

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie München

Direktorin: Prof. Dr. Dr. med. univ. Elisabeth Binder

**Matrix-Metalloproteinase-9 (*MMP9*) mRNA als Biomarker für Diagnostik und
Therapieverlauf der Posttraumatischen Belastungsstörung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Céleste Marie Chevalier

aus Homburg

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Matthias M. Weber
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Kristina Adorjan
	Prof. Dr. Andrea Schmitt
Mitbetreuung durch promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. Ulrike Schmidt
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	10.02.2022

Danksagung

Ich danke ...

... meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias M. Weber für die Promotionsmöglichkeit und die konstruktiven Anmerkungen zu dieser Arbeit.

... meiner Betreuerin Dr. Ulrike Schmidt für die kontinuierliche Unterstützung und den intensiven Austausch.

... meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für ihre Hilfestellungen und die anregende gemeinsame Zeit.

... meinem Partner Gunther Glenk für die gegenseitige Inspiration und die Begleitung in allen Lebenslagen.

... meiner Familie und meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung und liebevolle Ermutigung.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Posttraumatische Belastungsstörung	1
1.1.1 Epidemiologie und Symptomatik	1
1.1.2 Pathophysiologie der PTBS	3
1.1.2.1 HPA-Achse in der PTBS	3
1.1.2.2 Zytokine und ihre Rezeptoren in der PTBS	4
1.1.3 Probleme in der Diagnostik und Therapieüberwachung	5
1.1.4 PTBS-Biomarker	6
1.1.4.1 Diagnostische Biomarker	6
1.1.4.2 Therapeutische Biomarker	7
1.2 Die Matrix-Metalloproteinase-9 als möglicher Biomarker für PTBS	8
1.2.1 Molekulare Charakteristika und Aktivität	8
1.2.2 Rolle in der Physiologie des Gehirns	9
1.2.3 Rolle bei psychiatrischen Erkrankungen	9
1.2.4 Rolle bei der PTBS	10
1.2.5 Regulation	11
1.2.5.1 Einfluss der HPA-Achse und Zytokinrezeptoren auf die MMP-9 Expression	11
1.2.6 Schlussfolgerung	13
2 Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Bezugsnachweis	16
3.1.1 Chemikalien	16
3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3 PCR Primer	16

3.1.4	Geräte	17
3.1.5	Software	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Fragebögen.....	18
3.2.2	Studienpopulationen und Materialgewinnung	18
3.2.3	Trier Social Stress Test (TSST) - Kohorte.....	18
3.2.4	Dexamethason-Suppressionstest (DST) - Kohorte	20
3.2.5	Molekularbiologische Methoden	21
3.2.5.1	Arbeiten mit Ribonukleinsäure	21
3.2.5.2	RNA-Isolation	22
3.2.5.3	Messung der RNA-Konzentration	22
3.2.5.4	Messung der RNA-Integrität.....	22
3.2.5.5	Reverse Transkription	22
3.2.5.6	Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion	22
3.3	Statistische Auswertung	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Demographische Charakteristika der Studienpopulationen.....	26
4.1.1	TSST-Kohorte	26
4.1.2	DST-Kohorte.....	27
4.2	Molekularbiologische Ergebnisse	30
4.2.1	Stressmodulation der <i>MMP9</i> Expression in PTBS-Patienten in Ruhe und im Therapieverlauf vs. in gesunden Kontrollprobanden	30
4.2.2	Expressionsniveaus der Regulatoren von <i>MMP9</i> im Blut von PTBS-Patienten vs. Kontrollprobanden während des DST.....	34
4.2.2.1	HPA-Achsen-Reaktivität und <i>MMP9</i> Hyperexpression	34
4.2.2.2	Zytokinrezeptoren und <i>MMP9</i> Hyperexpression	34
5	Diskussion	40
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	40
5.2	<i>MMP-9</i> in der Pathogenese der PTBS	40
5.3	Remission der <i>MMP9</i> Expression durch psychotherapeutische Behandlung – post- Dexamethason <i>MMP9</i> als Biomarker	42
5.4	Einflussfaktoren der <i>MMP9</i> Expression	43
5.4.1	Einfluss der HPA-Achsenreaktivität auf die Dexamethason-induzierte <i>MMP9</i> Hyperexpression bei PTBS-Patientinnen.....	43
5.4.2	Einfluss der Zytokinrezeptoren auf die Dexamethason-induzierte <i>MMP9</i> Hyperexpression bei PTBS-Patientinnen.....	44

5.5	Limitationen	46
5.6	Ausblick	48
6	Zusammenfassung.....	50
	Literaturverzeichnis.....	51
	Affidavit.....	IX

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 MMP-9 und Regulatoren.....	13
Abb. 2 Versuchsablauf TSST in Anlehnung an Zaba et al. 2015	19
Abb. 3 Versuchsablauf DST in Anlehnung an Schubert et al. 2018	21
Abb. 4 <i>MMP9</i> Expression in PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden während des TSST und DST	32
Abb. 5 Zytokinrezeptorexpressionen in PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden während des DST	36

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Chemikalien	16
Tab. 2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	16
Tab. 3 PCR Primer	16
Tab. 4 Geräte	17
Tab. 5 Software	17
Tab. 6 Einschluss- und Ausschlusskriterien der TSST-Kohorte in Anlehnung an Zaba et al. 2015	19
Tab. 7 Einschluss- und Ausschlusskriterien der DST-Kohorte in Anlehnung an Schubert et al. 2018	21
Tab. 8 Verdünnungsschema der PCR Proben	23
Tab. 9 Sequenzen und Verdünnung der PCR Primer	23
Tab. 10 PCR Programm des Lightcycler® 480 Systems	24
Tab. 11 Demographische und klinische Charakteristika der TSST-Kohorte	26
Tab. 12 Demographische und klinische Charakteristika der DST-Kohorte.....	28
Tab. 13 Demographische und klinische Charakteristika der Teilstichprobe der prä-post Therapie DST-Kohorte	29
Tab. 14 Korrelation der <i>MMP9</i> Expression und psychopathologischen Daten in PTBS-Patienten der DST-Kohorte	33
Tab. 15 Korrelation der <i>MMP9</i> Expression und <i>IL1R1</i> Expression in PTBS-Patienten der DST-Kohorte	37
Tab. 16 Korrelation der <i>MMP9</i> Expression und <i>IL1R2</i> Expression in PTBS-Patienten der DST-Kohorte	38
Tab. 17 Korrelation der <i>MMP9</i> Expression und <i>IL6R</i> Expression in PTBS-Patienten der DST-Kohorte	38
Tab. 18 Korrelation der <i>MMP9</i> Expression und <i>TNFR1</i> Expression in PTBS-Patienten der DST-Kohorte	39

