ist hier zunächst die wiederholt replizierte Tatsache, dass nach Abklingen der Depression die endokrinologischen Dysbalancen ebenfalls zur Normalität zurückkehren (Holsboer, 2000; Ising et al., 2007; Nemeroff, 1996; Wodarz et al., 1992).

Den Effekt von Antidepressiva auf das neuroendokrine System teilen Holsboer und Barden nach dessen zeitlichem Eintreten auf. Unmittelbar nach Einnahme verschiedener Antidepressiva (Desipramin, Clomipramin, Venlafaxin) konnte eine Aktivierung der HPA-Achse mit gesteigerter Cortisol-Ausschüttung beobachtet werden (Holsboer & Barden, 1996). Nach längerfristiger Einnahme allerdings, stellte sich eine zunehmende Suppression der vormals im Rahmen der Depression gesteigerten HPA-Achsenaktivität ein. Als Hinweis für einen durch die Antidepressiva selbst verursachten Effekt diente hier der Vergleich zu einer äquivalent kranken, aber medikamentenfreien Gruppe. Dabei werden sowohl eine Modifikation der GR-Funktion als auch eine gesteigerte GR-mRNA- und Proteinexpression durch die antidepressive Medikation als erster Dominostein einer sich in der Folge erneut ausbalancierenden HPA-Achse diskutiert (Holsboer & Barden, 1996; Pariante & Miller, 2001). Besonders bemerkenswert ist dabei die von Reul et al. im Tiermodell beobachtete anhaltende Suppression der HPA-Achse auch bei Stressexposition, gleichbedeutend einer gesteigerten neuroendokrinen Stressresistenz, unter einer Medikation mit Amitriptylin (Reul et al., 1993).

Bisher wurde die Rolle der HPA-Achse für stressinduzierte psychische Erkrankungen ausführlich diskutiert. Im folgenden Kapitel soll nun eine mögliche Assoziation zur

Herzinsuffizienz beleuchtet werden, einer somatischen Erkrankung für deren Genese die Stresshormonsysteme des Körpers ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen.

### 1.1.3 Die Rolle der HPA-Achse in der Pathogenese der Herzinsuffizienz

*Definition, Klassifikation, Schweregradeinteilung, Epidemiologie, diagnostische Kriterien und Ursachen der Herzinsuffizienz*

Der Nationalen Versorgungsleitlinie chronische Herzinsuffizienz folgend, ist diese durch die Unfähigkeit des Herzens den Organismus mit ausreichend Blut und Sauerstoff zu versorgen definiert (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019). Die rein auf der Pumpfunktion basierende Definition wurde für die Diagnosestellung mittlerweile verlassen und um weitere Komponenten ergänzt. Klinisch resultiert ein typischer Symptomkomplex aus Dyspnoe, Müdigkeit, Leistungsschwäche sowie einer eventuellen Flüssigkeitsretention. Unter Berücksichtigung der Linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) kann klinisch eine Einteilung in drei Gruppen erfolgen, wie Tabelle 1 zeigt.

**Tabelle 1: Einteilung der Herzinsuffizienz.** LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion. (Ponikowski et al., 2016)

<b>Art der Herzinsuffizienz</b>	<b>LVEF</b>
Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (HF <sub>r</sub> EF)	< 40%
Herzinsuffizienz mit geringgradig eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (HF <sub>mr</sub> EF)	40-49%
Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (HF <sub>p</sub> EF)	≥ 50%

Darüber hinaus ist die Schweregradeinteilung nach der New York Heart Association international etabliert. Entsprechend der Reduktion der Leistungsfähigkeit findet eine Klassifikation in vier Stufen, von I = asymptomatisch bis IV = Beschwerden bereits in Ruhe, statt (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019).

Die enorme Bedeutung der Herzinsuffizienz als Volkskrankheit verdeutlicht u.a., dass nach einer Versorgungsstudie im deutschen Herzbericht 2020 keine andere Erkrankung im Jahr 2019 zu mehr stationären Krankenhauseinweisungen führte. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung ist darüber hinaus eine schrittweise Zunahme der jährlichen Fallzahlen zu beobachten (Fleck et al., 2021). Unter den zum Tode führenden Erkrankungen der deutschen Bevölkerung rangiert die Herzinsuffizienz bei Männern auf

Rang neun, bei Frauen sogar auf Rang vier (Statistisches Bundesamt, 2021). Bezüglich Prävalenz und Inzidenz besteht eine klare Altersabhängigkeit, wobei Frauen bei insgesamt ausgeglichener Geschlechterverteilung tendenziell später erkranken (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019). Eine Würzburger Studie aus dem Jahr 2008 stellt diesbezüglich fest, dass Männer in der Gruppe von Patienten mit reduzierter LVEF überrepräsentiert sind (Störk et al., 2008).

Die in der Leitlinie empfohlene Diagnostik sieht ein gestuftes Vorgehen zur Diagnosesicherung vor. Bei diesem erfolgt, ausgehend von den typischen Symptomen, die Suche nach klinischen Zeichen der Herzinsuffizienz. Anschließend werden mittels Labordiagnostik und EKG relevante Differentialdiagnosen ausgeschlossen. Besonders die natriuretischen Peptide BNP/ NT-proBNP fungieren hier als negative prädiktive Marker. Erhärtet sich der Verdacht auf das Vorliegen einer Herzinsuffizienz, erfolgt mittels Echokardiografie die Sicherung einer systolischen/diastolischen Funktionsstörung des Herzens und damit die Diagnosestellung. Neben der Erfassung möglicher Komorbiditäten und prognosebestimmender Faktoren, wie beispielsweise dem Raucherstatus, wird insbesondere Wert auf eine Erfassung depressiver Beschwerden gelegt, für deren standardisierte Erhebung eine eigene Soll-Empfehlung in der Leitlinie existiert (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019).

Im Wesentlichen stellen sich die Koronare Herzkrankheit und die arterielle Hypertonie, häufig in Kombination, als ursächlich für die Entstehung der Herzinsuffizienz dar. Pathophysiologisch bedingen diese durch einen Myokardschaden meist eine Einschränkung der LVEF, wohingegen die genaue Genese der Herzinsuffizienz mit erhaltener LVEF heterogener und noch nicht abschließend geklärt ist. Eine besondere Rolle der chronischen Komorbiditäten wie Diabetes Mellitus, aber auch eine anhaltende Inflammation, werden hier diskutiert. Abseits dieser beiden existiert eine Vielzahl seltener Erkrankungen (beispielsweise Infektionen, strukturelle Herzerkrankungen aber auch Alkoholabhängigkeit), die für die verbleibenden Fälle verantwortlich sind (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019).

#### *Bidirektionaler Zusammenhang von Herzinsuffizienz und Depression*

Vor einer Beleuchtung der möglichen Pathomechanismen der Herzinsuffizienz soll zunächst auf die umfangreiche Evidenz für einen bidirektionalen Zusammenhang beider Erkrankungen eingegangen werden. So besteht einerseits eine um den Faktor 2-3

gesteigerte Prävalenz für das Auftreten einer Depression bei an Herzinsuffizienz Erkrankter, andererseits konnte auch gezeigt werden, dass das Vorhandensein einer depressiven Episode die Wahrscheinlichkeit eine Herzinsuffizienz zu entwickeln erhöht (Freedland et al., 2003; Guck et al., 2003; Gustad et al., 2014). Das komorbide Vorhandensein beider Erkrankungen mündet dann in einen schlechteren Erkrankungsverlauf der Herzinsuffizienz mit häufigeren Krankenhauseinweisungen, reduzierter Lebensqualität und Zunahme der Mortalität. Mit zunehmender Erkrankungsschwere der Herzinsuffizienz steigt schließlich auch die Prävalenz für Depressionen und deren Symptomausprägung weiter an. (Angermann et al., 2011; Chaudhry et al., 2013; Freedland et al., 2016; Guck et al., 2003; Kato et al., 2012; Moser et al., 2005; Rutledge et al., 2006).

Neben der Herzinsuffizienz selbst zeigen sich auch kardiovaskuläre Erkrankungen, meist die Vorstufe bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz, deutlich häufiger bei Menschen mit psychischen Erkrankungen, wie Depression und Bipolarer Erkrankung (Daskalopoulou et al., 2016; Nielsen et al., 2021; Warriach et al., 2022).

Unter Berücksichtigung der häufigen klinischen Komorbidität von Depression und Herzinsuffizienz, scheint die Annahme gemeinsamer zugrundeliegender Ursachen naheliegend. Als mögliche Pathomechanismen sind daher u.a. das Stresshormonsystem der HPA-Achse sowie eine chronische Inflammation mit erhöhten Zytokinpiegeln vielversprechend (Ghosh et al., 2016). Im Rahmen der bereits geschilderten Stressreaktion kommt es bei Depressionen zu einer Aktivierung der HPA-Achse. Hält diese aufgrund der gestörten negativen Feedbackschleifen länger an, stellt sich im Verlauf eine GR-Resistenz bei gleichzeitig vorliegendem Hypercortisolismus ein. Cortisol wirkt dann nicht mehr exklusiv am GR, sondern entfaltet zusätzlich eine Mineralocortikoidwirkung. Diese wiederum führt über Flüssigkeitsretention und kardialen Remodelling zu einer Verschlechterung der Herzleistung. Die erhöhten Cortisolspiegel nehmen außerdem negativen Einfluss auf den Stoffwechsel. Durch Hyperglykämien und Bluthochdruck kommt es so zur Zunahme kardiovaskulärer Erkrankungen. Zuletzt bewirkt der Hypercortisolismus eine Favorisierung proinflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) und Interleukin 6, welche ebenfalls mit einem kardialen Remodelling und reduzierter Herzleistung in Verbindung gebracht werden (Kop et al., 2011). Auch in einem aktuellen Review von Warriach et al. auf Basis klinischer Studien der Jahre 2019-2020 werden die gleichen Veränderungen der HPA-Achse, nämlich erhöhte Cortisolspiegel und in der Folge

eintretende Hyperglykämie sowie einer Überexpression proinflammatorischer Cytokine, mit dem deutlich häufigeren Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen bei Depressionen assoziiert (Warriach et al., 2022). Einen weiteren pathomechanistischen Kandidaten stellt das VNS dar. So konnte dessen Überaktivierung mit folgender Hypertension und erhöhter Herzfrequenz sowohl bei Depressionen als auch Herzinsuffizienz belegt werden (Kop et al., 2011; Nemeroff & Goldschmidt-Clermont, 2012; Parati & Esler, 2012).

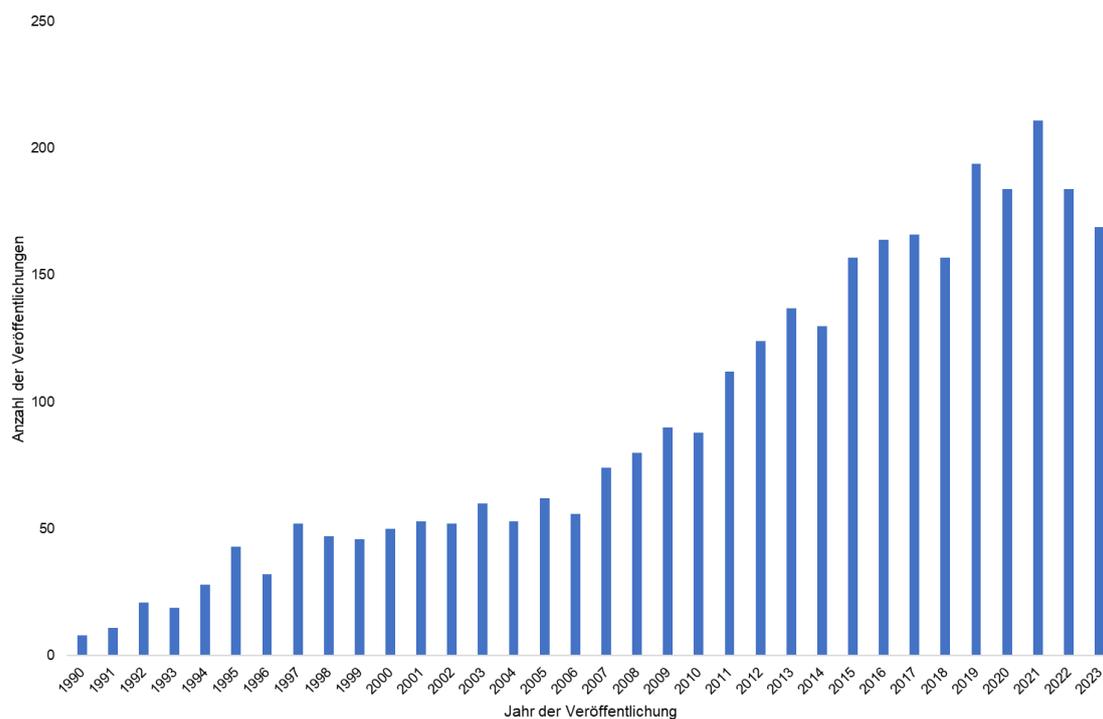
Die geschilderten Interaktionen verdeutlichen die hohe klinische Relevanz einer Behandlung depressiver Symptome bei Menschen mit Herzinsuffizienz. Allerdings belegen bereits mehrere randomisiert kontrollierte Studien eine unzureichende Wirkung von Selektiven Serotonin Wiederaufnahmehemmern (SSRI) auf die depressive Symptomatik bei PatientInnen mit Herzinsuffizienz. Gleichzeitig sind andere Antidepressiva aufgrund potenzieller Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme (Mirtazapin) und Herzrhythmusstörungen (Trizyklische Antidepressiva) deutlich weniger für eine Therapie bei Herzinsuffizienz geeignet (Ghosh et al., 2016; Zambrano et al., 2020). Gerade die Schwierigkeiten und Komplikationen durch die gegenwärtig verfügbaren antidepressiven Therapien, die bei komorbider Herzinsuffizienz entstehen, machen die Suche nach neuen zielgerichteten therapeutischen Ansätzen, zum Beispiel durch Besserung der HPA-Achsen Dysregulation oder Modulation der Inflammation, besonders relevant.

Bereits kurz nach der Entdeckung der Relevanz der HPA-Achse für die Pathogenese der Depression richtete sich das Forschungsinteresse schnell auf die Identifizierung der zugrundeliegenden Pathomechanismen innerhalb dieser. Dabei konnte *FKBP5* in seiner zentralen Funktion bei der Regulation der GR-Sensitivität bereits früh als Risikogen ausgemacht werden (Binder, 2009; Binder et al., 2004; Denny et al., 2000; Grad & Picard, 2007; Scammell et al., 2001; Westberry et al., 2006). Eine zusätzliche Rolle der HPA-Achse bei der Entstehung der Herzinsuffizienz rückt somit auch *FKBP5* als Bindeglied zwischen beiden Erkrankungen in den Fokus, worauf im folgenden Kapitel eingegangen werden soll.

## 1.2 FKBP5

### 1.2.1 Grundlagen und Proteinfunktion

Das 154.998 Basenpaare umfassende Gen *FKBP5* mit seinen dreizehn Exons und zwölf Introns befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (Cunningham et al., 2022; Pellemounter et al., 2011). Nachdem durch Splicing im Rahmen der Transkription die Introns herausgeschnitten wurden, erfolgt der Transport der insgesamt vier möglichen Transkripte aus dem Zellkern. Durch Translation entsteht schließlich das FK506-Binding-Protein-(FKBP)5, aufgrund seines Molekulargewichtes von 51kDa auch als FKBP51 bezeichnet. Wie Fries et al. in ihrem Review bereits 2017 aufführen, erfreut sich FKBP5 seit seiner Entdeckung 1990 immer größerem Forschungsinteresse, was sich anhand der jährlichen Veröffentlichungen in Abbildung 2 veranschaulichen lässt (Fries et al., 2017; Smith et al., 1990).



**Abbildung 2: PubMed Suchergebnisse für FKBP5: (FKBP5) OR (FKBP51) OR (FKBP54) OR (FKBP prolyl isomerase 5) OR (P54) zwischen 1990 und 2023. Letzte Suche: 28.10.2023.**

Als Peptidyl-Prolyl-Isomerase katalysiert FKBP5 die Konformationsänderung zwischen den Cis- und Trans-Isomeren an der Peptidbindung der Aminosäure Prolin (Fischer & Schmid, 1990). Biochemisch liegt seine Hauptfunktion als Co-Chaperon damit in der Unterstützung der Proteinfaltung durch die Chaperone. Auf zellulärer Ebene erfüllt es so unterschiedlichste Aufgaben. Zu den Wichtigsten, auch im Zusammenhang mit dieser Arbeit, gehört dabei die inhibitorische Wirkung von FKBP5 auf den

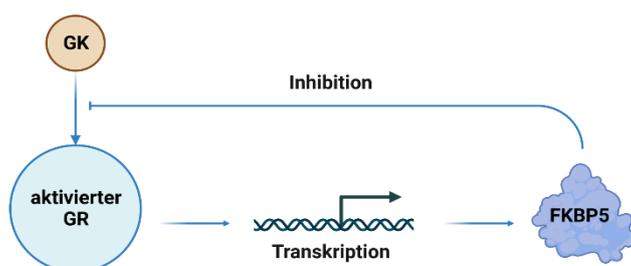
Glukokortikoidrezeptor (Fries et al., 2017). Nach Bindung an das Chaperon Heat-Shock-Protein90, welches wiederum selbst den GR bindet, erschwert FKBP5 die Ligandenbindung im aktiven Zentrum des GR und in der Folge dessen Aktivierung und Verlagerung in den Zellkern (Baischew et al., 2023; Denny et al., 2000; Wochnik et al., 2005). Darüber hinaus nimmt FKBP5 durch Interaktionen mit dem Nuclear Factor kappa-light-Chain-Enhancer of activated B cells-(NF-κB)-System Einfluss auf das Immunsystem und die Produktion inflammatorischer Zytokine (Bekhat et al., 2017). Weitere Funktionsbereiche von FKBP5 stellen Wechselwirkungen mit dem für Wachstum, Zellproliferation und Zellzyklus zentralen Proteinkinase B - Pathway, eine Beteiligung in den regulatorischen Prozessen der zellulären Autophagie sowie die Stabilisierung von Mikrotubuli dar (Galigniana et al., 2022; Jinwal et al., 2010; Romano et al., 2010; L. Wang, 2011). Besonders zu erwähnen ist außerdem der Einfluss von FKBP5 auf metabolische Prozesse. In Zusammenhang mit Adipogenese, Insulin-Resistenz und Cholesterinstoffwechsel beeinflusst FKBP5 das Körpergewicht und den Effekt unserer Diäten auf dieses (Bajaj et al., 2022; Balsevich et al., 2014; Galigniana et al., 2022; Pereira et al., 2014; Stechschulte et al., 2014). Zuletzt bewirkt FKBP5 durch eine Steuerung der Phosphorylierung der DNA-Methyltransferase1 eine Modifikation deren Aktivität. Auf diesem Weg spielt FKBP5 eine wichtige Rolle bei epigenetischen Prozessen, indem es den gesamtgenomischen DNA-Methylierungsgrad beeinflusst. Der Überbegriff „Epigenetik“ umfasst dabei all jene Veränderungen unseres Erbgutes ohne Anpassung der Basensequenz der DNA (Gassen et al., 2015). Passend zu diesen vielfältigen Aufgaben wird *FKBP5* in allen Gewebetypen exprimiert, wobei sowohl auf RNA als auch Proteinebene teilweise deutliche Unterschiede vorliegen (GTEx Consortium, 2015; D. Wang et al., 2019).

Matosin und KollegInnen beschreiben *FKBP5* zusammenfassend als „*Molecular amplifier of the stress response, influencing many pathways implicated in neuronal function, synaptic plasticity, autophagy, and DNA methylation*“ (Matosin et al., 2018).

### 1.2.2 Regulation

Den vielen unterschiedlichen Funktionen von FKBP5 geschuldet, unterliegen Gen und Proteinen einer Vielzahl von Regulationsmechanismen und Rückkopplungsschleifen auf mehreren Ebenen. Die erste Stufe der Regulation findet auf Ebene der Transkription statt. *FKBP5* besitzt sogenannte Glukokortikoid Responsive Elemente (GRE). Diese dienen dem GR, nach dessen Aktivierung und Verlagerung in den Zellkern, als

Bindungsstellen und vermitteln dessen Effekt auf die Transkription glukokortikoidabhängiger Gene. Bei *FKBP5* befinden sich diese nicht nur im Promotorbereich des Gens, sondern auch auf intronischen, also nichtcodierenden, Bereichen, besonders auf Intron 2 und Intron 7. Im Sinne einer ultrakurzen negativen Rückkopplungsschleife begünstigt das Vorhandensein von aktiviertem GR eine durch Glukokortikoide induzierte Steigerung der *FKBP5* Expression. Dabei erfolgt eine



**Abbildung 3: Negative Rückkopplungsschleife zwischen *FKBP5* und GR.** Erstellt mit BioRender.com

Schleifenbildung des Chromatins, dem Komplex aus DNA und assoziierten Proteinen, wodurch sich die entfernt der Transkriptionsstartstelle

(TSS) liegenden GRE dieser anlagern und so als Transkriptionsfaktoren agieren (Hubler & Scammell, 2004; Matosin et al., 2018; Paakinaho et al., 2010; Pelleymounter et al., 2011). *FKBP5* wiederum fungiert dann selbst als Inhibitor einer weiteren GR-Aktivierung (Fries et al., 2017). Die GRE auf Intron 7 haben dabei durch die bestehende 3D-Formation während der Transkription dauerhaft Kontakt mit der TSS (Klengel et al., 2013). Allerdings kann ihr Einfluss durch den Grad an Methylierung der in der Nähe befindlichen Cytosin-Guanin-Dinukleotide (CpG) feinjustiert werden (Lee et al., 2010).

Die Methylierung, also das Hinzufügen einer Methylgruppe, an der Nukleinbase Cytosin durch DNA-Methyltransferasen kann chemisch nur stattfinden, wenn unmittelbar darauf Guanin als Nukleinbase folgt. Sie stellt einen zentralen Mechanismus epigenetischer Modifikationen unserer Erbinformation dar. So kann sie sinnbildlich als das ausführende Instrument der Interaktion von Umwelteinflüssen, denen ein Individuum ausgesetzt ist, und dessen Genen verstanden werden. Die Anwesenheit von Methylgruppen beeinflusst die Anlagerungen von chromatinorganisierenden Proteinen wie Histonen aber auch verschiedener Transkriptionsfaktoren an die DNA. Dies ermöglicht durch die im Laufe der Evolution entstandene Verteilung der CpGs an relevanten Positionen im Gen eine Regulation der Genexpression, wobei die CpGs selbst ungefähr wie der Dimmer einer Lampe fungieren. Die ständige Anpassung der DNA-Methylierung ermöglicht es so das aktuelle Profil der exprimierten Gene an die gegenwärtigen Umwelteinflüsse anzupassen (Jeltsch, 2002; Seisenberger et al., 2013).

Im Vergleich zu den GRE auf Intron 7 wird die Interaktion der GRE auf Intron 2 über einen Einzelbasenpolymorphismus (SNP ist dabei die gebräuchliche Abkürzung des engl. Fachbegriffs: Single-Nukleotid-Polymorphismus), also einer Variation eines einzelnen Basenpaares der DNA-Stränge, vermittelt. In diesem Fall begünstigt das A-Allel, aufgrund seiner Assoziation mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen im Weiteren auch als Risikoallel bezeichnet, des SNP mit der Bezeichnung: rs1360780 den Kontakt zwischen GRE und TSS und bedingt so eine gesteigerte Expression von *FKBP5* (Klengel et al., 2013).

Auf Ebene der mRNA-Prozessierung wurden bisher verschiedene microRNAs identifiziert, deren Bindung an die *FKBP5*-mRNA sich auf die Stabilität und weitere Verarbeitung während Translation auswirken (Pelleymounter et al., 2011; Volk et al., 2016). Nach Abschluss der Translation bieten Modifikationen am Protein selbst weitere Regulationsmöglichkeiten. Antunica-Noguerol et al. beschreiben beispielsweise das Anfügen von Small-Ubiquitin-related-Modifiern (SUMO) als wichtigen Schritt für die Interaktion zwischen *FKBP5* und dem GR (Antunica-Noguerol et al., 2016).

### 1.2.3 *FKBP5* und Depression

Für die Rolle von *FKBP5* als Risikogen stressinduzierter psychischer Erkrankungen, allen voran der Depression und der Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS), liegt mittlerweile umfangreiche Evidenz vor. Dabei belegen post mortem Untersuchungen eine Veränderung der Genexpression in unterschiedlichen Hirnarealen von an Depression (Darby et al., 2016; Tatro et al., 2009), Bipolarer Erkrankung (Chen et al., 2013; Darby et al., 2016) und PTBS Erkrankter (Young et al., 2015). Im Tiermodell konnte ein Zusammenhang zwischen gesteigerter *FKBP5*-Genexpression und Verhaltensänderungen mit verminderter Stressresistenz nachgewiesen werden (Touma et al., 2011). Dahingegen führte eine Ausschaltung von *FKBP5* zu einer Reduktion der HPA-Achsenaktivität und verkürzter Stressreaktion (Hoeijmakers et al., 2014). Menke et al. gelang es die gestörte Stressreaktion bei GR-Resistenz in Form einer signifikant niedrigeren Zunahme der *FKBP5*-Expression im DST bei depressiven im Vergleich zu gesunden ProbandInnen nachzuweisen (Menke et al., 2012).

Wie bereits erwähnt spielt für die Regulation der Expression die Methylierung des Gens eine entscheidende Rolle, wobei unterschiedliche Gründe für eine Änderung der Methylierung existieren. Beispielsweise kommt es im Alter zu einer generellen

Demethylierung, die auch für FKBP5 gezeigt werden konnte und die mit einer altersbedingten Steigerung der Expression einhergeht (Fraga et al., 2007; Sabbagh et al., 2014; Sedivy et al., 2008; Zannas et al., 2018). Für die Entstehung Stress-induzierter Erkrankungen ist aber besonders die Glukokortikoid assoziierte Beeinflussung der Methylierung relevant. Dabei konnte eine Demethylierung in relevanten Bereichen des Gens, insbesondere auf Intron 7, bei Glukokortikoidexzessen nachgewiesen werden. Eine Besonderheit von FKBP5 stellt hier das Vorhandensein regulatorischer CpGs auch intronisch in unmittelbarer Nähe zu GRE dar. So verändert eine stressbedingte Adaptation des Methylierungsgrades in der Folge die Expression bei einer erneuten Glukokortikoidexposition und beeinflusst über die geschilderten Feedbackschleife schließlich die Fähigkeit zu einer adäquaten Terminierung der Stressreaktion (Klengel et al., 2013; Lee et al., 2010; Wiechmann et al., 2019). *FKBP5* ist also eine zentrale Schaltstelle zwischen Stressexposition und der sich in der Folge einstellenden Dysregulation der HPA-Achse mit GR-Resistenz.

Genomweite Assoziationsstudien offenbarten SNPs von *FKBP5* als mögliche prädisponierende Faktoren, die auf Basis genetischer Veränderungen die Stressresilienz und damit die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten stressinduzierter Erkrankungen beeinflussen (Matosin et al., 2018). Am besten untersucht ist hier rs1360780 und insbesondere dessen Einfluss auf die Genexpression (Klengel et al., 2013). So führt das Risikoallel einerseits zu einer potenteren Bindung von Transkriptionsfaktoren, andererseits vermittelt es durch Änderung der 3D-Konformation den Kontakt der GRE auf Intron 2 mit der TSS. Daraus resultierend konnte eine gesteigerte Expression von *FKBP5* sowohl in Anwesenheit als auch bei Fehlen von Glukokortikoiden belegt werden. Hiervon abgeleitet postulierten die Kollegen ein Modell der Gen x Umweltinteraktion, in dem eine Traumatisierung während einer vulnerablen Phase beim Risikogenotyp zu einer gesteigerten *FKBP5*-Expression führt, welche dann durch eine selbsteingeleitete Demethylierung von *FKBP5* in eine anhaltend reduzierte Stressresistenz mit erhöhtem Risiko für das Auftreten stressinduzierter psychischer Erkrankungen mündet. Die Demethylierung als Folge einer Traumatisierung in der Kindheit konnte mittlerweile in mehreren Studien repliziert werden (Mourtzi et al., 2021). Auch die Assoziation von rs1360780 zur depressiven Erkrankung konnte in zwei Metaanalysen sowohl mit als auch ohne zusätzliche Traumatisierung bestätigt werden (Mourtzi et al., 2021; Rao et al., 2016; Q. Wang et al., 2018). Über die Depression hinaus bestehen außerdem Zusammenhänge bei PTBS sowie suizidalem Verhalten (Zannas & Binder, 2014). Neben rs1360780 existieren noch weitere SNPs von *FKBP5*, die mit

Depression, Bipolarer Erkrankung oder PTBS assoziiert wurden. Deren physiologische sowie pathophysiologische Funktionen sind allerdings bisher nicht ausreichend bekannt (Criado-Marrero et al., 2018).

Grundlegend für alle oben aufgeführten Punkte ist, dass sich Änderungen häufig nicht in der Baseline, sondern erst im Rahmen einer Stressexposition (= Anwesenheit von aktiviertem GR) offenbaren, was sowohl für das Tiermodell (Hoeijmakers et al., 2014; Touma et al., 2011) also auch im Menschen belegt werden konnte (Höhne et al., 2015; Klengel et al., 2013; Menke et al., 2014).

Die Assoziation zu stressinduzierten psychischen Erkrankungen, eingebettet in ein biologisches Modell zur Krankheitsentstehung, machen FKBP5 zu einem vielversprechenden Biomarker-Kandidaten für das Therapieansprechen einer antidepressiven Medikation. Erste Hinweise auf eine höhere Frequenz depressiver Episoden bei gleichzeitig besserem Ansprechen der Medikation berichteten Binder et al. bereits 2004 in Zusammenhang mit dem Risikoallel von rs1360780 (Binder et al., 2004). Eine Metaanalyse konnte dies allerdings nicht bestätigen (Zou et al., 2010). Als weiteren Ansatzpunkt entdeckten Cattaneo et al. eine reduzierte Genexpression von *FKBP5* bei Therapierespondern (Cattaneo et al., 2013). Auch im Tiermodell konnte die Relevanz von FKBP5 für das Therapieansprechen belegt werden. So zeigten beispielsweise Gassen et al. eine Reduktion der Antidepressiva-Wirkung in *FKBP5*-Knockout-Mäusen (Gassen et al., 2015). Sie postulierten daraus eine mögliche Wirkverstärkung der antidepressiven Therapie durch FKBP5 über Autophagie-Pathways. Einen weiteren Ansatzpunkt, der ebenfalls im Tiermodell untersucht wurde, stellt die Inhibition der Bindung von SUMO an FKBP5 durch trizyklische Antidepressiva dar. Das Vorhandensein der SUMO ist eine Voraussetzung für die Interaktion von FKBP5 und dem GR und damit der Entfaltung der inhibitorischen Wirkung auf diesen (Budziński et al., 2022). Auch wenn die bisherige Literatur bezüglich des Therapieansprechens also erste Hinweise liefert, so existieren aktuell noch relevante Widersprüche in Bezug auf der Wirkrichtung und die Rolle des Genotyps.

### 1.2.3 FKBP5 und Herzinsuffizienz

Die umfangreiche Evidenz für eine Beteiligung der HPA-Achse an der Entstehung von Depression und Herzinsuffizienz sowie deren bidirektionale Beziehung legen nahe, dass mit *FKBP5* ein zentrales Gen in der Regulation dieser ebenfalls Einfluss auf die

Krankheitsentwicklung nimmt. Denkbare Mechanismen stellen hierbei einerseits eine durch *FKBP5* induzierte Dysregulation der HPA-Achse mit veränderter negativer Feedbackschleife und in der Folge gestörter Stressreaktion sowie Glukokortikoidresistenz dar. Andererseits müssen auch die vielfältigen Einflüsse von *FKBP5* auf den Fettstoffwechsel und die Insulinresistenz als Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen sowie die Assoziation zu proinflammatorischen Zytokinen berücksichtigt werden. Wenngleich ein mechanistischer Zusammenhang also naheliegend erscheint, ist entsprechende Evidenz ggw. rar.

Einzelne Hinweise auf einen Zusammenhang lieferten u.a. Pereira et al., indem sie eine *FKBP5* vermittelte Insulinresistenz nach Dexamethasongabe beobachteten (Pereira et al., 2014). Ortiz und KollegInnen fanden in einem breiter gewählten Ansatz 2018 einen Zusammenhang zwischen der Methylierung regulatorisches CpGs von *FKBP5* auf Intron 2 und verschiedenen metabolischen Risikoparametern wie dem HbA1c, LDL-Cholesterin und Körpergewicht (Ortiz et al., 2018). Ein Zusammenhang zwischen der Methylierung von *FKBP5* und dem kardiovaskulärem Risikoprofil konnte 2022 reproduziert werden (Beach et al., 2022).

Die Proinflammation stellt einen weiteren möglichen gemeinsamen Mechanismus dar. Eine gesteigerte Inflammation konnte dabei mit dem gehäuften Auftreten von Herzinfarkten bei multifaktoriell stimulierten (NF- $\kappa$ B)-Pathways mit vermehrter Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine aufgrund einer stressinduzierten Überexpression von *FKBP5* in Zusammenhang gebracht werden (Zannas et al., 2018).

Zuletzt tauchte *FKBP5* wiederholt als Biomarker für Herzinsuffizienz und assoziierte Erkrankungen wie Rhythmusstörungen in großen Genexpressionsanalysen auf, ohne dass daraus bisher klinische Rückschlüsse abgeleitet werden konnten (Dang et al., 2020; Kolar et al., 2021; Wei et al., 2023).