Abkürzungsverzeichnis

5-HTTLPR	Serotonin-transporter-linked polymorphic region
ACC	Anteriorer cingulärer Cortex
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CAPS	Clinician Administered PTSD Scale
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRH	Corticotropin-releasing hormone
CRHR1	Corticotropin-releasing hormone receptor 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DST	Dexamethason-Suppressionstest
EKT	Elektrokrampftherapie
FKBP51	FK506-Bindungsprotein 51
GC	Glucocorticoide
GR	Glucocorticoidrezeptor
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ICD	International Statistical Classification of Diseases
IFN-gamma	Interferon-gamma
IL-1 beta	Interleukin-1 beta
IL-1R1	Interleukin-1 Rezeptor 1
IL-1R2	Interleukin-1 Rezeptor 2
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IL6R	Interleukin-6 Rezeptor

MC2R	Melanocortinrezeptor 2
M-CIDI	Munich Composite International Diagnostic Interview
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
miRNA	Micro-RNA
<i>MMP9</i>	Matrix-Metalloproteinase-9 mRNA
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9 Protein
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRS	Magnetresonanztomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NAA	N-Acetylaspartat
NFκB	Nuclear factor kappa B
OD	Optical Density
PFC	Präfrontaler Cortex
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung
RIN	Ribonukleinsäure-Integritätszahl
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sIL6R	Löslicher Interleukin-6 Rezeptor
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
STAI I / II	State-Trait Anxiety Inventory I / II
TIR8	Toll Interleukin-1 Rezeptor 8
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFR1	Tumornekrosefaktor Rezeptor 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor Rezeptor 2
TSST	Trier Social Stress Test
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1

Aus Gründen der Lesbarkeit und Verständlichkeit werden in dieser Arbeit häufig nur die männlichen Versionen von Begriffen verwendet. Diese gelten jedoch ausdrücklich für alle Geschlechter, außer es wird gezielt darauf hingewiesen, dass es sich um nur ein bestimmtes Geschlecht handelt.

1 Einleitung

1.1 Die Posttraumatische Belastungsstörung

1.1.1 Epidemiologie und Symptomatik

Die Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS) wird seit 1980 als eigenständige Diagnose im Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) geführt. Seit 2013 gilt sie nicht länger als Angststörung, sondern zählt zu den Trauma- und stressbezogenen Störungen (APA, 2013). Die Lebenszeitprävalenz der PTBS in den USA beträgt 6 - 7% (Dohrenwend et al., 2006), in Deutschland 1,5 - 2,5% (Maercker et al., 2008). 50 - 90% aller Menschen werden während ihres Lebens mit traumatischen Ereignissen konfrontiert, die potentiell, bei Vorliegen einer entsprechenden Vulnerabilität, eine PTBS verursachen können (Vieweg et al., 2006). Beispiele sind etwa Kriegserfahrungen, körperlicher oder seelischer Missbrauch und Unfälle. Die Krankheit entwickelt sich jedoch nur bei ca. 8% der exponierten Personen (Yehuda and LeDoux, 2007).

Das DSM-IV definiert spezifische diagnostische Kriterien (A bis F) zur Diagnose einer PTBS. Diese umfassen das Erleben eines Traumas (Kriterium A), das Vorhandensein von Symptomen aus für die Erkrankung definierten Symptomclustern (Kriterium B-D), die Dauer der Störung über mehr als einen Monat (Kriterium E) und relevante Beeinträchtigungen durch die Störung in sozialen, beruflichen oder anderen wichtigen Funktionen (Kriterium F). Um die Diagnose einer PTBS zu stellen, müssen alle Kriterien in der erforderlichen Ausprägung vorhanden sein. Die Kriterien B-D umfassen 3 verschiedene Symptomcluster: Intrusionen, Vermeidungsverhalten und Abnahme der allgemeinen Reagibilität sowie Hyperarousal, also eine erhöhte nervöse Übererregbarkeit (APA, 1994). Bei Intrusionen erleben Geschädigte das traumatische Ereignis beispielsweise in Form von aversiven und unwillkürlich auftretenden Alpträumen oder Flashbacks wieder. Das Vermeidungsverhalten bezeichnet das Vermeiden von Gesprächen, Gedanken, Situationen oder Personen, die mit dem Trauma in Verbindung stehen. Die Abnahme der allgemeinen Reagibilität ist durch eine reduzierte Bandbreite des Affekts, eine verminderte Teilnahme und ein vermindertes Interesse an wichtigen Aktivitäten und einem Gefühl der Entfremdung von anderen charakterisiert. Das Hyperarousal beschreibt eine vegetative und psychische Übererregbarkeit der Patienten, die sich beispielweise in Form von Schlaflosigkeit, Konzentrationsschwäche oder Reizbarkeit äußern kann. In der überarbeiteten Form des DSM-IV, dem 2013 veröffentlichten DSM-5, werden 4 Symptomgruppen bestehend aus Intrusionen, Vermeidungsverhalten, negativen Veränderungen in Kognition und Stimmung, und Veränderungen der Erregbarkeit und Reaktivität differenziert (APA, 2013). Die Symptomcluster des Vermeidungsverhaltens und

der Abnahme der allgemeinen Reagibilität wurden also im DSM-5 separiert. Die Definition der einzelnen Symptome wurde ebenfalls geändert. Die reduzierte Bandbreite des Affekts ist beispielweise nun als persistierende Unfähigkeit zum Erleben positiver Emotionen definiert. Zudem wurden neue Symptome, wie etwa selbstschädigende Verhaltensweisen ergänzt. Ein weiterer Unterschied liegt in der im Kriterium A der DSM-5 gewählten konkreten Definition der traumatischen Ereignisse. Diese müssen den akut drohenden Tod, ernsthafte Verletzungen oder sexuelle Gewalt beinhalten. Die im DSM-IV noch genannten subjektiven Reaktionen auf die Traumaexposition in Form von „Furcht, Hilflosigkeit und Schrecken“ (APA, 1994) wurden im DSM-5 aus dem Kriterium A entfernt (APA, 2013). Die Kriterien A1-A4 des DSM-5 unterscheiden die Form des Erlebens. Im Kriterium A1 wird das Ereignis persönlich erlebt. Im Kriterium A2 ist der Betroffene direkter Zeuge, während das traumatische Ereignis einer anderen Person widerfährt. Im Kriterium A3 wird die Person damit konfrontiert, dass das Erlebnis einem engen Familienmitglied oder Freund zugestoßen ist. Im Falle eines eigentlichen oder drohenden Todes muss dieser gewaltsam oder plötzlich stattgefunden haben. Das Kriterium A4 bezeichnet das wiederholte oder extreme Erleben von aversiven Details eines traumatischen Ereignisses (APA, 2013). In dem Diagnosekatalog International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10 (ICD-10) werden für die Diagnose einer PTBS ebenfalls Symptome des Vermeidungsverhaltens und des Wiedererlebens aufgeführt. Ergänzend muss entweder eine „teilweise oder vollständige Unfähigkeit, sich an einige wichtige Aspekte der Belastung zu erinnern“ vorliegen oder es müssen „anhaltende Symptome einer erhöhten psychischen Sensitivität und Erregung“ bestehen (WHO, 1993), die vorher nicht vorhanden waren. Negative Kognitionen oder Emotionen sind nicht Teil der Kriterien. Über die Dauer der Symptomatik wird anders als im DSM ebenfalls keine Angabe gemacht, jedoch muss diese innerhalb von sechs Monaten nach dem Belastungsereignis oder der Belastungsperiode auftreten (WHO, 1993). Je nach verwendetem Manual könnte die Identifizierung von PTBS-Fällen daher unterschiedlich ausfallen (Pai et al., 2017).

Es wird ersichtlich, dass die PTBS ein heterogenes Krankheitsbild darstellt. Innerhalb des Patientenkollektives existieren deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Symptomcluster und im Schweregrad der einzelnen Symptome. Das Ansprechen auf eine psychotherapeutische oder pharmakologische Therapie fällt ebenfalls sehr variabel aus (Ipser & Stein, 2012). Zudem können Komorbiditäten, wie zum Beispiel Depression oder Angststörungen (de Kloet et al., 2008), das Beschwerdebild dominieren und die klinische Symptomatik der PTBS überlagern.

Die Erkrankung bedeutet eine erhebliche Beeinträchtigung für das Leben der Betroffenen. Zatzick et al. konnten etwa bei an PTBS erkrankten Kriegsveteranen ein signifikant höheres Risiko für körperliche Einschränkungen, vermindertes Wohlbefinden, vermehrte Gewaltbereitschaft und Arbeitslosigkeit nachweisen (Zatzick et al., 1997).

1.1.2 Pathophysiologie der PTBS

Die Pathophysiologie der PTBS ist derzeit noch unzureichend verstanden. Molekulare und endokrine Veränderungen, die mit der PTBS assoziiert zu sein scheinen, betreffen unter anderem die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) (Fries et al., 2015, Yehuda et al., 2013b, Yehuda et al., 2014, Zaba et al., 2015), das Sympathoadrenerge System (SAM) (Hendrickson and Raskind, 2016), das FK506-Bindungsprotein 51 (FKBP51) (Schmidt et al., 2013a), verschiedene miRNAs (Schmidt et al., 2013b, Martin et al., 2017) und Moleküle des Immunsystems (Schmidt et al., 2011, Wang and Young, 2016). Zudem wurden Veränderungen der strukturellen und funktionellen Plastizität des Gehirns beobachtet (Bremner et al., 2008). Im Folgenden soll insbesondere auf Veränderungen der HPA-Achse und Veränderungen der Zytokine und ihrer Rezeptoren als Immunmediatoren eingegangen werden.

1.1.2.1 HPA-Achse in der PTBS

Hypothalamus, Hypophyse und Nebennierenrinde bilden über ihre endokrine Achse eine zentrale Steuereinheit. Zusammen mit anderen Systemen wie dem SAM und der Amygdala sind sie an der Stressreaktion des Körpers beteiligt. Hypothalamische releasing-Hormone stimulieren und release-inhibiting-Hormone inhibieren die Synthese und Freisetzung hypophysärer glandotroper Hormone. Die hypophysären Botenstoffe aktivieren wiederum die Nebennierenrinde. Die Hormone der Nebennierenrinde wirken über eine negative Rückkopplungsschleife hemmend auf die vorgeschalteten Ebenen. Die HPA-Achse ist durch eine zirkadiane Rhythmik gekennzeichnet (Besedovsky et al., 2008). Der Nucleus paraventricularis des Hypothalamus sezerniert das Corticotropin-releasing hormone (CRH). Die Freisetzung erfolgt vor allem nachts und am frühen Morgen. Die transienten Spitzen sind auch durch die kurze Halbwertszeit des Hormons bedingt. In der Hypophyse bindet CRH an den Corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1), woraufhin die Sezernierung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) stimuliert wird. Dieses bindet an den Melanocortinrezeptor 2 (MC2R) in der Nebennierenrinde und stimuliert dort die Zona fasciculata zur Cortisolsekretion. Cortisol vermittelt über Bindung an den Glucocorticoidrezeptor (GR) weitreichende Effekte, u.a. auf den Metabolismus, das Immunsystem und das kardiovaskuläre System. Der GR ist bei fehlendem Liganden im Zytosol lokalisiert. Nach Ligandenbindung kommt es zur Translokation in den Zellkern und Stimulation von Transkriptionsfaktoren. Die Cortisolkonzentration steigt zeitversetzt zu CRH und ACTH am Morgen an und fällt im Tagesverlauf langsam ab. Die Sekretion von CRH und ACTH wird durch Rückkopplungsmechanismen von Cortisol auf der Ebene des Hypothalamus, der Hypophyse und des Hippocampus (Herman et al., 1989) über den GR reguliert (Smith and Vale, 2006, Castro et al., 2010, Stephens and Wand, 2012).

In der Fachliteratur werden verschiedene Veränderungen für die HPA-Achse bei der PTBS beschrieben. Mehrere Studien wiesen peripher verminderte Cortisolkonzentrationen in Blut, Speichel und Urin von Patienten nach (Gill et al., 2008, Rohleder et al., 2004, Mouthaan et al.,

2014). Eine Studie von Yehuda et al. zeigte eine erhöhte Glucocorticoidsensitivität von PTBS-Patienten im low-dose Dexamethason-Suppressionstest (DST) mit einer im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verstärkten Cortisol-suppression (Yehuda, 2009). Niedrige Cortisolspiegel könnten daher ein Ausdruck erhöhter Feedbacksuppression auf die HPA-Achse in Patienten sein (Heim et al., 2008). Schubert et al. dagegen wiesen eine ungestörte HPA-Achsen-Funktion im DST bei PTBS-Patienten nach (Schubert et al., 2018). Eine weitere Studie ergab wiederum erhöhte Speichel-Cortisolwerte in PTBS-Patientinnen nach Exposition mit einem traumabezogenen Stressor (Stoppelbein et al., 2012). Die Heterogenität der Ergebnisse könnte auf Einflussfaktoren wie Komorbiditäten, den Zeitraum seit dem Trauma, die Dauer des Traumas, das Geschlecht (Wessa and Flor, 2007) und insbesondere auf verschiedene HPA-Achsen-Reaktivitätstypen zurückzuführen sein. Zaba et al. konnten erstmalig zwei klinisch und biologisch unterschiedliche HPA-Achsen-Reaktivitäts-Untergruppen der PTBS identifizieren. Eine Untergruppe der PTBS-Patienten ("Non-Responder") zeigte nach Stressexposition im Rahmen des Trier Social Stress Test (TSST) nicht nur niedrigere Serum-Cortisolspiegel, sondern auch niedrigere ACTH-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden und PTBS-Patienten mit adäquatem Cortisolanstieg („Responder“) (Zaba et al., 2015). Spätere Untersuchungen anderer Forschungsgruppen konnten diese Beobachtungen bestätigen (Wichmann et al., 2017).