### **1.3 Fragestellungen**

In dieser Arbeit soll mittels explorativer Analysen die DNA-Methylierung und Genexpression von *FKBP5* als Risikogen stressinduzierter Erkrankungen näher betrachtet werden. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf einer möglichen Funktion als Bindeglied zwischen Herzinsuffizienz und Depression. Die Identifikation zugrundeliegender pathophysiologischer Mechanismen soll so zur Spezifizierung von Subgruppen beitragen, die dann später mit Hilfe einer Batterie von unterschiedlichen Biomarkern unterschieden werden können. Folgende konkrete Fragen sind zu beantworten:

- 1. Gibt es Unterschiede in der Methylierung verschiedener regulatorischer CpGs im *FKBP5*-Gen zwischen Patienten mit Depression, Herzinsuffizienz und gesunden Kontrollen in der Baseline sowie nach DST?**
- 2. Wie verhält sich die mRNA-Expression von *FKBP5* in diesen unterschiedlichen Gruppen?**
- 3. Bestehen Zusammenhänge zwischen einer Änderung der Methylierung oder mRNA-Expression nach Glukokortikoidstimulation und relevanten klinischen Parametern?**
- 4. Liegen Unterschiede der Methylierung regulatorische CpGs oder mRNA-Expression zwischen Risikogenotyp und der protektiven Genvariante vor?**
- 5. Eignen sich Methylierung und/oder mRNA-Expression von *FKBP5* als Biomarker zur Vorhersage eines Therapieansprechens bei Depressionen?**

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Produkte

*Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Hersteller.*

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose peqGOLD ELECTRAN®	peqLab, Erlangen, Deutschland
CoralLoad Konzentrat	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ethanol (70%)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (absolut, min. 99,9 %)	ChemSolute, Renningen, Deutschland
Ethidiumbromid Lösung 0,07%	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific, München, Deutschland
Isopropanol (2-propanol for molecular biology)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin Sepharose™	GEHealthcare, München, Deutschland
Wasser destilliert (dH <sub>2</sub> O) für Chromatografie	Merck, Darmstadt, Deutschland
LiChrosolv®	
Wasser für Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wasser RNase frei	Qiagen, Hilden, Deutschland

#### 2.1.2 Lösungen und Puffer

*Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Puffer mit Zusammensetzung, Hersteller. TAE = TRIS-Acetat-EDTA-Puffer, TE = TRIS-EDTA-Puffer.*

<b>Lösung, Puffer</b>	<b>Zusammensetzung/Hersteller</b>
Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Binding Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Denaturationspuffer	8g NaOH 1l dH <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (10l)	400ml 25xTAE 9600 ml dH <sub>2</sub> O
TAE-Puffer Konzentrat 25x	Fisher Scientific, Schwerte, Germany
TE-Puffer pH 8,0	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wash Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 2.1.3 Kitsysteme

**Tabelle 4: Verwendete Kitsysteme und Hersteller.**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
EpiTect® 96 Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EpiTect® PCR Control DNA Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
FlexiGene® DNA Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
HotStarTaq®Plus Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
PAXgene® Blood RNA Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark® Gold Q96 Reagents	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR™ Select Master Mix for CFX	appliedbiosystems by Thermo Fischer Scientific, Vilnius, Litauen

### 2.1.4 Laborbedarf und Verbrauchsgegenstände

**Tabelle 5: Verwendeter Laborbedarf/ Verbrauchsgegenstände und Hersteller.**

<b>Gegenstand</b>	<b>Hersteller</b>
Achtkanalpipette: Biohit m100	Biohit, Helsinki, Finland
Achtkanalpipette: FINNPIPETTE®	Thermo Scientific, München, Deutschland
Achtkanalpipette: PEQPETTE	peqLab, Erlangen, Deutschland
Aggarosegel-Trennstreifen: 20 Well 1,5mm	peqLab, Erlangen, Deutschland
Becherglas 100ml	Marinfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Biosphere® Filter Tips 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 300µl, 1250µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® SafeSeal Tube 1,5ml, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CELLSTAR® Serological Pipette steril, 10ml, 25ml, 50ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Combitips advanced® 0,1ml, 1ml, 10ml, 25ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deep well plate PP 96 x 1,1ml	nerbe Plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Handschuhe: Peha-soft® nitrile white	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Messzylinder 1000ml	VITLAB, Grossostheim, Deutschland
Messzylinder 100ml	Scherf-Präzision, Meiningen, Deutschland
Multipipette: FINNPIPETTE®	Thermo Scientific, München, Deutschland
Multipipetten: Eppendorf Multipipette® M4, Plus, Eppendorf Xplorer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
neoAccupette 3-9905	neoLab, Heidelberg, Deutschland
PCR-Strips, 8 tubes, 0,2ml	BRAND, Wertheim, Deutschland

PCR-Abdeckfolie: AB-0550 Adhesive PCR Film	Thermo Scientific, München, Deutschland
PCR-Platte: 96x0,2ml	nerbe Plus, Winsen/Luhe, Deutschland
PCR-Platte: FrameStar® 96	4titude, Surrey, UK
PCR-Platte: twin.tec 96	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten: Eppendorf Research Plus 10µl, 100µl, 1000µl; Eppendorf Research 10µl, 100µl, 1000µl; Eppendorf Reference 10µl, 100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattenabdeckfolie	3M, Neuss, Deutschland
Plattenabdeckfolie Aluminium	LVL technologies Crailsheim, Deutschland
PyroMark® Q96 Cartridge	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark® Q96 Plate Low	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark® Q96 Vacuum Prep Trough	Qiagen, Hilden, Deutschland
qPCR-Platte: 384-qPCR-Plate	BRAND, Wertheim, Deutschland
Reagenzienflasche 1000ml	Duran, Mainz, Deutschland
Reinigungstücher: Science Precision Wipes	KIMTECH, Dallas, USA
SafeSeal micro tube 1,5ml, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tube 5ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Weithals-Erlenmeyerkolben 500ml	Duran, Mainz, Deutschland

### 2.1.5 Geräte

***Tabelle 6: Verwendete Gerätschaften und Hersteller.***

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Beleuchtungskammer: Lourmat Fusion FX	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
CFX384® Real-Time System C1000 Touch® Thermocycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektrophorese-Kammer: Model 40-1214	peqLab, Erlangen, Deutschland
Feinwaage PM300	Mettler, Gießen, Deutschland
Gefrierschrank -20°	Liebherr, Biberach, Germany
Gefrierschrank -80°	Fisher Scientific, Schwerte, Germany
Heizplatte: MR Hei-Tec	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Inkubator B 5042 E	Heraeus, Hanau, Deutschland
LABINCO L46 Power Mixer	LABINCO, Breda, Niederlande
Magnetrührer: GLW M21	Heidolph, Schwabach, Germany
Mikrowelle	Sharp, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler: BioShake iQ	BioShake, Jena, Germany

Plattenzentrifuge: Centrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PyroMark® Q96 ID	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark® Q96 Workstation	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAvac 96 Vacuum Station	Qiagen, Hilden, Deutschland
Spannungsgeber: CONSORT E431, CONSORT E844	CONSORT, Turnhout, Belgien
Spannungsgeber: EL. Phor.-Powerpack P24	Biometra, Göttingen, Deutschland
Spannungsgeber: GENE POWER SUPPLY GPS 200/400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Spectralphotometer: NANODROP 8000	Thermo Scientific, München, Deutschland
Spectralphotometer: NanoDrop® ND-1000	peqLab, Erlangen, Deutschland
Thermocycler: TProfessional Basic Gradient, Gradient 96, Standard	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge: Vortex + Microspin FV-2400	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe	Welch, Ilmenau, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasseraufbereitung: NANOpure Diamond™	Thermo Scientific, München, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen: ROTANTA 96 RS, 460R, MIKRO 220R, MIKRO 200R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

### 2.1.6 Software

*Tabelle 7: Verwendete Software und Hersteller.*

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
LinReg PCR V2017	Ruijter et al., Open-Source
IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26, Version 28	IBM Corporation, Armonk, USA
Qbase+	Biogazelle, Zwijnaarde, Belgien
Evolution Capt. FX6	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
Microsoft® Office 365	Microsoft, Redmond, USA
EndNote™ X9	Clarivate, St. Helier, USA
Adobe Acrobat Reader	Adobe Inc., San José, USA
PyroMark® Assay Desgin 2.0	Qiagen, Hilden, Deutschland
Bio-Rad CFX Manager 3.0	Bio-Rad, Hercules, USA
PyroMark Q96 2.5.10	Qiagen, Hilden, Deutschland
PLINK 1.9	Shaun Purcell, Open-Source

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Studiendesgin und Studienablauf**

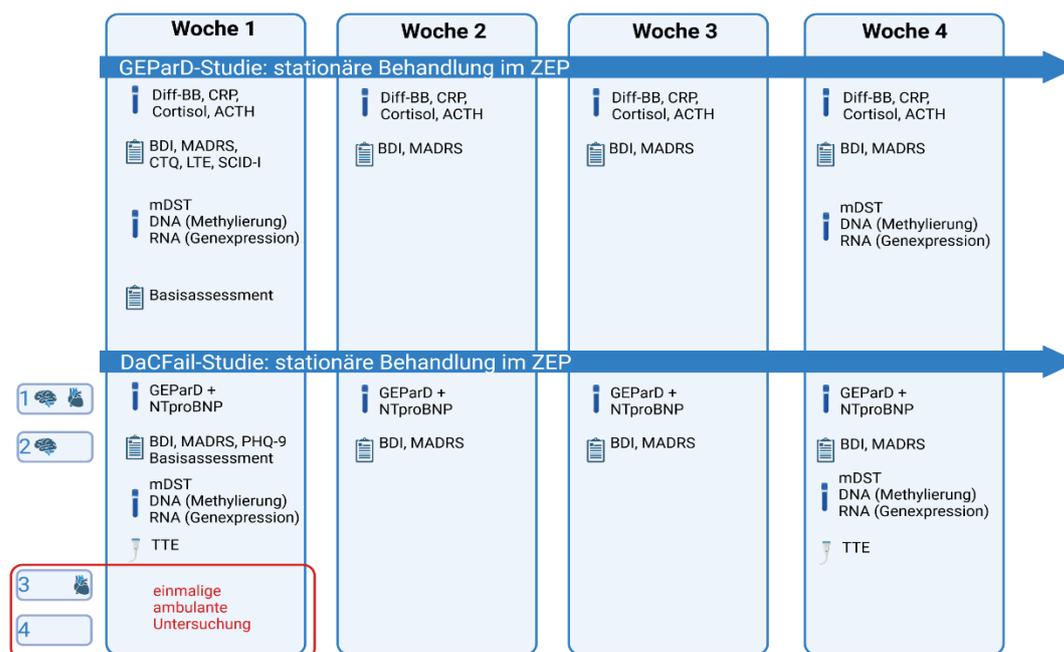
Alle im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proben stammen von Teilnehmenden der DaCFail- bzw. der modifizierten GEPaRD-Studie. Um die Fragestellungen dieser Arbeit zu beantworten, wurden aus allen Teilnehmenden diejenigen ausgewählt, von denen erfolgreich Proben mindestens eines vollständigen modifizierten Dexamethasontests (mDST) gewonnen werden konnten.

Die GEPaRD-Studie (Genetik und Epigenetik von Pharmako- und Psychotherapie bei akuter und rezidivierender Depression; Ltg.: Univ.-Prof. Dr. Dr. K. Domschke bis 2016, ab 2016 Prof. Dr. med. Andreas Menke) an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie (Dir.: Univ.-Prof. Dr. J. Deckert) untersuchte seit Oktober 2012 als Beobachtungsstudie die Genetik und Epigenetik von Kandidatengenen der Depression bei im Zentrum für psychische Gesundheit (ZEP) der Universitätsklinik Würzburg stationär behandelten PatientInnen. Im Studienverlauf wurde ab September 2015 zusätzlich ein modifizierter oraler DST ergänzt, um stressinduzierte Veränderungen der HPA-Achse zu untersuchen (Lichter et al., 2023; Menke et al., 2016; Menke et al., 2012; Menke & Binder, 2014).

Die DaCFail-Studie (Depression associated Cardiac Failure; Ltg: Prof. Dr. med. Andreas Menke, Prof. Dr. med. Stefan Störk, Prof. Dr. rer. med. Dr. rer. nat. Götz Gelbrich) an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie (Dir.: Univ.-Prof. Dr. J. Deckert), der Medizinischen Klinik und Poliklinik I (Dir.: Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Frantz) und dem Deutsches Zentrum für Herzinsuffizienz (DZHI, Ltg. Abteilung klinische Forschung: Prof. Dr. med. Stefan Störk), beschäftigte sich seit November 2015 mit der Untersuchung der Dysregulation von Stresssystemen als Basis für den bidirektionalen Zusammenhang von Depression und Herzinsuffizienz. Als Fall-Kontroll-Studie entworfen, soll der Vergleich von vier Gruppen (Gruppe 1: depressive Episode und Herzinsuffizienz, Gruppe 2: depressive Episode, Gruppe 3: Herzinsuffizienz, Gruppe 4: gesunde Kontrollen) so unter anderem Aufschluss über die Funktionsstörungen der HPA-Achse liefern.

Beide Studien zielten so auf die Identifikation der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen ab, um eine Spezifizierung von Subgruppen zu ermöglichen, die dann im Weiteren mit Hilfe einer Batterie von Biomarkern unterschieden werden können (Lichter et al., 2023).

Für den Ablauf und die Aufteilung der Rekrutierung zwischen den beteiligten Zentren sei auf das Methodenpaper von Lichter et al. verwiesen (Lichter et al., 2023). Die stationäre psychiatrische Behandlung verlief in einem naturalistischen Setting. Jeder Patient erhielt eine individualisierte Therapie, veranlasst durch die behandelnden ÄrztInnen und ohne Beeinflussung durch die Studienteilnahme. Nach Etablierung von DaCFail im ZEP erfolgte die Durchführung beider Studien parallelisiert. PatientInnen mit depressiven Episoden, die älter als 50 Jahre waren und die Einschlusskriterien erfüllten, wurden, nach ihrer ausdrücklichen Zustimmung, zusätzlich neben GEPaRD auch in die DaCFail-Studie eingeschlossen. Abbildung 4 gibt einen Überblick über den Studienablauf, reduziert auf die relevanten Parameter der Fragestellungen dieser Arbeit. Das vollständige Studienprotokoll kann dem Methodenpaper von Lichter et al. entnommen werden (Lichter et al., 2023). Tabelle 8 zeigt die angewendeten Ein- und Ausschlusskriterien der beiden Studien.



**Abbildung 4: Studienablauf GEPaRD und DaCFail.** PatientInnen der GEPaRD-Studie sowie der Gruppen 1 (Depression und Herzinsuffizienz) und 2 (Depression) der DaCFail-Studie wurden während der stationären Behandlung im Zentrum für psychische Gesundheit wöchentlich untersucht. In Woche 1 und 4 wurde ein mDST durchgeführt sowie Blut zur Isolierung von DNA und RNA abgenommen. In der DaCFail-Studie erfolgte zusätzlich ein transthorakale Echokardiografie (TTE) in Woche 1 und 4. ProbandInnen der DaCFail-Gruppen 3 (Herzinsuffizienz) und 4 (gesunde Kontrollen) erhielten das Untersuchungsprogramm der Woche 1 während eines einmaligen ambulanten Termins. ACTH = Adrenocorticotropin, BDI = Beck-Depressions-Inventar, CRP = C-reaktives Protein, CTQ = Childhood Trauma Questionnaire, Diff-BB = Differentialblutbild, DNA = Desoxyribonukleinsäure, LTE = List of Threatening Experiences, MADRS = Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale, NT-proBNP = N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide, PHQ-9 = Patient Health Questionnaire, RNA = Ribonukleinsäure. Basisassessment = u.a. Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Größe, Gewicht. Erstellt mit BioRender.com. Modifiziert nach (Lichter et al., 2023), „Reproduced with permission from Springer Nature“.

**Tabelle 8: Ein- und Ausschlusskriterien von GEPaD und DaCFail.** DSM-IV = Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, PHQ-9 = Patient Health Questionnaire, SCID-I = Structured Clinical Interview for DSM axis I disorders, STAAB = Häufigkeit und Einflussfaktoren auf frühe STAdien A und B der Herzinsuffizienz in der Bevölkerung, (Lichter et al., 2023).

<b>Einschlusskriterien</b>	
<b>GEPaD</b>	<b>DaCFail</b>
Alter: 18-80 Jahre	Alter: $\geq$ 50 Jahre
Diagnose einer uni- oder bipolaren Depression nach strukturiertem klinischem Interview (SCID-I) anhand der Kriterien des DSM-IV	<p><i>Gruppe 1:</i> Depression parallel zu GEPaD + Herzinsuffizienz (LVEF: ♂ &lt; 52%, ♀ &lt; 54%)</p> <p><i>Gruppe 2:</i> Depression parallel zu GEPaD + normwertige LVEF</p> <p><i>Gruppe 3:</i> Herzinsuffizienz (LVEF: ♂ &lt; 52%, ♀ &lt; 54%) + Ausschluss Depression</p> <p><i>Gruppe 4:</i> Teilnahme an STAAB, Ausschluss Depression + normwertige LVEF</p>
<b>Ausschlusskriterien</b>	
<b>GEPaD</b>	<b>DaCFail</b>
Unfähigkeit zur Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung	Unfähigkeit zur Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung
Schwere neurologische Erkrankung: z.B.: Demenz, M. Parkinson, Multiple Sklerose, Schlaganfall	Schwere neurologische Erkrankung: z.B.: Demenz, M. Parkinson, Multiple Sklerose, Schlaganfall
Schizoaffektive Erkrankung, Schizophrene Psychose, Depression im Zusammenhang mit Schlaganfall, komorbide Abhängigkeitserkrankung	Schizoaffektive Erkrankung, Schizophrene Psychose, Depression im Zusammenhang mit Schlaganfall, komorbide Abhängigkeitserkrankung
Schwangerschaft, Krebserkrankung, systemische Behandlung mit Glukokortikoiden	Schwangerschaft, Krebserkrankung, systemische Behandlung mit Glukokortikoiden
	<i>Gruppe 3 und 4:</i> Ausschluss einer aktuellen oder zurückliegenden depressiven Episode (PHQ-9, SCID-I)

Als wissenschaftlicher Mitarbeiter im ZEP umfasste mein Eigenanteil während der Zeit von September 2018 bis März 2019 die Aufklärung und den Einschluss von ProbandInnen, die Durchführung der initialen Anamnese und psychometrischen Untersuchungen, deren Betreuung während der Studienteilnahme sowie die Koordination der beteiligten MitarbeiterInnen (Pflegerkräfte, Funktionsdiagnostik,

medizinische Doktoranden). Anschließend erfolgte eine weitere Unterstützung des Studienteams ab März 2019 bei der Rekrutierung von ProbandInnen der Kontrollgruppe. Die Betreuung der stationären Studienpatienten erfolgte überwiegend durch Dipl.-Psych. Dr. Catherina Klüpfel, Dipl.-Psych. Dr. Saskia Johanna Stonawski und Manuel Blickle. Die Blutabnahmen wurden von den behandelnden StationsärztInnen oder Medizinischen Fachangestellten des ZEPs durchgeführt, die mDST durch weitere medizinische Doktoranden.

Die Bestimmung von Standardlaborparametern erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg (Ltg: Dr. med. Udo Steigerwald), die der endokrinologischen Messwerte im endokrinologischen Labor des Universitätsklinikums Würzburg (Ltg: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Fassnacht). Die kardiologische Diagnostik wurde von KollegInnen des DZHs dort durchgeführt und ausgewertet. Darüber hinaus wurden alle weiteren molekularbiologischen Experimente und assoziierte Laborarbeiten zwischen September 2018 und Juli 2019, sofern nicht explizit anders aufgeführt, durch mich im Labor der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie umgesetzt.

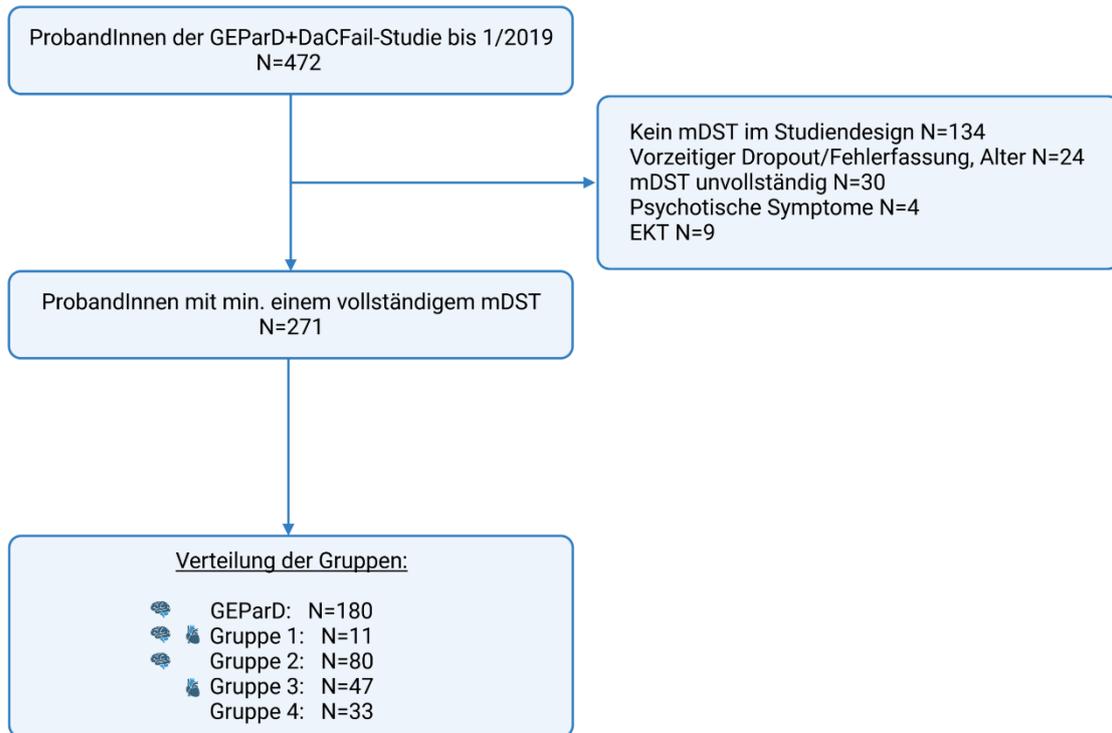
#### *Ethikvotum*

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität-Würzburg erteilte der GEPaD-Studie (Ethikvotum: 104/12 und 128/15) und DaCFail-Studie (Ethikvotum: 285/14) ihre Zustimmung. Alle Teilnehmenden wurden vor Studieneinschluss mündlich und schriftlich über Ziele, Studienablauf, beinhaltete Untersuchungen sowie Nutzung und Verbleib von Material und Daten aufgeklärt. Auch über die Möglichkeit ihre Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen zu können, wurden sie informiert. Eine Studienteilnahme oder Nichtteilnahme hatte keinen Einfluss auf den Verlauf der stationären Behandlung.

#### *Kohorten der Studienpatienten*

Wie Abbildung 5 zeigt, konnten bis zum Beginn der Labortätigkeiten für diese Arbeit zwischen 2012 und 2019 insgesamt 472 ProbandInnen in beide Studien eingeschlossen werden. Nach erneuter Prüfung der Ausschlusskriterien, Dropouts und Berücksichtigung mindestens eines vollständig vorliegenden mDSTs, wurden 271 ProbandInnen für die weitere Analyse ausgewählt. Gründe für die erfolgten Ausschlüsse sind ebenfalls

Abbildung 5 zu entnehmen. Eine ausführlichere Charakterisierung der Gruppen erfolgt in den jeweiligen Kapiteln des Ergebnisteils.



**Abbildung 5: Flussdiagramm Rekrutierung.** EKT = Elektrokonvulsionstherapie, N = Anzahl ProbantInnen. Erstellt mit BioRender.com

### 2.2.2 Psychometrie

Zur Beurteilung des Vorliegens einer Depression, deren Schwere sowie einer Verlaufsbeobachtung und Beurteilung des Therapieansprechens während der stationären Behandlung, wurden BDI-II sowie MADRS ausgewählt. Dabei wurde die MADRS unter den zur Verfügung stehenden Fremdbeurteilungsverfahren aufgrund einer besseren Vollständigkeit im vorliegenden Datensatz gegenüber der Hamilton-Skala bevorzugt. Beide Skalen können auch zur Beurteilung eines Therapieansprechens herangezogen werden. Dies ist allgemein definiert als Reduktion des Gesamtscores einer etablierten Depressionsskala um  $\geq 50\%$  (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2022). Das **Beck-Depressions-Inventar (BDI)** ist ein testpsychologisches Selbstbeurteilungsverfahren zur Erfassung des Schweregrades einer depressiven Episode. Nach seiner Erstveröffentlichung 1961 liegt der Fragebogen mittlerweile in überarbeiteter Form (BDI-II) und deutscher Übersetzung vor (Beck et al., 1961; Hautzinger et al., 2006). Bei der **Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale**

**(MARDS)** handelt es sich um ein testpsychologisches Fremdbeurteilungsverfahren zur Einschätzung der Schwere einer depressiven Episode (Montgomery & Asberg, 1979).

Darüber hinaus sollte das Vorhandensein von Stress im kurzen Zeitintervall bzw. Traumatisierung in der Kindheit zur Beurteilung einer möglichen Gen x Umweltinteraktion durch Verwendung von LTE sowie CTQ abgebildet werden. Die **List of Threatening Experiences (LTE)** erfasst als kurzer Selbstbeurteilungsfragebogen Stressoren innerhalb des letzten Jahres (Brugha et al., 1985). Beim **Childhood Trauma Questionnaire (CTQ)** handelt es sich um ein Selbstbeurteilungsinstrument, um in der Kindheit stattgefundenene Traumatisierungen unterschiedlichen Ausmaßes und Art abzubilden (Bernstein et al., 1994; Bernstein et al., 2003; Klinitzke et al., 2012).

### 2.2.3 Bestimmung kardiologischer Parameter

Alle ProbandInnen der DaCFail-Studie erhielten eine umfangreiche kardiologische Untersuchung mittels 24-Stunden-Blutdruckmessung, 24-Stunden-EKG sowie transthorakaler Echokardiografie. Zusätzlich wurden ebenfalls in Woche 1 sowie 4 die Laborparameter NT-proBNP und Troponin ermittelt. Unter der Vielzahl erhobener Parameter wurden für diese Arbeit die LVEF sowie das NT-proBNP als Gradmesser der vorliegenden Herzschwäche verwendet. Die LVEF gibt dabei unmittelbar Auskunft über die Auswurfleistung und damit die Fähigkeit des Herzens den Organismus mit Blut zu versorgen. Die Höhe des NT-proBNP im Serum wiederum korreliert mit dem klinischen Stadium der Herzinsuffizienz und der damit einhergehenden Leistungsschwäche (Balion et al., 2013).

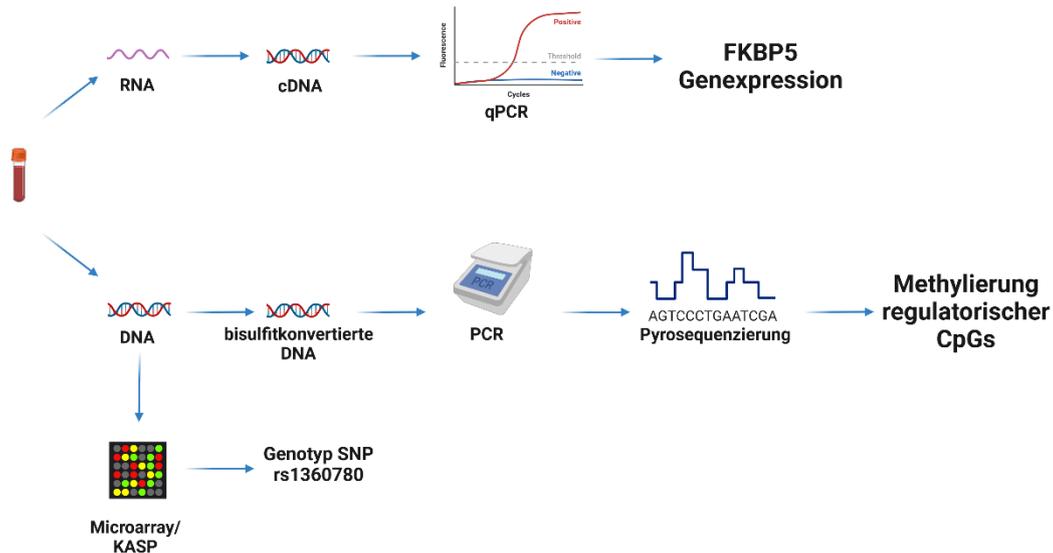
### 2.2.4 Durchführung mDST, Gewinnung und Verarbeitung der Blutproben

Um die Funktion der HPA-Achse und die bereits geschilderten Mechanismen der Rückkopplung als Antwort auf eine Stressreaktion zu untersuchen, wurde ein durch Prof. Dr. med. Menke etablierter mDST in der ersten Behandlungswoche bzw. während der einmaligen ambulanten Untersuchung durchgeführt (Leistner & Menke, 2018; Menke et al., 2016; Menke et al., 2014; Menke et al., 2012). Hierzu erfolgte eine erste Blutabnahme um 18 Uhr. Diese umfasste EDTA-Blut (9,0ml EDTA Monovette) zur späteren Isolation von DNA aus den enthaltenen Leukozyten, ein Spezialblutentnahmeröhrchen zur Isolation von RNA (2,5 ml PAXgene® Blood RNA

tube) sowie weitere zur Anfertigung eines Differentialblutbildes (2,7ml EDTA Monovette) und Bestimmung der endokrinologischen Parameter Cortisol (7,5ml Serum Monovette) und ACTH (7,5ml EDTA Monovette). Im Anschluss erhielten die ProbandInnen 1,5mg Dexamethason zur oralen Einnahme mit Wasser. Nach einem Intervall von 3h erfolgte um 21 Uhr die zweite Blutabnahme in identischer Zusammensetzung. Während der Aufklärung sowie mittels schriftlicher Information am Untersuchungstag, wurden die Teilnehmenden angehalten mindestens 30 Minuten vor der ersten Blutabnahme sowie im Intervall nicht zu Rauchen und auf intensivere körperliche Betätigungen zu verzichten. Für PatientInnen in stationärer Behandlung fand zur Untersuchung möglicher Veränderungen an der HPA-Achse im Rahmen der Therapie in der vierten Behandlungswoche ein erneuter mDST mit identischem Ablauf statt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Blutproben bei 4° gekühlt (PAXgene® Blood RNA tube) bzw. bei -20° eingefroren (9ml EDTA Monovette). Der mDST sowie die dazugehörigen Blutentnahmen wurden überwiegend durch medizinische DoktorandInnen (Jacqueline Helmelt, Lisa Friesz, Carolin Burschka, Leonie Kranemann) durchgeführt.

Zur **Isolation der DNA** aus EDTA-Blut wurde das FlexiGene® DNA-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben im Protokoll „*Isolation of DNA from 4-14ml Whole Blood*“ des FlexiGene® DNA Handbook verwendet. Die **Isolation der RNA** aus Vollblut wurde mit dem PAXgene® Blood RNA-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben im Protokoll „*Manual Purification of Total RNA from Human Whole Blood Collected into PAXgene Blood RNA Tubes*“ des PAXGene® Blood RNA Handbook durchgeführt. Nachfolgend wurden Konzentration und Reinheit der extrahierten DNA bzw. RNA mit einem Spektralphotometer (NanoDrop® ND-1000 peqLab, Erlangen, Deutschland; NANODROP 8000 Thermo Scientific, München, Deutschland) bestimmt und dokumentiert. Beide Verfahren wurden durch verschiedene MitarbeiterInnen des Labors der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie (Dir.: Univ.-Prof. Dr. J. Deckert) durchgeführt. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80° gelagert.

## 2.2.5 Übersicht der laborexperimentellen Schritte



**Abbildung 6: Übersicht laborexperimenteller Schritte.** cDNA = komplementäre DNA, DNA = Desoxyribonukleinsäure, KASP = kompetitive Allel-spezifische PCR, RNA = Ribonukleinsäure, PCR= Polymerase Kettenreaktion, qPCR = quantitative Echtzeit PCR, SNP = Single-Nukleotid-Polymorphismus. Erstellt mit BioRender.com

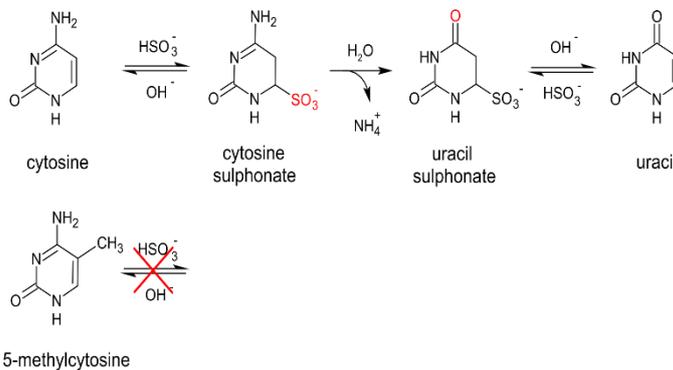
Beginnend mit Erhalt der Blutproben stellt Abbildung 6 den weiteren Weg der Laborexperimentellen Schritte da. Nach der bereits beschriebenen Isolation der RNA wurde aus dieser zunächst eine komplementäre cDNA synthetisiert. Anschließend wurde eine quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qPCR) durchgeführt, um die enthaltene Menge der *FKBP5* mRNA zu beziffern. Der Isolation der DNA schloss sich eine Behandlung mit Natriumbisulfid an. Die regulatorischen Bereiche der bisulfatkonvertierten DNA wurden im Weiteren amplifiziert und der Methylierungsgrad der enthaltenen CpGs durch Pyrosequenzierung bestimmt. Parallel erfolgte eine Genotypisierung des *FKBP5* SNPs rs1360780 extern auf einem Microarray bzw. mittels kompetitiver Allel-spezifischer PCR.

## 2.2.6 Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung

### *Theoretischer Hintergrund*

Wie bereits beschrieben findet die Methylierung als epigenetische Modifikation in der menschlichen DNA an der Nukleinbase Cytosin statt, wenn diese gemeinsam mit Guanin als CpG-Dinukleotid vorliegt. Dort betrifft sie in der Regel das 5. Kohlenstoffatom. Zur Bestimmung des Methylierungsgrades eines DNA-Abschnitts muss also unterschieden werden, wie sich der Anteil von Cytosin zu 5-Methylcytosin verhält. Hierzu wurde die

DNA zunächst mit Natriumbisulfit behandelt. Durch die Bisulfitkonversion kommt es in zwei Schritten zur Umwandlung von Cytosin zu Uracil, einer Nukleinbase die sich bei der



**Abbildung 7: Reaktion von Natriumbisulfit an Cytosin bzw. 5-Methylcytosin.** (Jujubix, 2011), Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0 Unported: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>

Weiterverarbeitung wie Thymin verhält. Liegt allerdings 5-Methylcytosin vor, so findet keine Konversion durch Natriumbisulfit statt und an der entsprechenden Position bleibt ein Cytosin erhalten, wie Abbildung 7 zeigt (Hayatsu et al., 1970; Shapiro et al., 1973). Nach Amplifikation der DNA mittels PCR, bei der Uracil durch das verwandte Thymin ersetzt wird, kann durch Sequenzierung das Verhältnis von Cytosin zu Thymin bestimmt werden. Dies entspricht dann ebenfalls dem Verhältnis von 5-Methylcytosin zu Cytosin, woraus schließlich der Grad der Methylierung am entsprechenden CpG-Dinukleotid berechnet werden kann. Eine Möglichkeit zur Sequenzierung stellt dabei das hier eingesetzte enzymatische Verfahren der Pyrosequenzierung dar, das 1993 entwickelt wurde und auf dem Prinzip des „sequencing by synthesis“ beruht (Colella et al., 2003; Nyrén et al., 1993; Tost et al., 2003). Der in einem Enzymmix (DNA-Polymerase, ATP-Sulferylase, Luciferase, Apyrase) zunächst als Einzelstrang vorliegenden DNA werden dabei nacheinander die vier verschiedenen Nucleinsäuren (dNTP) zugesetzt. Kommt es zur Paarung der komplementären Basen, wird die korrekte Nucleinsäure durch die DNA-Polymerase in den neu entstehenden Strang eingebaut und Pyrophosphat freigesetzt. Dieses reagiert durch Katalyse der ATP-Sulfurylase mit Adenosinmonophosphat zu Adenosintriphosphat (ATP). ATP ermöglicht dann durch Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin die Aussendung eines Lichtimpulses, der detektiert und analysiert wird. Seine Intensität steht direkt im Zusammenhang mit der Menge der eingebauten Nucleinsäure, wodurch eine Sequenz wiederholt gleicher Basen einen höheren Peak erzeugt. Durch Hinzugabe des Enzyms Apyrase, eine Modifikation der ursprünglichen Methode, werden übriggebliebene Nucleinsäuren abgebaut, sodass im gleichen Reaktionsansatz ein neuer Syntheseschritt beginnen kann (Ronaghi et al., 1998). Eine umfassende Schilderung des hier verwendeten Verfahrens der Pyrosequenzierung zur Methylierungsanalyse wurde 2007 veröffentlicht (Tost & Gut, 2007). Die größte

Limitation der Pyrosequenzierung stellt eine Beschränkung der Analyse auf kurze Sequenzen dar. Diese hängt zusätzlich von den enthaltenen Basen ab und beträgt in der Regel um 100-200 Basenpaare. Einen bisher nicht weiter ausgeführten Zwischenschritt stellt die Amplifikation der bisulfitkonvertierten DNA mittels PCR dar. Aufgrund der breiten Anwendung und Vertrautheit dieses Verfahrens zur Amplifikation von DNA, soll auf die Schilderung ihrer theoretischen Grundlagen verzichtet werden (Mullis et al., 1986).

### *Bisulfitkonversion*

Die Bisulfitkonversion wurde mit dem EpiTect® 96 Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Entsprechend der Herstellervorgaben im Protokoll: „*Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosin in DNA using a Vacuum Manifold*“ des EpiTect® 96 Bisulfite Handbook erfolgten kurz zusammengefasst folgende Schritte im 96-Well Plattenformat. Der Reaktionsansatz aus Tabelle 9 wurde hergestellt, nach vollständiger Durchmischung kurz abzentrifugiert und nach dem Reaktionsprotokoll in Tabelle 10 in den Thermocycler gegeben.

**Tabelle 9: Reaktionsansatz Bisulfitkonversion.**

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen je Reaktionsgefäß</b>
DNA-Lösung mit 500ng DNA	} 20 µl
RNase freies Wasser	
Gelöster Bisulfit-Mix	85 µl
DNA Protect Buffer	35 µl
Gesamtvolumen	140 µl

**Tabelle 10: Reaktionsprotokoll Bisulfitkonversion.**

<b>Schritt</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	25 min	60°C
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	85 min	60°C
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	175 min	60°C
Halten		20°C

Nach Abschluss der Bisulfitreaktion wurde die konvertierte DNA unter Verwendung der QIAvac 96 Vakuumbstation (Qiagen, Hilden, Deutschland) weiter aufgereinigt. Dazu wurde die DNA unter Einsatz verschiedener Pufferlösungen und Ethanol desulfiniert, gewaschen und durch wiederholtes Saugen durch die Membran der verwendeten Platten mittels Vakuums an diese gebunden. In einem letzten Elutionsschritt wurde sie schließlich durch den Elutionspuffer aus dieser herausgewaschen und in der Elutionsplatte gesammelt. Nach dem Aliquotieren erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -20°.

### *Primer-Design*

In einer initialen Literaturrecherche wurde zunächst nach differenzierter Methylierung regulatorischen CpGs von *FKBP5* in Zusammenhang mit den stressinduzierten Erkrankungen Depression und Herzinsuffizienz gesucht. Dabei konnten zwei interessante Bereiche identifiziert werden. Die Methylierung von CpGs auf Intron 2 zeigen eine Assoziation zu den kardiovaskulären Risikofaktoren HbA1c und Body-Mass-Index (BMI), die wie bereits geschildert eng mit der Entstehung der Herzinsuffizienz interagieren (Ortiz et al., 2018). Außerdem befinden sich besagte CpGs in der Nähe von funktionellen GRE, was eine mögliche Beeinflussung durch diese im Rahmen einer Stressreaktion nahelegt (Klengel et al., 2013). Auf Intron 7 fand sich eine weitere Zielregion. Für diese konnte eine besonders enge Assoziation von Methylierung und Expression als Reaktion auf eine Glukokortikoidstimulation nachgewiesen werden. Damit scheint sie besonders relevant für die Vermittlung der Stressreaktion. Für die gleiche Region konnte auch ein Zusammenhang der regulatorischen Parameter des Gens mit kindlicher Traumatisierung beobachtet werden, die ihrerseits ein Risiko für spätere affektive Erkrankungen darstellt (Klengel et al., 2013; Wiechmann et al., 2019). Tabelle 11 gibt einen Überblick über Position und Benennung der als für die Fragestellung vielversprechenden identifizierten CpGs.

**Tabelle 11: Nomenklatur und Position relevanter CpGs.** GRCh37.p13 = Genome Reference Consortium Human Build 37 patch release 13, hg19 = Human Genome Assembly. (Cunningham et al., 2022).

<b>CpG</b>	<b>Position (GRCh37.p13/hg19)</b>
CpG1	chr6: 35,609,541
CpG2	chr6: 35,609,556
CpG3	chr6: 35,609,628
CpG4	chr6: 35,609,645

CpG5		chr6:35,558,498
CpG6	<b>Intron 7</b>	chr6:35,558,523
CpG7		chr6:35,558,566

Im nächsten Schritt wurden anhand der CpGs flankierenden DNA-Sequenzen mittels der Software PyroMark® Assay Design 2.0 (Qiagen, Hilden, Deutschland) Primer für PCR und Pyrosequenzierung entworfen. Ein Primerset besteht hierbei aus drei einzelnen Primern. Für die PCR je einen Primer für Forward-(F) und Reversestrand (R), wobei letzterer an seinem 5'-Ende eine Biotinmarkierung (Btn) enthält. Diese ermöglicht während der Pyrosequenzierung eine Bindung des Stranges an Streptavidin-Beads, um diesen zu isolieren. Bei dem dritten Primer handelt es sich um einen Sequencing-Primer (S), der nach Paarung mit dem amplifizierten PCR-Produkt die Startsequenz für die Pyrosequenzierung markiert. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die entworfenen Primer, deren Nomenklatur und Sequenzen:

**Tabelle 12: Verwendete Primer Pyrosequenzierung.** Primer 3 und 4 enthalten identische Primer für die PCR, lediglich der Sequenzierungs-Primer unterscheidet sich.

<b>Primer</b>		<b>Sequenz (5' nach 3')</b>
Primer 1 (CpG1+2)	F	TGGTGAATGATTGTATAGTGTTTAATAAG
	R	[Btn]CACCATATTAACCAAATAATCTTAAACT
	S	GGTGGTTTATGTTTGTAAT
Primer 2 (CpG3+4)	F	AGGAGTTTAAGATTAGTTTGGTTAATATGG
	R	[Btn]CCTCCCCCTCCTAAATTCAAACAATTCTAC
	S	ATATGGTGAAATTTTGTTTTATAA
Primer 3 (CpG5+6)	F	AGTTGGGATAATAATTTGGAGTTATAGT
	R	[Btn]ATTCCCTTATTTATTCCTAAACTTATTCTT
	S	GGAGTTATAGTGTAGGTTTT
Primer 4 (CpG7)	F	AGTTGGGATAATAATTTGGAGTTATAGT
	R	[Btn]ATTCCCTTATTTATTCCTAAACTTATTCTT
	S	AGTTGTATTTTATTTTTTTAAGGAG

Im der weiteren Versuchsdurchführung gelang es trotz verschiedener Optimierungsversuche nicht mit Primer 2 ein PCR-Produkt zufriedenstellender Qualität herzustellen. Bei Primer 3 wiederum ließ sich kein ausreichend gleichmäßiger Durchlauf der Pyrosequenzierung etablieren, sodass die gerätinterne Qualitätskontrolle eine Auswertung der Daten weitestgehend verbot. Um aus den eingesetzten Materialien die bestmöglichen Untersuchungsergebnisse zu erzielen, erfolgte daher im Weiteren nur die

Verwendung der Primer 1 und 4. Diese ermöglicht die Untersuchung der CpGs 1,2 und 7. Aufgrund ihrer Verteilung auf den beiden relevanten Intronen 2 und 7, ermöglicht dies unter dem Aspekt einer nötigen Kostenoptimierung einen guten Überblick über die regulatorischen Elemente von *FBKP5*. Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) bezogen, nach dem Erhalt von der 100µM Ausgangskonzentration auf eine 10µM Konzentration verdünnt, aliquotiert und bei -20° gelagert.

### *Polymerase Kettenreaktion*

Zur Amplifizierung der bisulfitkonvertierten DNA wurde das HotStarTaq®Plus Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellervorgaben im „*Quick-Start Protocol HotStarTaq®Plus Master Mix Kit*“ verwendet. Für die variablen Bestandteile des Reaktionsansatzes wurde zunächst auf ein etabliertes Protokoll des Labors zurückgegriffen. Ausgehend von diesem wurden dann Anpassungen für die jeweiligen Primer vorgenommen. Dazu erfolgten wiederholte Gel-Elektrophoresen, um die Qualität des PCR-Produktes zu beurteilen. So entstanden beispielsweise bei der Verwendung des Primersets 1 Dimere aus den Primern selbst, weshalb eine Reduktion der eingesetzten Primermenge stattfand. Die finalen Reaktionsansätze zeigt Tabelle 13:

**Tabelle 13: Reaktionsansätze Bisulfit-PCR.**

Bestandteil	Volumen je Reaktionsgefäß	
	Primer 1	Primer 4
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1µl	1µl
F-Primer (10µM)	0,6µl	0,8µl
R-Primer (10µM)	0,6µl	0,8µl
Bisulfitkonvertierte DNA	2µl	2µl
HotStarTaq® Master Mix (enthält dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR-Puffer)	12,5µl	12,5µl
Coral (Farbstoff)	2,5µl	2,5µl
RNase freies Wasser	5,8µl	5,4µl
Gesamtvolumen	25µl	25µl

Nach Herstellungen des Reaktionsansatzes und Verteilung auf die 96 Wells der PCR-Platte wurde die PCR in einem Thermocycler durchgeführt. Zentraler Bestandteil des

Programms sind hier die repetitiven Zyklen aus Denaturierung der DNA, gefolgt von einer Anlagerungsphase für die Primer und schließlich der Verlängerungsphase der neu entstehenden DNA-Stränge. Dabei ist die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer abhängig von deren Sequenz. Zur Ermittlung dieser wurde die PCR initial mit verschiedenen Temperaturgradienten getestet und die Qualität der PCR-Produkte mittels Gel-Elektrophorese beurteilt. Für beide Primer stellte sich 58°C als optimale Temperatur heraus. Tabelle 14 zeigt das vollständige Reaktionsprotokoll:

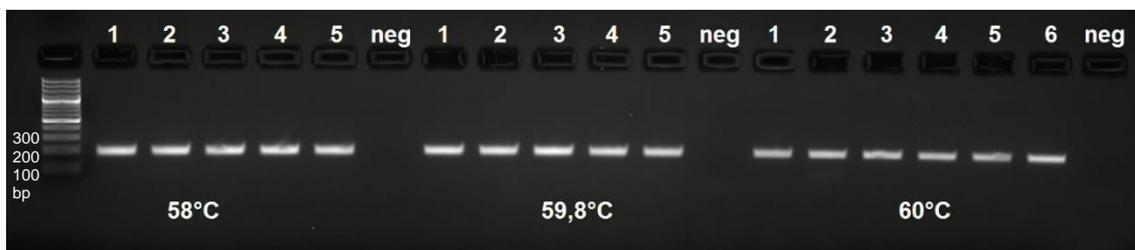
**Tabelle 14: Reaktionsprotokoll Bisulfit-PCR.**

Schritt	Zeit	Temperatur
Aktivierung	15min	95°C
Denaturierung	30s	95°C
Anlagerung	30s	58°C
Verlängerung	30s	72°C
45 Zyklen		
Finale Verlängerung	10min	72°C

#### *Agarosegel-Elektrophorese*

Die Elektrophorese kann zur Auftrennung von DNA nach ihrer Größe verwendet werden und ist ein zentrales Verfahren im Zusammenhang mit der Durchführung der PCR. Zu Beginn wird die zu untersuchende DNA in ein Agarosegel gegeben, welches wiederum in einer Elektrophoresekammer in TAE-Puffer einliegt. Nun wird von außen an die Kammer eine Spannung angelegt. Die insgesamt negativ geladene DNA durchläuft das Gel hin zum Pluspol. Da dieses sich wie ein dichtes Netz verhält, gelangen kleinere DNA-Fragmente in einer festgesetzten Zeit weiter voran. Um die DNA-Moleküle sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugegeben. Diese Substanz interkaliert in der doppelsträngigen DNA und fluoresziert nach Anregung durch UV-Licht, wobei die Intensität mit der Konzentration der DNA korreliert. Die Verwendung einer DNA-Leiter, die DNA-Moleküle verschiedener Größen enthält, erlaubt so die Größenbestimmung der PCR-Produkte (Schmidt, 2017). Die verwendeten 2,5% Agarosegele setzten sich wie folgt zusammen: 2,5g Agarose, 100ml TAE-Puffer, 3µl Ethidiumbromid. Nach Aufkochen der Agarose im TAE-Puffer wurde das Ethidiumbromid während der Abkühlphase unter Einsatz eines Magnetrührers hinzugegeben. Anschließend wurden die Gele in Form gegossen. Die ausgehärteten Gele wurden dann mit 3µl PCR-Produkt sowie einer DNA-Leiter mit 100bp Abstufungen (Thermo Scientific, München, Deutschland) bestückt. Nach ungefähr 20 Minuten erfolgte das Ablesen der Gele durch UV-Belichtung (Lourmat

Fusion FX, Vilber, Eberhardzell, Deutschland). Die Agarosegel-Elektrophorese wurde zunächst zur Temperaturoptimierung der PCR eingesetzt (Abbildung 8). Im Weiteren wurden dann alle erzeugten PCR-Produkte vor Einsatz der Pyrosequenzierung zur Sicherstellung der Qualität und Ausschluss von Verunreinigungen untersucht.



**Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese zur Temperaturoptimierung der PCR, Primer 4.** Gut lässt sich die Ampliconlänge von 190 Basenpaaren (bp) an der DNA-Leiter links ablesen. Alle Temperaturen liefern ein ausreichend gutes Ergebnis. Aufgrund eines möglichen Primerdimers in Probe 2 bei 60°C sowie der höheren Intensität der Banden wurde 58°C ausgewählt. neg = Negativkontrolle.

### Pyrosequenzierung

Den letzten Schritt der Methylierungsanalyse stellt die eigentliche Pyrosequenzierung dar. Hierzu wurde der PyroMark® Q96 ID mit zugehöriger PyroMark® Q96 Workstation, die PyroMark® Q96 Cartridge und die PyroMark® Gold Q96 Reagents (alle Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellervorgaben im „PyroMark® Q96 User Manual“, „PyroMark® Gold Q96 Reagents Handbook“ und „PyroMark® Q96 Software User Guide“ eingesetzt.

Der erste Schritt umfasste die Immobilisierung der aufgrund des verwendeten Primers biotinylierten DNA an Streptavidin Beads. Basis hierfür ist die starke Bindung zwischen Streptavidin und Biotin (Mülhardt, 2013). Dafür wurde der Reaktionsansatz in Tabelle 15 in eine 96-Well Platte gegeben, verschlossen und nach kurzem zentrifugieren für 10 Minuten auf den Plattenrüttler gegeben.

**Tabelle 15: Reaktionsansatz DNA-Immobilisierung.**

Bestandteil	Volumen je Reaktionsgefäß
Streptavidin Sepharose Beads	1,5µl
Binding Puffer	40µl
dH <sub>2</sub> O	28,5µl
[Btn] PCR-Produkt	10µl
Gesamtvolumen	80µl

Parallel wurde in eine weitere 96-Well Platte 40µl Reaktionsansatz bestehend aus 37,6µl Annealing-Puffer und 2,4µl des 10µM Sequencing-Primers vorgelegt sowie die Vakuum Workstation vorbereitet. Dafür wurden die entsprechenden Gefäße mit dH<sub>2</sub>O, 70% Ethanol, Denaturationspuffer und einem Waschpuffer versehen.

Im zweiten Schritt wurden nun die Streptavidin Beads mitsamt der anhaftenden DNA durch das angelegte Vakuum aus der ersten Platte in den Arbeitskopf der Workstation übernommen. Nach einer Spülung mit 70% Ethanol wurde die doppelsträngige DNA durch den Denaturationspuffer in Einzelstränge aufgetrennt und nach einem Waschschrift im entsprechenden Puffer durch Abschalten des Vakuums aus dem Arbeitskopf in die vorbereitete zweite Platte abgegeben.

Der dritte Schritt umfasste dann eine weitere Denaturierung der DNA, wozu die 96-Well Platte für 2 Minuten auf eine Heizplatte (85°C) gestellt wurde. Daraufhin erfolgte die Anlagerung des Sequenzprimers, die anschließend innerhalb von 8 Minuten bei Raumtemperatur abgeschlossen wurde. Begleitend wurde der Pyrosequenzierer vorbereitet. Dazu wurde nach Starten der Software und Hochladen des mit dieser erstellten Assays die Kartusche mit einem Enzym- und Substratmixes sowie den dNTPs in durch die Software vorgegebener Menge bestückt.

Für den vierten und letzten Schritt wurde die 96-Well Platte in den Pyrosequenzierer eingestellt und der vorbereitete Lauf gestartet. Base für Base erfolgte dann die Zugabe von Substrat, Enzym und dNTP. Bei erfolgreichem Einbau wurde der ausgesendete Lichtimpuls registriert und als Peak dargestellt. Da das vorbereitete Assay eine Methylierungsanalyse der CpGs vorsieht, erfolgt die Berechnung bereits durch die verwendete Software. Die Ausgabe enthält somit den Methylierungsgrad in Prozent je untersuchten CpG für jede einzelne Probe.

#### *Qualitätskontrolle*

Auf verschiedenen Ebenen der Versuche wurden Maßnahmen ergriffen, um eine möglichst hohe Qualität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Als Basismaßnahme fand der Einsatz von Negativkontrollen zum Ausschluss von Verunreinigungen statt. Außerdem wurde bei der Zusammenstellung der Platten auf eine Durchmischung von Proben aller Studienarme auf jeder einzelnen Platte geachtet, um Batch-Effekte zu vermeiden. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Bisulfidkonvertierung wurden DNA-Proben (EpiTect® PCR Control DNA Set, Qiagen, Hilden, Deutschland)

mit 0, 50 und 100% Methylierung der enthaltenen CpGs vor deren Durchführung auf allen Platten ergänzt. Sowohl PCR als auch die Pyrosequenzierung wurden dann in Duplikaten praktiziert. Nach einer ersten softwareinternen Qualitätskontrolle, die Einzelergebnisse unzureichender Güte aussortierte, wurden in einem weiteren Schritt die Duplikate auf Übereinstimmung kontrolliert. Nur solche mit einer absoluten Standardabweichung ( $SD$ )  $< 0,05$  sowie einer Abweichung  $< 3SD$  vom Mittelwert des Duplikats wurden akzeptiert und ihr Mittelwert für die Auswertung berücksichtigt (Kollert et al., 2020). Alle ausgeschlossenen Proben wurden dokumentiert und, soweit vielversprechende Ausgangsproben vorlagen, auf einer Wiederholerplatte erneut analysiert. Abbildung 9 gibt einen Überblick über die Probenanzahl und final erhaltenen Messwerte.

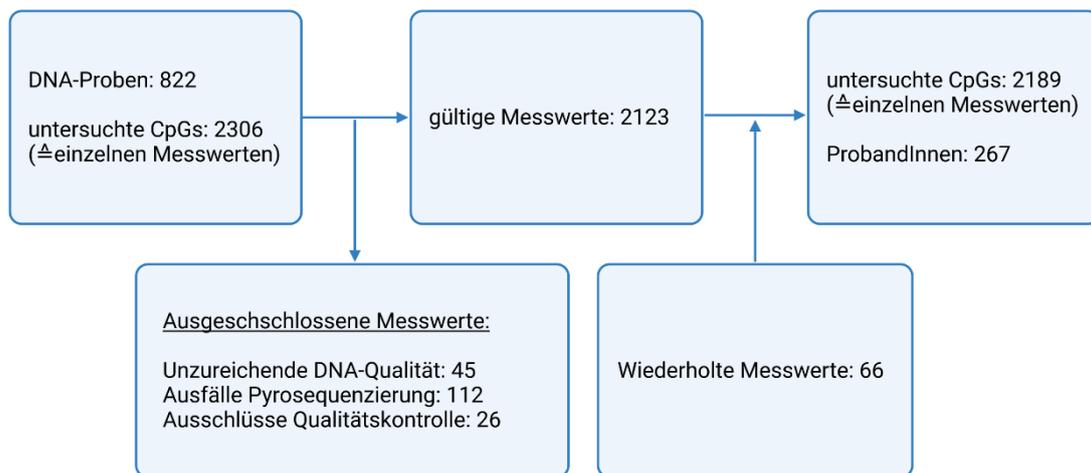


Abbildung 9: Methylierungsanalyse, verarbeitete Proben und Ausfälle. Erstellt mit BioRender.com

### 2.2.7 Expressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

#### *Theoretischer Hintergrund*

Bei der qPCR handelt es sich um eine weitverbreitete Methode zur Mengenbestimmung der vorliegenden DNA in einer Probe. Sie eignet sich durch Kombination mit einem vorgeschalteten Schritt der reversen Transkription, bei dem RNA in die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt wird, auch zur Quantifizierung von mRNA (Bustin, 2000; Higuchi et al., 1992). Dabei wird zunächst das in unterschiedlichen Viren vorkommende Enzym Reverse Transkriptase gemeinsam mit ubiquitären Primern eingesetzt. Als RNA-abhängige-DNA-Polymerase besitzt dieses die Fähigkeit einen Hybridstrang aus RNA und ihrer komplementären DNA zu erzeugen. Nach Abbau der

RNA durch eine RNase liegt der zur ursprünglichen RNA komplementäre cDNA-Einzelstrang vor (Mülhardt, 2013). Dieser wird dann in der sich anschließenden qPCR verwendet, um die Menge der initial vorhanden mRNA zu bestimmen. Im Vergleich zu anderen quantitativen PCR-Methoden beruht ihre Funktionsweise auf einer Beobachtung der ablaufenden PCR in Echtzeit. Dazu wird dem üblichen PCR-Reaktionsansatz (DNA-Polymerase, Substrat, Primer) ein in die DNA interkalierender Farbstoff, z.B. SYBR Green, zugegeben, der nach Einlagerung in die DNA seine Fluoreszenz verändert. Die üblichen PCR-Zyklen aus Denaturierung → Anlagerung → Verlängerung werden durchlaufen und nach jeder Verlängerungsphase die Fluoreszenz in den Reaktionsgefäßen gemessen. Mit Zunahme der vorhanden DNA durch die Amplifikation steigt diese immer weiter an. Zu einem bestimmten Zeitpunkt der Reaktion werden die für das Verhältnis von Primern, Enzym und DNA-Vorlage optimalen Bedingungen erreicht, sodass das Wachstum exponentiell erfolgt. Diese exponentielle Wachstumsphase, erkennbar an der Geraden in der Mitte des Fluoreszenzdiagramm, erlaubt schließlich die Bestimmung der zugrunde liegenden DNA-Menge (Mülhardt, 2013). Einheitlich definiert wird dazu der Zyklus abgelesen, bei dem die gemessene Fluoreszenz erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dieser wird als Cq (Quantification Cycle) oder Ct (Threshold Cycle) angegeben, wobei die „*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guideline*“ die Verwendung von Cq empfiehlt, was in dieser Arbeit umgesetzt wird (Bustin et al., 2009). Zusammenfassend wird das Verfahren aus Reverser Transkription mit anschließender qPCR auch als RT-qPCR bezeichnet. Um die Ergebnisse für verschiedene Proben, Untersuchungsdurchläufe sowie unter Anbetracht weiterer Einflüsse vergleichen zu können, stellt die relative Quantifizierung der Cq die geläufigste Methodik dar. Dazu werden in einem ersten Schritt die Effizienzen der einzelnen PCR-Läufe, die methodenbedingt in der Realität nicht bei exakt 100% liegen, zur Relativierung der zuvor ausgegeben Quantitäten genutzt. Anschließend erfolgt die Normalisierung dieser anhand von Referenzgenen. Bei Referenz- oder Housekeeping-Genen handelt es sich um ubiquitär exprimierte Gene, die bestenfalls kaum Schwankungen im Rahmen des Zellzykluses unterliegen. Daher eignen sie sich zur Normalisierung der Expression eines Genes unter Berücksichtigung des Gesamtniveaus der Genexpression der jeweiligen Probe (Kozera & Rapacz, 2013). Zuletzt kann durch den Einsatz gleichbleibender Kontrollproben in jedem PCR-Lauf eine Kalibrierung für einzelnen Läufe durchgeführt werden. Nach Abschluss der Berechnung, die nach Aufbereitung der Ausgangsdaten durch eine Software wie Qbase+ erfolgen kann, ergeben sich die sogenannten

kalibrierten, normalisierten, relativen Quantitäten (CNRQ) (Hellemans et al., 2007). Diese einheitenlosen Verhältniswerte erlauben schließlich den Vergleich der mRNA-Expression zwischen den einzelnen Proben und Untersuchungsgruppen.

### *cDNA-Synthese*

Für die Synthese der cDNA wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) entsprechend der Herstellervorgaben verwendet. Nach Herstellung des Reaktionsansatzes in Tabelle 16, welcher unter Verwendung steriler Pipettenspitzen und besonderer Sorgfalt zum Schutz vor Verunreinigungen erfolgte, fand die eigentliche Synthese im Thermocycler nach dem Protokoll in Tabelle 17 statt.

**Tabelle 16: Reaktionsansatz cDNA-Synthese.**

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen je Reaktionsgefäß</b>
RNA-Lösung mit 400ng RNA	} 15 µl
Nuklease freies Wasser	
5x iScript Reaktions-Mix	4µl
iScript Reverse Transkriptase	1µl
Gesamtvolumen	20µl

**Tabelle 17: Reaktionsprotokoll cDNA-Synthese. RT = Reverse Transkriptase.**

<b>Schritt</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Primer Anlagerung	5min	25°C
Reverse Transkription	30min	42°C
Inaktivierung der RT	5min	85°C
Halten		4°C

Die synthetisierte cDNA wurde für die weiteren Untersuchungen mit TE-Puffer auf 1:5 verdünnt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### *Primer-Design und Vorarbeit der Arbeitsgruppe*

Für die Auswahl der qPCR-Primer wurde auf die *Roche Life Science Universal Probe Library* (Roche, Basel, Schweiz) zurückgegriffen, deren Dienst mittlerweile eingestellt ist (Roche, 2019). Dabei wurde für *FKBP5* ein Primerpaar ausgewählt, welches drei der vier bekannten *FKBP5*-Transkripte erfasst und ein Amplicon von 184bp Länge erzeugt. Auch

die Auswahl der Primer für die verwendeten Referenzgene RS27A, ALAS und SDHA erfolgten über die gleiche Bibliothek. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die Sequenzen aller verwendeter Primer für die qPCR. Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) bezogen.

*Tabelle 18: Verwendete Primer qPCR.*

<b>Primer</b>		<b>Sequenz (5´ nach 3´)</b>
FKBP5	F	AAAATGCAGCGGGAAGAAC
	R	CAGCCTGCTCCAATTTTTCT
RS27A	F	GGTTAAGCTGGCTGTCCTGAA
	R	AGAAGGGCACTCTCGACGAA
ALAS	F	CGGGATGGAGTCATGCCAAA
	R	ATCAGAGAACTCGTGCTGGC
SDHA	F	AACATCGGAACTGCGACTC
	R	CTTCTTGCAACACGCTTCCC

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit standen die obigen Primer durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe „Biomarker affektiver Störungen“ (Ltg. Prof. Dr. Andreas Menke) insbesondere durch Dr. Carolin Weiß, bereits zur Verfügung. Aufbauend auf dieser wurden die Primer der Referenzgene, die sich in den Vorversuchen unter den Gegebenheiten des Labors als besonders zuverlässig erwiesen hatten, übernommen. Der *FKBP5* Primer wurde zunächst anhand der *Roche Life Science Universal Probe Library* im Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit überprüft und für passend befunden. Seine Funktionalität in der qPCR wurde anschließend mittels Gelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse kontrolliert. Beide bestätigten die Synthese des erwarteten, ungefähr ~180bp langen Amplicons. Neben den Primern waren als weitere Vorarbeit, besonders durch Dr. Carolin Weiß, bereits ein Teil der Proben mittels qPCR analysiert, sodass deren Rohdaten für eine gemeinsame Auswertung mit den neu gewonnen zur Verfügung stand. Um diese möglichst ohne technische Verfälschung der Ergebnisse durch Batch-Effekte durchzuführen, wurde in den weiteren Analyseschritten neben den gleichen Primern auch auf die identischen Kontrollproben (IRC = Inter Run Calibrator) zurückgegriffen sowie dieselben Protokolle und Gerätschaften verwendet.

### *Durchführung der qPCR*

Die qPCR wurde mit dem SYBR™ Select Master Mix for CFX (appliedbiosystems by Thermo Fischer Scientific, Vilnius, Litauen) im 384-Well Plattenformat mit Hilfe des CFX384® Real-Time System C1000 Touch® Thermocyclers (Bio-Rad, Hercules, USA) unter Berücksichtigung der Herstellervorgaben durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Reaktionsansatz aus Tabelle 19 unter besonderer Vorsicht, permanenter Kühlung auf Eis sowie möglichst dunkler Umgebung hergestellt, durch vortexen gründlich vermischt und für eine Minute bei 4000rpm kurz abzentrifugiert. Die Lagerung erfolgte über Nacht bei 4°C, am Folgetag fand die qPCR nach dem Protokoll in Tabelle 20 statt. Nach initialer Aktivierung der DNA-Polymerase wurden 45 Zyklen aus Denaturierung → Anlagerung → Verlängerung durchlaufen, wobei nach jedem Zyklus eine Messung der Fluoreszenz durch den Thermocycler durchgeführt und dokumentiert wurde. Nach einer ersten optischen Qualitätskontrolle (Homogenität des Fluoreszenzdiagramms, Schmelzkurve) erfolgte die Ausgabe der Cq über die Software Bio-Rad CFX Manager 3.0 (Bio-Rad, Hercules, USA).

**Tabelle 19: Reaktionsansatz qPCR.**

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen je Reaktionsgefäß</b>
SYBR™ Select Master Mix	5µl
Primer-Mix (Konzentration 5µM F- + R-Primer)	1µl
cDNA-Lösung (≅ 4ng eingesetzter RNA vor Synthese)	4µl
Gesamtvolumen	10µl

**Tabelle 20: Reaktionsprotokoll qPCR.**

<b>Schritt</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
DNA-Polymerase Aktivierung	2min	95°C
Denaturierung	5s	95°C
Anlagerung und Verlängerung	30s	60°C
45 Zyklen		

### *Datenaufbereitung und Berechnung der CNRQ*

Im ersten Schritt der Datenaufbereitung erfolgte die Berechnung der Effizienzen für jeden einzelnen qPCR-Lauf, um später auf dieser Basis relative Quantitäten bestimmen zu können. Das Programm LinReg PCR V2017 wendet dabei ein Lineares

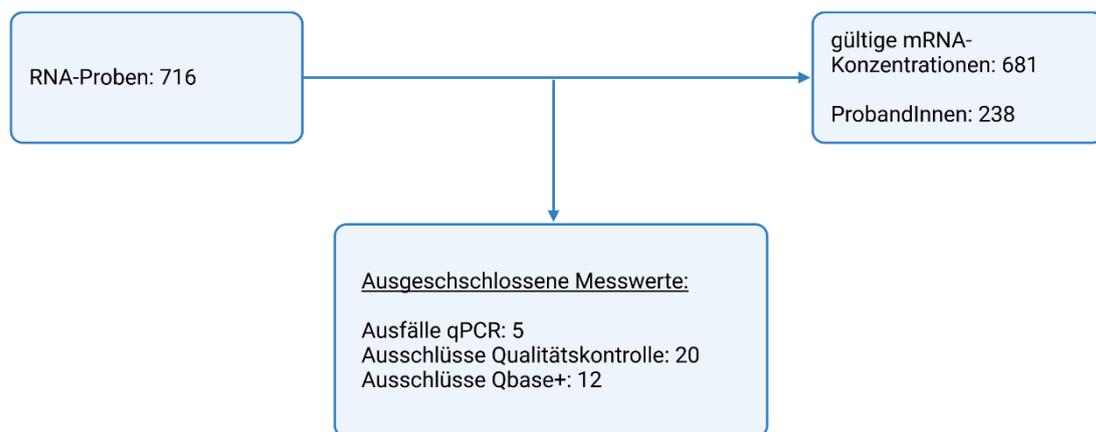
Regressionsmodell auf jede einzelne Probe an und errechnet anhand dessen die durchschnittliche PCR-Effizienz aller Proben eines Laufes. Vorausgesetzt werden dabei mindestens vier Datenpunkte zur Bestimmung der Regressionsgerade sowie ein Korrelationskoeffizient  $R$  von  $> 0,9995$ . Für die mittleren Effizienzen ergeben sich Werte zwischen 1 (entspricht 0% und keiner Amplifikation) und 2 (entspricht 100% und einer Verdopplung der DNA in jedem Zyklus) (Ruijter et al., 2013; Ruijter et al., 2009). Alle Läufe mit einer Effizienz  $> 1,75$  wurden akzeptiert, dabei lagen die errechneten Werte zwischen 1,81 und 1,88.

Im zweiten Schritt erfolgte dann, nach einer Qualitätskontrolle und Aufbereitung der Datenstruktur, die Eingabe in die Software Qbase+ (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgien). Diese umfasste die zuvor errechneten mittleren Effizienzen der einzelnen PCR-Läufe sowie die Cqs des Zielgens *FKBP5*. Für die Normalisierung der Werte wurden außerdem die ebenfalls mittels qPCR bestimmter Cqs der in der Arbeitsgruppe etablierten Referenzgene *RS27A* (*40S Ribosomal Protein S27a*), *SDHA* (*Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A*) und *ALAS* (*Aminolevulinat Synthase*) ergänzt (Lallemant et al., 2009; Menke et al., 2018; Santegoeds et al., 2017; Song et al., 2023). Da eine größere Anzahl an verwendeten Referenzgenen auch die Qualität der Normalisierung verbessert, kann die Nutzung von drei verschiedenen Referenzgenen als kosteneffiziente Normalisierung mit ausreichender Qualität angesehen werden (Kozera & Rapacz, 2013). Zuletzt wurden die auf jeder Platte enthaltenen IRCs definiert, die eine Kalibrierung zwischen den einzelnen Läufen erlauben. Nach Abschluss der Berechnungen erfolgte dann die Ausgabe der CNRQ (Hellemans et al., 2007).

#### *Qualitätskontrolle*

Bei der qPCR handelt es sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität um ein empfindliches und fehleranfälliges Verfahren, weshalb abseits einer besonders sorgfältigen Arbeitsweise weitere Maßnahmen zur Qualitätskontrolle unternommen wurden (Bustin et al., 2009). Alle untersuchten qPCR-Platten wurden zur größtmöglichen Nivellierung von Batch-Effekten aus Proben der verschiedenen Studienarme zusammengesetzt. Neben zwei unterschiedlichen Negativkontrollen ( $H_2O$ , kein cDNA-Template) enthielten alle außerdem eine Probe, der keine Reverse Transkriptase zugegeben worden war. Die Kombination dieser drei Kontrollen der unterschiedlichen Arbeitsschritte erlaubte später eine Identifikation der möglichen Fehler oder Verunreinigungsquelle. Die Untersuchung

selbst fand in Triplikaten statt, mit deren Mittelwerten die eigentliche Auswertung stattfand. In einer Analyse wurden zuvor solche Triplikate identifiziert, deren Cqs weiter als 0,5 auseinander lagen. Nach deren Ausschluss wurden die verbleibenden zwei Werte nur dann akzeptiert, wenn die Differenz unter 0,3 lag. Zuletzt wurde durch die Software Qbase+ sowohl die Stabilität der Referenzgene untersucht als auch eine weitere Qualitätskontrolle der eingegeben Werte durchgeführt, welche zum Ausschluss weiterer Proben führte. Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Probenanzahl und final erhaltene Messwerte.



**Abbildung 10: Analyse der mRNA-Expression, Verarbeitete Proben und Ausfälle.** (m)RNA = (messenger) Ribonucleic Acid, qPCR = quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion. Erstellt mit BioRender.com

### 2.2.8 Genotypisierung von rs1360780

Die Genotypisierung des SNP rs1360780 von *FKBP5* sowie einer Vielzahl weiterer genetischer Polymorphismen in Assoziation mit psychischen Erkrankungen erfolgte für den Großteil der ProbandInnen (insgesamt 384) durch die Firma Life&Brain GmbH (Bonn, Deutschland) unter Verwendung eines Microarrays (Global Screening Arrays Version 1.0) der Firma Illumina (San Diego, USA). Aus den nach der Analyse erhaltenen Rohdaten wurden die Allele von rs1360780 mit Hilfe der Software PLINK (Version 1.9, Shaun Purcell, Open-Source) dekodiert.

62 später eingeschlossene TeilnehmerInnen wurden durch Inge Reck, eine technische Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe, mittels kompetitiver Allel-spezifischer PCR genotypisiert (KASP-Assay). Die verwendeten Primer sowie der Reaktions-Mastermix wurden von der Firma LGC (Teddington, UK) bezogen.

### 2.2.9 Statistische Auswertung

Die Erstellung der Statistik erfolgte mit Unterstützung und unter Supervision von Dr. Catharina Klüpfel und Dr. Martin Weiß an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie (Dir.: Univ.-Prof. Dr. J. Deckert). Für die Organisation der Daten, deren Auswertung sowie die Erstellung der Grafiken wurde SPSS Statistics Version 26 bzw. 28 (IBM Corporation, Armonk, USA) verwendet.

Als erster Schritt der Datenauswertung wurden die für die Fragestellungen relevanten klinischen Daten der beiden Studien GEPaD und DaCFail mit den Laborergebnissen in einen gemeinsamen Datensatz überführt. Anschließend wurden weitere Variablen anhand der Rohdaten berechnet und vorhandene zur besseren statistischen Verarbeitung umgewandelt. Für die Depressionsfragebögen BDI und MADRS erfolgte die Berechnung der Gesamtscores in Woche 1 und 4, deren absolute Reduktion sowie der verbleibende Prozentsatz nach Therapie. Daraus wurde anschließend ein Therapieansprechen bei Reduktion der Gesamtpunktzahl um min. 50% abgeleitet. Auch die Gesamtscores von LTE und CTQ wurden gebildet. Die Allele des SNP rs1360780 wurden zu einem Risiko- (AA oder AG) sowie einem protektiven Genotyp (GG) zusammengefasst. Anhand der dokumentierten Medikation in der jeweiligen Behandlungswoche wurden außerdem dichotome Variablen für die Behandlung mit einer Medikamentengruppe über den Gesamtzeitraum erstellt.