1.1.2.2 Zytokine und ihre Rezeptoren in der PTBS

PTBS-Patienten zeigen ein erhöhtes Risiko für immunvermittelte Erkrankungen wie beispielsweise kardiovaskuläre (Boscarino and Chang, 1999, Kang et al., 2006), autoimmune (Bookwalter et al., 2020) und neurodegenerative Krankheiten (Yaffe et al., 2010), die eine Beteiligung von Immunmediatoren wie Zytokinen und ihren Rezeptoren an der Pathophysiologie der PTBS vermuten lassen. Ihnen scheint zudem vermutlich eine grundlegende Funktion in der Verarbeitung von Angst und für das Gedächtnis zuzukommen, die bei PTBS häufig beeinträchtigt sind. Zytokine werden in den relevanten Hirnregionen, vor allem dem Hippocampus und der Amygdala, verstärkt exprimiert (Schobitz et al., 1993, French et al., 1999, Wong and Licinio, 1994). Im Tiermodell mit Ratten konnte darüber hinaus nach Stressexposition eine Zunahme der Expression von Interleukin-1 beta (IL-1 beta) und Interleukin-6 (IL-6) im Hippocampus bei gestressten im Vergleich zu nicht gestressten Tieren beobachtet werden (Peng et al., 2013). Eine andere Studie wies jedoch unveränderte IL-1 beta und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) Spiegel im Hippocampus von Ratten nach Stressinduktion nach (Qiu et al., 2016).

Bei PTBS wies die Mehrheit der bereits veröffentlichten Studien für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 beta, TNF-alpha und IL-6 erhöhte Spiegel nach (Daskalakis et al., 2016, Gola et al., 2013, Hunter et al., 2015, Newton et al., 2014, von Kanel et al., 2007). Eine 2020 publizierte Metaanalyse zu Immunbiomarkern der PTBS ergab ebenfalls erhöhte Spiegel von IL-1 beta, Interleukin-2 (IL-2), IL-6, Interferon-gamma (IFN-gamma), TNF-alpha, C-reaktivem Protein

(CRP) und Leukozyten in PTBS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (Yang and Jiang, 2020). Während die Ergebnisse für IFN-gamma, TNF-alpha, CRP und die Leukozytenanzahl in Subgruppenanalysen konsistent blieben, zeigten sich Abweichungen für IL-1 beta, IL-2 und IL-6. In Subgruppenanalysen zum Vorhandensein einer psychotropen Medikation zeigten sich IL-1 beta und IL-2 bei der PTBS nicht erhöht. IL-1 beta war zudem nicht erhöht, wenn traumexponierte Kontrollprobanden in den Analysen ausgeschlossen wurden. Dagegen wurden für IL-6 keine erhöhten Spiegel in der PTBS nachgewiesen, wenn nur traumexponierte Kontrollprobanden verwendet wurden (Yang and Jiang, 2020).

Zu den Rezeptoren dieser Zytokine existieren nur wenige Analysen bei an PTBS erkrankten Kollektiven. Dies betrifft vor allem die Rezeptoren von IL-1 beta, den Interleukin-1 Rezeptor 1 (IL-1R1) und Interleukin-1 Rezeptor 2 (IL-1R2). Für IL-1R1 wurde die Gen- oder Proteinexpression in PTBS-Patienten bisher nicht untersucht. Für IL-1R2 konnte eine Studie von Guardado et al. in Microarrays eine verstärkte Expression bei Kriegsveteranen mit PTBS im Vergleich zu Veteranen ohne PTBS nachweisen (Guardado et al., 2016). Der IL-1R2 nimmt eine Sonderposition innerhalb der Zytokinrezeptoren ein. Ihm fehlt die zytoplasmatische Domäne. Er löst bei Bindung von IL-1 beta oder Interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) keine Signaltransduktion aus und wird daher als „decoy receptor“ (*engl. decoy* = Köder) bezeichnet. Durch diesen Mechanismus kann IL-1 beta oder IL-1 alpha keine Wirkung mehr entfalten. Im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren wirkt er folglich antiinflammatorisch. Der IL-1R2 kann auch den Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1RA) binden, welcher die Aktivität von IL-1 beta und IL-1 alpha inhibiert, jedoch mit deutlich geringerer Affinität als IL-1 beta und IL-1 alpha. Der zu IL-6 gehörige Rezeptor Interleukin-6 Rezeptor (IL6R) wurde bisher in drei Studien bei PTBS-Patienten untersucht, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen (Imai et al., 2018, Newton et al., 2014, Maes et al., 1999). Zwei Studien zu den Rezeptoren von TNF-alpha, dem Tumornekrosefaktor Rezeptor 1 (TNFR1) und dem Tumornekrosefaktor Rezeptor 2 (TNFR2) zeigten ähnliche Blutkonzentrationen beider Rezeptoren für Soldaten mit PTBS und Soldaten ohne PTBS (Himmerich et al., 2015). Die Konzentration nahm jedoch im Verlauf einer Psychotherapie bei PTBS-Patienten ab (Himmerich et al., 2016). Darüber hinaus konnte keine Studie identifiziert werden, die den zeitlichen Verlauf der Zytokinrezeptoren während eines bei PTBS-Patienten durchgeführten psychosozialen oder pharmakologischen Stressexperiments analysiert.

1.1.3 Probleme in der Diagnostik und Therapieüberwachung

Trotz der schwerwiegenden Symptomatik bereitet die Diagnose der PTBS und ihr Monitoring unter Therapie aus verschiedenen Gründen oft Schwierigkeiten. Bis auf bestimmte neurodegenerative Erkrankungen, für die heute einige molekulare Biomarker zur Verfügung stehen, die beispielsweise die Diagnosestellung der Alzheimer-Demenz deutlich erleichtern (Wiltfang et al., 2019), beruht die Diagnostik psychiatrischer Erkrankungen auf dem psychopathologischen Befund, der wiederum hauptsächlich aus den Angaben der Untersuchten

besteht und außerdem auf Verhaltensbeobachtung und ggf. Fremdanamnesen beruht. Aus erkrankungsimmanenten Gründen oder persönlichen Motiven der Untersuchten, beispielsweise in Gutachtenfällen, können die subjektiven Angaben der Untersuchten zu psychopathologischen Symptomen wie Nachhallerinnerungen, Angst, Stimmung etc. in einigen Fällen nicht zielführend oder falsch sein. Aus diesem Grund, aber auch aufgrund der Subjektivität der diagnostizierenden Experten, kann die Diagnose PTBS und auch die Besserung der Symptome im Therapieverlauf oft nur unzureichend beurteilt werden. Somit könnte die Identifikation messbarer Biomarker in peripheren Körperflüssigkeiten psychiatrische Diagnosen wie die PTBS erleichtern und die Zuverlässigkeit einer Diagnosestellung erhöhen.

1.1.4 PTBS-Biomarker

Ein Biomarker ist ein Prozess, eine Struktur oder eine Substanz, die direkt oder in Form ihrer Produkte im Körper gemessen wird. Biomarker sollen helfen, das Risiko für das Auftreten von Krankheiten zu bestimmen, Krankheiten zu diagnostizieren, Prognosen abzugeben oder das Ansprechen auf die Behandlung zu bewerten (WHO, 2001). Es werden daher prädiktive, diagnostische, therapeutische und prognostische Biomarker unterschieden. Bisher beschriebene potentielle Biomarker für die PTBS, einschließlich Veränderungen neuroendokriner, monoaminerger und kortikaler Systeme, finden jedoch noch keine weitreichende klinische Anwendung (Schmidt et al., 2013b).