Für die deskriptiven Statistiken wurde das arithmetische Mittel ( $M$ ) sowie die Standardabweichung ( $SD$ ) angegeben. Zur Berechnung von Gruppenunterschieden der deskriptiven Statistiken wurde im Vergleich der vier Gruppen eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) verwendet. Allen Verfahren der Varianzanalyse gemeinsam ist dabei, dass der Vergleich der Varianzen innerhalb sowie zwischen den definierten Gruppen verwendet wird, um zu bestimmen, ob diese sich für die zu untersuchende Variable unterscheiden. Wird also die Nullhypothese „Zwischen den Untersuchungsgruppen besteht kein Unterschied“ auf dem gewählten Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  abgelehnt, so besteht ein signifikanter Gruppenunterschied. Für den Vergleich zwischen Depression und Kontrollen wurde für mindestens ordinal skalierte Werte auf den nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test und für nominal skalierte auf den Chi-Quadrat-Test zurückgegriffen. Als allgemeines Signifikanzniveau für diese und alle weiteren Berechnungen wurde  $p \leq 0,05$  (\*) festgelegt (Bortz & Schuster, 2010).

Um die Frage nach Gruppenunterschieden in der Methylierung regulatorischer CpGs vor Durchführung des mDST, also der Baseline-Methylierung, als Teil der Fragestellungen 1,4 und 5 zu beantworten, wurde das Verfahren der Kovarianzanalyse (ANCOVA) gewählt. Da die Methylierung der DNA multiplen Einflussfaktoren unterliegt, ist deren Berücksichtigung für die Dateninterpretation wesentlich. Die ANCOVA erlaubt es deren Einfluss zu erfassen und diesen statistisch zu korrigieren. Zur Auswahl möglicher Kovariaten wurde die vorhandene Literatur studiert. Um dem explorativen Ansatz dieser Arbeit gerecht zu werden, wurde aus der Vielzahl möglicher Kovariaten die gemeinsame Schnittmenge der Vorliteratur herausgefiltert, um sich auf diese zu begrenzen. Alter und Geschlecht konnten dabei als elementar identifiziert werden und wurden für alle Berechnungen als Kovariaten berücksichtigt (Klengel et al., 2013; Menke et al., 2013; Menke et al., 2021; Ortiz et al., 2018). Eine probatorisch zusätzliche Berücksichtigung von Raucherstatus und BMI zu Beginn der Auswertungen brachte unabhängig davon keine relevant abweichenden Ergebnisse. Der Genotyp des SNPs rs1360780 wurde aus obigen Gründen ebenfalls nicht als allgemeine Kovariate berücksichtigt. Stattdessen erfolgte eine Aufteilung der Daten entsprechend dem Genotyp für Auswertungen mit vermutetem Einfluss durch diesen. Vor jeder ANCOVA erfolgte eine Prüfung auf Normalverteilung der Stichproben mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests, deren Vorhandensein für alle parametrischen Testverfahren eine nötige Grundlage darstellt. Als weitere Voraussetzungen wurde die Homogenität der Regressionssteigungen durch Bildung der entsprechenden Interaktionsterme sowie die Varianzgleichheit mittels des Levene-Tests überprüft. Vereinzelt Verletzungen der Voraussetzungen werden für die entsprechende Gruppe in der Statistik berichtet, die ANCOVA aber dennoch verwendet, da sie als robustes Testverfahren bei vereinzelt Abweichungen dennoch verlässliche Ergebnisse liefert (Bortz & Schuster, 2010). Im Ergebnisteil wurde neben dem  $p$ -Wert, der eine Aussage über die Signifikanz der Ergebnisse erlaubt, auch das partielle  $\eta^2$  als Effektstärke angegeben. Dabei entspricht ein Wert von 0,01 einem kleinen, 0,06 einem mittleren und 0,14 einem großen Effekt (Cohen, 1988).

Der Effekt des mDST auf die Methylierung und mRNA-Expression als Teil der Fragestellungen 1, 2, 4 und 5, wurde mittels einer Mixed ANOVA berechnet. Diese berücksichtigt sowohl den Einfluss von Zwischensubjektfaktoren (entsprechend der Zugehörigkeit zu einer Gruppe) als auch Innersubjektfaktoren (entsprechend der Intervention zwischen den zwei Untersuchungszeitpunkten am einzelnen Probanden). Dies stellt eine Erweiterung der zuvor geschilderten ANCOVA dar, um die erfolgte Messwiederholung im Rahmen des mDST zu berücksichtigen. Parallel wurden Alter und

Geschlecht ebenfalls als Kovariaten verwendet. Neben einer Normalverteilung der Daten und der Varianzgleichheit setzt die Mixed ANOVA außerdem eine Gleichheit der Kovarianzen voraus, die mittels des Box-Tests überprüft wurde. Eine Berücksichtigung der Sphärizität, also der Varianzgleichheit zwischen den einzelnen Stufen, war aufgrund des Studiendesigns mit lediglich zwei Untersuchungszeitpunkten nicht nötig. Entsprechend der ANCOVA wurden ebenfalls alle Abweichungen berichtet, aufgrund der Robustheit des Verfahrens aber keine Anpassung vorgenommen. Das Ergebnis der Mixed ANOVA unterscheidet zwischen einem Haupteffekt der Zwischen- oder Innersubjektfaktoren sowie einem Interaktionseffekt dieser, die jeweils separat angegeben werden. In einer Unteranalyse wurden alle Gruppen zusammengefasst, um beobachtete Trends der Glukokortikoidwirkung nachzuvollziehen. Zur Beurteilung des Effekts zwischen den zwei Untersuchungszeitpunkten wurde ein t-Test für verbundene Stichproben verwendet, wobei angesichts eines  $N > 30$  auf eine Prüfung bezüglich Normalverteilung verzichtet wurde. Als Maß für die Effektstärke wird dabei der Betrag von Cohens  $d$  verwendet. Ab einem Wert von 0,8 liegt ein großer Effekt vor (Cohen, 1988).

Die Untersuchung möglicher Parameter von *FKBP5* als Biomarker für ein Therapieansprechen, entsprechend Fragestellung 5, wurden zusätzlich zur Mixed ANOVA auch ein prospektiver Ansatz gewählt. Dazu wurde das Verfahren der binären logistischen Regression angewendet. Dies dient zur Überprüfung des Einflusses verschiedener Variablen auf die Vorhersagewahrscheinlichkeit zur Zugehörigkeit einer dichotomen Gruppe (Therapieresponder vs. Therapie-Non-Responder). Als nötige Voraussetzung wurde die Linearität der Beziehung von abhängigen und unabhängigen Variablen mittels des Box-Tidwell-Ansatz überprüft. Außerdem wurden relevante Ausreißer sowie das Vorliegen von Multikollinearität zwischen mehreren Variablen ausgeschlossen. Im Ergebnis liefern die Berechnungen einen Signifikanzwert für das gesamte Regressionsmodell sowie für die einzelnen enthaltenen Variablen. Außerdem wurde die Anpassungsgüte des Modells mittels des Hosmer-Lemeshow-Testes beurteilt, wobei ein nicht signifikantes Testergebnis diese bescheinigt. Die Varianzaufklärung, die durch das Modell erfolgen kann, stellt Nagelkerkes  $R^2$  dar. Für Werte  $> 0,2$  ist von einer akzeptablen Varianzaufklärung auszugehen (Backhaus et al., 2006; Hemmerich, 2018). Veranschaulicht werden die Ergebnisse, indem der Gesamtprozentsatz korrekter Klassifikationen von Therapieansprechen bzw. -nichtansprechen durch das Modell gegen eine zufällige Einteilung verglichen wird.

Zur Beurteilung eines Zusammenhangs zwischen den erhobenen Messwerten von *FKBP5* und klinischen Parametern wurde angesichts der vorliegenden metrischen Daten das Verfahren der Pearson-Produkt-Moment Korrelation angewendet. Das Vorliegen einer Normalverteilung wurde aufgrund der Stichprobengröße von  $> 30$  nicht separat überprüft. Der errechnete Korrelationskoeffizient  $r$ , der Werte zwischen  $-1$  und  $+1$  annehmen kann, gibt Auskunft über die Stärke des Zusammenhangs sowie dessen Richtung. Die Signifikanz des beobachteten Zusammenhangs wurde separat berichtet.

Da alle beschriebenen Auswertungen im Rahmen des Pilotstudiendesigns einen explorativen Ansatz verfolgen, wurde auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 FKBP5 und Herzinsuffizienz

##### 3.1.1 Deskriptive Statistik der Kohorten

Zur Überprüfung einer möglichen Assoziation regulatorischer Parameter von *FKBP5* und dem Vorhandensein einer Herzinsuffizienz wurden alle 171 ProbandInnen der DaCFail-Studie untersucht. Tabelle 21 gibt einen Überblick über relevante Charakteristika der Stichprobe.

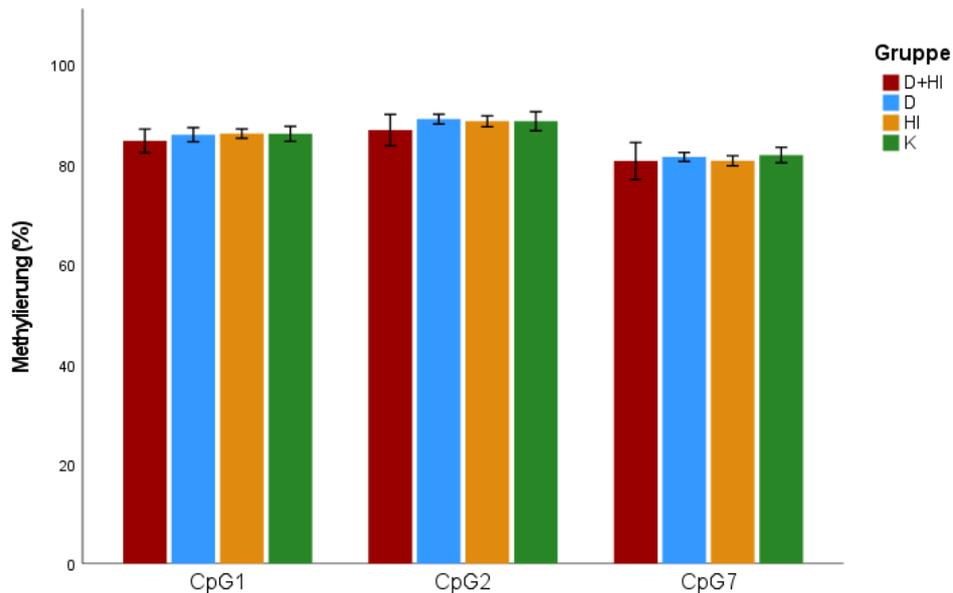
**Tabelle 21: Charakteristika DaCFail-Stichprobe (N = 171).** BMI= Body Mass Index, D= Depression, HI = Herzinsuffizienz, K = Kontrollen, M = Mittelwert, N = Anzahl, SD = Standardabweichung. p-Wert berechnet mittels ANOVA, \* p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

<b>Merkmal</b>	<b>Gruppe 1 (D + HI) N = 11</b>	<b>Gruppe 2 (D) N = 80</b>	<b>Gruppe 3 (HI) N = 47</b>	<b>Gruppe 4 (K) N = 33</b>	<b>p-Wert</b>
Geschlecht					<b>&lt;0,001*</b>
Frauen N (%)	4 (36,4)	43 (53,8)	6 (12,8)	17 (51,1)	
Männer N (%)	7 (63,6)	37 (46,3)	41 (87,2)	16 (48,5)	
Alter in Jahren	65,00	58,88	69,40	63,27	<b>&lt;0,001*</b>
M ( $\pm$ SD)	( $\pm$ 10,61)	( $\pm$ 7,82)	( $\pm$ 8,26)	( $\pm$ 7,45)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,07	28,94	31,41	26,70	0,230
M ( $\pm$ SD)	( $\pm$ 5,48)	( $\pm$ 5,73)	( $\pm$ 16,89)	( $\pm$ 3,78)	
Raucher N (%)	1 (9,1)	18 (22,5)	2 (4,3)	6 (18,2)	<b>0,023*</b>
Risikogenotyp (A-Allel) N (%)	5 (50)	36 (46,2)	23 (50)	16 (48,5)	0,922

Auffällig ist ein signifikanter Unterschied der Gruppen bezüglich Alter und Geschlechterverteilung (jeweils  $p < 0,001$ ), wohingegen das Risikoallel von rs1360780 nahezu identisch in den Gruppen vertreten ist. Auch hinsichtlich ihrer Größe unterscheiden sich die Gruppen, wobei PatientInnen mit Depression über- und solche mit komorbider Herzinsuffizienz unterrepräsentiert sind.

### 3.1.2 Baselinemethylierung

Abbildung 11 stellt die durchschnittliche Methylierung der drei untersuchten CpGs zur Baseline, also vor Durchführung des mDST, dar.

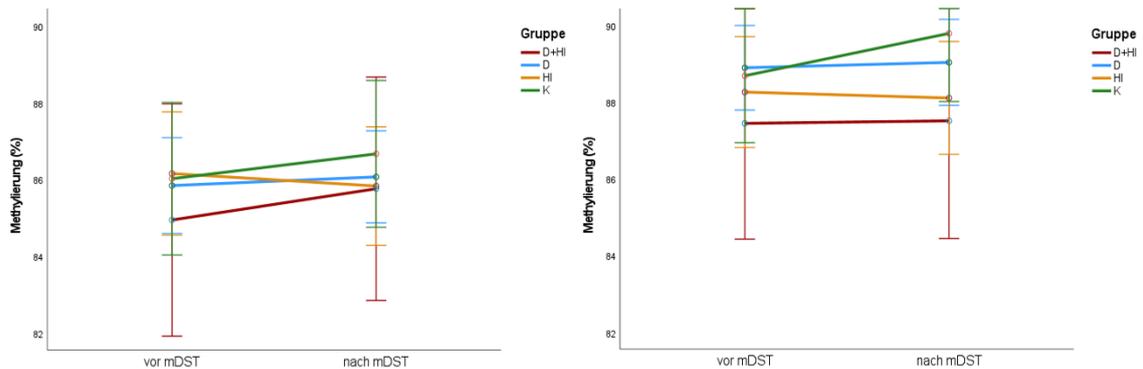


**Abbildung 11: Baselinemethylierung regulatorischer CpGs (4 Gruppen).** D = Depression, HI = Herzinsuffizienz, K = Kontrollen. Jeder Balken zeigt die durchschnittliche Methylierung aller Proben innerhalb einer Gruppe für das jeweilige CpG zum Zeitpunkt vor Durchführung des mDST, entsprechend der Baselinemethylierung. Für CpG1 standen 141, für CpG2 142 und für CpG7 164 Messungen zur Verfügung. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall.

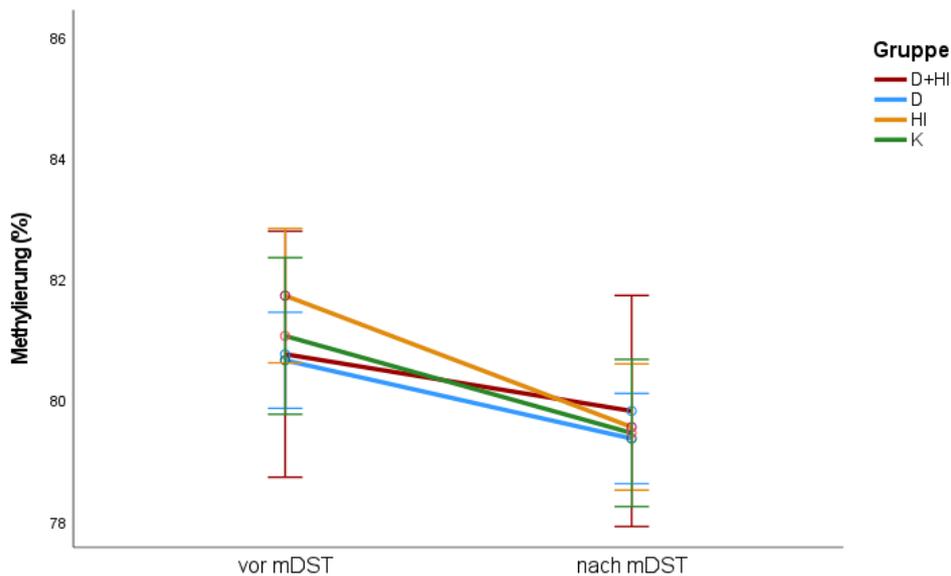
Für keines der analysierten CpGs fand sich ein Unterschied zwischen den Gruppen. CpG1:  $F(3, 135) = 0,19$ ,  $p = 0,903$ , partielles  $\eta^2 = 0,004$  (Verletzung der Normalverteilungsannahme in Gruppe 2: Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < 0,001$ ); CpG2:  $F(3, 136) = 0,632$ ,  $p = 0,596$ , partielles  $\eta^2 = 0,014$ ; CpG7:  $F(3, 158) = 1,090$ ,  $p = 0,355$ , partielles  $\eta^2 = 0,020$ .

### 3.1.3 Änderung der Methylierung durch mDST

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die Veränderung des Methylierungszustandes an den untersuchten CpGs als Reaktion auf eine GK-Ausschüttung bei Stress, simuliert durch den mDST.



**Abbildung 12: Änderung der Methylierung auf den mDST für CpG1 (links) und CpG2 (rechts).** D = Depression, HI = Herzinsuffizienz, K = Kontrollen. Jede Linie zeigt die Veränderung der durchschnittlichen Methylierung des CpGs für die jeweilige Gruppe, zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten: vor und nach Durchführung des mDST. Für CpG1 standen 135 und für CpG2 130 Messungen je Zeitpunkt zur Verfügung. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall. Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.



**Abbildung 13: Änderung der Methylierung auf den mDST für CpG7.** D = Depression, HI = Herzinsuffizienz, K = Kontrollen. Jede Linie zeigt die Veränderung der durchschnittlichen Methylierung des CpGs für die jeweilige Gruppe, zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten: vor und nach Durchführung des mDST. Es wurden 154 Messungen je Zeitpunkt berücksichtigt. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall. Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.

Für CpG1 lassen sich weder ein Haupteffekt des mDST ( $F(1, 129) = 0,562$ ;  $p = 0,455$ , partielles  $\eta^2 = 0,004$ ) oder der Gruppe ( $F(3, 129) = 0,112$ ;  $p = 0,953$ , partielles  $\eta^2 = 0,003$ ), noch ein Interaktionseffekt zwischen den beiden beobachteten ( $F(3, 129) = 1,077$ ;

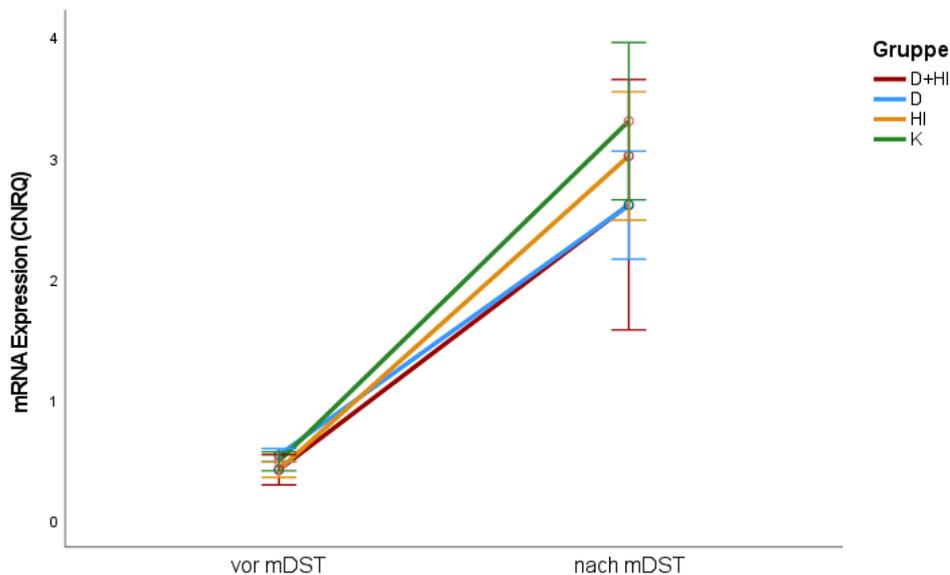
$p = 0,361$ , partielles  $\eta^2 = 0,024$ ), wobei für Gruppe 2 eine Verletzung der Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < 0,001$ ) sowie der Gleichheit der Kovarianzen vorliegt (Box-Test  $p < 0,001$ ). Auch für CpG2 fand sich kein Haupteffekt des mDST ( $F(1, 124) = 0,542$ ;  $p = 0,463$ , partielles  $\eta^2 = 0,004$ ) oder der Gruppe ( $F(3, 124) = 0,615$ ;  $p = 0,607$ , partielles  $\eta^2 = 0,015$ ), noch ein Interaktionseffekt ( $F(3, 124) = 0,616$ ;  $p = 0,606$ , partielles  $\eta^2 = 0,015$ ).

Für CpG7 lässt sich grafisch der Trend für einen Effekt des mDST vermuten. Die Mixed ANOVA konnte aber weder einen signifikanten Haupteffekt des mDST ( $F(1, 148) = 1,557$ ;  $p = 0,214$ , partielles  $\eta^2 = 0,010$ ) oder der Gruppe ( $F(3, 148) = 0,278$ ;  $p = 0,842$ , partielles  $\eta^2 = 0,006$ ), noch ein Interaktionseffekt ( $F(3, 148) = 1,838$ ;  $p = 0,143$ , partielles  $\eta^2 = 0,036$ ) nachweisen, wobei die Normalverteilungsannahme für Gruppe 2 verletzt wurde (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < 0,001$ ).

Um die *FKBP5*-Genregulation auf CpG7 in Zusammenhang mit dem mDST unabhängig von Gruppeneinteilung und Kovariaten zu untersuchen, wurde ein t-Test für verbundene Stichproben über alle ProbandInnen hinweg ergänzt. Dieser bestätigte eine signifikante Demethylierung als Reaktion auf den mDST:  $t(153) = 10,329$ ,  $p < 0,001$ , mit großer Effektstärke: Cohens  $d = 0,832$ .

### 3.1.4 Änderung der mRNA-Expression durch mDST

Die erwartete Zunahme der *FKBP5* mRNA-Expression als Reaktion auf die Glukokortikoidstimulation im Rahmen des mDST veranschaulicht Abbildung 14.



**Abbildung 14: Änderung der mRNA-Expression auf den mDST (4 Gruppen).** CNRQ = Calibrated Normalized Relative Quantities, D = Depression, HI = Herzinsuffizienz, K = Kontrollen. Jede Linie zeigt die Veränderung der durchschnittlichen *FKBP5* mRNA-Expression einer Gruppe, angegeben in CNRQ, zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten: vor und nach Durchführung des mDST. Es wurden 134 Messungen je Zeitpunkt berücksichtigt. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall. Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.

Der grafische Eindruck eines Haupteffekts des mDSTs konnte nach Berücksichtigung der Kovariaten Alter und Geschlecht in der Mixed ANOVA nicht bestätigt werden. Diese wies keinen signifikanten Haupteffekt für mDST ( $F(1, 128) = 0,562$ ;  $p = 0,470$ , partielles  $\eta^2 = 0,004$ ) oder Gruppe ( $F(3, 128) = 0,918$ ;  $p = 0,434$ , partielles  $\eta^2 = 0,021$ ) nach. Auch ein Interaktionseffekt fand sich nicht ( $F(3, 128) = 1,754$ ;  $p = 0,184$ , partielles  $\eta^2 = 0,037$ ), wobei die Normalverteilungsannahme für die Gruppen 2 (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < 0,001$ ) und 3 (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p = 0,033$ ) sowie die Gleichheit der Kovarianzen (Box-Test  $p < 0,001$ ) verletzt wurde.

Um die beobachtete Zunahme der mRNA-Expression unabhängig von Gruppenzugehörigkeit und Kovariaten zu untersuchen und so die *FKBP5*-Genregulation greifbar zu machen, wurde zusätzlich ein *t*-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Erwartungsgemäß bestätigte dieser eine signifikant höhere mRNA-Expression nach Durchführung des mDST:  $t(133) = -17,627$ ,  $p < 0,001$  mit großer Effektstärke: Cohens  $d = -1,523$ .

Neben dem allgemeinen Effekt des mDST auf die mRNA-Expression entsteht zusätzlich der Eindruck einer differentiellen Reaktion der Gruppen depressiver ProbandInnen im Vergleich zur Kontroll- und Herzinsuffizienzgruppe auf die Glukokortikoidstimulation. Dieser soll im nächsten Kapitel durch eine gesonderte Auswertung näher beleuchtet werden.

### **3.2 FKBP5 und Depression vs. gesunde Kontrollen**

#### **3.2.1 Deskriptive Statistik der Kohorten**

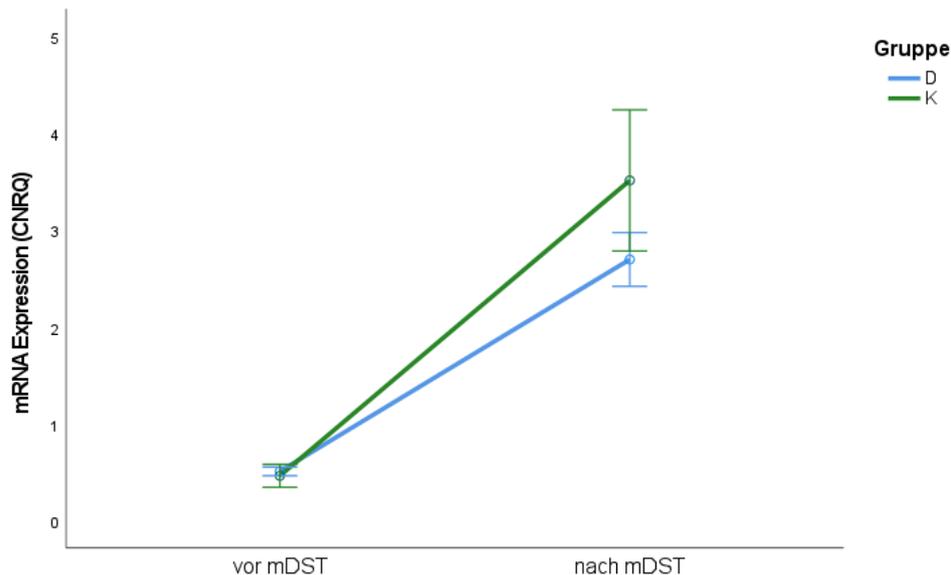
Für diese Untersuchung wurden alle 180 PatientInnen mit schwerer Depression aus der Gesamtstichprobe ausgewählt und deren *FKBP5* mRNA-Expression mit denen der 33 ProbandInnen in der Kontrollgruppe verglichen. Tabelle 22 gibt einen Überblick über die Charakteristika der Stichprobe, wobei sich die beiden Kohorten vor allem hinsichtlich des Alters unterscheiden (Depressionsgruppe: 46,13 ±14,77 Jahre vs. Kontrollgruppe: 63,27 ±7,45 Jahre).

**Tabelle 22: Charakteristika der Stichprobe Depression vs. Kontrollen (N = 213).** BMI = Body Mass Index, M = Mittelwert, N = Anzahl, SD = Standardabweichung. p-Wert berechnet mittels  $\chi^2$ -Tests für nominal skalierte Variablen bzw. Mann-Whitney-U-Test für mindestens ordinal skalierte Variablen, \* p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

<b>Merkmal</b>	<b>GEPaRD (Depression) N = 180</b>	<b>Gruppe 4 (Kontrollen) N = 33</b>	<b>p-Wert</b>
Geschlecht			0,940
Frauen N (%)	94 (52,2)	17 (51,5)	
Männer N (%)	86 (47,8)	16 (48,5)	
Alter in Jahren M (±SD)	46,13 (±14,77)	63,27 (±7,45)	<b>&lt;0,001*</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) M (±SD)	28,69 (±7,42)	26,70 (±3,78)	0,414
Raucher N (%)	62 (34,4)	6 (18,2)	<b>0,008*</b>
Risikogenotyp (A-Allel) N (%)	76 (44,2)	16 (53,3)	0,353

### 3.2.2 Änderung der mRNA-Expression durch mDST

Wie Abbildung 15 veranschaulicht, induziert der mDST eine Steigerung der mRNA-Expression in beiden Gruppen.



**Abbildung 15: Änderung der mRNA-Expression auf den mDST (2 Gruppen).** CNRQ = Calibrated Normalized Relative Quantities, D = Depression, K = Kontrollen. Jede Linie zeigt die Veränderung der durchschnittlichen FKBP5 mRNA-Expression einer Gruppe, angegeben in CNRQ, zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten: vor und nach Durchführung des mDST. Es wurden 162 Messungen je Zeitpunkt berücksichtigt. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall. Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.

Die Mixed ANOVA bestätigt einen signifikanten Haupteffekt des mDST ( $F(1, 158) = 41,305$ ;  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,207$ ). Ein Haupteffekt der Gruppe fand sich nicht ( $F(1, 158) = 3,053$ ;  $p = 0,083$ , partielles  $\eta^2 = 0,019$ ). Allerdings konnte ein Interaktionseffekt für mDST x Gruppe nachgewiesen werden ( $F(1, 158) = 5,333$ ;  $p = 0,023$ , partielles  $\eta^2 = 0,033$ ), wobei der mDST einen Effekt auf die Depressionsgruppe ( $F(1, 136) = 40,253$ ;  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,228$ ), nicht auf die Kontrollgruppe ( $F(1, 20) < 0,001$ ;  $p = 0,998$ , partielles  $\eta^2 < 0,001$ ) entfaltete und sich beide Gruppen nach Durchführung des mDST nicht signifikant unterschieden ( $p = 0,058$ ). Zusammenfassend bewirkt der mDST eine Zunahme der FKBP5 mRNA-Expression. Diese fällt bei PatientInnen mit Depression schwächer als bei den gesunden Kontrollen aus. In der Analyse wurde die Normalverteilungsannahme für Gruppe 2 (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < 0,001$ ) sowie die Kovarianzgleichheit verletzt (Box-Test  $p < 0,001$ ).

Nach Aufteilung der Daten hinsichtlich des Genotyps von rs1360780 besteht sowohl bei den Trägern des Risikoallels als auch der protektiven Genvariante weiter ein signifikanter Haupteffekt des mDST ( $F(1, 65) = 18,460$ ;  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,221$  bzw.  $F(1, 82)$

= 20,007;  $p < 0,0001$ , partielles  $\eta^2 = 0,196$ ) auf die mRNA-Expression. Interaktionseffekte finden sich aber für beide Genvarianten nicht mehr ( $F(1, 65) = 1,686$ ;  $p = 0,199$ , partielles  $\eta^2 = 0,025$  bzw.  $F(1, 82) = 1,828$ ;  $p = 0,180$ , partielles  $\eta^2 = 0,022$ ), ebenso wie Haupteffekte vermittelt durch die Gruppe ( $F(1, 65) = 1,004$ ;  $p = 0,320$ , partielles  $\eta^2 = 0,015$  bzw.  $F(1, 82) = 1,828$ ;  $p = 0,180$ , partielles  $\eta^2 = 0,022$ ). Zusammenfassend konnte in dieser Stichprobe kein Hinweis auf eine differentielle mRNA-Expression zwischen Risikogenotyp und der protektiven Genvariante gefunden werden.

### **3.3 FKBP5 und Depression**

#### **3.3.1 Deskriptive Statistik der Kohorte**

In diesem Kapitel werden die Laborergebnisse der regulatorischen Parameter von *FKBP5* in Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer depressiven Erkrankung berichtet. Der Fokus liegt hierbei neben einem möglichen Einfluss des Genotyps von rs1360780 auf der Suche nach Biomarkern für die Vorhersage eines Therapieansprechens. Tabelle 23 gibt einen Überblick über die klinischen Charakteristika der GEPaD-Stichprobe bestehend aus 180 PatientInnen mit schwerer depressiver Episode.

**Tabelle 23: Charakteristika GEPaD-Stichprobe (N = 180).** BDI = Beck Depression Inventar, BMI = Body Mass Index, CTQ = Childhood Trauma Questionnaire, LTE = List of Threatening Experiences = Mittelwert, MADRS = Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale, N = Anzahl, SD = Standardabweichung. SNRI = Selektive Serotonin und Noradrenalin Wiederaufnahmehemmer, SSRI = Selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer, TCA = Trizyklische Antidepressiva.

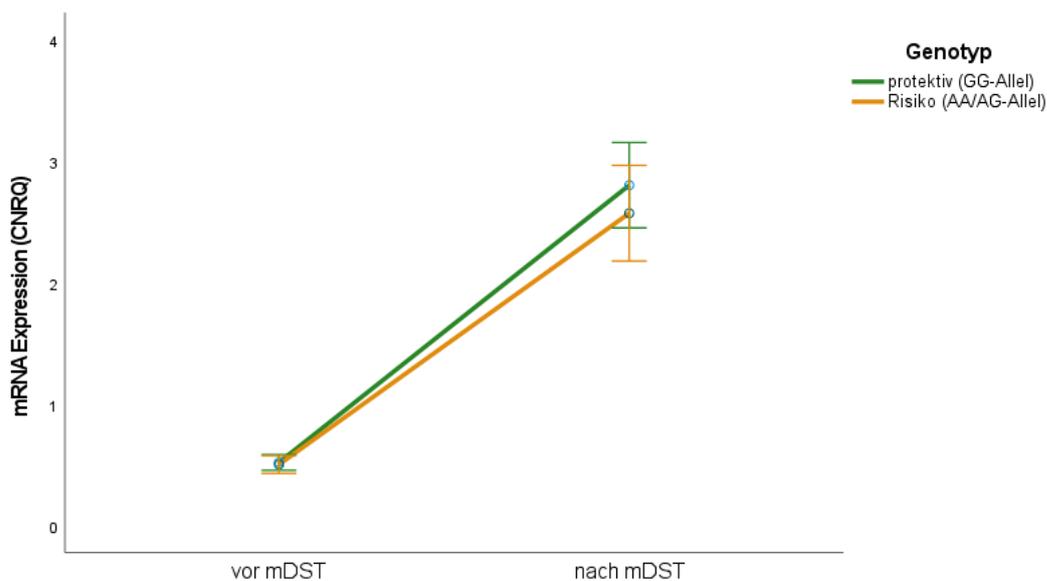
<b>Merkmal</b>	<b>GEPaD N = 180</b>
<b>Geschlecht</b>	
Frauen N (%)	94 (52,2)
Männer N (%)	86 (47,8)
Alter in Jahren M ( $\pm$ SD)	46,13 ( $\pm$ 14,77)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) M ( $\pm$ SD)	28,69 ( $\pm$ 7,42)
Raucher N (%)	62 (34,4)
<b>Genotyp</b>	
AA N (%)	14 (7,8)
AG N (%)	62 (34,4)
GG N (%)	96 (53,3)
fehlend N (%)	8 (4,4)
LTE in Punkten M ( $\pm$ SD)	2,36 ( $\pm$ 2,02)

CTQ in Punkten <i>M (± SD)</i>	30,39 (±9,46)
MADRS Woche 1 <i>M (± SD)</i>	32,77 (±6,71)
MADRS Woche 4 <i>M (± SD)</i>	18,56 (±8,13)
Thearpiresponse nach MADRS	
Nein <i>N (%)</i>	83 (46,1)
Ja <i>N (%)</i>	52 (28,9)
fehlend <i>N (%)</i>	45 (25)
BDI Woche 1 <i>M (± SD)</i>	23,88 (±10,26)
BDI Woche 4 <i>M (± SD)</i>	17,39 (±10,81)
Thearpiresponse nach BDI	
Nein <i>N (%)</i>	84 (46,7)
Ja <i>N (%)</i>	37 (20,6)
fehlend <i>N (%)</i>	59 (32,8)
Medikamentöse Therapie	
SSRI/SNRI <i>N (%)</i>	38 (21,1)
TCA <i>N (%)</i>	9 (5,0)
SSRI/SNRI + TCA <i>N (%)</i>	35 (19,4)
andere Kombination <i>N (%)</i>	48 (26,7)
keine <i>N (%)</i>	5 (2,8)
fehlend <i>N (%)</i>	45 (25)

---

### 3.3.2 Genotyp

Die Auswertung der regulatorischen Parameter von *FKBP5* lieferte in der vorliegenden Kohorte keine Hinweise auf signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit mindestens einem Risikoallel (AG- oder AA-Allel) und denjenigen mit protektivem Genotyp (GG-Allel). Dies betraf einerseits die Baselinemethylierung der betrachtete CpGs (CpG1:  $F(1, 142) = 0,273$ ;  $p = 0,602$ , partielles  $\eta^2 < 0,001$ , Verletzung der Normalverteilungsannahme (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < 0,001$ ); CpG2:  $F(1, 142) = 0,334$   $p = 0,564$ , partielles  $\eta^2 = 0,003$ ; CpG7:  $F(1, 162) = 1,539$ ;  $p = 0,217$ , partielles  $\eta^2 = 0,009$ ), aber auch die Änderung der Methylierung als Reaktion auf den mDST (siehe Tabelle 24). Der mDST führt zwar in beiden Gruppen zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression ( $F(1, 131) = 42,512$ ;  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,245$ ), allerdings konnte dabei kein Gruppenunterschied ( $F(1, 131) = 0,693$ ;  $p = 0,407$ , partielles  $\eta^2 = 0,005$ ) oder eine Interaktion des mDST mit der Gruppe ( $F(1, 131) = 0,730$ ;  $p = 0,394$ , partielles  $\eta^2 = 0,006$ ) beobachtet werden, wie Abbildung 16 veranschaulicht.