1.1.4.1 Diagnostische Biomarker

Als vielversprechende diagnostische Biomarker für die PTBS werden Veränderungen der HPA-Achsen-Funktion, des SAM, der physiologischen Schreckreaktion (*engl. startle response*) und der Hirnmorphologie und -funktionen diskutiert.

Wie schon in Kapitel 1.2.2.1 erwähnt, wurden in PTBS-Patienten Auffälligkeiten in der HPA-Achsen-Aktivität in Form veränderter Cortisol- und ACTH-Konzentrationen sowie veränderter Feedbackmechanismen nachgewiesen und als Biomarker evaluiert. Ergänzend wurde FKBP51 untersucht, ein Protein, das an der Regulierung der HPA-Achse beteiligt ist. FKBP51 inhibiert die Ligandenbindung an den GR und dessen Translokation in den Zellkern. Eine Studie konnte zeigen, dass die Deletion des *Fkbp5* Gens in Mäusen zu einem verbesserten Stressbewältigungsverhalten führte (Hartmann et al., 2011). Yehuda et al. wiesen eine geringere *FKBP5* mRNA-Expression in PTBS-Individuen nach (Yehuda et al., 2009). Eine andere Studie konnte zudem zeigen, dass *FKBP5* Polymorphismen mit spezifischen Varianten der HPA-Achsen-Dysfunktion und darüber hinaus mit verschiedenen biologischen Subtypen der PTBS assoziiert sind (Mehta et al., 2011).

Eine bei PTBS häufig beschriebene Überaktivität des SAM wurde ebenfalls als potentieller diagnostischer Biomarker in der Literatur angeführt (Vieweg et al., 2006). In PTBS-Patienten

konnten neben erhöhten Herzfrequenz- und Blutdruckwerten (Bedi & Arora, 2007) auch erhöhte Norepinephrinkonzentrationen im Urin (Wessa, 2007) und zudem erhöhte periphere und zentrale Norepinephrinspiegel als Reaktion auf bedrohliche Stimuli (Blanchard et al., 1991, Geraciotti et al., 2008) nachgewiesen werden. Das Symptomcluster des Hyperarousals könnte durch eine gesteigerte Katecholaminaktivität mitbedingt sein (Vieweg et al., 2006).

Zu den diagnostischen Biomarkern wird auch der Nachweis einer pathologisch gesteigerten Schreckreaktion (*engl. startle response*) gezählt, die bei gesunden Individuen als psychophysiologische Reaktion des Körpers auf plötzliche, unerwartete Stimuli wie z.B. laute Geräusche auftritt. Hierbei kommt es zu parallel ablaufenden, durch den Hirnstamm gesteuerten motorischen Reflexen mit Kontraktion des Kaumuskels, der Lidschlussmuskulatur, Extension des Kopfes und der Wirbelsäule sowie Flexion und Adduktion der Arme und Beine. Die Objektivierung der Schreckreaktion erfolgt durch Messung der Latenzzeit zwischen Stimulus und Auftreten des Reflexes mittels Elektromyographie. In PTBS-Patienten konnte in mehreren Studien eine gesteigerte Schreckreaktion mit verringerter Latenzzeit gezeigt werden (Butler et al., 1990, Orr et al., 1995, Grillon et al., 1998).

Analysen zur Hirnmorphologie und Hirnfunktion von PTBS-Patienten ergaben inkonsistente Ergebnisse. In einigen Studien wurde mittels Magnetresonanztomographie (MRT) eine Atrophie der Amygdala, des präfrontalen Cortex, aber vor allem auch des Hippocampus gefunden (Bremner, 2006, Gurvits et al., 1996), die jedoch andere Studien nicht aufzeigen konnten (Fennema-Notestine et al., 2002, Schuff et al., 2001). Ein vermindertes Volumen des Hippocampus wird zudem als Risikofaktor für die Entstehung einer PTBS diskutiert (Bremner et al., 2008). Der Hippocampus ist an der Kontrolle der Stressreaktion und der Gefahrenkonditionierung beteiligt. Die Unterscheidung zwischen gefährlichen und ungefährlichen Stimuli sowie die frühzeitige Beendigung einer Stressreaktion könnte im Falle einer Atrophie beeinträchtigt sein. Eine Studie im Tiermodell mit traumatisierten Mäusen konnte ergänzend eine Reduktion von hippocampalen präsynaptischen (Herrmann et al., 2012) und postsynaptischen neuronalen Proteinen (Golub et al., 2011) zeigen. Eine mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS) durchgeführte Quantifizierung von N-Acetylaspartat (NAA), einem Marker der neuronalen Dichte, wies ebenfalls geringere Konzentrationen von NAA im Hippocampus von PTBS-Patienten nach (Karl and Werner, 2010, Pitman et al., 2012). Analysen der Amygdala, die eine zentrale Rolle im Erlernen von Angst einnimmt, konnten teilweise reduzierte Volumina in PTBS-Patienten detektieren (Karl et al., 2006), die sich jedoch im Rahmen anderer Studien nicht bestätigen ließen (Woon and Hedges, 2008).

1.1.4.2 Therapeutische Biomarker

Therapeutische Biomarker lassen sich in Marker zum Monitoring eines Therapieansprechens und Marker zur Therapiestratifizierung differenzieren. Marker zum Therapiemonitoring sollen den Krankheitsverlauf der Patienten unter einer psychotherapeutischen oder pharmakologischen Therapie abbilden. Anhand der Marker zur Stratifizierung soll ein

Ansprechen auf spezifische Therapieformen eingeschätzt werden, das in einem nächsten Schritt die Unterteilung in verschiedene Therapie-Responder-Gruppen ermöglichen soll. Insgesamt sind bisher nur wenige therapeutische Biomarker für die PTBS beschrieben worden (Schmidt et al., 2013b).

Ein möglicher Biomarker zum Therapiemonitoring der PTBS ist die Erfassung der Aktivität des rostralen Abschnitts des anterioren cingulären Cortex (ACC). Der ACC ist als Teil des medialen präfrontalen Cortex (PFC) u.a. an der neuronalen Prozessierung von Emotionen beteiligt, insbesondere an der emotionalen Erfassung der äußeren Umwelt und Angstregulierung. Der mediale PFC kann eine inhibierende Kontrolle auf Stressreaktionen und emotionale Reaktivität ausüben und den Abbau konditionierter Angst durch aktive Hemmung erworbener Angstreaktionen bewirken (Shin et al., 2006). Verschiedene Untersuchungen konnten für PTBS-Patienten verringerte Volumina des PFC auch mit reduzierten Volumina des ACC detektieren (Woodward et al., 2006, Yamasue et al., 2003, Corbo et al., 2005). Der Schweregrad der PTBS-Symptomatik korrelierte darüber hinaus negativ mit den Volumina des ACC (Yamasue et al., 2003). Eine Studie von Felmingham et al. konnte nach erfolgreicher kognitiver Verhaltenstherapie bei PTBS-Patienten eine erhöhte Aktivität des ACC zeigen (Felmingham et al., 2007). Eine Reduktion von PTBS-Symptomen unter kognitiver Verhaltenstherapie war auch in einer weiteren Studie mit einem Volumenzuwachs dieser Hirnregion assoziiert (Bryant et al., 2008).

In Studien wurde ebenfalls nach Biomarkern gesucht, die mit dem Ansprechen auf eine pharmakologische Therapie assoziiert zu sein scheinen. Aikins et al. wiesen eine Assoziation des Serotonin-transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR) Genotyps mit verbessertem Ansprechen auf eine Therapie mit dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Sertralin nach (Aikins et al., 2011). Ein zweiter potentieller therapeutischer Biomarker ist der Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), welcher für die Proliferation und Differenzierung von Nervenzellen verantwortlich ist (Hartmann et al., 2001). Bei PTBS-Patienten mit geringeren BDNF-Konzentrationen zeigte sich eine stärkere Abnahme der PTBS-Symptomatik unter einer Therapie mit dem SSRI Escitalopram (Berger et al., 2010).

1.2 Die Matrix-Metalloproteinase-9 als möglicher Biomarker für PTBS

Im Folgenden soll dargelegt werden, warum das Enzym Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) als möglicher neuer Biomarker für die Erkrankung in Erwägung gezogen und daher in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde.

1.2.1 Molekulare Charakteristika und Aktivität

MMP-9, auch Gelatinase B genannt, gehört zur Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen. Diese unterteilen sich in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membrantypische Matrix-Metalloproteinasen (Vandooren et al., 2013). MMP-9 katalysiert primär die Spaltung von

Kollagen Typ IV und Typ V. Da es für seine proteolytische Aktivität Zink bindet, zählt es zur Metzincin-Superfamilie der Metalloproteinasen (Apte and Parks, 2015). Durch alternatives Splicing können drei verschiedene mRNAs erzeugt werden, welche für drei verschiedene Proteinisoformen codieren (Thierry-Mieg and Thierry-Mieg, 2006).

MMP-9 ist hauptsächlich im Extrazellulärraum aktiv, wo es Bestandteile der extrazellulären Matrix degradiert. Substrate sind Oberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) (Bajor and Kaczmarek, 2013, Conant et al., 2015), aber auch Cytokine und Chemokine, die durch die Proteinase aktiviert oder deaktiviert werden können (Opdenakker and Van Damme, 2011, Song et al., 2015b, Song et al., 2015a). Durch oben genannte Funktionen nimmt MMP-9 eine wichtige Stellung in biologischen Prozessen wie der embryonalen Entwicklung, dem Gewebeumbau und der Wundheilung ein (Ram et al., 2006, Vafadari et al., 2016, Buisson et al., 1996).

1.2.2 Rolle in der Physiologie des Gehirns

MMP9 mRNA ist in verschiedenen Gehirnregionen, etwa dem Hippocampus, Cerebellum und zerebralen Cortex in geringen Konzentrationen exprimiert. MMP-9 ist vornehmlich in Neuronen lokalisiert (Dzwonek et al., 2004), in den Zellkörpern, Dendriten und exzitatorischen Synapsen der Dendriten (Wilczynski et al., 2008). Die Expression nimmt unter glutamaterger Aktivierung der Areale zu (Dziembowska et al., 2012, Michaluk et al., 2007). Eine Reihe von Studien wiesen eine Beteiligung von MMP-9 an physiologischen Abläufen im Gehirn nach. So wurde beispielsweise seine Funktion in der synaptischen Plastizität beschrieben (Dziembowska and Wlodarczyk, 2012, Huntley, 2012, Rivera et al., 2010). Michaluk et al. zeigten, dass MMP-9 Dendritenspitzen verlängern und ausdünnen kann (Michaluk et al., 2011). Huntley et al. vermuteten einen Einfluss auf Lern- und Gedächtnisprozesse durch Modulierung der Langzeit-Potenzierung an Synapsen (Huntley, 2012). Im Rahmen der Langzeitpotenzierung (*engl. long term potentiation, LTP*), einer Form der synaptischen Plastizität, wird durch wiederholte Erregung der Synapsen die Expression spezifischer Rezeptoren an der postsynaptischen Membran moduliert. Das Ansprechen der Synapse auf Stimuli wird somit langfristig verstärkt und Gedächtnisinhalte gespeichert. Eine andere Studie konnte eine verstärkte Expression von MMP-9 im Hippocampus beobachten, der maßgeblich am Lernen beteiligt ist (Meighan et al., 2006). Bei Inhibition oder Knockout des *MMP9* Gens war hier die Langzeitpotenzierung gestört (Meighan et al., 2007).

1.2.3 Rolle bei psychiatrischen Erkrankungen

Neben seiner physiologischen Funktion wird MMP-9 auch im Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Erkrankungen diskutiert. Es wurde eine mögliche Beziehung des Enzyms zu Autoimmunerkrankungen (Efthimiou and Blanco, 2009), zur

bakteriellen Meningitis (Leppert et al., 1999), zu neuroinflammatorischen Prozessen (Vandooren et al., 2014) und Tumorerkrankungen (Farina and Mackay, 2014) festgestellt.

Darüber hinaus wird MMP-9 eine Beteiligung in der Pathophysiologie neurodegenerativer und psychiatrischer Erkrankungen zugeschrieben. Han et al. vermuteten, dass ein Polymorphismus des *MMP9* Gens mit dem Auftreten von Schizophrenie assoziiert ist (Han et al., 2011, Rybakowski et al., 2009). Beim Morbus Alzheimer wurde ein positiver Einfluss einer erhöhten MMP-9 Aktivität auf den Krankheitsverlauf festgestellt. Die Proteinase ist am Abbau der für die Erkrankung verantwortlichen Amyloid-Plaques beteiligt (Mizoguchi et al., 2009). Auch Fragkouli et al. werteten die in-vivo Aktivierung von MMP-9 bei Alzheimer-Patienten als neuroprotektiv (Fragkouli et al., 2014). Bei Patienten mit bipolarer Störung konnte bei Vorliegen einer akuten depressiven Symptomatik, aber auch nach Remission der depressiven Symptomatik, eine signifikant erhöhte MMP-9 Expression nachgewiesen werden (Rybakowski et al., 2013). Analysen von MMP-9 an depressiv erkrankten Individuen konnten ebenfalls erhöhte MMP-9 Spiegel (Domenici et al., 2010) detektieren. Eine Studie in Ovarialkarzinompatientinnen mit und ohne Diagnose einer Depression ergab eine erhöhte MMP-9 Expression in CD68+ Zellen bei gleichzeitig vorliegender Depression (Lutgendorf et al., 2008). Yehuda et al. beobachteten zudem eine Korrelation zwischen MMP-9 Expressionswerten und dem Schweregrad der Depression (Yoshida et al., 2012). Darüber hinaus konnte im Tiermodell mit Ratten, die einer analog depressiogen wirkenden chronischen Immobilisation ausgesetzt waren, gezeigt werden, dass ein im Hippocampus applizierter MMP-9-Inhibitor der Entwicklung eines gestörten Sozialverhaltens und Erinnerungsvermögens vorbeugen konnte (van der Kooij et al., 2014). Für weitere psychiatrische Erkrankungen, wie beispielweise für die Borderline-Persönlichkeitsstörung und die Angststörungen, liegen nur wenige Erkenntnisse zur MMP-9 Expression vor. In einem Tiermodell zeigte sich eine aberrante Expression des *Mmp9* Gens im Striatum von Ratten unter mütterlichem Trennungsstress im Vergleich zu nicht gestressten Kontrolltieren. Der vorliegende Einzelnukleotid-Polymorphismus (rs3918242) im humanen Homolog des *MMP9* Gens war signifikant mit einer Anfälligkeit für Angststörungen assoziiert (McGregor et al., 2018)