**Abbildung 16: Änderung der mRNA-Expression auf den mDST in Woche 1 (aufgeteilt nach Genotyp).** CNRQ = Calibrated Normalized Relative Quantities. Jede Linie zeigt die Veränderung der durchschnittlichen *FKBP5* mRNA-Expression einer Gruppe, angegeben in CNRQ, zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten: vor und nach Durchführung des mDST. Es wurden 135 Messungen je Zeitpunkt berücksichtigt. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall. Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.

**Tabelle 24: Änderung der Methylierung auf den mDST in Woche 1 (aufgeteilt nach Genotyp).** Met. = Methylierung in %. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung. \* p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Normalverteilungsannahme verletzt für CpG1, 18 und 21Uhr und CpG7, 21 Uhr (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < .001$ ). Kovarianzgleichheit verletzt für CpG1 (Box-Test  $p < 0,001$ ). Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.

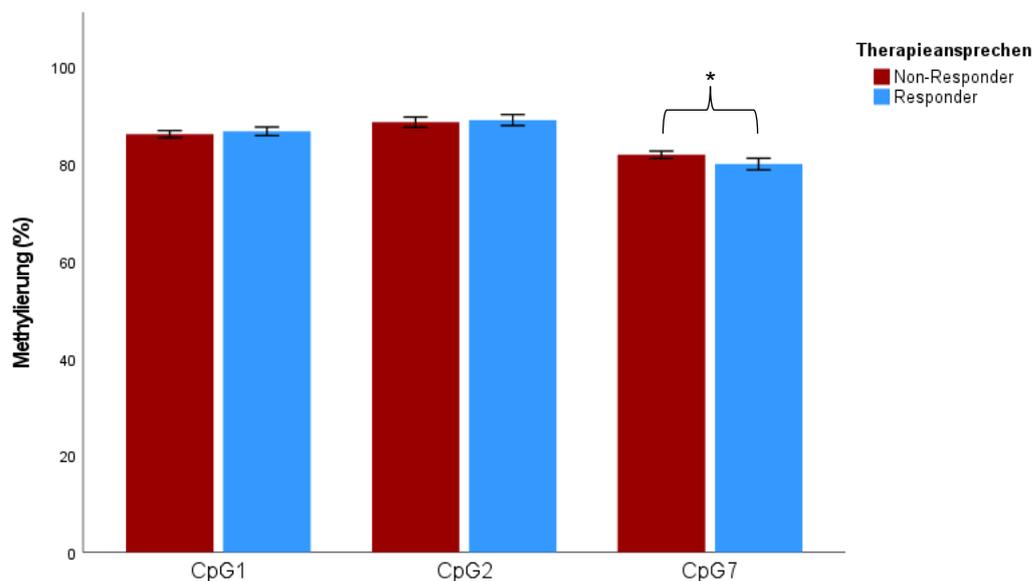
CpG	Met. vor mDST <i>M (%) ± SD</i>	Met. nach mDST <i>M (%) ± SD</i>	Effekt	p-Wert	$\eta^2$
CpG1	Risikogenotyp	Risikogenotyp	Interaktion:	0,751	0,001
	85,95 ± 2,89	85,99 ± 2,97	mDST x Gruppe		
	Protektiver Genotyp	Protektiver Genotyp	Haupt: mDST	0,719	0,001
	85,68 ± 5,07	85,86 ± 4,92	Haupt: Gruppe	0,847	< 0,001
CpG2	Risikogenotyp	Risikogenotyp	Interaktion:	0,734	0,001
	88,43 ± 4,00	88,43 ± 4,02	mDST x Gruppe		
	Protektiver Genotyp	Protektiver Genotyp	Haupt: mDST	0,741	0,001
	88,38 ± 3,91	88,63 ± 3,74	Haupt: Gruppe	0,953	< 0,001
CpG7	Risikogenotyp	Risikogenotyp	Interaktion:	0,537	0,002
	80,96 ± 4,06	79,31 ± 4,07	mDST x Gruppe		
	Protektiver Genotyp	Protektiver Genotyp	Haupt: mDST	<b>&lt;0,001 *</b>	0,081
	81,11 ± 3,36	79,65 ± 3,13	Haupt: Gruppe	0,113	0,016

### 3.3.3 Therapieansprechen

Die erste Untersuchung bzgl. einer Assoziation der Parameter Methylierung und mRNA-Expression mit einem Ansprechen auf die antidepressive Therapie erfolgte retrospektiv durch den Einsatz der Varianzanalyse. Dazu fand anfangs eine Unterteilung in die zwei Gruppen Responder vs. Non-Responder, statt. Anschließend wurde aus den dabei entstanden Beobachtungen ein binäres logistisches Regressionsmodell entworfen, um die regulatorischen Parameter von *FKBP5* prospektiv hinsichtlich ihrer Eignung als Biomarker für das Therapieansprechen zu evaluieren.

## Methylierung

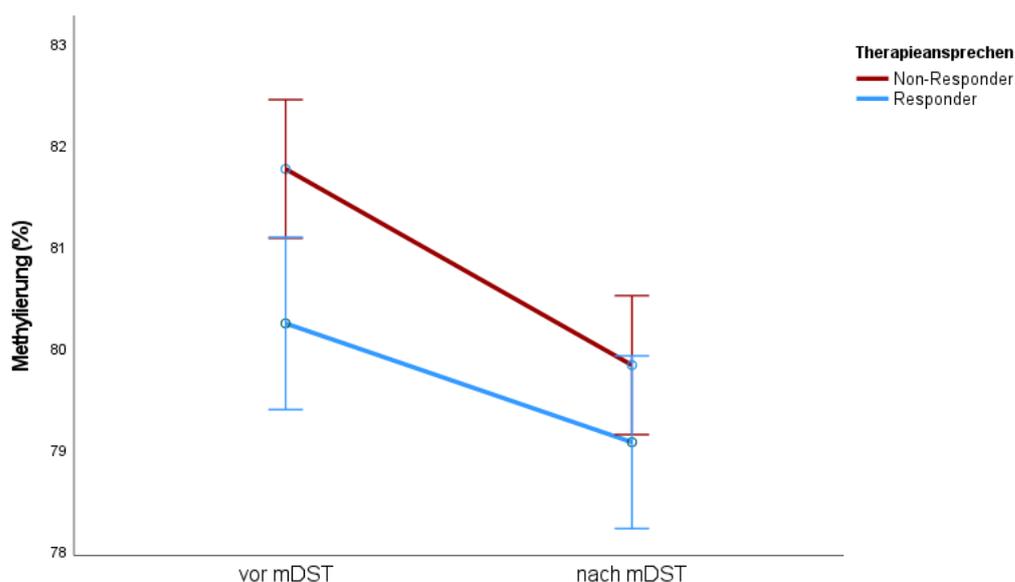
In der Baselinemethylierung zeigt sich auf CpG7 ein signifikant höherer Methylierungsgrad der Non-Responder ( $81,84 \pm 2,33\%$ ) verglichen mit den Respondern ( $80,06 \pm 3,82\%$ ), ( $F(1, 125) = 8,040$ ;  $p = 0,005$ , partielles  $\eta^2 = 0,060$ ), wenn die Gruppeneinteilung anhand des MADRS erfolgt, wie Abbildung 17 veranschaulicht. An CpG1 und CpG2 bestehen keine Unterschiede in der Methylierung (CpG1:  $F(1, 105) = 0,931$ ;  $p = 0,337$ , partielles  $\eta^2 = 0,009$ , Verletzung der Normalverteilungsannahme (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < 0,001$ ), CpG2:  $F(1, 106) = 0,015$   $p = 0,901$ , partielles  $\eta^2 = .000$ ).



**Abbildung 17: Baselinemethylierung regulatorischer CpGs (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS).** Jeder Balken zeigt die durchschnittliche Methylierung aller Proben innerhalb einer Gruppe für das jeweilige CpG zum Zeitpunkt vor Durchführung des mDST, entsprechend der Baselinemethylierung. Für CpG1 standen 109, für CpG2 110 und für CpG7 129 Messungen zur Verfügung. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall. \*  $p$ -Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

Erfolgt die Gruppeneinteilung für das Therapieansprechen dagegen unter Berücksichtigung des BDI, so besteht keine differentielle Methylierung an allen untersuchten CpGs (CpG1:  $F(1, 96) = 0,271$ ;  $p = 0,604$ , partielles  $\eta^2 = 0,003$ , Normalverteilungsannahme verletzt (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < .001$ ), Homogenität der Regressionssteigerungen verletzt für Gruppe x Alter ( $p = .008$ ). CpG2:  $F(1, 97) = 0,137$   $p = 0,712$ , partielles  $\eta^2 = 0,001$ , Homogenität der Regressionssteigerungen verletzt für Gruppe x Alter ( $p = 0,006$ ), CpG7:  $F(1, 111) = 0,805$ ;  $p = 0,371$ , partielles  $\eta^2 = 0,007$ ).

Die Ergebnisse zur Änderung der Methylierung verursacht durch den mDST im Vergleich von Respondern und Non-Respondern sind in Tabelle 25 zusammengefasst, wobei zur Gruppeneinteilung zunächst wieder der MADRS verwendet wurde. Neben einer ersten Analyse zu Behandlungsbeginn, wurde diese parallel anhand der Ergebnisse nach vier Wochen antidepressiver Therapie erneut durchgeführt. In der ersten Behandlungswoche weist CpG7 für die Non-Responder insgesamt einen höheren Methylierungsgrad auf (Haupteffekt der Gruppe:  $F(1, 123) = 4,610$ ;  $p = 0,034$ , partielles  $\eta^2 = 0,036$ ). Aufgrund eines Interaktionseffekts von mDST x Gruppe ( $F(1, 123) = 4,610$ ;  $p = 0,034$ , partielles  $\eta^2 = 0,036$ ), der sich in einer stärkeren Demethylierung bei den Non-Respondern äußert ( $F(1, 74) = 12,758$ ;  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,147$ ), besteht ein signifikanter Gruppenunterschied aber nur vor Durchführung des mDST ( $p = 0,004$ ), der insgesamt zu einer signifikanten Demethylierung an CpG7 führt ( $F(1, 123) = 9,149$ ;  $p = 0,003$ , partielles  $\eta^2 = 0,069$ ). Abbildung 18 veranschaulicht die Wirkung des mDST auf die Methylierung von CpG7 für Responder und Non-Responder.



**Abbildung 18: Änderung der Methylierung von CpG7 auf den mDST in Woche 1 (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS).** Jede Linie zeigt die Veränderung der durchschnittlichen Methylierung des CpGs für eine Gruppe zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten: vor und nach Durchführung des mDST. Es wurden 127 Messungen je Zeitpunkt berücksichtigt. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall. Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.

Nach vier Wochen Behandlung lässt sich der Unterschied in der Methylierung zwischen den beiden Gruppen weiterhin nachweisen ( $F(1, 114) = 4,280$   $p = 0,041$ , partielles  $\eta^2 = 0,036$ ), wobei diese nicht mehr signifikant unterschiedlich auf die Glukokortikoidstimulation reagieren ( $F(1, 114) = 2,410$ ;  $p = 0,123$ , partielles  $\eta^2 = 0,021$ )

und die verursachte Demethylierung ebenfalls nicht mehr signifikant ist ( $F(1, 114) = 1,403$ ;  $p = 0,239$ , partielles  $\eta^2 = 0,012$ ).

**Tabelle 25: Änderung der Methylierung auf den mDST (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS).** *M = Mittelwert, Met. = Methylierung in %, SD = Standardabweichung, \* p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Normalverteilungsannahme verletzt für Woche 1: CpG1, 18 und 21 Uhr und CpG7, 21 Uhr (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < .001$ ). Woche 4: CpG 2, 18 Uhr (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p = 0,038$ ). Kovarianzgleichheit verletzt für Woche 4, CpG2 (Box-Test  $p = 0,029$ ) und CpG7 (Box-Test  $p < 0,001$ ). Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.*

	CpG	Met. vor mDST <i>M (%) <math>\pm</math> SD</i>	Met. nach mDST <i>M (%) <math>\pm</math> SD</i>	Effekt	p-Wert	$\eta^2$	
Woche 1	CpG1	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,463	0,005	
		86,54 $\pm$ 3,61	86,55 $\pm$ 3,17	mDST x Gruppe			
		Non-Responder:	Non-Responder:	Haupt: mDST	0,816	0,001	
			88,56 $\pm$ 4,41	86,4 $\pm$ 2,63	Haupt: Gruppe	0,580	0,003
	CpG2	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,574	0,003	
		88,65 $\pm$ 2,75	88,73 $\pm$ 3,88	mDST x Gruppe			
		Non-Responder:	Non-Responder:	Haupt: mDST	0,665	0,002	
			86,07 $\pm$ 2,93	89,02 $\pm$ 3,97	Haupt: Gruppe	0,844	< 0,001
	CpG7	Responder:	Responder:	Interaktion:	<b>0,017 *</b>	0,045	
80,12 $\pm$ 3,83		78,98 $\pm$ 3,76	mDST x Gruppe				
Non-Responder:		Non-Responder:	Haupt: mDST	<b>0,003 *</b>	0,069		
		81,83 $\pm$ 3,01	79,88 $\pm$ 3,05	Haupt: Gruppe	<b>0,034 *</b>	0,036	
Woche 4	CpG1	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,713	0,001	
		86,27 $\pm$ 2,87	86,43 $\pm$ 3,31	mDST x Gruppe			
		Non-Responder:	Non-Responder:	Haupt: mDST	0,347	0,009	
			86,00 $\pm$ 2,99	85,99 $\pm$ 2,84	Haupt: Gruppe	0,674	0,002
	CpG2	Responder:	Responder:	Interaktion:	<b>0,043 *</b>	0,043	
		87,98 $\pm$ 3,72	89,13 $\pm$ 4,61	mDST x Gruppe			
		Non-Responder:	Non-Responder:	Haupt: mDST	0,582	0,003	
			88,34 $\pm$ 4,19	88,36 $\pm$ 3,77	Haupt: Gruppe	0,870	0,001
	CpG7	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,123	0,021	
79,83 $\pm$ 3,84		78,52 $\pm$ 4,32	mDST x Gruppe				
Non-Responder:		Non-Responder:	Haupt: mDST	0,239	0,012		
		81,7 $\pm$ 2,96	79,3 $\pm$ 3,58	Haupt: Gruppe	<b>0,041 *</b>	0,036	

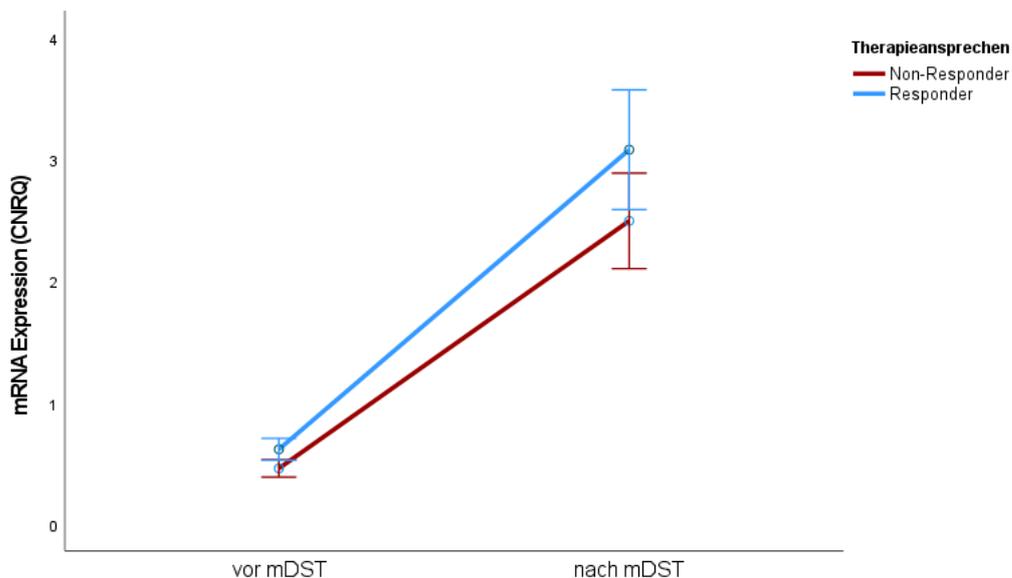
Parallel zur Baselinemethylierung lassen sich die beobachteten Gruppenunterschiede in der Methylierungsänderung nicht nachweisen, wenn zur Gruppeneinteilung bzgl. Therapieansprechen der BDI berücksichtigt wird, wie Tabelle 26 zeigt.

**Tabelle 26: Änderung der Methylierung auf den mDST (Therapieansprechen, aufgeteilt nach BDI).** *M* = Mittelwert, *Met.* = Methylierung in %, *SD* = Standardabweichung, \* *p*-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Normalverteilungsannahme verletzt für Woche 1: CpG1, 18 und 21Uhr und CpG7, 21 Uhr (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < .001$ ). Woche 2: CpG 2, 18 Uhr (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p = 0,038$ ). Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.

	<b>CpG</b>	<b>Met. vor mDST</b> <b><i>M</i> (%) <math>\pm</math> <i>SD</i></b>	<b>Met. nach mDST</b> <b><i>M</i> (%) <math>\pm</math> <i>SD</i></b>	<b>Effekt</b>	<b><i>p</i>-Wert</b>	<b><math>\eta^2</math></b>
<b>Woche 1</b>	CpG1	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,161	0,021
		86,53 $\pm$ 3,25	87,18 $\pm$ 3,09	mDST x Gruppe		
		Non-Responder:	Non-Responder:	Haupt: mDST	0,908	< 0,001
		86,2 $\pm$ 2,76	86,18 $\pm$ 2,72	Haupt: Gruppe	0,289	0,012
	CpG2	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,018	0,026
		88,49 $\pm$ 4,48	89,96 $\pm$ 4,14	mDST x Gruppe		
		Non-Responder:	Non-Responder:	Haupt: mDST	0,082	0,001
		88,49 $\pm$ 4,12	88,44 $\pm$ 3,88	Haupt: Gruppe	0,233	0,015
	CpG7	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,417	0,004
80,99 $\pm$ 3,8		79,46 $\pm$ 3,92	mDST x Gruppe			
Non-Responder:		Non-Responder:	Haupt: mDST	<b>0,003 *</b>	0,079	
	81,38 $\pm$ 3,40	79,58 $\pm$ 3,3	Haupt: Gruppe	0,429	0,006	
<b>Woche 4</b>	CpG1	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,081	0,001
		86,33 $\pm$ 3,1	86,43 $\pm$ 3,46	mDST x Gruppe		
		Non-Responder:	Non-Responder:	Haupt: mDST	0,219	0,016
		86,03 $\pm$ 2,90	86,09 $\pm$ 2,92	Haupt: Gruppe	0,689	0,002
	CpG2	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,435	0,007
		88,4 $\pm$ 4,15	88,64 $\pm$ 4,53	mDST x Gruppe		
		Non-Responder:	Non-Responder:	Haupt: mDST	0,224	0,017
		88,16 $\pm$ 4,03	88,72 $\pm$ 3,96	Haupt: Gruppe	0,978	< 0,001
	CpG7	Responder:	Responder:	Interaktion:	0,749	0,001
80,76 $\pm$ 3,77		79,0 $\pm$ 4,35	mDST x Gruppe			
Non-Responder:		Non-Responder:	Haupt: mDST	0,162	0,018	
	81,14 $\pm$ 3,32	79,56 $\pm$ 3,21	Haupt: Gruppe	0,260	0,012	

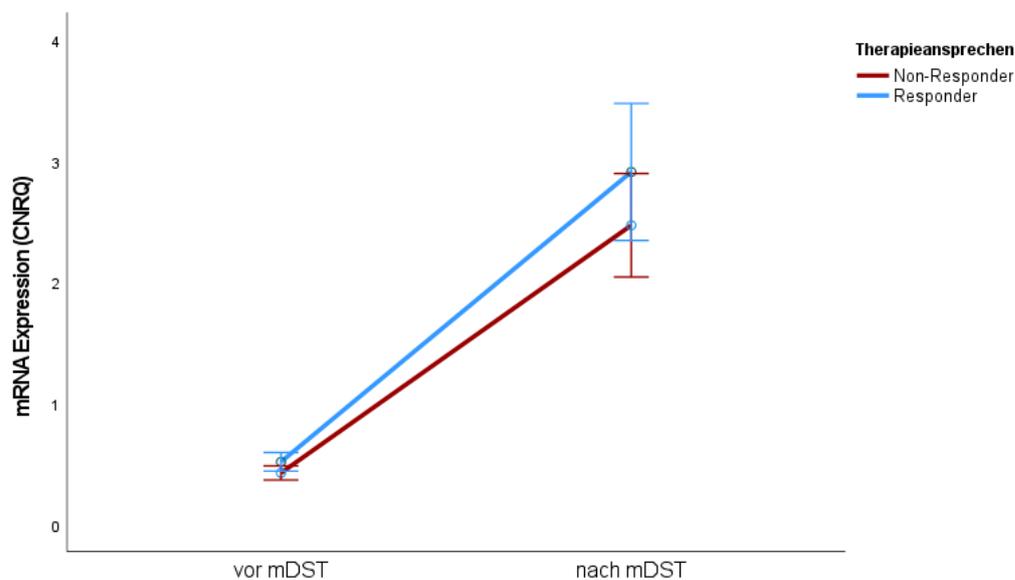
### mRNA-Expression

Auch hinsichtlich der mRNA-Expression bestehen Unterschiede zwischen den Gruppen der Responder und Non-Responder. Hierbei wurde erneut eine Analyse zu Behandlungsbeginn sowie nach vier Wochen Therapie durchgeführt. Wie Abbildung 19 darstellt, liegt bei den späteren Therapierespondern im MADRS bereits zu Beginn der Behandlung eine höhere mRNA-Expression vor ( $F(1, 101) = 4,446$ ;  $p = 0,037$ , partielles  $\eta^2 = 0,042$ ). Durch den mDST wird diese in beiden Gruppen signifikant gesteigert ( $F(1, 101) = 38,043$ ;  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,274$ ), wobei keine unterschiedliche Reaktion auf den mDST zwischen den Gruppen zu beobachten ist ( $F(1, 101) = 2,099$ ;  $p = 0,150$ , partielles  $\eta^2 = 0,020$ ). Im Modell waren die Normalverteilungsannahme sowie die Gleichheit der Kovarianzen und Fehlervarianzen verletzt (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p < 0,001$ , Box-Test  $p < 0,001$ , Levene-Test  $p = 0,002$ ).



**Abbildung 19: Änderung der mRNA-Expression auf den mDST in Woche 1 (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS).** CNRQ = Calibrated Normalized Relative Quantities. Jede Linie zeigt die Veränderung der durchschnittlichen FKBP5 mRNA-Expression einer Gruppe, angegeben in CNRQ, zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten: vor und nach Durchführung des mDST. Es wurden 105 Messungen je Zeitpunkt berücksichtigt. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall. Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.

Nach vier Wochen Therapie kommt es durch die Glukokortikoidstimulation weiterhin zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression ( $F(1, 83) = 24,961$ ;  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,231$ ), Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen aber nicht mehr ( $F(1, 83) = 1,912$ ;  $p = 0,170$ , partielles  $\eta^2 = 0,023$ ), wie Abbildung 20 veranschaulicht. Auch ein Interaktionseffekt existiert nicht ( $F(1, 83) = 1,022$ ;  $p = 0,315$ , partielles  $\eta^2 = 0,012$ ).



**Abbildung 20: Änderung der mRNA-Expression auf den mDST in Woche 4 (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS).** CNRQ = Calibrated Normalized Relative Quantities. Jede Linie zeigt die Veränderung der durchschnittlichen FKBP5 mRNA-Expression einer Gruppe, angegeben in CNRQ, zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten: vor und nach Durchführung des mDST. Es wurden 87 Messungen je Zeitpunkt berücksichtigt. Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall. Für das Modell wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht berücksichtigt.

Getragen wird die Annäherung der beiden Gruppen durch eine Abnahme der mRNA-Expression im Therapieverlauf, die nur die Gruppe der Responder betrifft (CNRQ Woche 1, Responder/Non-Responder:  $0,61 \pm 0,4 / 0,46 \pm 0,18$ , Woche 4, Responder/Non-Responder:  $0,52 \pm 0,23 / 0,43 \pm 0,2$ ). Dabei bestätigt die Mixed ANOVA einen signifikanten Interaktionseffekt von Zeit x Gruppenzugehörigkeit auf die mRNA-Expression ( $F(1, 86) = 4,465$ ;  $p = 0,037$ , partielles  $\eta^2 = 0,049$ ).

Wird für die Gruppeneinteilung der BDI verwendet, besteht gleichermaßen eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression als Reaktion auf den mDST zu beiden Untersuchungszeitpunkten (Woche 1:  $F(1, 94) = 30,311$ ;  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,244$ , Woche 2:  $F(1, 79) = 22,966$ ;  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,225$ ). Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern (Woche 1:  $F(1, 94) = 2,323$ ;  $p = 0,131$ , partielles  $\eta^2 = 0,024$ , Woche 4:  $F(1, 79) = 0,000$ ;  $p = 0,985$ , partielles  $\eta^2 < 0,001$ ) oder eine Interaktion von mDST und Gruppenzugehörigkeit finden sich aber nicht (Woche 1:  $F(1, 94) = 817$ ;  $p = 0,368$ , partielles  $\eta^2 = 0,009$ , Woche 4:  $F(1, 79) = 551$ ;  $p = 0,460$ , partielles  $\eta^2 = 0,007$ ).

### *Regressionsanalyse*

Die vorangegangenen Auswertungen lieferten Hinweise darauf, dass für Therapieresponder und Non-Responder Unterschiede in den regulatorischen Parametern von *FKBP5* existieren. Besonders die Methylierung auf CpG7 sowie die mRNA-Expression fielen dabei auf. Diese beiden wurden daher in der folgenden binären logistischen Regressionsanalyse als Prädiktoren verwendet, um zu überprüfen, inwieweit sie die abhängige Variable: Therapieansprechen nach 4 Wochen, beurteilt durch den MADRS, vorhersagen. Das erzeugte Regressionsmodell war signifikant (Omnibus-Test:  $\chi^2(2) = 13,835$ ,  $p < 0,001$ ), besaß eine hohe Anpassungsgüte (Hosmer-Lemeshow-Test  $p = 0,813$ ), allerdings nur eine geringe Varianzaufklärung (Nagelkerkes  $R^2 = 0,168$ ). Beide untersuchten Variablen im Modell hatten signifikanten Einfluss auf die Klassifizierung des späteren Therapieansprechens (mRNA-Expression W1, 18Uhr:  $p = 0,018$ , Methylierung CpG7 W1  $p = 0,034$ ). Durch das Modell ließ sich ein Gesamtprozentsatz korrekter Klassifikationen von 66,3%, verglichen mit 59,6% im Ausgangsmodell, erzielen. Dabei betragen die Sensitivität 38,1% und die Spezifität 85,5%. Ein höherer Grad der Methylierung auf CpG7 war somit prädiktiv für ein Nichtansprechen (Odds: 0,872, 95%-Konfidenzintervall: 0,767-0,990), wohingegen eine initial höhere *FKBP5* mRNA-Expression das spätere Therapieansprechen begünstigte (Odds: 10,287, 95%-Konfidenzintervall: 1,492-70,917).

### 3.3.4 Korrelationen

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln auf die Unterschiede der regulatorischen Elemente von *FKBP5* im Vergleich verschiedener Patientengruppen eingegangen wurde, sollen zuletzt noch die untersuchten Zusammenhänge dieser mit verschiedenen klinischen Parametern der Herzinsuffizienz und Depression berichtet werden.

### *Herzinsuffizienz*

Für die Schwere der Herzinsuffizienz, beurteilt durch LVEF und NT-proBNP zu Behandlungsbeginn, konnten innerhalb der DaCFail-Kohorte keine Zusammenhänge mit der Baselinemethylierung oder Änderung der Methylierung als Reaktion auf den mDST an den drei untersuchten CpGs beobachtet werden. Auch ein Zusammenhang mit der Änderung der mRNA-Expression fand sich nicht, wie Tabelle 27 zu entnehmen ist.

**Tabelle 27: Pearson-Korrelation: Schwere der Herzinsuffizienz und regulatorische Parameter von FKBP5.** Tabellenwerte = Korrelationskoeffizienten, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, W1 = Woche 1.

	LVEF W1	NTproBNP W1	Methylierung CpG1 18Uhr	Methylierung CpG2 18Uhr	Methylierung CpG7 18Uhr	Änderung Methylierung CpG1 W1	Änderung Methylierung CpG2 W1	Änderung Methylierung CpG7 W1	Änderung mRNA Expression W1
LVEF W1	--								
NTproBNP W1	-0,235	--							
Methylierung CpG1 18Uhr	-0,049	0,000	--						
Methylierung CpG2 18Uhr	0,055	-0,090	0,601**	--					
Methylierung CpG7 18Uhr	-0,010	-0,117	-0,051	0,081	--				
Änderung Methylierung CpG1 W1	0,022	-0,033	-0,323**	-0,380**	-0,097	--			
Änderung Methylierung CpG2 W1	-0,012	-0,019	-0,214*	-0,398**	-0,025	0,850**	--		
Änderung Methylierung CpG7 W1	0,227	-0,104	0,031	-0,042	-0,330**	-0,033	-0,045	--	
Änderung RNA Expression W1	-0,148	0,166	-0,028	0,026	0,062	-0,110	-0,109	-0,198*	--

### *Depression*

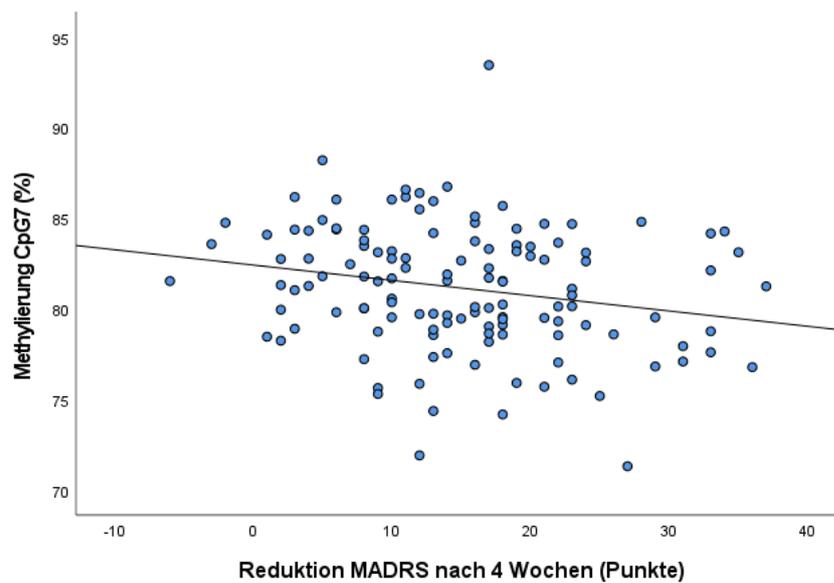
Die GEPaD-Kohorte wurde auch auf mögliche Zusammenhänge klinischer Aspekte der Depression und den ermittelten regulatorischen Parametern von *FKBP5* analysiert.

Für die Schwere der depressiven Episode, ausgedrückt durch MADRS und BDI zu Behandlungsbeginn, konnten keine Zusammenhänge mit der Baselinemethylierung oder Änderung der Methylierung als Reaktion auf den mDST an den drei untersuchten CpGs aufgedeckt werden. Auch die Änderung der mRNA-Expression korrelierte nicht mit diesen, wie Tabelle 28 zu entnehmen ist.

**Tabelle 28: Pearson-Korrelation: Schwere der Depression und regulatorische Parameter von FKBP5. Tabellenwerte = Korrelationskoeffizienten, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . W1 = Woche 1.**

	MADRS W1	BDI W1	Methylierung CpG1 18Uhr	Methylierung CpG2 18Uhr	Methylierung CpG7 18Uhr	Änderung Methylierung CpG1 W1	Änderung Methylierung CpG2 W1	Änderung Methylierung CpG7 W1	Änderung mRNA Expression W1
MADRS W1	--								
BDI W1	0,440**	--							
Methylierung CpG1 18Uhr	-0,107	-0,027	--						
Methylierung CpG2 18Uhr	-0,068	-0,016	0,592**	--					
Methylierung CpG7 18Uhr	0,076	0,094	-0,089	0,027	--				
Änderung Methylierung CpG1 W1	0,012	0,030	-0,277**	-0,391**	-0,032	--			
Änderung Methylierung CpG2 W1	0,043	0,070	-0,192*	-0,437**	-0,057	0,852**	--		
Änderung Methylierung CpG7 W1	-0,081	-0,108	0,029	-0,039	-0,307**	0,077	0,038	--	
Änderung mRNA Expression W1	0,019	0,100	-0,107	-0,043	0,086	0,030	-0,015	-0,239**	--

Bei Betrachtung des Therapieansprechens, entsprechend einer Reduktion von MADRS und BDI nach vier Wochen Therapie im Vergleich zum Ausgangswert, findet sich ein negativer Zusammenhang ( $r = -0,219$ ,  $p = 0,013$ ) mit der Methylierung auf CpG7, der in Abbildung 21 dargestellt ist. Dieser Zusammenhang verhält sich parallel zu den Beobachtungen in Kapitel 3.3.3. Darüber hinaus besteht eine positive Korrelation zwischen der Änderung der Methylierung an CpG1 ( $r = 0,253$ ,  $p = 0,012$ ) und CpG2 ( $r = 0,259$ ,  $p = 0,011$ ) als Reaktion auf den mDST und der Reduktion des BDI, wie Tabelle 29 zu entnehmen ist.



**Abbildung 21: Streudiagramm Baselinemethylierung CpG7 in Woche 1 und Reduktion des MADRS nach vier Wochen Therapie.** Berechnung der Reduktion: Wert MADRS Woche 1 – Wert MADRS Woche 4.

Zuletzt wurden noch die Schwere der vorangegangenen Traumatisierung, erfasst durch LTE und CTQ, untersucht. Wie Tabelle 30 wiedergibt, fanden sich hier keine Zusammenhänge mit der Baselinemethylierung oder der Änderung der Methylierung als Reaktion auf den mDST an den drei untersuchten CpGs. Auch die Änderung der mRNA-Expression durch den mDST korrelierte nicht mit der Traumatisierung.

**Tabelle 29: Pearson-Korrelation: Therapieansprechen und regulatorische Parameter von FKBP5.** Tabellenwerte = Korrelationskoeffizienten, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . W1 = Woche 1.