1.2.4 Rolle bei der PTBS

Nach aktuellem Kenntnisstand ist die vorliegende Arbeit erst die dritte Studie, die MMP-9 in PTBS-Patienten untersucht. Lima et al. verglichen die Konzentration der proinflammatorischen Biomarker IL-6, MMP-9, Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) und Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) nach Exposition mit einem psychosozialen Stressor im peripheren Blut von post-Myokardinfarkt-Patienten mit und ohne Diagnose einer PTBS. Hierbei konnte ein signifikanter Anstieg der IL-6 Konzentration 90 min nach dem Stresstest im Kollektiv der Myokardinfarktpatienten mit PTBS im Vergleich zu den Patienten ohne PTBS beobachtet werden. Die MMP-9 Protein-Expressionsspiegel dagegen blieben im Zeitverlauf bei PTBS-Patienten unverändert (Lima et al., 2019). In der

Gesamtkohorte aus PTBS-Patienten und Kontrollprobanden konnte jedoch ein leichter Anstieg in der MMP-9 Konzentration nach Stressexposition nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten Szymanowski et al. eine durch psychosozialen Stress induzierte Abnahme von MMP-9 Blutkonzentrationen in gesunden Kontrollprobanden (Szymanowski et al., 2011). Neben den Analysen von Lima et al. konnten Brahmajothi et al. in einer kürzlich veröffentlichten Studie mittels Zymographie eine gesteigerte MMP-9 Enzymaktivität in Veteranen mit Diagnose einer PTBS im Vergleich zu gesunden Veteranen dokumentieren (Brahmajothi and Abou-Donia, 2020).

Auch die Rolle des Enzyms in der Furchtkonditionierung, die in zwei Studien beschrieben wurde, zeigt, dass weiterführende Untersuchungen auf dem Gebiet von Nutzen sein können. In einem Mausmodell bewirkte die Angstkonditionierung der Versuchstiere, dass die *MMP9* Transkription in den drei Hauptregionen des Angsterlernens - der Amygdala, dem Hippocampus und dem präfrontalen Cortex - anstieg (Ganguly et al., 2013). Der Einfluss von MMP-9 auf die synaptische Plastizität könnte grundlegend hierfür sein. Da MMP-9 in die Verarbeitung von Gedächtnisinhalten involviert ist, könnte es auch an der Langzeitstabilisierung von traumatischen Erinnerungen mitwirken. Hierfür sprechen die Ergebnisse der zweiten Studie. Bach et al. hatten in einem Pavlov'schen Modell in Ratten angstausslösende Erfahrungen konditioniert. Wenn die Versuchstiere mit Doxycyclin, einem MMP-9-Inhibitor, behandelt wurden, reduzierte dies die erworbenen Erinnerungen signifikant (Bach et al., 2017).

1.2.5 Regulation

Um die Funktion von MMP-9 und damit auch seine mögliche Rolle in der Pathophysiologie der PTBS besser zu verstehen, wurden Modulatoren der Enzymexpression, für die auch in der PTBS Veränderungen beschrieben sind, in PTBS-Patientenkohorten untersucht, nämlich die HPA-Achsen-Reaktivität und Immunmediatoren in Form der Interleukinrezeptoren IL-1R1, IL-1R2, TNFR1 und IL6R. Potentielle Auffälligkeiten in der *MMP9* Expression bei PTBS-Patienten könnten mit Veränderungen der HPA-Achse oder der Zytokinrezeptoren zusammenhängen bzw. auf diese zurückzuführen sein.

1.2.5.1 Einfluss der HPA-Achse und Zytokinrezeptoren auf die MMP-9 Expression

Ein möglicher regulatorischer Einfluss von Glucocorticoiden auf die MMP-9 Expression wurde bereits mehrfach beschrieben. Hierbei wurde sowohl die MMP-9 Proteinexpression als auch die *MMP9* mRNA-Expression erfasst. Die meisten Studien mit kultivierten Zellen konnten eine Glucocorticoid-vermittelte Suppression der MMP-9 Protein- und mRNA-Expression beobachten (Wang et al., 2011, Forster et al., 2007). Ähnliches galt für klinische Studien bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten (Mautino et al., 1997, Ram et al., 2006). Andere Analysen ergaben wiederum, dass die MMP-9 Proteinexpression in den Atemkondensaten (Grzela et al., 2015) und peripheren Neutrophilen (Cundall et al., 2003) von Asthmapatienten

nach Glucocorticoid-Behandlung unverändert blieb oder unter Glucocorticoidtherapie ein Anstieg der MMP-9 Serumkonzentration eintrat (Berker et al., 2010). Auch Lutgendorf et al. wiesen in einem in-vitro-Experiment eine durch Hydrocortison induzierte, ungefähr zweifache Erhöhung der MMP-9 Expression in humanen Makrophagen von Tumorpatientinnen nach (Lutgendorf et al., 2008). Die Glucocorticoid-vermittelte Suppression der MMP-9 Expression könnte indirekt durch Inhibierung von IL-1 beta, IL-6 und TNF-alpha (Goppelt-Strube et al., 1996) bedingt sein. Die Heterogenität der Ergebnisse zeigt, dass der Einfluss der HPA-Achse auf die Expression von MMP-9 noch nicht vollständig verstanden ist.