	Reduktion MADRS nach 4 Wochen	Reduktion BDI nach 4 Wochen	Methylierung CpG1 18Uhr	Methylierung CpG2 18Uhr	Methylierung CpG7 18Uhr	Änderung Methylierung CpG1 W1	Änderung Methylierung CpG2 W1	Änderung Methylierung CpG7 W1	Änderung mRNA Expression W1
Reduktion MADRS nach 4 Wochen	--								
Reduktion BDI nach 4 Wochen	0,461**	--							
Methylierung CpG1 18Uhr	-0,061	-0,126	--						
Methylierung CpG2 18Uhr	-0,088	-0,141	,592**	--					
Methylierung CpG7 18Uhr	-0,219*	-0,130	-0,089	0,027	--				
Änderung Methylierung CpG1 W1	-0,031	<b>0,253*</b>	-0,277**	-0,391**	-0,032	--			
Änderung Methylierung CpG2 W1	0,020	<b>0,259*</b>	-0,192*	-0,437**	-0,057	0,852**	--		
Änderung Methylierung CpG7 W1	0,137	0,068	0,029	-0,039	-0,307**	0,077	0,038	--	
Änderung mRNA Expression W1	-0,154	-0,013	-0,107	-0,043	0,086	0,030	-0,015	-0,239**	--

Tabelle 30: Pearson-Korrelation: Traumatisierung und regulatorische Parameter von FKBP5. Tabellenwerte = Korrelationskoeffizienten, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . W1 = Woche 1.

	LTE	CTQ	Methylierung CpG1 18Uhr	Methylierung CpG2 18Uhr	Methylierung CpG7 18Uhr	Änderung Methylierung CpG1 W1	Änderung Methylierung CpG2 W1	Änderung Methylierung CpG7 W1	Änderung mRNA Expression W1
LTE	--								
CTQ	0,219*	--							
Methylierung CpG1 18Uhr	-0,058	0,049	--						
Methylierung CpG2 18Uhr	0,000	0,073	0,592**	--					
Methylierung CpG7 18Uhr	0,080	0,116	-0,089	0,027	--				
Änderung Methylierung CpG1 W1	-0,018	-0,026	-0,277**	-0,391**	-0,032	--			
Änderung Methylierung CpG2 W1	0,031	-0,033	-0,192*	-0,437**	-0,057	0,852**	--		
Änderung Methylierung CpG7 W1	-0,031	0,012	0,029	-0,039	-0,307**	0,077	0,038	--	
Änderung mRNA Expression W1	-0,128	0,000	-0,107	-0,043	0,086	0,030	-0,015	-0,239**	--

## 4 Diskussion

### 4.1 Einordnung der Ergebnisse

#### 4.1.1 FKBP5 und Herzinsuffizienz

Meiner Kenntnis nach stellt diese Arbeit die erste Untersuchung der Methylierung und mRNA-Expression von *FKBP5* in Zusammenhang mit einer Glukokortikoidstimulation für Patienten mit Depressionen und Herzinsuffizienz dar. Zusammenfassend fand sich kein Hinweis auf eine differentielle Regulation von *FKBP5* zwischen den ProbandInnen mit Depressionen, Herzinsuffizienz sowie den gesunden Kontrollen, wobei die später ausführlich geschilderten allgemeinen Limitationen aufgrund des Studiendesigns berücksichtigt werden müssen.

Die drei untersuchten CpGs zeigten vor Durchführung des mDST für alle Gruppen einen ähnlichen Grad der Methylierung. Der prozentuale Anteil methylierter CpGs (CpG1: 85,9 ± 4,44%, CpG2: 88,59 ± 3,9%, CpG7: 81,02 ± 3,55) entsprach dem Niveau vorheriger Studien, auf deren Basis die Auswahl erfolgt war (Klengel et al., 2013; Ortiz et al., 2018; Wiechmann et al., 2019). Die Glukokortikoidstimulation durch den mDST bewirkte an den CpGs1 und 2 keine wesentliche Änderung der Methylierung. An CpG7 hingegen fiel eine Demethylierung nach Glukokortikoideinnahme auf. Im Vergleich der vier Gruppen mittels ANCOVA verhielt sich dieser Effekt zwar nicht signifikant, konnte im Weiteren aber über alle Gruppen hinweg mittels *t*-Test bestätigt werden. Die Methylierung auf Intron 2 (CpG1 und 2) zeigt sich also stabil gegenüber der Glukokortikoidstimulation, wohingegen es auf Intron 7 (CpG7) zu einer glukokortikoidabhängigen Demethylierung kommt. Dieser Sachverhalt deckt sich ebenfalls mit den Vorstudien zur Regulation von *FKBP5* und legt angesichts seiner mehrfachen Reproduzierbarkeit eine stabile Beziehung zwischen dem Methylierungszustand von *FKBP5* und der Exposition gegenüber Glukokortikoiden nahe (Klengel et al., 2013; Wiechmann et al., 2019). Für das Fehlen eines Zusammenhangs zwischen der Methylierung von *FKBP5* und dem Auftreten einer Herzinsuffizienz bleibt zu berücksichtigen, dass in dieser Arbeit lediglich die Methylierung an drei verschiedenen CpGs untersucht wurde. Möglicherweise spielen hier aber CpGs in anderen, nicht untersuchten, regulatorischen Bereichen eine entscheidende Rolle. So wiesen Wada et al. eine niedrigere Methylierung bei PatientInnen mit dilatativer Kardiomyopathie für CpG-Inseln im Promotor und dem untranslatiertem Bereich am 5`-Ende des *FKBP5* Genes nach (Wada et al., 2021).

Die Bestimmung der mRNA-Expression von *FKBP5* in unserer Kohorte offenbarte ebenfalls keine relevanten Unterschiede zwischen PatientInnen mit Herzinsuffizienz und Depression sowie den Kontrollen. Wie erwartet konnte aber die glukokortikoidinduzierte Zunahme der mRNA-Expression parallel zu vorherigen Studien mittels *t*-Test belegt werden (Leistner & Menke, 2018; Menke et al., 2013; Yurtsever et al., 2018). Abschließend lieferte die Analyse der Korrelationen regulatorischer Parameter von *FKBP5* mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz ebenso keinen Hinweis auf einen Zusammenhang.

Auch wenn in dieser Arbeit kein Hinweis für einen Einfluss regulatorischer Parameter von *FKBP5* gefunden werden konnte, so liefern neuere Studien diesbezüglich weitere Anhaltspunkte. Allerdings ist die Rolle und Wirkrichtung von *FKBP5* dabei bisher nicht eindeutig auszumachen. So fiel bei der Auswertung einer Genexpressionsdatenbank eine Downregulation von *FKBP5* bei PatientInnen mit ischämischer Kardiomyopathie auf (Dang et al., 2020). Konträr zu diesen Befunden wiesen Wada et al. eine gesteigerte mRNA-Expression von *FKBP5* bei dilatativer Kardiomyopathie nach (Wada et al., 2021). Schließlich belegten Wang et al. einen protektiven Effekt von *FKBP5* in Bezug auf das Auftreten von Vorhofflimmern, nachdem sie *FKBP5* im Mausmodell ausschalteten (X. Wang et al., 2023). Da unsere Studienkohorte PatientInnen mit Herzinsuffizienz jeglicher Ätiologie umfasste, stellt die mögliche Vermischung teils entgegengesetzter Effekte von *FKBP5* auf die verschiedenen pathophysiologischen Unterformen der Herzinsuffizienz eine mögliche Erklärung für die negativen Befunde dar. Ein weiterer könnte in der Beschränkung auf PatientInnen mit reduzierter LVEF für den Studieneinschluss zu finden sein. So werden einerseits ungefähr die Hälfte der an einer Herzinsuffizienz Erkrankten Menschen nicht berücksichtigt, da der Anteil derer mit erhaltender Pumpfunktion (HFpEF) je nach Studie zwischen 40 und 50% beträgt (Störk et al., 2008; Tiller et al., 2013). Andererseits wird gerade für die Pathogenese dieser Subgruppe der Herzinsuffizienz ein großer Einfluss von chronischer Inflammation, mit der die HPA-Achse und *FKBP5* in engem Zusammenhang stehen, angenommen (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019). Zusammenfassend existieren unterschiedliche Gründe für den fehlenden Nachweis eines Zusammenhangs von *FKBP5* und Herzinsuffizienz in der untersuchten Stichprobe auf biologischer Ebene. Als Grundlage für die Annahme eines solchen diene die zuvor geschilderte enge klinische Assoziation zwischen den beiden Erkrankungen Depression und Herzinsuffizienz. In die Überlegungen muss neben der zugrundeliegenden Biologie aber auch der Effekt von Verhaltensfaktoren bedingt durch beide Erkrankungen einbezogen werden. So

existieren Hinweise für den negativen Effekt von depressionsassoziierten Faktoren wie Bewegungsmangel, Übergewicht, Raucherstatus sowie unzuverlässiger Medikamenteneinnahme, auf den Verlauf der Herzinsuffizienz (Ghosh et al., 2016). Interessanterweise lagen diese parallel mit stoffwechselbedingten Veränderungen wie erhöhten Entzündungsparametern und Hypercortisolismus vor. Eine Beobachtung die im Verlauf ebenfalls reproduziert werden konnte (Warriach et al., 2022). Auch die Auswertung von Therapiestudien bei PatientInnen mit Herzinsuffizienz und komorbider Depression verdeutlichen die Wichtigkeit der Verhaltensfaktoren. So konnte in dieser Patientengruppe ein guter Effekt von Psychotherapie unterschiedlicher Art sowie eine Überlegenheit der Psychotherapie gegenüber einer antidepressiven Medikation aufgezeigt werden (Zambrano et al., 2020; Zhao et al., 2023). Für die klinisch belegte Interaktion beider Erkrankungen kann also, ebenso wie für die Entstehung psychischer Erkrankungen im Allgemeinen etabliert, ein biopsychosoziales Modell angenommen werden (Angermann et al., 2011; Freedland et al., 2003; Möller et al., 2015). In Anbetracht der unbekanntenen Größe des biologischen Anteils in diesem Modell und der heterogenen Kohorte herzinsuffizienter PatientInnen ist es möglich, dass dieser bei der relativ kleinen Stichprobengröße unserer Studie verborgen blieb.

#### 4.1.2 FKBP5 und Depression

##### *Vergleich der mRNA-Expression bei Depressiven und Gesunden*

Der Vergleich der mRNA-Expression als Reaktion auf den mDST offenbarte einen signifikanten Unterschied zwischen der Depressions- und Kontrollgruppe. So bedingte die medikamentöse Stimulation einer Stressreaktion mittels Dexamethasongabe eine stärkere Zunahme der mRNA-Expression bei den Gesunden. Dies führt aufgrund der inhibitorische Wirkung von FKBP5 auf den GR zu einer raschen Terminierung der Stressreaktion (Fries et al., 2017). Die geringere mRNA-Expression in der Gruppe der Depressiven ist somit möglicherweise gleichbedeutend mit einer länger anhaltenden Aktivierung der HPA-Achse bei Stress und in der Folge länger erhöhten Cortisolspiegeln, passend zum eingangs geschilderten Entstehungsmodell der Depression (Pariante & Miller, 2001). Dieser Befund von *FKBP5* im Zusammenhang mit der Dysregulation der HPA-Achse bei Depression deckt sich mit den vorherigen Beobachtungen von Menke et al., die ebenfalls eine niedrigere mRNA-Expression nach Glukokortikoidstimulation bei depressiven PatientInnen ausmachen konnten (Menke et al., 2012). Da die Induktion der *FKBP5* mRNA-Expression direkt Glukokortikoid abhängig ist, spiegelt sich die

Sensitivität des GR in der Reaktion auf die Glukokortikoidstimulation wider (Yurtsever et al., 2018). Wiederholt wurde die *FKBP5* mRNA-Expression daher als Indikator für die Glukokortikoidrezeptorsensitivität im Allgemeinen herangezogen und als möglicher Biomarker für depressive Erkrankungen diskutiert (Jääskeläinen et al., 2011; Scharf et al., 2011; Vermeer et al., 2003). Die Beobachtung einer geringen Induzierbarkeit der mRNA-Expression bei den depressiven PatientInnen dieser Studie ist somit auch Ausdruck der im Rahmen der Depression bestehenden Glukokortikoidrezeptorresistenz (Menke et al., 2012; Wodarz et al., 1992).

Die differentielle *FKBP5* mRNA-Expression besitzt gewissermaßen eine Doppelbedeutung. Einerseits nimmt *FKBP5* eine zentrale Schaltstelle in der kurzfristigen Regulation der GR-Sensitivität ein, sodass sie Auskunft über den Ablauf der Stressreaktion innerhalb der HPA-Achse liefert. Andererseits hängt die Expression als steroidresponsives Gen selbst direkt von der Sensitivität des GR ab, welche im Rahmen depressiver Erkrankungen auch längerfristig nachweislich reduziert ist (Holsboer & Barden, 1996; Pariante & Lightman, 2008).

#### *rs1360780 Genotyp*

Die Untersuchung der rs1360780 Genotypen in unserer Stichprobe lieferte keine Hinweise auf eine differentielle mRNA-Expression oder Methylierung zwischen den Trägern des Risikoallels und der protektiven Genvariante. Einerseits kann dies in den teilweise kleinen Stichproben begründet sein. So halbierte die Aufteilung nach Genotyp im Vergleich der Depressionsgruppe mit der Kontrollgruppe die Stichprobe, sodass der zuvor beobachtete Effekt einer geringeren Induktion der mRNA-Expression bei den depressiven PatientInnen nicht mehr nachweisbar war. Daher waren anschließend auch mögliche Effekte durch den Genotyp selbst nicht zu fassen. Für die Analyse der DaCFail-Kohorte wurde unter anderem aus diesem Grund ganz auf eine Berücksichtigung des Genotyps verzichtet. Ein weiterer Grund für diesen Schritt war die beinahe identische Verteilung der Risikoallelträger auf die vier Gruppen. Dies könnte unter anderem darin begründet sein, dass mit der Entstehung kardialer Erkrankungen nicht das gleiche Allel wie für stressinduzierte psychische Erkrankungen assoziiert ist (Brandt et al., 2020).

Die negativen Befunde für einen Effekt des Genotyps innerhalb der GEPaD-Kohorte fügen sich in das insgesamt recht heterogene Bild der Vorbefunde ein, wenn nur eine allgemeine Assoziation des SNPs rs1360780 mit depressiven Erkrankungen

berücksichtigt wird. Einigen Studien konnten das A-Allel des SNPs als häufiger mit Depressionen vergesellschaftet identifizieren (Lavebratt et al., 2010). Andere dagegen wiesen keinen Unterschied in der Verteilung der Allele und depressiven Erkrankungen nach (Sarubin et al., 2017; Schneider et al., 2014). Auch eine Metaanalyse mit über 25.000 ProbandInnen belegte eine Assoziation zum Genotyp erst nach Entfernung einer heterogenen Studie aus der Analyse (Rao et al., 2016). Eine Studie wiederum belegte einen Zusammenhang mit dem Genotyp nur bei unipolarer Depression, nicht aber bei der bipolaren Erkrankung (Szczepankiewicz et al., 2014). Die mRNA-Expression selbst betreffend, konnten einzelne Studien eine differentielle Expression der Genotypen bei Stressexposition nachweisen (Höhne et al., 2015; Menke et al., 2013). Homogener stellt sich die Datenlage dar, wenn zusätzlich eine Traumatisierung der PatientInnen als Kovariable berücksichtigt wird. Hier konnten sowohl einzelne Studien als auch eine Metaanalyse eine Interaktion zwischen dem Risikoallel, einer vorangegangenen Traumatisierung und dem Auftreten von Depressionen belegen (Appel et al., 2011; Rao et al., 2016; Q. Wang et al., 2018). Da der Genotyp des SNPs rs1360780 nur eine untergeordnete Fragestellung dieser Arbeit darstellt, wurde auf eine umfangreichere Auswertung hinsichtlich einer Traumatisierung als zusätzliche Kovariable verzichtet. Orientierend fand sich in der GEPaD Stichprobe keine Korrelation zwischen den untersuchten regulatorischen Parametern von *FKBP5* und einer vorangegangenen Traumatisierung, erfasst durch CTQ und LTE.

Ein ausbleibender Effekt des Genotyps in dieser Arbeit könnte also in der kleinen Stichprobengröße, der Heterogenität dieser durch den Einschluss von PatientInnen mit uni- sowie bipolarer Depression oder der Nicht-Berücksichtigung von Traumatisierung als zusätzlicher Kovariable begründet sein.

#### *FKBP5 als Biomarker für das Therapieansprechen*

Etwa 30-50% der depressiven Erkrankungen sprechen nicht ausreichend auf die leitliniengerechte pharmakologische Therapie an (Möller et al., 2015). Dabei ist bisher nicht abschließend festgelegt, wie dabei eine kombinierte Psychotherapie, die auch der Großteil der PatientInnen in unserer Stichprobe erhielt, zu bewerten ist (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2022). Fest steht aber, dass eine frühzeitige Identifikation solcher PatientInnen mit besonders schwer zu behandelnder Depression hilft, schnell die richtigen, beispielsweise intensivierten Therapiekonzepte, zu wählen. Eine Umgehung der unwirksamen Standardtherapie kann so helfen die Krankheitslast

früher zu reduzieren und bietet gleichzeitig durch Einsparung begrenzter Ressourcen auch ökonomische Anreize (Runia et al., 2022). Die Suche nach Biomarkern konnte bisher v.a. Parameter der bereits erläuterten, im Rahmen der Depression gesteigerten Inflammation, wie beispielsweise den Cortisol-Spiegel, als relevant für ein Ansprechen der antidepressiven Therapie identifizieren (Fernandes et al., 2022; Gasparini et al., 2022; Runia et al., 2022). *FKBP5* mit seiner zentralen Rolle auf die Glukokortikoidrezeptorsensitivität scheint daher ebenfalls ein vielversprechender Kandidat.

Tatsächlich offenbart die Aufteilung der depressiven PatientInnen hinsichtlich des Therapieansprechens Gruppenunterschiede in der Ausprägung der untersuchten regulatorischen Parameter von *FKBP5*. Die Non-Responder weisen dabei eine höhere Baseline-Methylierung an CpG7 auf. Allerdings bewirkt der mDST bei dieser Gruppe eine stärkere Demethylierung, sodass nach diesem kein Unterschied zwischen den Gruppen mehr besteht. Nach vier Wochen Therapie findet sich zwar weiter ein höherer Methylierungsgrad bei den Non-Respondern, eine differentielle Reaktion auf den mDST lässt sich aber nicht mehr nachweisen. Dem isoliert zum Untersuchungszeitpunkt in Woche 4 beobachteten Interaktionseffekt an CpG2 haftet aufgrund der insgesamt ungerichteten Reaktion der Methylierung an diesem CpG als Reaktion auf den mDST eine große Unsicherheit an. Vorbefunde bezüglich der Methylierung von *FKBP5* und dem Ansprechen einer antidepressiven Therapie existieren der Kenntnis des Autors nach nicht, weshalb eine Bewertung der Ergebnisse insgesamt schwierig ist. Allerdings bestätigt die Betrachtung der mRNA-Expression das Modell der epigenetischen Regulation von *FKBP5*, wonach eine höhere Methylierung mit einer erniedrigten mRNA-Expression einhergeht (Klengel et al., 2013; Lee et al., 2010). So liegt in der Gruppe der Non-Responder bereits vor dem mDST eine niedrigere mRNA-Expression vor, die auch nach Induktion der Expression durch Dexamethason bestehen bleibt. Interessanterweise reagieren beide Gruppen mit einer ähnlichen Zunahme der Expression vom jeweiligen Startpunkt aus. Die zuvor beschriebene Glukokortikoidrezeptorresistenz, die durch den mDST als unmittelbare Stressreaktion erfasst werden kann, scheint also beide Gruppen gleichermaßen zu betreffen. Allerdings unterscheidet sich das Grundniveau der *FKBP5* mRNA-Expression. Analog zur hemmenden Wirkung von *FKBP5* auf den GR kann dies als Hinweis für die Hyperaktivität der HPA-Achse aufgefasst werden, die die Gruppe der späteren Therapieresponder stärker betrifft (Baischew et al., 2023; Holsboer, 2001). Eine einzige weitere Studie betrachtete ebenfalls die mRNA-Expression zu Therapiebeginn. Deren Befunde vielen

dabei allerdings gegenteilig aus. So konnte dort eine diskret höhere *FKBP5* mRNA-Expression bei den Non-Respondern beobachtet werden (Cattaneo et al., 2013).

Spannend stellt sich die Veränderung der mRNA-Expression im Verlauf der vierwöchigen Therapie dar. So unterscheiden sich beide Gruppen am Ende der Therapie nicht mehr signifikant bezüglich ihrer mRNA-Expression. Dieser Umstand ist primär einer Abnahme der mRNA-Expression in der Gruppe der Responder geschuldet, wohingegen die Non-Responder keine relevante Änderung über den Behandlungszeitraum erfahren. Diese Beobachtung konnte bereits wiederholt gemacht werden und betrifft neben der mRNA-Expression auch die Proteinlevel von FKBP5 (Cattaneo et al., 2013; Ising et al., 2019). Lediglich eine kleine Studie ( $N=30$ ) mit ausschließlich Teilnehmerinnen kam zu dem Schluss, dass eine Therapie mit Venlafaxin oder Sertralin zu keiner Veränderung der mRNA-Expression von *FKBP5* führt (Banach et al., 2017). Über den Behandlungsverlauf lässt sich in der Gruppe der Responder anhand der *FKBP5* mRNA-Expression also die vielfach postulierte Normalisierung der HPA-Achsen-Dysfunktion im Rahmen einer antidepressiven Therapie nachvollziehen (Holsboer & Barden, 1996; Pariante & Miller, 2001; Reul et al., 1993). Das biopsychosoziale Entstehungsmodell der Depression sowie die tägliche klinische Erfahrung liefern einen möglichen Erklärungsansatz, weshalb dies vor allem die Gruppe der Responder betrifft. Demnach lässt sich nur ein Teil der Pathogenese der Depression biologisch erklären, wohingegen auch Umwelteinflüsse wie beispielsweise die aktuellen Lebensumstände relevant für Entstehung und Abklingen der Depression sind (Möller et al., 2015). Die HPA-Achse stellt dabei einen solchen biologischen Faktor dar, der durch eine medikamentöse Therapie adressiert und dessen Dysregulation so im Therapieverlauf ausgeglichen werden kann. Dabei gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass Antidepressiva diese Wirkung unter anderem durch direkte Interaktion mit FKBP5 entfalten könnten (Asadi-Pooya et al., 2023; Budziński et al., 2022).

Gemeinsam ist allen zuvor geschilderten Beobachtungen, dass diese nur bei einer Aufteilung des Therapieansprechens unter Verwendung des MADRS gemacht werden könnten. Setzt man dafür stattdessen den BDI-II ein, lassen sich zwar die gleichen Tendenzen beobachten, signifikante Gruppenunterschiede zeigen sich aber nicht. Eine mögliche Erklärung könnte schlicht in der Anzahl vollständig ausgefüllter Fragebögen und damit der zur Verfügung stehenden Stichprobengröße zu finden sein. So lagen sowohl in Woche 1 (MADRS/BDI-II: 180/176) als auch in Woche 4 (MADRS/BDI-II: 135/121) mehr vollständige MADRS-Auswertungen vor. Da allerdings der MADRS auch

ein insgesamt höheres Therapieansprechen (MADRS/BDI: 28,9%/ 20,6%) aufwies, sind auch Unterschiede zwischen den Tests zu berücksichtigen. Bei beiden handelt es sich um gut etablierte Instrumente zur Beurteilung der Erkrankungsschwere von Depressionen (Hershenberg et al., 2020; Seemüller et al., 2023). Aber sowohl die Diskrepanz zwischen Selbst- und Fremdbeurteilungsinstrument als auch die der verwendeten Items, resultiert in einer relevanten Differenz beider. Die beobachtete Korrelation zwischen den Tests liegt daher nur auf einem mittleren Niveau. Der BDI-II als Selbstbeurteilungsinstrument besitzt dabei auch aufgrund mehr Items zu kognitiven Domänen und negativen Gedanken eine gegenüber dem MADRS zusätzliche Dimension der Selbstmitteilung (Uher et al., 2008). Die Itemgestaltung des MADRS hingegen, mit Fokussierung auf die Prüfung depressiver Kernelemente, resultiert in der höchsten Spezifität der etablierten Testverfahren (Nejati et al., 2020). Nach der nur kurzen Therapiezeit von vier Wochen scheint eine niedrigere Rate des Ansprechens im BDI-II, aufgrund der geschilderten Umstände und der im Rahmen der Depression oft verzögerten Selbstwahrnehmung einer Symptombesserung, nachvollziehbar. Aus den eingangs geschilderten Gründen sind aber auch die mit dem MADRS erhobenen Befunde des Therapieansprechens als glaubhaft einzustufen.

Die ergänzende Untersuchung hinsichtlich Korrelationen zwischen den regulatorischen Parametern von *FKBP5* und dem Therapieansprechen konnte nur einen Teil der zuvor geschilderten Ergebnisse abbilden. So offenbarte sich ein negativer Zusammenhang zwischen der Methylierung auf CpG7 und einem späteren Therapieansprechen, passend zu oben geschilderten Befunden. Darüber hinaus fiel auch eine Assoziation zwischen der Änderung der Methylierung an CpG1 und 2 und dem Therapieansprechen im BDI-II auf. Aufgrund der Überlegung zu Beginn dieses Kapitels, nämlich einer insgesamt ungerichteten Reaktion dieser CpGs auf den mDST und der damit verbundenen Anfälligkeit der Ergebnisse für Ausreißer, soll auf eine weitere Interpretation dieser Befunde verzichtet werden. Signifikante Korrelationen zwischen der mRNA-Expression und dem Therapieansprechen finden sich aber nicht. Darüber hinaus bestehen ebenfalls keine Assoziationen zwischen den untersuchten regulatorischen Parametern und der Schwere der depressiven Erkrankung. Dies eliminiert einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für den Gruppenunterschied zwischen Respondern und Non-Respondern, wonach die Non-Responder möglicherweise die schwerer betroffene Patientengruppe darstellen und deshalb in der Kürze der Therapie nicht ansprechen. Stattdessen erhärten die beschriebenen Ergebnisse den Verdacht eines primär biologisch bedingten Subtyps depressiver Erkrankungen, bei dem es über eine Normalisierung der

HPA-Achsendysregulation durch die antidepressive Therapie zu einem Ansprechen kommt (Holsboer & Barden, 1996; Pariante & Miller, 2001).

Für die Qualifikation als prognostischer Biomarker für das Therapieansprechen sind aber neben der Assoziation zu klinischen Parametern weitere Voraussetzungen zu berücksichtigen (Hendrix et al., 2021). Grundlegend ist eine Einbettung des potenziellen Biomarkers in den angenommenen Pathomechanismus der Erkrankung (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), 2018). Dies kann für *FKBP5* aufgrund seiner zentralen Rolle in der HPA-Achse als gegeben angesehen werden (Matosin et al., 2018). Darüber hinaus soll der Biomarker zu einer höheren Sensitivität bei der Vorhersage, in diesem Fall des Therapieansprechens, führen und keinesfalls aufgrund falscher Annahmen PatientInnen schaden (Hendrix et al., 2021).

Um diese Fragen zu beantworten, wurde eine binäre logistische Regressionsanalyse durchgeführt. In einem insgesamt signifikanten Modell konnten die mRNA-Expression zu Therapiebeginn sowie die Methylierung an CpG7 als Variablen mit Einfluss die Vorhersage des Therapieansprechens ermittelt werden. Parallel zu den bereits geschilderten Ergebnissen war eine höhere Methylierung prädiktiv für das Therapieversagen, wohingegen eine höhere mRNA-Expression das Therapieansprechen begünstigte. Die ermittelten Odds-Ratio (Methylierung: 0,872, mRNA-Expression: 10,287) legen dabei eine deutlich höhere Effektstärke der mRNA-Expression nahe. Allerdings müssen hier die jeweiligen Einheiten berücksichtigt werden. Die Normierung auf eine Verdopplung des relativen Risikos unter Berücksichtigung der Ausgangswerte (~80% Methylierung, ~0,5 CNRQ mRNA-Expression) erleichtert den Vergleich: eine um 5% höhere Methylierung verdoppelt so das Risiko eines Therapieversagens, während eine um 0,3 CNRQ gesteigerte mRNA-Expression dieses halbiert (Backhaus et al., 2006). Unter Verwendung dieser beiden Variablen verbessert das Modell die Vorhersagewahrscheinlichkeit für ein Therapieansprechen von 59,6% auf 66,3%. Eine richtige Klassifizierung von lediglich 2/3 der PatientInnen scheint bereits fragwürdig für die Qualifikation als Biomarkers. Die Berücksichtigung einer Sensitivität von 38,1% sowie einer Spezifität 85,5% manifestiert diese Einschätzung weiter. Im konkreten Fall würden über 60% der PatientInnen, die auf die Standardtherapie binnen vier Wochen ansprechen nicht richtig identifiziert werden und so möglicherweise einer unnötig intensiven und teuren Therapie zugeführt werden. Im Gegenzug blieben auch knapp 15% der Therapie-Non-Responder unentdeckt, sodass diese nicht die nötige Intensivierung der Therapie erfahren. Sowohl das Kriterium einer relevanten

Verbesserung der Vorhersage als auch die Verhinderung von Schaden durch ihre Verwendung, konnten die Parameter mRNA-Expression und Methylierung von *FKBP5* nicht erfüllen (Hendrix et al., 2021). Trotz der beobachteten Assoziationen sowie des zugrundeliegenden Pathomechanismus stellen sie für die klinische Praxis für sich allein genommen daher keine sinnvollen Biomarker für ein Therapieansprechen dar. Allerdings könnten sie, den grundlegenden Überlagerungen zur Initiierung der DaCFail-Studie entsprechend, in einer Batterie mehrerer Biomarker, die neben der bereits diskutierten Inflammation beispielsweise auch klinische Parameter, psychometrische Erhebungen oder physiologische Parameter wie die Herzratenvariabilität umfassen, zur Vorhersage des Therapieansprechens beitragen.

## **4.2 Allgemeine Limitationen**

Für alle zuvor geschilderten und diskutierten Ergebnisse sind allgemeine Einschränkungen durch Studiendesign, Durchführung und Auswertung dieser Arbeit zu berücksichtigen, auf die im Folgenden eingegangen werden soll. Soweit mögliche wurde versucht diesen mittels in den einzelnen Kapiteln beschriebenen Maßnahmen zu begegnen. In Anbetracht der trotzdem verbleibenden Einschränkungen sei auf den explorativen Ansatz der beiden Studien GEPard und DaCFail sowie auch dieser Arbeit verwiesen, der naturgemäß mit gewissen Unsicherheiten behaftet ist.

### **4.2.1. Zusammensetzung der Gruppen**

Wie bereits in den entsprechenden Kapiteln des Ergebnisteils berichtet, unterscheiden sich die rekrutierten Gruppen hinsichtlich ihrer Charakteristika teilweise signifikant, weshalb im Folgenden auf die Unterschiede in der Alters- und Geschlechterverteilung eingegangen werden soll.

#### *Alter*

In der DaCFail-Kohorte sind die jüngsten PatientInnen in der Depressionsgruppe vertreten (58,88  $\pm$  7,82 Jahre), wohingegen solche PatientInnen mit Herzinsuffizienz im Durchschnitt zehn Jahre älter sind (69,40  $\pm$  8,26 Jahre). PatientInnen mit komorbiden Erkrankungen sowie Gesunde rangieren in der Mitte (65,00  $\pm$  10,61 bzw. 63,27  $\pm$  7,45 Jahre). Die GEPard-Kohorte wiederum, die nur Patientinnen mit Depressionen umfasst,

ist deutlich jünger ( $46,13 \pm 14,77$ ). Ein Abgleich mit den epidemiologischen Daten beider Erkrankungen bestätigt, dass die jeweilige Kohorte ihre Zielgruppe gut repräsentiert. So findet sich die höchste Rate der Neuerkrankungen für die Herzinsuffizienz jenseits des 70. Lebensjahres, während sich die Depression in der Regel zwischen dem 30. und 45. Lebensjahr erstmals manifestiert. Allerdings kommt es im Rahmen der Altersdepression ab dem 65. Lebensjahr zu einem weiteren Erkrankungsgipfel, sodass die Prävalenz für Depressionen in dieser Altersgruppe am höchsten ist (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019; Möller et al., 2015). Gleichzeitig ist diese Patientengruppe in ihrem Zugang zu einer adäquaten, z.B. stationären Therapie, weiter unterversorgt (Boenisch et al., 2012). Die entstandenen Gruppenunterschiede sind daher, trotz eines festgelegten Mindestalters für den Studieneinschluss von mindestens 50 Jahren, auf das unterschiedliche Patientenalter im Zentrum für Psychische Gesundheit (Rekrutierung Gruppe 1), verglichen mit der Medizinischen Klinik (Rekrutierung Gruppe 3) zurückzuführen.

Die Relevanz des Alters für die erhobenen Messwerte wird deutlich, wenn man die in der Literatur beschriebenen Veränderungen von *FKBP5*, die mit dem Alter einhergehen, näher betrachtet. Sabbagh und KollegInnen konnten im Mausmodell eine zunehmende Demethylierung im Alter mit gleichzeitiger Steigerung der *FKBP5* mRNA-Expression nachweisen (Sabbagh et al., 2014). Eine Ausschaltung von *FKBP5* dagegen führte zu einer besseren Stressresilienz im Alter. Dies konnte durch van Doeselaar et al. repliziert werden (van Doeselaar et al., 2023). Als biochemische Grundlage für diese Beobachtungen konnte ein Zusammenhang der altersabhängigen kumulativen Cortisolexposition mit der Demethylierung von *FKBP5* nachgewiesen werden (Zannas, 2023). Auch der zusätzliche Einfluss von Stress auf die Untersuchten, der eine weitere Demethylierung begünstigt, konnte wiederholt belegt werden (Zannas et al., 2018). Darüber hinaus kommt es im Zusammenhang mit Änderungen der *FKBP5* Methylierung zu einer vorgezogenen Alterung, welche mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergeht (Beach et al., 2022). Zusammengenommen verdeutlicht dies einerseits eine mögliche Rolle von *FKBP5* in der Entstehung der Altersdepression, andererseits die Wichtigkeit einer Berücksichtigung des Alters bei der Interpretation von Methylierung und Expression. Als Versuch eines Ausgleiches der bestehenden Gruppenunterschiede wurde das Alter daher in allen Gruppenvergleichen als Kovariate berücksichtigt.

## *Geschlecht*

Auch die Geschlechter sind innerhalb der Untersuchungsgruppen nicht immer gleich verteilt. So sind besonders in der Herzinsuffizienzgruppe (87%) und der Gruppe mit komorbiden Erkrankungen (64%) Männer überrepräsentiert. Dies bestätigt die Beobachtung einer großen Würzburger Studie, wonach die Herzinsuffizienz mit reduziertem LVEF häufiger Männer betrifft, wohingegen bei Betrachtung aller herzinsuffizienten PatientInnen kein Geschlechterunterschied besteht (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019; Störk et al., 2008). Wenngleich die Stichproben also ein gutes Abbild der erkrankten Bevölkerung liefern, so muss dennoch der Einfluss des Geschlechts auf die analysierten Parameter berücksichtigt werden. Anders als für das Alter sind die Befunde in der Literatur diesbezüglich heterogen. So fanden Li et al. keinen unabhängigen Effekt des Geschlechts auf die Methylierung bei gesunden und depressiven ProbandInnen (Li et al., 2022). Dahingegen beobachteten Lee und KollegInnen Veränderungen von Methylierung und mRNA-Expression bei *FKBP5* in Zusammenhang mit dem Cortisolstoffwechsel, die abhängig vom weiblichen Geschlecht waren (Lee et al., 2018). Auch van Doeselaar und KollegInnen konnten im Mausmodell Verhaltensänderungen durch Manipulationen an *FKBP5* in Abhängigkeit des Geschlechts nachvollziehen (van Doeselaar et al., 2023). Obwohl die genauen Effekte und Wirkrichtung eines Einflusses des Geschlechts noch unbekannt sind, wurde in Anbetracht der Gruppenunterschiede versucht, diesen parallel zum Alter durch Berücksichtigung als Kovariate in den Modellen zu korrigieren.

### 4.2.2 Fallzahl

Die DaCFail-Studie verfolgte die Klärungen unterschiedlicher Hypothesen, wobei für ihre initiale Powerberechnung der erwartete Effekt einer unterschiedlichen Herzratenvariabilität zwischen den Untersuchungsgruppen herangezogen wurde. Hieraus ergab sich eine prognostizierte Gruppengröße von je 48 ProbandInnen zur Beantwortung der Fragestellung (Lichter et al., 2023). Bei der Konzeption dieser Arbeit wurde eine weitere Powerberechnung für die *FKBP5* betreffenden Fragestellungen durchgeführt. Da in der Literatur bisher keine Daten zur Herzinsuffizienz vorlagen, wurde eine mindestens mittlere Effektstärke (entsprechend  $\eta^2 > 0,06$ ) angenommen, um möglichen beobachteten Effekten auch eine klinische Relevanz einräumen zu können. Für vier Untersuchungsgruppen und einer statistischen Power von 0,8 ergab sich eine angestrebte Gruppengröße von je 44 ProbandInnen, woraufhin mit der Laborarbeit

begonnen wurde (Hemmerich, 2018). Die angestrebten Einschlüsse konnten für PatientInnen mit Depression oder Herzinsuffizienz erreicht werden. In der Kontrollgruppe kam es zu Verzögerungen bei der Rekrutierung, da der Einschluss gesunder ProbandInnen außerhalb des stationären Settings einen hohen Zeitaufwand der Anwerbung mit sich brachte. Daher war diese Gruppe zum Zeitpunkt der Laborarbeiten mit 33 ProbandInnen kleiner als angestrebt. Die größten Probleme bereitete der Einschluss von PatientInnen mit Depression und komorbider Herzinsuffizienz. Trotz intensiver Bemühungen konnten über den gesamten Studienzeitraum nur zwölf Teilnehmer eingeschlossen werden, wovon elf in dieser Arbeit berücksichtigt wurden (Lichter et al., 2023). Mögliche Gründe sind eine Unterrepräsentation dieser Patientengruppe in der stationären psychiatrischen Behandlung, parallel zur bereits berichteten Unterbehandlung der Altersdepression, oder eine geringere Teilnahmebereitschaft dieser besonders schwer betroffenen Patientengruppe. Die für die Arbeit zu Verfügung stehenden Gruppengrößen waren also teilweise kleiner als angenommen. Zusätzlich fielen auch die beobachteten Effektstärken geringer aus als angenommen ( $\eta^2$  0,01-0,02). In einer Post-hoc Powerberechnung ergab sich unter sonst gleichen Annahmen so eine nötige Stichprobengröße von je 180 (Hemmerich, 2018). Für alle berichteten Ergebnisse muss also die möglicherweise zu geringe und ungleich auf die Studiengruppen verteilte Stichprobengröße berücksichtigt werden.

Die GEPaRD-Studie erreichte mit insgesamt 356 Einschlüssen nicht ganz das gesetzte Ziel von 500 TeilnehmerInnen (Lichter et al., 2023). Allerdings ergab sich mit 180 für diese Arbeit zu berücksichtigenden ProbandInnen eine ausreichend große Stichprobe.

#### 4.2.3 Fehlende Werte

Während der Dokumentation der umfangreichen klinischen Parameter sowie wiederholten Psychometrischen Untersuchungen kommt es naturgemäß zum Auftreten von fehlenden Werten. Von Seiten der Laborarbeit bedingte die einzelne Auswertung der gewonnenen DNA- und RNA-Proben eine zusätzliche Quelle. Dabei betrug der Ausfall für die Methylierungsanalyse knapp 5% (2189 gültige Messwerte bei 2308 untersuchten Stellen), ebenso wie für die Bestimmung der mRNA-Expression (681 gültige Messwerte bei 716 analysierten Proben), wobei bereits der gesamte Weg von der Probenentnahme bis zur Qualitätskontrolle berücksichtigt ist. Da sich die insgesamt wenigen Ausfälle aber über alle ProbandInnen verteilten, wurde für die jeweiligen statistischen Berechnungen ein paarweiser Fallausschluss gewählt, um eine zu große

Reduktion der Stichprobengröße zu vermeiden. Im Gegenzug muss allerdings die damit einhergehende Inkonzanz der Stichprobengrößen der einzelnen Analysen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

#### 4.2.4 Naturalistisches Studiendesign

Sowohl die Beobachtungsstudie GEPaRD als auch die Fall-Kontrollstudie DaCFail sind naturalistisch konzipiert. Das bedeutet, dass durch das Studienteam keinerlei Einfluss auf die psychiatrische bzw. internistische Behandlung durch die jeweils betreuenden ÄrztInnen genommen wurden. Da die leitliniengerechte Therapie einer schweren Depression unter anderem eine antidepressive Medikation empfiehlt, überrascht es nicht, dass die Mehrheit der PatientInnen in stationär psychiatrischer Behandlung diese erhielt (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2022). Lediglich fünf PatientInnen nahmen über den 4-wöchigen Behandlungszeitraum gar keine entsprechende Medikation ein. Für die Interpretation der Ergebnisse zu *FKBP5* muss also auch ein möglicher Einfluss der Antidepressiva berücksichtigt werden. So beobachteten Cattaneo et al. eine Reduktion der *FKBP5*-mRNA-Expression nach 8-wöchiger Einnahme von Escitalopram oder Nortriptylin bei depressiven PatientInnen, die in der gesunden Kontrollgruppe nicht auffiel (Cattaneo et al., 2013). Auch eine Demethylierung von *FKBP5* in Zusammenhang mit einer SSRI-Therapie ist in der Literatur beschrieben (Mohammadi et al., 2022). Abseits dieser direkten Effekte auf die untersuchten Parameter existieren Hinweise für verschiedene Interaktionen der Medikation mit dem Protein FKBP5. Gemeinsam ist ihnen FKBP5 als Ansatzpunkt für eine Normalisierung der HPA-Achsen-Dysregulation im Rahmen der psychischen Erkrankung. Budzinsky und KollegInnen belegten beispielweise den hemmenden Effekt von trizyklischen Antidepressiva auf die SUMOylation, also das Anfügen von SUMO an FKBP5, das eine Voraussetzung für seine spätere Interaktion mit dem GR darstellt (Budziński et al., 2022). Die dadurch reduzierte Aktivität von FKBP5 bedingte eine Steigerung der GR-Aktivität und beeinflusste so die Funktion der gesamten HPA-Achse. Das naturalistische Studiendesign, welches neben der ausführlich beschriebenen antidepressiven Medikation noch weitere mögliche Störvariablen beinhaltet, muss also ebenfalls bei der Ergebnisinterpretation bedacht werden.

#### 4.2.5 Untersuchtetes Gewebe

Alle in dieser Arbeit analysierten DNA und RNA-Proben wurden aus den kernhaltigen Zellen von Vollblutproben, also Leukozyten, gewonnen. Die regulatorischen Elemente der HPA-Achse liegen mit Hypothalamus und Hypophyse aber im zentralen Nervensystem. Das Herz und die Nebenniere stellen schließlich die relevanten Endorgane für die Cortisolfreisetzung beziehungsweise deren Wirkort dar. Wiederholt konnte gezeigt werden, dass die Glukokortikoidstimulation eine Demethylierung und Steigerung der *FKBP5* Expression verursacht, die sowohl Zellen des zentralen Nervensystems als auch des peripheren Blutes betrifft (Budziński et al., 2022; Di Sante et al., 2018; Ewald et al., 2014; Klengel et al., 2013; Lee et al., 2010). Dies erlaubt prinzipiell die Verwendung von peripherem Blut zur Untersuchung von *FKBP5*. Allerdings unterscheiden sich verschiedene Hirnareale in ihrer *FKBP5* Expression und in den zuvor zitierten Studien wurden überwiegend hippocampale Zellen bzw. deren Vorläufer, verwendet (GTEx Consortium, 2015; D. Wang et al., 2019). Scharf et al. konnten hierbei eine besonders starke Zunahme der Expression in solchen Arealen beobachten, für die eine niedrigere Baselineexpression vorlag (Scharf et al., 2011). Wiechmann und KollegInnen belegten für die Methylierung, dass, trotz unterschiedlicher Baselinemethylierung zwischen Zellen des peripheren Blutes und Hippocampusprogenitorzellen, die Veränderung der Methylierung durch Glukokortikoidstimulation die gleiche Richtung besitzt (Wiechmann et al., 2019).

Die Verwendung von peripherem Blut zur Untersuchung der HPA-Achse und insbesondere von *FKBP5* ist also bereits umfassend etabliert. Auch eine vergleichbare Wirkrichtung der Glukokortikoidstimulation zwischen Hirn- und Blutzellen ist belegt, wobei Unsicherheiten vor allem hinsichtlich deren Intensität in den verschiedenen Gewebetypen verbleiben. Für eine Übertragbarkeit dieses Zusammenhangs auf das Herz liegen den Kenntnissen des Autors nach gegenwärtig allerdings keine Quellen vor, auch wenn *FKBP5* in Herzmuskelzellen nachweislich exprimiert wird (GTEx Consortium, 2015; X. Wang et al., 2023).

### **4.3 Ausblick**

Ziel der Erforschung der Pathomechanismen von Erkrankungen ist immer auch eine Entdeckung möglicher Ansatzpunkte für neue therapeutische Interventionen. Für *FKBP5* steht mit „SAFit2“ bereits ein selektiver Inhibitor zur präklinischen Anwendung zur Verfügung (Codagnone et al., 2022). Die zentrale Rolle von *FKBP5* in der HPA-Achse macht es dabei einerseits zu einem vielversprechenden Target bei der Therapie unterschiedlicher Erkrankungen. Andererseits stellen die vielfältigen Effekte mit teils entgegengesetzter Wirkrichtung auch eine Quelle möglicherweise schwerer Nebenwirkungen dar. Eine Ausschaltung von *FKBP5* im Mausmodell bedingt so beispielsweise eine Verbesserung der Stressreaktion bei Depression (Brix et al., 2022). An anderen Organen entfalten sich dadurch aber negative Effekte, wie ein begünstigtes Auftreten von Vorhofflimmern oder eine Gewichtszunahme (Bajaj et al., 2022; X. Wang et al., 2023). Vor einer klinischen Anwendung ist also ein noch umfänglicheres Verständnis der Funktionen von *FKBP5* notwendig. Ein anderer Ansatzpunkt zur Umgehung möglicher unerwünschter Effekte ist es, Ziele unterhalb der Wirkung von *FKBP5* selbst ins Fadenkreuz zu nehmen. Dabei ist besonders die gesteigerte Inflammation im Rahmen depressiver Erkrankungen Gegenstand umfangreicher Forschung. Allerdings konnte eine aktuelle Metaanalyse keinen relevanten Benefit in der antidepressiven Therapie durch den Einsatz verschiedener anti-inflammatorischer Substanzen ausmachen (Simon et al., 2023). Wie bereits diskutiert, stellt auch hier ein besseres Verständnis möglicher Subtypen innerhalb der biologischen Ursachen depressiver Erkrankungen den Schlüssel zu einer zielgerichteten Therapie eben dieser dar (Beijers et al., 2019; Foley et al., 2023; Křenek et al., 2023; Runia et al., 2022). So könnten sich Verfahren bei bestimmten Subgruppen als wirksam erweisen, die bei Behandlung der Gesamtheit aller depressiven Erkrankungen keinen ausreichenden Effekt entfalten.

## 5 Zusammenfassung

*FKBP5* stellt im Stresssystem der HPA-Achse ein zentrales Gen bei der Regulation der Sensitivität des Glukokortikoidrezeptors und somit der Reaktion auf Stress dar. Zur Adaptation an Umwelteinflüsse ist es selbst in ein komplexes System von Regulationsmechanismen eingebettet, die unter anderem epigenetische Modifikationen in Form von DNA-Methylierung umfassen. Bisherige Studien legen eine starke Assoziation von *FKBP5* zu stressinduzierten psychischen Erkrankungen nahe und weisen auf eine Dysregulation der HPA-Achse als möglichen Pathomechanismus hin. Für die enge klinische Interaktion von Depression und Herzinsuffizienz sowie eine ebenfalls vermutete Rolle der HPA-Achse in der Pathogenese letzterer, könnte *FKBP5* daher ein entscheidendes Bindeglied darstellen. Gleichzeitig bietet die Identifikation einer über *FKBP5* ausgedrückten Dysregulation der HPA-Achse einen biologischen Befund, der als Marker für das Ansprechen einer antidepressiven Therapie herangezogen werden könnte. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung eines möglichen Einflusses regulatorischer Parameter von *FKBP5* auf die Herzinsuffizienz sowie eine Prüfung dieser als mögliche Biomarker für einen Erfolg der antidepressiven Therapie.

Dazu wurden Blutproben von ProbandInnen der GEPaD- bzw. DaCFail-Studie mit Depression, Herzinsuffizienz sowie gesunde Kontrollen untersucht. Durch Pyrosequenzierung bisulfitkonvertierter DNA erfolgte die Bestimmung der Methylierung regulatorischer CpGs. Die Messung der relativen mRNA-Expression erfolgte durch den Einsatz einer qPCR.

In der Auswertung fand sich keine differentielle mRNA-Expression oder Methylierung zwischen den vier Untersuchungsgruppen. Allerdings reagierten depressive PatientInnen verglichen mit der Kontrollgruppe mit einer geringeren Zunahme der mRNA-Expression als Reaktion auf den mDST. Das Therapieansprechen in der Depressionsgruppe wiederum war mit einer niedrigeren Methylierung auf CpG7 sowie einer höheren mRNA-Expression zu Therapiebeginn assoziiert. Im Behandlungsverlauf führte eine Abnahme der mRNA-Expression bei den Respondern zu einer Annäherung beider Gruppen.

Diese Arbeit konnte keine Hinweise für eine Rolle von *FKBP5* in der Pathogenese der Herzinsuffizienz finden. Allerdings zeigten die Befunde zur Regulation des Gens bei Glukokortikoidstimulation eine hohe Konstanz zu vorherigen Ergebnissen. In diesen

Kontext reihen sich auch die Ergebnisse für das Therapieansprechen ein, die aufgrund einer Herabregulation der HPA-Achse im Therapieverlauf die Idee einer ursächlichen HPA-Dysregulation in der Gruppe der Responder bekräftigen. Für sich allein genommen lassen sich mRNA-Expression und Methylierung aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität nicht als Biomarker für das Therapieansprechen einsetzen. Die bisherigen Befunde bestärken aber eine mögliche Rolle in einer Batterie unterschiedlicher Biomarker auf verschiedenen Ebenen, wie Klinik, Psychometrie und Physiologie.

## 6 Literaturverzeichnis

- Amasi-Hartoonian, N., Sforzini, L., Cattaneo, A., & Pariante, C. M. (2022). Cause or consequence? Understanding the role of cortisol in the increased inflammation observed in depression. *Curr Opin Endocr Metab Res*, *24*, 100356. doi:10.1016/j.coemr.2022.100356
- Angermann, C. E., Gelbrich, G., Störk, S., Schowalter, M., Deckert, J., Ertl, G., & Faller, H. (2011). Somatic correlates of comorbid major depression in patients with systolic heart failure. *Int J Cardiol*, *147*(1), 66-73. doi:10.1016/j.ijcard.2009.07.044
- Antunica-Noguerol, M., Budziński, M. L., Druker, J., Gassen, N. C., Sokn, M. C., Senin, S., . . . Arzt, E. (2016). The activity of the glucocorticoid receptor is regulated by SUMO conjugation to FKBP51. *Cell Death Differ*, *23*(10), 1579-1591. doi:10.1038/cdd.2016.44
- Appel, K., Schwahn, C., Mahler, J., Schulz, A., Spitzer, C., Fenske, K., . . . 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. doi:10.1038/npp.2011.81
- Asadi-Pooya, A. A., Malekpour, M., Zamiri, B., Kashkooli, M., & Firouzabadi, N. (2023). FKBP5 blockade may provide a new horizon for the treatment of stress-associated disorders: An in-silico study. *Epilepsia Open*, *8*(2), 633-640. doi:10.1002/epi4.12749
- Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., & Weibe, R. (2006). *Multivariate Analysemethoden*. Berlin: Springer.
- Baischew, A., Engel, S., Geiger, T. M., Taubert, M. C., & Hausch, F. (2023). Structural and biochemical insights into FKBP51 as a Hsp90 co-chaperone. *J Cell Biochem*. doi:10.1002/jcb.30384
- Bajaj, T., Häusl, A. S., Schmidt, M. V., & Gassen, N. C. (2022). FKBP5/FKBP51 on weight watch: central FKBP5 links regulatory WIPI protein networks to autophagy and metabolic control. *Autophagy*, *18*(11), 2756-2758. doi:10.1080/15548627.2022.2063006
- Balion, C., Don-Wauchope, A., Hill, S., Santaguida, P. L., Booth, R., Brown, J. A., . . . Raina, P. (2013). AHRQ Comparative Effectiveness Reviews. In *Use of Natriuretic Peptide Measurement in the Management of Heart Failure*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US).
- Balsevich, G., Uribe, A., Wagner, K. V., Hartmann, J., Santarelli, S., Labermaier, C., & Schmidt, M. V. (2014). Interplay between diet-induced obesity and chronic stress in mice: potential role of FKBP51. *J Endocrinol*, *222*(1), 15-26. doi:10.1530/joe-14-0129
- Banach, E., Szczepankiewicz, A., Leszczyńska-Rodziewicz, A., Pawlak, J., Dmistrz-Węglarz, M., Zaremba, D., & Twarowska-Hauser, J. (2017). Venlafaxine and sertraline does not affect the expression of genes regulating stress response in female MDD patients. *Psychiatr Pol*, *51*(6), 1029-1038. doi:10.12740/pp/76329
- Beach, S. R. H., Ong, M. L., Lei, M. K., Carter, S. E., Simons, R. L., Gibbons, F. X., & Philibert, R. A. (2022). Methylation of FKBP5 is associated with accelerated DNA methylation ageing and cardiometabolic risk: replication in young-adult and middle-aged Black Americans. *Epigenetics*, *17*(9), 982-1002. doi:10.1080/15592294.2021.1980688
- Beck, A. T., Ward, C. H., Mendelson, M., Mock, J., & Erbaugh, J. (1961). An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*, *4*, 561-571. doi:10.1001/archpsyc.1961.01710120031004

- Beijers, L., Wardenaar, K. J., van Loo, H. M., & Schoevers, R. A. (2019). Data-driven biological subtypes of depression: systematic review of biological approaches to depression subtyping. *Mol Psychiatry*, 24(6), 888-900. doi:10.1038/s41380-019-0385-5
- Bekhat, M., Rowson, S. A., & Neigh, G. N. (2017). Checks and balances: The glucocorticoid receptor and NFκB in good times and bad. *Front Neuroendocrinol*, 46, 15-31. doi:10.1016/j.yfrne.2017.05.001
- Bernstein, D. P., Fink, L., Handelsman, L., Foote, J., Lovejoy, M., Wenzel, K., . . . Ruggiero, J. (1994). Initial reliability and validity of a new retrospective measure of child abuse and neglect. *Am J Psychiatry*, 151(8), 1132-1136. doi:10.1176/ajp.151.8.1132
- Bernstein, D. P., Stein, J. A., Newcomb, M. D., Walker, E., Pogge, D., Ahluvalia, T., . . . Zule, W. (2003). Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse Negl*, 27(2), 169-190. doi:10.1016/s0145-2134(02)00541-0
- BfArM, BMG, & KKG. (2022). ICD-10-GM Version 2023, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, Stand: 16. September 2022.
- 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. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.05.021
- Binder, E. B., Salyakina, D., Lichtner, P., Wochnik, G. M., Ising, M., Pütz, B., . . . 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. doi:10.1038/ng1479
- Boenisch, S., Kocalevent, R. D., Matschinger, H., Mergl, R., Wimmer-Brunauer, C., Tauscher, M., . . . Bramesfeld, A. (2012). Who receives depression-specific treatment? A secondary data-based analysis of outpatient care received by over 780,000 statutory health-insured individuals diagnosed with depression. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 47(3), 475-486. doi:10.1007/s00127-011-0355-y
- Bortz, J., & Schuster, C. (2010). *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler* (7. Auflage ed.). Berlin: Springer-Verlag GmbH.
- Brandt, J., Warnke, K., Jörgens, S., Arolt, V., Beer, K., Domschke, K., . . . Grosse, L. (2020). Association of FKBP5 genotype with depressive symptoms in patients with coronary heart disease: a prospective study. *J Neural Transm (Vienna)*, 127(12), 1651-1662. doi:10.1007/s00702-020-02243-6
- Brix, L. M., Häusl, A. S., Toksöz, I., Bordes, J., van Doeselaar, L., Engelhardt, C., . . . Schmidt, M. V. (2022). The co-chaperone FKBP51 modulates HPA axis activity and age-related maladaptation of the stress system in pituitary proopiomelanocortin cells. *Psychoneuroendocrinology*, 138, 105670. doi:10.1016/j.psyneuen.2022.105670
- Brown, G. W., & Harris, T. (1978). *Social Origins of Depression: A Study of Psychiatric Disorder in Women*. London.
- Brugha, T., Bebbington, P., Tennant, C., & Hurry, J. (1985). The List of Threatening Experiences: a subset of 12 life event categories with considerable long-term contextual threat. *Psychol Med*, 15(1), 189-194. doi:10.1017/s003329170002105x
- Budziński, M. L., Sokn, C., Gobbini, R., Ugo, B., Antunica-Noguerol, M., Senin, S., . . . Liberman, A. C. (2022). Tricyclic antidepressants target FKBP51 SUMOylation to restore glucocorticoid receptor activity. *Molecular Psychiatry*, 27(5), 2533-2545. doi:10.1038/s41380-022-01491-0

- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). (2019). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 3. Auflage. Version 3. 2019. doi:DOI: 10.6101/AZQ/000482.
- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). (2022). Nationale VersorgungsLeitlinie Unipolare Depression – Langfassung, Version 3.2. 2022. doi:10.6101/AZQ/000505
- Busch, M. A., Maske, U. E., Ryl, L., Schlack, R., & Hapke, U. (2013). Prevalence of depressive symptoms and diagnosed depression among adults in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56(5-6), 733-739. doi:10.1007/s00103-013-1688-3
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2), 169-193. doi:10.1677/jme.0.0250169
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Carroll, B. J. (1980). Dexamethasone suppression test in depression. *Lancet*, 2(8206), 1249. doi:10.1016/s0140-6736(80)92507-6
- Carroll, B. J., & Curtis, G. C. (1976). Neuroendocrine identification of depressed patients. *Aust N Z J Psychiatry*, 10(1), 13-20. doi:10.3109/00048677609159480
- Carroll, B. J., Curtis, G. C., Davies, B. M., Mendels, J., & Sugeran, A. A. (1976). Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychol Med*, 6(1), 43-50. doi:10.1017/s0033291700007480
- Carroll, B. J., Curtis, G. C., & Mendels, J. (1976). Cerebrospinal fluid and plasma free cortisol concentrations in depression. *Psychol Med*, 6(2), 235-244. doi:10.1017/s0033291700013775
- Carroll, B. J., Martin, F. I., & Davies, B. (1968). Resistance to suppression by dexamethasone of plasma 11-O.H.C.S. levels in severe depressive illness. *Br Med J*, 3(5613), 285-287. doi:10.1136/bmj.3.5613.285
- Cattaneo, A., Gennarelli, M., Uher, R., Breen, G., Farmer, A., Aitchison, K. J., . . . Pariante, C. M. (2013). Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'. *Neuropsychopharmacology*, 38(3), 377-385. doi:10.1038/npp.2012.191
- Chaudhry, S. I., McAvay, G., Chen, S., Whitson, H., Newman, A. B., Krumholz, H. M., & Gill, T. M. (2013). Risk factors for hospital admission among older persons with newly diagnosed heart failure: findings from the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*, 61(6), 635-642. doi:10.1016/j.jacc.2012.11.027
- Chen, H., Wang, N., Zhao, X., Ross, C. A., O'Shea, K. S., & McClinnis, M. G. (2013). Gene expression alterations in bipolar disorder postmortem brains. *Bipolar Disorders*, 15(2), 177-187. doi:10.1111/bdi.12039
- Codagnone, M. G., Kara, N., Ratsika, A., Levone, B. R., van de Wouw, M., Tan, L. A., . . . O'Leary, O. F. (2022). Inhibition of FKBP51 induces stress resilience and alters hippocampal neurogenesis. *Mol Psychiatry*, 27(12), 4928-4938. doi:10.1038/s41380-022-01755-9
- Cohen, J. W. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale: Erlbaum.

- Colella, S., Shen, L., Baggerly, K. A., Issa, J. P., & Krahe, R. (2003). Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques*, *35*(1), 146-150. doi:10.2144/03351md01
- Criado-Marrero, M., Rein, T., Binder, E. B., Porter, J. T., Koren, J., 3rd, & Blair, L. J. (2018). Hsp90 and FKBP51: complex regulators of psychiatric diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *373*(1738). doi:10.1098/rstb.2016.0532
- Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., . . . Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res*, *50*(D1), D988-d995. doi:10.1093/nar/gkab1049
- Dang, H., Ye, Y., Zhao, X., & Zeng, Y. (2020). Identification of candidate genes in ischemic cardiomyopathy by gene expression omnibus database. *BMC Cardiovasc Disord*, *20*(1), 320. doi:10.1186/s12872-020-01596-w
- Darby, M. M., Yolken, R. H., & Sabuncian, S. (2016). Consistently altered expression of gene sets in postmortem brains of individuals with major psychiatric disorders. *Translational Psychiatry*, *6*(9), e890-e890. doi:10.1038/tp.2016.173
- Daskalopoulou, M., George, J., Walters, K., Osborn, D. P., Batty, G. D., Stogiannis, D., . . . Hemingway, H. (2016). Depression as a Risk Factor for the Initial Presentation of Twelve Cardiac, Cerebrovascular, and Peripheral Arterial Diseases: Data Linkage Study of 1.9 Million Women and Men. *PLoS One*, *11*(4), e0153838. doi:10.1371/journal.pone.0153838
- de Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, *6*(6), 463-475. doi:10.1038/nrn1683
- 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. doi:10.1210/endo.141.11.7785
- Di Sante, J., Ismaylova, E., Nemoda, Z., Gouin, J. P., Yu, W. J., Caldwell, W., . . . Booij, L. (2018). Peripheral DNA methylation of HPA axis-related genes in humans: Cross-tissue convergence, two-year stability and behavioural and neural correlates. *Psychoneuroendocrinology*, *97*, 196-205. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.07.019
- Ewald, E. R., Wand, G. S., Seifuddin, F., Yang, X., Tamashiro, K. L., Potash, J. B., . . . Lee, R. S. (2014). Alterations in DNA methylation of Fkbp5 as a determinant of blood-brain correlation of glucocorticoid exposure. *Psychoneuroendocrinology*, *44*, 112-122. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.03.003
- Fernandes, B. M., Scotti-Muzzi, E., & Soeiro-de-Souza, M. G. (2022). Effects of antidepressant drug therapy with or without physical exercise on inflammatory biomarkers in major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Pharmacol*, *78*(3), 339-349. doi:10.1007/s00228-021-03240-8
- Fischer, G., & Schmid, F. X. (1990). The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*, *29*(9), 2205-2212. doi:10.1021/bi00461a001
- Fleck, E., Heinemann, M., Meinertz, T., Besthorn, K., Pott, A., & Rohjans, M. (2021). *Deutscher Herzbericht 2020*.
- Foley, É. M., Parkinson, J. T., Mitchell, R. E., Turner, L., & Khandaker, G. M. (2023). Peripheral blood cellular immunophenotype in depression: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, *28*(3), 1004-1019. doi:10.1038/s41380-022-01919-7
- Fraga, M. F., Agrelo, R., & Esteller, M. (2007). Cross-Talk between Aging and Cancer: The Epigenetic Language. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1100*(1), 60-74. doi:10.1196/annals.1395.005

- Freedland, K. E., Carney, R. M., Rich, M. W., Steinmeyer, B. C., Skala, J. A., & Dávila-Román, V. G. (2016). Depression and Multiple Rehospitalizations in Patients With Heart Failure. *Clinical Cardiology*, *39*(5), 257-262. doi:10.1002/clc.22520
- Freedland, K. E., Rich, M. W., Skala, J. A., Carney, R. M., Dávila-Román, V. G., & Jaffe, A. S. (2003). Prevalence of depression in hospitalized patients with congestive heart failure. *Psychosom Med*, *65*(1), 119-128. doi:10.1097/01.psy.0000038938.67401.85
- Fries, G. R., Gassen, N. C., & Rein, T. (2017). The FKBP51 Glucocorticoid Receptor Co-Chaperone: Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, *18*(12). doi:10.3390/ijms18122614
- Galigniana, N. M., Ruiz, M. C., & Piwien-Pilipuk, G. (2022). FK506 binding protein 51: Its role in the adipose organ and beyond. *J Cell Biochem*. doi:10.1002/jcb.30351
- Gasparini, A., Callegari, C., Lucca, G., Bellini, A., Caselli, I., & Ielmini, M. (2022). Inflammatory Biomarker and Response to Antidepressant in Major Depressive Disorder: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Psychopharmacol Bull*, *52*(1), 36-52.
- Gassen, N. C., Fries, G. R., Zannas, A. S., Hartmann, J., Zschocke, J., Hafner, K., . . . Rein, T. (2015). Chaperoning epigenetics: FKBP51 decreases the activity of DNMT1 and mediates epigenetic effects of the antidepressant paroxetine. *Sci Signal*, *8*(404), ra119. doi:10.1126/scisignal.aac7695
- GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, *396*(10258), 1204-1222. doi:10.1016/s0140-6736(20)30925-9
- GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. (2022). Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Psychiatry*, *9*(2), 137-150. doi:10.1016/s2215-0366(21)00395-3
- Geckle, M., Wischmeyer, E., Gründer, S., Petersen, M., Schwab, A., Markwardt, F., . . . Marti, H. (2010). *Taschenlehrbuch Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Ghosh, R. K., Ball, S., Prasad, V., & Gupta, A. (2016). Depression in heart failure: Intricate relationship, pathophysiology and most updated evidence of interventions from recent clinical studies. *Int J Cardiol*, *224*, 170-177. doi:10.1016/j.ijcard.2016.09.063
- Gold, P. W., Goodwin, F. K., & Chrousos, G. P. (1988). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1). *N Engl J Med*, *319*(6), 348-353. doi:10.1056/nejm198808113190606
- Grad, I., & Picard, D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol*, *275*(1-2), 2-12. doi:10.1016/j.mce.2007.05.018
- GTEEx Consortium. (2015). Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6235), 648-660. doi:10.1126/science.1262110
- Guck, T. P., Elsasser, G. N., Kavan, M. G., & Eugene J, E. J. (2003). Depression and Congestive Heart Failure. *Congestive Heart Failure*, *9*(3), 163-169. doi:10.1111/j.1527-5299.2003.01356.x
- Gustad, L. T., Laugsand, L. E., Janszky, I., Dalen, H., & Bjerkeset, O. (2014). Symptoms of anxiety and depression and risk of heart failure: the HUNT Study. *European Journal of Heart Failure*, *16*(8), 861-870. doi:10.1002/ejhf.133
- Hautzinger, M., Keller, F., & Kühner, C. (2006). *Das Beck Depressionsinventar II. Deutsche Bearbeitung und Handbuch zum BDI II*. Frankfurt a. M.: Harcourt Test Services.

- Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K., & Iida, S. (1970). Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry*, 9(14), 2858-2865. doi:10.1021/bi00816a016
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, 8(2), R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19
- Hemmerich, W. (2018). StatistikGuru: Stichprobengröße für die einfaktorielle ANOVA berechnen. Retrieved from <https://statistikguru.de/rechner/stichprobengroesse-einfaktorielle-anova.html>
- Hendrix, S. B., Mogg, R., Wang, S. J., Chakravarty, A., Romero, K., Dickson, S. P., . . . McShane, L. M. (2021). Perspectives on statistical strategies for the regulatory biomarker qualification process. *Biomark Med*, 15(9), 669-684. doi:10.2217/bmm-2020-0523
- Hershenberg, R., McDonald, W. M., Crowell, A., Riva-Posse, P., Craighead, W. E., Mayberg, H. S., & Dunlop, B. W. (2020). Concordance between clinician-rated and patient reported outcome measures of depressive symptoms in treatment resistant depression. *J Affect Disord*, 266, 22-29. doi:10.1016/j.jad.2020.01.108
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10(4), 413-417. doi:10.1038/nbt0492-413
- Hoeijmakers, L., Harbich, D., Schmid, B., Lucassen, P. J., Wagner, K. V., Schmidt, M. V., & Hartmann, J. (2014). Depletion of FKBP51 in Female Mice Shapes HPA Axis Activity. *PLoS One*, 9(4), e95796. doi:10.1371/journal.pone.0095796
- Höhne, N., Poidinger, M., Merz, F., Pfister, H., Brückl, T., Zimmermann, P., . . . Ising, M. (2015). FKBP5 genotype-dependent DNA methylation and mRNA regulation after psychosocial stress in remitted depression and healthy controls. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(4), pyu087.
- Holma, K. M., Haukka, J., Suominen, K., Valtonen, H. M., Mantere, O., Melartin, T. K., . . . Isometsä, E. T. (2014). Differences in incidence of suicide attempts between bipolar I and II disorders and major depressive disorder. *Bipolar Disord*, 16(6), 652-661. doi:10.1111/bdi.12195
- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, 23(5), 477-501. doi:10.1016/S0893-133X(00)00159-7
- Holsboer, F. (2001). Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord*, 62(1-2), 77-91. doi:10.1016/s0165-0327(00)00352-9
- Holsboer, F., & Barden, N. (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev*, 17(2), 187-205. doi:10.1210/edrv-17-2-187
- 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. doi:10.1379/csc-32r.1
- Ising, M., Horstmann, S., Kloiber, S., Lucae, S., Binder, E. B., Kern, N., . . . Holsboer, F. (2007). Combined dexamethasone/corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression - a potential biomarker? *Biol Psychiatry*, 62(1), 47-54. doi:10.1016/j.biopsych.2006.07.039
- Ising, M., Maccarrone, G., Brückl, T., Scheuer, S., Hennings, J., Holsboer, F., . . . Lucae, S. (2019). FKBP5 Gene Expression Predicts Antidepressant Treatment Outcome in Depression. *Int J Mol Sci*, 20(3). doi:10.3390/ijms20030485

- Jääskeläinen, 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. doi:10.1016/j.coph.2011.04.006
- Jeltsch, A. (2002). Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem*, *3*(4), 274-293. doi:10.1002/1439-7633(20020402)3:4<274::Aid-cbic274>3.0.Co;2-s
- Jinwal, U. K., Koren, J., 3rd, Borysov, S. I., Schmid, A. B., Abisambra, J. F., Blair, L. J., . . . Dickey, C. A. (2010). The Hsp90 cochaperone, FKBP51, increases Tau stability and polymerizes microtubules. *J Neurosci*, *30*(2), 591-599. doi:10.1523/jneurosci.4815-09.2010
- Jujubix. (2011). Figure 2: Outline of the chemical reaction that underlies the bisulfite-catalyzed conversion of cytosine to uracil. Retrieved from [https://en.wikipedia.org/wiki/Bisulfite\\_sequencing#/media/File:Bisulfite\\_conversion.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Bisulfite_sequencing#/media/File:Bisulfite_conversion.svg)
- Kato, N., Kinugawa, K., Shiga, T., Hatano, M., Takeda, N., Imai, Y., . . . Nagai, R. (2012). Depressive symptoms are common and associated with adverse clinical outcomes in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *J Cardiol*, *60*(1), 23-30. doi:10.1016/j.jjcc.2012.01.010
- Klengel, T., Mehta, D., Anacker, C., Rex-Haffner, M., Pruessner, J. C., Pariante, C. M., . . . Binder, E. B. (2013). Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nat Neurosci*, *16*(1), 33-41. doi:10.1038/nn.3275
- Klinitzke, G., Romppel, M., Häuser, W., Brähler, E., & Glaesmer, H. (2012). [The German Version of the Childhood Trauma Questionnaire (CTQ): psychometric characteristics in a representative sample of the general population]. *Psychother Psychosom Med Psychol*, *62*(2), 47-51. doi:10.1055/s-0031-1295495
- Kollert, L., Schiele, M. A., Thiel, C., Menke, A., Deckert, J., & Domschke, K. (2020). DNA hypomethylation of the Krüppel-like factor 11 (KLF11) gene promoter: a putative biomarker of depression comorbidity in panic disorder and of non-anxious depression? *Journal of Neural Transmission*, *127*(11), 1539-1546. doi:10.1007/s00702-020-02216-9
- Kolur, V., Vastrad, B., Vastrad, C., Kotturshetti, S., & Tengli, A. (2021). Identification of candidate biomarkers and therapeutic agents for heart failure by bioinformatics analysis. *BMC Cardiovasc Disord*, *21*(1), 329. doi:10.1186/s12872-021-02146-8
- Kop, W. J., Synowski, S. J., & Gottlieb, S. S. (2011). Depression in heart failure: biobehavioral mechanisms. *Heart Fail Clin*, *7*(1), 23-38. doi:10.1016/j.hfc.2010.08.011
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, *54*(4), 391-406. doi:10.1007/s13353-013-0173-x
- Křenek, P., Hořínková, J., & Bartečků, E. (2023). Peripheral Inflammatory Markers in Subtypes and Core Features of Depression: A Systematized Review. *Psychopathology*, 1-14. doi:10.1159/000528907
- Lallemant, B., Evrard, A., Combescure, C., Chapuis, H., Chambon, G., Raynal, C., . . . Brouillet, J. P. (2009). Reference gene selection for head and neck squamous cell carcinoma gene expression studies. *BMC Mol Biol*, *10*, 78. doi:10.1186/1471-2199-10-78
- 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. doi:10.1016/j.jad.2010.02.113
- Lee, R. S., Mahon, P. B., Zandi, P. P., McCaul, M. E., Yang, X., Bali, U., & Wand, G. S. (2018). DNA methylation and sex-specific expression of FKBP5 as correlates of one-month bedtime cortisol levels in healthy individuals. *Psychoneuroendocrinology*, *97*, 164-173. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.07.003

- Lee, R. S., Tamashiro, K. L., Yang, X., Purcell, R. H., Harvey, A., Willour, V. L., . . . Potash, J. B. (2010). Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinology*, *151*(9), 4332-4343. doi:10.1210/en.2010-0225
- Leistner, C., & Menke, A. (2018). How to measure glucocorticoid receptor's sensitivity in patients with stress-related psychiatric disorders. *Psychoneuroendocrinology*, *91*, 235-260. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.01.023
- Li, W., Wang, W., Lai, W., Li, X., Zhu, L., Shi, J., . . . Lu, C. (2022). The association of FKBP5 gene methylation, adolescents' sex, and depressive symptoms among Chinese adolescents: a nested case-control study. *BMC Psychiatry*, *22*(1), 749. doi:10.1186/s12888-022-04392-2
- Lichter, K., Klüpfel, C., Stonawski, S., Hommers, L., Blickle, M., Burschka, C., . . . Deckert, J. (2023). Deep phenotyping as a contribution to personalized depression therapy: the GEPaD and DaCFail protocols. *J Neural Transm (Vienna)*, *130*(5), 707-722. doi:10.1007/s00702-023-02615-8
- Lönngqvist, K. J. (2000). Psychiatric Aspects of Suicidal Behaviour: Depression. In *The International Handbook of Suicide and Attempted Suicide* (pp. 107-120).
- Massart, R., Mongeau, R., & Lanfumey, L. (2012). Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1601), 2485-2494. doi:doi:10.1098/rstb.2012.0212
- Matosin, N., Halldorsdottir, T., & Binder, E. B. (2018). Understanding the Molecular Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The FKBP5 Model. *Biol Psychiatry*, *83*(10), 821-830. doi:10.1016/j.biopsych.2018.01.021
- Menke, A., Arloth, J., Best, J., Namendorf, C., Gerlach, T., Czamara, D., . . . Uhr, M. (2016). Time-dependent effects of dexamethasone plasma concentrations on glucocorticoid receptor challenge tests. *Psychoneuroendocrinology*, *69*, 161-171. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.04.003
- Menke, A., Arloth, J., Gerber, M., Rex-Haffner, M., Uhr, M., Holsboer, F., . . . Beck, J. (2014). Dexamethasone stimulated gene expression in peripheral blood indicates glucocorticoid-receptor hypersensitivity in job-related exhaustion. *Psychoneuroendocrinology*, *44*, 35-46. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.02.013
- Menke, A., Arloth, J., Putz, B., Weber, P., Klengel, T., Mehta, D., . . . 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. doi:10.1038/npp.2011.331
- Menke, A., & Binder, E. B. (2014). Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. *Dialogues Clin Neurosci*, *16*(3), 395-404. doi:10.31887/DCNS.2014.16.3/amenke
- Menke, A., Klengel, T., Rubel, J., Bruckl, T., Pfister, H., Lucae, S., . . . 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. doi:10.1111/gbb.12026
- Menke, A., Lehrieder, D., Fietz, J., Leistner, C., Wurst, C., Stonawski, S., . . . Domschke, K. (2018). Childhood trauma dependent anxious depression sensitizes HPA axis function. *Psychoneuroendocrinology*, *98*, 22-29. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.07.025
- Menke, A., Nitschke, F., Hellmuth, A., Helmel, J., Wurst, C., Stonawski, S., . . . Deckert, J. (2021). Stress impairs response to antidepressants via HPA axis and immune system activation. *Brain Behav Immun*, *93*, 132-140. doi:10.1016/j.bbi.2020.12.033

- Mohammadi, S., Beh-Pajooh, A., Ahmadimanesh, M., Amini, M., Ghazi-Khansari, M., Moallem, S. A., . . . Ghahremani, M. H. (2022). Evaluation of DNA methylation in BDNF, SLC6A4, NR3C1 and FKBP5 before and after treatment with selective serotonin-reuptake inhibitor in major depressive disorder. *Epigenomics*, *14*(20), 1269-1280. doi:10.2217/epi-2022-0246
- Möller, H.-J., Laux, G., & Deister, A. (2015). *Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie* (Vol. 6). Stuttgart: Thieme.
- Montgomery, S. A., & Asberg, M. (1979). A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry*, *134*, 382-389. doi:10.1192/bjp.134.4.382
- Moser, D. K., Doering, L. V., & Chung, M. L. (2005). Vulnerabilities of patients recovering from an exacerbation of chronic heart failure. *Am Heart J*, *150*(5), 984. doi:10.1016/j.ahj.2005.07.028
- Mourtzi, N., Sertedaki, A., & Charmandari, E. (2021). Glucocorticoid Signaling and Epigenetic Alterations in Stress-Related Disorders. *Int J Mol Sci*, *22*(11). doi:10.3390/ijms22115964
- Mülhardt, C. (2013). *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics* (7., aktualisierte Aufl. ed.). Berlin: Springer Spektrum.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *51 Pt 1*, 263-273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032
- Munhoz, C. D., Lepsch, L. B., Kawamoto, E. M., Malta, M. B., Lima Lde, S., Avellar, M. C., . . . Scavone, C. (2006). Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci*, *26*(14), 3813-3820. doi:10.1523/jneurosci.4398-05.2006
- Munhoz, C. D., Sorrells, S. F., Caso, J. R., Scavone, C., & Sapolsky, R. M. (2010). Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *J Neurosci*, *30*(41), 13690-13698. doi:10.1523/jneurosci.0303-09.2010
- Nejati, S., Ariai, N., Björkelund, C., Skoglund, I., Petersson, E. L., Augustsson, P., . . . Svenningsson, I. (2020). Correspondence Between the Neuropsychiatric Interview M.I.N.I. and the BDI-II and MADRS-S Self-Rating Instruments as Diagnostic Tools in Primary Care Patients with Depression. *Int J Gen Med*, *13*, 177-183. doi:10.2147/ijgm.S243150
- Nemeroff, C. B. (1996). The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry*, *1*(4), 336-342.
- Nemeroff, C. B., & Goldschmidt-Clermont, P. J. (2012). Heartache and heartbreak--the link between depression and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, *9*(9), 526-539. doi:10.1038/nrcardio.2012.91
- Nielsen, R. E., Banner, J., & Jensen, S. E. (2021). Cardiovascular disease in patients with severe mental illness. *Nat Rev Cardiol*, *18*(2), 136-145. doi:10.1038/s41569-020-00463-7
- Nyrén, P., Pettersson, B., & Uhlén, M. (1993). Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Anal Biochem*, *208*(1), 171-175. doi:10.1006/abio.1993.1024
- Ortiz, R., Joseph, J. J., Lee, R., Wand, G. S., & Golden, S. H. (2018). Type 2 diabetes and cardiometabolic risk may be associated with increase in DNA methylation of FKBP5. *Clin Epigenetics*, *10*, 82. doi:10.1186/s13148-018-0513-0
- Osimo, E. F., Baxter, L. J., Lewis, G., Jones, P. B., & Khandaker, G. M. (2019). Prevalence of low-grade inflammation in depression: a systematic review and meta-analysis of CRP levels. *Psychol Med*, *49*(12), 1958-1970. doi:10.1017/s0033291719001454

- Osimo, E. F., Pillinger, T., Rodriguez, I. M., Khandaker, G. M., Pariante, C. M., & Howes, O. D. (2020). Inflammatory markers in depression: A meta-analysis of mean differences and variability in 5,166 patients and 5,083 controls. *Brain Behav Immun*, *87*, 901-909. doi:10.1016/j.bbi.2020.02.010
- 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. doi:10.1002/9780470514368.ch15
- 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. doi:10.1210/me.2009-0443
- Palazidou, E. (2012). The neurobiology of depression. *Br Med Bull*, *101*, 127-145. doi:10.1093/bmb/lds004
- Parati, G., & Esler, M. (2012). The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J*, *33*(9), 1058-1066. doi:10.1093/eurheartj/ehs041
- Pariante, C. M., & Lightman, S. L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*, *31*(9), 464-468. doi:10.1016/j.tins.2008.06.006
- Pariante, C. M., & Miller, A. H. (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, *49*(5), 391-404. doi:10.1016/s0006-3223(00)01088-x
- Pelleymounter, L. L., Moon, I., Johnson, J. A., Laederach, A., Halvorsen, M., Eckloff, B., . . . Rossetti, S. (2011). A novel application of pattern recognition for accurate SNP and indel discovery from high-throughput data: targeted resequencing of the glucocorticoid receptor co-chaperone FKBP5 in a Caucasian population. *Mol Genet Metab*, *104*(4), 457-469. doi:10.1016/j.ymgme.2011.08.019
- Pereira, M. J., Palming, J., Svensson, M. K., Rizell, M., Dalenbäck, J., Hammar, M., . . . Eriksson, J. W. (2014). FKBP5 expression in human adipose tissue increases following dexamethasone exposure and is associated with insulin resistance. *Metabolism*, *63*(9), 1198-1208. doi:10.1016/j.metabol.2014.05.015
- Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Romero-López-Alberca, C., González-Saiz, F., Mico, J. A., & Berrocoso, E. (2019). Monoaminergic system and depression. *Cell and Tissue Research*, *377*(1), 107-113. doi:10.1007/s00441-018-2978-8
- Pitsillou, E., Bresnehan, S. M., Kagarakis, E. A., Wijoyo, S. J., Liang, J., Hung, A., & Karagiannis, T. C. (2020). The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. *Mol Biol Rep*, *47*(1), 753-770. doi:10.1007/s11033-019-05129-3
- Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., . . . van der Meer, P. (2016). 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, *69*(12), 1167. doi:10.1016/j.rec.2016.11.005
- Rao, S., Yao, Y., Ryan, J., Li, T., Wang, D., Zheng, C., . . . Xu, Q. (2016). Common variants in FKBP5 gene and major depressive disorder (MDD) susceptibility: a comprehensive meta-analysis. *Scientific Reports*, *6*(1), 32687. doi:10.1038/srep32687
- Reul, J. M., Stec, I., Söder, M., & Holsboer, F. (1993). Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology*, *133*(1), 312-320. doi:10.1210/endo.133.1.8391426
- Roche. (2019). Roche Life Science Universal Probe Library. Retrieved from [https://lifescience.roche.com/en\\_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center](https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center)

- Romano, S., D'Angelillo, A., Pacelli, R., Staibano, S., De Luna, E., Bisogni, R., . . . Romano, M. F. (2010). Role of FK506-binding protein 51 in the control of apoptosis of irradiated melanoma cells. *Cell Death Differ*, *17*(1), 145-157. doi:10.1038/cdd.2009.115
- Ronaghi, M., Uhlen, M., & Nyren, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, *281*(5375), 363, 365. doi:10.1126/science.281.5375.363
- Ruijter, J. M., Pfaffl, M. W., Zhao, S., Spiess, A. N., Boggy, G., Blom, J., . . . Vandesompele, J. (2013). Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*, *59*(1), 32-46. doi:10.1016/j.ymeth.2012.08.011
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., Van Den Hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, *37*(6), e45-e45. doi:10.1093/nar/gkp045
- Runia, N., Yücel, D. E., Lok, A., de Jong, K., Denys, D., van Wingen, G. A., & Bergfeld, I. O. (2022). The neurobiology of treatment-resistant depression: A systematic review of neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev*, *132*, 433-448. doi:10.1016/j.neubiorev.2021.12.008
- Rutledge, T., Reis, V. A., Linke, S. E., Greenberg, B. H., & Mills, P. J. (2006). Depression in heart failure a meta-analytic review of prevalence, intervention effects, and associations with clinical outcomes. *J Am Coll Cardiol*, *48*(8), 1527-1537. doi:10.1016/j.jacc.2006.06.055
- Sabbagh, J. J., O'Leary, J. C., 3rd, Blair, L. J., Klengel, T., Nordhues, B. A., Fontaine, S. N., . . . Dickey, C. A. (2014). Age-associated epigenetic upregulation of the FKBP5 gene selectively impairs stress resiliency. *PLoS One*, *9*(9), e107241. doi:10.1371/journal.pone.0107241
- Santegoeds, R. G. C., Yakkoui, Y., Jahanshahi, A., Hoogland, G., Temel, Y., & van Overbeeke, J. J. (2017). Validation of reference genes in human chordoma. *Surg Neurol Int*, *8*, 100. doi:10.4103/sni.sni\_399\_16
- Sarubin, N., Hilbert, S., Naumann, F., Zill, P., Wimmer, A. M., Nothdurfter, C., . . . Schüle, C. (2017). The sex-dependent role of the glucocorticoid receptor in depression: variations in the NR3C1 gene are associated with major depressive disorder in women but not in men. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, *267*(2), 123-133. doi:10.1007/s00406-016-0722-5
- 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. doi:10.1006/gcen.2001.7696
- Scharf, S. H., Liebl, C., Binder, E. B., Schmidt, M. V., & Müller, M. B. (2011). Expression and regulation of the Fkbp5 gene in the adult mouse brain. *PLoS One*, *6*(2), e16883. doi:10.1371/journal.pone.0016883
- Schmidt, O. (2017). *Genetik und Molekularbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Schneider, M., Engel, A., Fasching, P. A., Häberle, L., Binder, E. B., Voigt, F., . . . Burghaus, S. (2014). Genetic variants in the genes of the stress hormone signalling pathway and depressive symptoms during and after pregnancy. *Biomed Res Int*, *2014*, 469278. doi:10.1155/2014/469278
- Sedivy, J. M., Banumathy, G., & Adams, P. D. (2008). Aging by epigenetics—A consequence of chromatin damage? *Experimental Cell Research*, *314*(9), 1909-1917. doi:10.1016/j.yexcr.2008.02.023
- Seemüller, F., Schennach, R., Musil, R., Obermeier, M., Adli, M., Bauer, M., . . . Möller, H. J. (2023). A factor analytic comparison of three commonly used depression

- scales (HAMD, MADRS, BDI) in a large sample of depressed inpatients. *BMC Psychiatry*, 23(1), 548. doi:10.1186/s12888-023-05038-7
- Seisenberger, S., Peat, J. R., Hore, T. A., Santos, F., Dean, W., & Reik, W. (2013). Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1609), 20110330. doi:10.1098/rstb.2011.0330
- Shapiro, R., Braverman, B., Louis, J. B., & Servis, R. E. (1973). Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem*, 248(11), 4060-4064.
- Simon, M. S., Arteaga-Henríquez, G., Fouad Algendy, A., Siepmann, T., & Illigens, B. M. W. (2023). Anti-Inflammatory Treatment Efficacy in Major Depressive Disorder: A Systematic Review of Meta-Analyses. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 19, 1-25. doi:10.2147/ndt.S385117
- Smith, D. F., Faber, L. E., & Toft, D. O. (1990). Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *J Biol Chem*, 265(7), 3996-4003.
- Song, R., He, S., Wu, Y., Chen, W., Song, J., Zhu, Y., . . . Tan, S. (2023). Validation of reference genes for the normalization of the RT-qPCR in peripheral blood mononuclear cells of septic patients. *Heliyon*, 9(4), e15269. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e15269
- Spencer, R. L., & Deak, T. (2017). A users guide to HPA axis research. *Physiol Behav*, 178, 43-65. doi:10.1016/j.physbeh.2016.11.014
- Statistisches Bundesamt. (2021). Suizide Deutschland 2021. Retrieved from <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/suizide.html#119576>
- Stechschulte, L. A., Hinds, T. D., Jr., Khuder, S. S., Shou, W., Najjar, S. M., & Sanchez, E. R. (2014). FKBP51 controls cellular adipogenesis through p38 kinase-mediated phosphorylation of GR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . *Mol Endocrinol*, 28(8), 1265-1275. doi:10.1210/me.2014-1022
- Steffen, A., Holstiege, J., Akmatov, M. K., & Bätzing, J. (2019). Zeitliche Trends in der Diagnoseprävalenz depressiver Störungen: eine Analyse auf Basis bundesweiter vertragsärztlicher Abrechnungsdaten der Jahr 2009 bis 2017. *Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi), Versorgungsatlas-Bericht Nr. 19/05*. doi:10.20364/VA-19.05
- Störk, S., Hense, H. W., Zentgraf, C., Uebelacker, I., Jahns, R., Ertl, G., & Angermann, C. E. (2008). Pharmacotherapy according to treatment guidelines is associated with lower mortality in a community-based sample of patients with chronic heart failure: a prospective cohort study. *Eur J Heart Fail*, 10(12), 1236-1245. doi:10.1016/j.ejheart.2008.09.008
- Szczepankiewicz, A., Leszczyńska-Rodziewicz, A., Pawlak, J., Narozna, B., Rajewska-Rager, A., Wilkosc, M., . . . Twarowska-Hauser, J. (2014). FKBP5 polymorphism is associated with major depression but not with bipolar disorder. *J Affect Disord*, 164, 33-37. doi:10.1016/j.jad.2014.04.002
- Tatro, E. T., Overall, I. P., Masliah, E., Hult, B. J., Lucero, G., Chana, G., . . . Achim, C. L. (2009). Differential Expression of Immunophilins FKBP51 and FKBP52 in the Frontal Cortex of HIV-Infected Patients with Major Depressive Disorder. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4(2), 218-226. doi:10.1007/s11481-009-9146-6
- Tiller, D., Russ, M., Greiser, K. H., Nuding, S., Ebel, H., Kluttig, A., . . . Werdan, K. (2013). Prevalence of symptomatic heart failure with reduced and with normal ejection fraction in an elderly general population-the CARLA study. *PLoS One*, 8(3), e59225. doi:10.1371/journal.pone.0059225

- Tost, J., Dunker, J., & Gut, I. G. (2003). Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques*, 35(1), 152-156. doi:10.2144/03351md02
- Tost, J., & Gut, I. G. (2007). DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc*, 2(9), 2265-2275. doi:10.1038/nprot.2007.314
- Touma, C., Gassen, N. C., Herrmann, L., Cheung-Flynn, J., Büll, D. R., Ionescu, I. A., . . . Rein, T. (2011). FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. *Biol Psychiatry*, 70(10), 928-936. doi:10.1016/j.biopsych.2011.07.023
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA). (2018). Biomarker Qualification: Evidentiary Framework. Guidance for Industry and FDA Staff. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/biomarker-qualification-evidentiary-framework>
- Uher, R., Farmer, A., Maier, W., Rietschel, M., Hauser, J., Marusic, A., . . . Aitchison, K. J. (2008). Measuring depression: comparison and integration of three scales in the GENDEP study. *Psychol Med*, 38(2), 289-300. doi:10.1017/s0033291707001730
- van Doeselaar, L., Stark, T., Mitra, S., Yang, H., Bordes, J., Stolwijk, L., . . . Schmidt, M. V. (2023). Sex-specific and opposed effects of FKBP51 in glutamatergic and GABAergic neurons: Implications for stress susceptibility and resilience. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 120(23), e2300722120. doi:10.1073/pnas.2300722120
- 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. doi:10.1210/jc.2002-020354
- Volk, N., Pape, J. C., Engel, M., Zannas, A. S., Cattane, N., Cattaneo, A., . . . Chen, A. (2016). Amygdalar MicroRNA-15a Is Essential for Coping with Chronic Stress. *Cell Rep*, 17(7), 1882-1891. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.038
- Wada, K., Misaka, T., Yokokawa, T., Kimishima, Y., Kaneshiro, T., Oikawa, M., . . . Takeishi, Y. (2021). Blood-Based Epigenetic Markers of FKBP5 Gene Methylation in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*, 10(21), e021101. doi:10.1161/jaha.121.021101
- Wang, D., Eraslan, B., Wieland, T., Hallström, B., Hopf, T., Zolg, D. P., . . . Kuster, B. (2019). A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. *Molecular systems biology*, 15(2), e8503. doi:10.15252/msb.20188503. (Accession No. 30777892)
- Wang, L. (2011). FKBP51 regulation of AKT/protein kinase B phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*, 11(4), 360-364. doi:10.1016/j.coph.2011.03.008
- Wang, Q., Shelton, R. C., & Dwivedi, Y. (2018). Interaction between early-life stress and FKBP5 gene variants in major depressive disorder and post-traumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 225, 422-428. doi:10.1016/j.jad.2017.08.066
- Wang, X., Song, J., Yuan, Y., Li, L., Abu-Taha, I., Heijman, J., . . . Li, N. (2023). Downregulation of FKBP5 Promotes Atrial Arrhythmogenesis. *Circ Res*, 133(1), e1-e16. doi:10.1161/circresaha.122.322213
- Warriach, Z. I., Patel, S., Khan, F., & Ferrer, G. F. (2022). Association of Depression With Cardiovascular Diseases. *Cureus*, 14(6), e26296. doi:10.7759/cureus.26296
- Weber, M. D., Godbout, J. P., & Sheridan, J. F. (2017). Repeated Social Defeat, Neuroinflammation, and Behavior: Monocytes Carry the Signal. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 46-61. doi:10.1038/npp.2016.102

- Wei, Y., Cao, H., Peng, Y. Y., & Zhang, B. (2023). Altered gene expression in dilated cardiomyopathy after left ventricular assist device support by bioinformatics analysis. *Front Cardiovasc Med*, *10*, 1013057. doi:10.3389/fcvm.2023.1013057
- 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. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.03.004
- Wiechmann, T., Röh, S., Sauer, S., Czamara, D., Arloth, J., Ködel, M., . . . Provençal, N. (2019). Identification of dynamic glucocorticoid-induced methylation changes at the FKBP5 locus. *Clin Epigenetics*, *11*(1), 83. doi:10.1186/s13148-019-0682-5
- Wochnik, G. M., Rüegg, 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. doi:10.1074/jbc.M407498200
- Wodarz, N., Rupprecht, R., Kornhuber, J., Schmitz, B., Wild, K., & Riederer, P. (1992). Cell-mediated immunity and its glucocorticoid-sensitivity after clinical recovery from severe major depressive disorder. *J Affect Disord*, *25*(1), 31-38. doi:10.1016/0165-0327(92)90090-s
- Wulsin, L. R., Vaillant, G. E., & Wells, V. E. (1999). A systematic review of the mortality of depression. *Psychosom Med*, *61*(1), 6-17. doi:10.1097/00006842-199901000-00003
- Young, K. A., Thompson, P. M., Cruz, D. A., Williamson, D. E., & Selemon, L. D. (2015). BA11 FKBP5 expression levels correlate with dendritic spine density in postmortem PTSD and controls. *Neurobiol Stress*, *2*, 67-72. doi:10.1016/j.ynstr.2015.07.002
- Yurtsever, T., Streit, F., Foo, J. C., Trifonova, S., Kumsta, R., Müller, C. P., . . . Schote, A. B. (2018). Temporal dynamics of cortisol-associated changes in mRNA expression of glucocorticoid responsive genes FKBP5, GILZ, SDPR, PER1, PER2 and PER3 in healthy humans. *Psychoneuroendocrinology*, *102*, 63-67. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.11.033
- Zambrano, J., Celano, C. M., Januzzi, J. L., Massey, C. N., Chung, W. J., Millstein, R. A., & Huffman, J. C. (2020). Psychiatric and Psychological Interventions for Depression in Patients With Heart Disease: A Scoping Review. *J Am Heart Assoc*, *9*(22), e018686. doi:10.1161/jaha.120.018686
- Zannas, A. S. (2023). Molecular integrators of stress and aging: the example of FKBP5. *Acta Neuropathol*, *145*(6), 713-715. doi:10.1007/s00401-023-02572-2
- Zannas, A. S., & Binder, E. B. (2014). Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism. *Genes Brain Behav*, *13*(1), 25-37. doi:10.1111/gbb.12104
- Zannas, A. S., Jia, M., Hafner, K., Baumert, J., Wiechmann, T., Pape, J. C., . . . Binder, E. B. (2018). Epigenetic derepression of FKBP5 by aging and stress contributes to NFκB-driven inflammation and cardiovascular risk. doi:10.1101/484709
- Zhao, Z., Liu, P., Jin, J., & Wang, W. (2023). Effects of non-drug interventions on anxiety and depression in patients with heart failure: A systematic review based on Bayesian network meta-analysis. *J Psychiatr Res*, *161*, 348-357. doi:10.1016/j.jpsychires.2023.02.039
- Zou, Y. F., Wang, F., Feng, X. L., Li, W. F., Tao, J. H., Pan, F. M., . . . Su, H. (2010). Meta-analysis of FKBP5 gene polymorphisms association with treatment response in patients with mood disorders. *Neurosci Lett*, *484*(1), 56-61. doi:10.1016/j.neulet.2010.08.019

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

(m)DST	(modifizierter) Dexamethason-Suppressions-Test
(q)PCR	(quantitative Echtzeit) Polymerase-Kettenreaktion
ACTH	Adrenocorticotropin
ANCOVA	Kovarianzanalyse
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BDI-II	Beck-Depressions-Inventar-II
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaar
Btn	Biotin
cDNA	komplementäre DNA
CNRQ	Calibrated Normalized Relative Quantity
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormone
CRP	C-reaktives-Protein
CTQ	Childhood Trauma Questionnaire
DaCFail	Depression associated Cardiac Failure
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
Diff-BB	Differentialblutbild
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV
DZHI	Deutsches Zentrum für Herzinsuffizienz
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glukokortikoid Responsives Element
HAMD	Hamilton rating scale for depression
HI	Herzinsuffizienz
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis)

ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IRC	Inter Run Calibrator
LTE	List of Threatening Experiences
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
<i>M</i>	Mittelwert
MADRS	Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale
<i>N</i>	Stichprobengröße
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-Chain-Enhancer of activated B cells
NT-proBNP	N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
SCID-I	Structured Clinical Interview for DSM axis I disorders
<i>SD</i>	Standardabweichung
SNP	Einzelbasenpolymorphismus (engl. Single-Nukleotid-Polymorphismus)
SSRI	Selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer
STAAB	Häufigkeit und Einflussfaktoren auf frühe STAdien A und B der Herzinsuffizienz in der Bevölkerung
SUMO	Small Ubiquitin-Related Modifier
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TSS	Transkriptionsstartstelle
TTE	Transthorakale Echokardiografie
VNS	Vegetatives Nervensystem
ZEP	Zentrum für psychische Erkrankungen

## II Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> HPA-Achse.....	1
<b>Abbildung 2:</b> PubMed Suchergebnisse für FKBP5 .....	10
<b>Abbildung 3:</b> Negative Rückkopplungsschleife zwischen FKBP5 und GR .....	12
<b>Abbildung 4:</b> Studienablauf GEPaD und DaCFail .....	23
<b>Abbildung 5:</b> Flussdiagramm Rekrutierung .....	26
<b>Abbildung 6:</b> Übersicht laborexperimenteller Schritte .....	29
<b>Abbildung 7:</b> Reaktion von Natriumbisulfit an Cytosin bzw. 5-Methylcytosin .....	30
<b>Abbildung 8:</b> Agarose-Gelelektrophorese zur Temperaturoptimierung der PCR, Primer 4 .....	36
<b>Abbildung 9:</b> Methylierungsanalyse, verarbeitete Proben und Ausfälle .....	38
<b>Abbildung 10:</b> Analyse der mRNA-Expression, Verarbeitete Proben und Ausfälle ....	44
<b>Abbildung 11:</b> Baselinemethylierung regulatorischer CpGs (4 Gruppen).....	50
<b>Abbildung 12:</b> Änderung der Methylierung auf den mDST für CpG1 und CpG2 .....	51
<b>Abbildung 13:</b> Änderung der Methylierung auf den mDST für CpG7 .....	51
<b>Abbildung 14:</b> Änderung der mRNA-Expression auf den mDST (4 Gruppen).....	53
<b>Abbildung 15:</b> Änderung der mRNA-Expression auf den mDST (2 Gruppen).....	55
<b>Abbildung 16:</b> Änderung der mRNA-Expression auf den mDST in Woche 1 (aufgeteilt nach Genotyp) .....	58
<b>Abbildung 17:</b> Baselinemethylierung regulatorischer CpGs (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS) .....	60
<b>Abbildung 18:</b> Änderung der Methylierung von CpG7 auf den mDST in Woche 1 (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS) .....	61
<b>Abbildung 19:</b> Änderung der mRNA-Expression auf den mDST in Woche 1 (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS) .....	64
<b>Abbildung 20:</b> Änderung der mRNA-Expression auf den mDST in Woche 4 (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS) .....	65
<b>Abbildung 21:</b> Streudiagramm Baselinemethylierung CpG7 in Woche 1 und Reduktion des MADRS nach vier Wochen Therapie.....	70

### III Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Einteilung der Herzinsuffizienz.....	6
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Chemikalien und Hersteller.....	18
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Lösungen und Puffer mit Zusammensetzung, Hersteller.....	18
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Kitsysteme und Hersteller.....	19
<b>Tabelle 5:</b> Verwendeter Laborbedarf/ Verbrauchsgegenstände und Hersteller.....	19
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Gerätschaften und Hersteller.....	20
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Software und Hersteller.....	21
<b>Tabelle 8:</b> Ein- und Ausschlusskriterien von GEPaD und DaCFail.....	24
<b>Tabelle 9:</b> Reaktionsansatz Bisulfitkonversion.....	31
<b>Tabelle 10:</b> Reaktionsprotokoll Bisulfitkonversion.....	31
<b>Tabelle 11:</b> Nomenklatur und Position relevanter CpGs.....	32
<b>Tabelle 12:</b> Verwendete Primer Pyrosequenzierung.....	33
<b>Tabelle 13:</b> Reaktionsansätze Bisulfit-PCR.....	34
<b>Tabelle 14:</b> Reaktionsprotokoll Bisulfit-PCR.....	35
<b>Tabelle 15:</b> Reaktionsansatz DNA-Immobilisierung.....	36
<b>Tabelle 16:</b> Reaktionsansatz cDNA-Synthese.....	40
<b>Tabelle 17:</b> Reaktionsprotokoll cDNA-Synthese.....	40
<b>Tabelle 18:</b> Verwendete Primer qPCR.....	41
<b>Tabelle 19:</b> Reaktionsansatz qPCR.....	42
<b>Tabelle 20:</b> Reaktionsprotokoll qPCR.....	42
<b>Tabelle 21:</b> Charakteristika DaCFail-Stichprobe (N = 171).....	49
<b>Tabelle 22:</b> Charakteristika der Stichprobe Depression vs. Kontrollen (N = 213).....	54
<b>Tabelle 23:</b> Charakteristika GEPaD-Stichprobe (N = 180).....	56
<b>Tabelle 24:</b> Änderung der Methylierung auf den mDST in Woche 1 (aufgeteilt nach Genotyp).....	59
<b>Tabelle 25:</b> Änderung der Methylierung auf den mDST (Therapieansprechen, aufgeteilt nach MADRS).....	62
<b>Tabelle 26:</b> Änderung der Methylierung auf den mDST (Therapieansprechen, aufgeteilt nach BDI).....	63
<b>Tabelle 27:</b> Pearson-Korrelation: Schwere der Herzinsuffizienz und regulatorische Parameter von FKBP5.....	67
<b>Tabelle 28:</b> Pearson-Korrelation: Schwere der Depression und regulatorische Parameter von FKBP5.....	69
<b>Tabelle 29:</b> Pearson-Korrelation: Therapieansprechen und regulatorische Parameter von FKBP5.....	71
<b>Tabelle 30:</b> Pearson-Korrelation: Traumatisierung und regulatorische Parameter von FKBP5.....	72

## **IV Danksagung**

Zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeiten haben eine ganze Reihe Personen beigetragen, bei denen ich mich herzlich bedanken möchte.

Zunächst danke ich Prof. Deckert, der mir ermöglicht hat die Arbeit an seiner Klinik durchzuführen, mir stets mit Rat zur Seite stand und schließlich durch sein beständiges Nachhaken eine wichtige Motivation zur Fertigstellung der Arbeit lieferte.

Meinem Doktorvater Prof. Menke danke ich besonders für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die Betreuung vom ersten Tag an. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Kittel-Schneider für die Übernahme der Betreuung im weiteren Verlauf bedanken.

Besonderer Dank gilt außerdem den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors, allen voran Inge Reck, Gabi Ortega, Carola Gagel und Dr. Leonie Kollert, die mich in die Methoden einarbeiteten und bei allen aufkommenden Fragen und Problemen stets weiterhalfen.

Für die Erstellung der Statistik waren der Input und Austausch mit Dr. Catherina Klüpfel, Dr. Martin Weiß und Dr. Katharina Lichter von großem Wert für mich.

Außerdem gilt mein Dank dem gesamten an DaCFail und GEPaRD beteiligtem Studententeam sowie allen teilnehmenden PatientInnen, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglichten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, Freunden und Frau danken, die über mehrere Jahre die Entstehung der Arbeit begleiten, mich mit Rat und Tat unterstützten und nicht zuletzt mit dem nötigen Druck die Fertigstellung der Arbeit förderten.

## V Eigene Publikationen/Kongressteilnahmen

Menke, A., **Nitschke, F.**, Hellmuth, A., Helmel, J., Wurst, C., Stonawski, S., . . . Deckert, J. (2021). Stress impairs response to antidepressants via HPA axis and immune system activation. *Brain Behav Immun*, 93, 132-140. doi:10.1016/j.bbi.2020.12.033

Lichter, K., Klüpfel, C., Stonawski, S., Hommers, L., Blickle, M., Burschka, C., **Das, F.**, . . . Deckert, J. (2023). Deep phenotyping as a contribution to personalized depression therapy: the GEPaD and DaCFail protocols. *J Neural Transm (Vienna)*, 130(5), 707-722. doi:10.1007/s00702-023-02615-8

Scherf-Clavel, M., Wurst, C., **Nitschke, F.**, Stonawski, S., Burschka, C., Friess, L., . . . Menke, A. (2020). Extent of cortisol suppression at baseline predicts improvement in HPA axis function during antidepressant treatment. *Psychoneuroendocrinology*, 114, 104590. doi:10.1016/j.psyneuen.2020.104590

Wurst, C., Schiele, M. A., Stonawski, S., Weiß, C., **Nitschke, F.**, Hommers, L., . . . Menke, A. (2021). Impaired fear learning and extinction, but not generalization, in anxious and non-anxious depression. *J Psychiatr Res*, 135, 294-301. doi:10.1016/j.jpsychires.2021.01.034

**Nitschke, F.**, Wurst, C., Lichter, K., Kittel-Schneider, S., Menke, A. (2022). FKBP5 DNA-Methylierung und Genexpression bei Patienten mit Depression, Herzinsuffizienz und Kontrollen. Poster presented at the DGPPN Kongress 2022, Berlin.