Durch die proinflammatorischen Zytokine IL-6 (Kothari et al., 2014), IL-1 beta und TNF-alpha - im Falle der beiden Letztgenannten durch den Transkriptionsfaktor Nuclear factor kappa B (NFκB) (Labrie and St-Pierre, 2013) - kann die Expression von MMP-9 ebenfalls beeinflusst werden. Die Zytokine wirken dabei größtenteils MMP-9 Expressions-induzierend. Vorangegangene in-vitro-Studien für TNF-alpha konnten eine durch TNF-alpha verstärkte MMP-9 Proteinexpression in Fibroblasten (Sato et al., 1996), Endothelzellen (Partridge et al., 1993), glatten Muskelzellen des Myometriums (Roh et al., 2000) und Zellen des proximalen renalen Tubulus (Nee et al., 2004) aufzeigen. Chattopadhyay et al. registrierten zudem einen über TNFR1 vermittelten signifikanten Anstieg in *Mmp9* mRNA nach Injektion von TNF-alpha in Ischiasnerven von Ratten (Chattopadhyay et al., 2007). Auch IL-1 beta bewirkte in mehreren in-vitro-Experimenten einen MMP-9 Anstieg. Dieser konnte in Neuronen (Vecil et al., 2000), Kornealzellen (Li et al., 2001), Trophoblasten (Librach et al., 1994) und ähnlich wie für TNF-alpha auch in Zellen des Myometriums (Roh et al., 2000) beobachtet werden. Eine immunhistochemische Studie zu perinatalen Hirnschäden zeigte eine verstärkte Expression der MMP-9 in geschädigten Arealen der weißen Hirnsubstanz im Vergleich zu gesunden Arealen mit in diesem Bereich auch erhöhter Expression von IL-1R1. In der Immunfluoreszenz waren MMP-9 positive Makrophagen auch IL-1R1-positiv (Girard et al., 2010). Die Autoren schlussfolgerten, dass eine Aktivierung des IL-1-Systems mit einer nachfolgenden Induktion von MMP-9 vergesellschaftet ist. Dagegen zeigte sich in einer Studie von Nee et al. an renalen Tubuluszellen, die wie oben erwähnt eine stimulierende Wirkung von TNF-alpha auf die MMP-9 Expression dokumentieren konnte, kein nachweisbarer Effekt von IL-1 beta auf die MMP-9 Expression. IL-1 beta kann neben dem proinflammatorisch wirksamen IL-1R1 auch an den antiinflammatorisch wirksamen IL-1R2 binden. Eine Studie zum IL-1R2 konnte zeigen, dass dieser die Expression von MMP-9 supprimiert. Guay et al. fanden heraus, dass Endometriumzellen mit einem Defizit an IL-1R2 erhöhte MMP-9 Sekretionswerte aufwiesen (Guay and Akoum, 2007).

Analysen zur Interaktion zwischen IL-6 und MMP-9 erbrachten ebenfalls interessante Ergebnisse. Kothari et al. konnten unter Einfluss von IL-6 erhöhte *MMP9* mRNA-Spiegel in Makrophagen nachweisen (Kothari et al., 2014). Eine weitere Studie zeigte in nasopharyngealen Karzinomzellen ebenfalls eine gesteigerte Expression von MMP-9 nach Stimulation durch IL-6 (Sun et al., 2014). Darüber hinaus konnte die Anwendung des IL6R-

Antikörpers Tocilizumab, der die Interaktion von IL-6 und IL6R neutralisiert, bei Patienten mit Takaysu-Arteriitis eine signifikante Reduktion von MMP-9 Spiegeln bewirken (Kong et al., 2018). Das gleiche konnte in einem in-vitro-Experiment mit humanen C28/I2-Chondrozyten beobachtet werden. Auch hier kam es durch Gabe von Tocilizumab und Blockade von IL6R zu einer reduzierten MMP-9 Produktion (Meszaros et al., 2015).

Legende

- ⊕ Stimulation
- △ Kein Einfluss
- ⊖ Inhibition

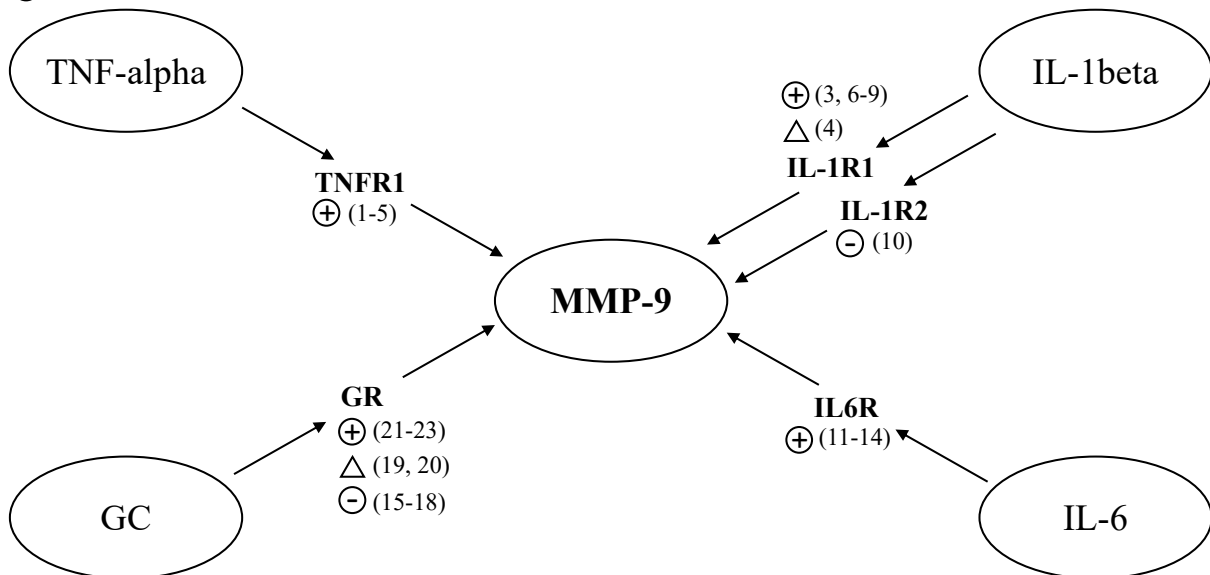


Abb. 1 MMP-9 und Regulatoren

Einfluss der HPA-Achse und der Interleukinrezeptoren IL-1R1, IL-1R2, IL6R und TNFR1 auf die MMP-9 Expression.

(1) (Sato et al., 1996), (2) (Partridge et al., 1993), (3) (Roh et al., 2000), (4) (Nee et al., 2004), (5) (Chattopadhyay et al., 2007), (6) (Vecil et al., 2000), (7) (Li et al., 2001), (8) (Librach et al., 1994), (9) (Girard et al., 2010), (10) (Guay and Akoum, 2007), (11) (Kothari et al., 2014), (12) (Sun et al., 2014), (13) (Kong et al., 2018), (14) (Meszaros et al., 2015), (15) (Wang et al., 2011), (16) (Forster et al., 2007), (17) (Mautino et al., 1997), (18) (Ram et al., 2006), (19) (Grzela et al., 2015), (20) (Cundall et al., 2003), (21) (Berker et al., 2010), (22) (Lutgendorf et al., 2008), (23) (Gelati et al., 2002).

Abkürzungen: IL-1 beta: Interleukin-1 beta; IL-6: Interleukin-6; TNF-alpha: Tumornekrosefaktor-alpha; GC: Glucocorticoide; IL-1R1: Interleukin-1 Rezeptor 1; IL-1R2: Interleukin-1 Rezeptor 2; IL6R: Interleukin-6 Rezeptor; TNFR1: Tumornekrosefaktor Rezeptor 1

1.2.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend soll MMP-9 im Rahmen dieser Arbeit aus zwei Gründen als möglicher Biomarker für die PTBS analysiert werden. Zum einen konnten Arbeitsgruppen bereits eine Assoziation des Enzyms mit anderen psychiatrischen Erkrankungen nachweisen (Domenici et al., 2010, Han et al., 2011, Lutgendorf et al., 2008, Rybakowski et al., 2009, Vafadari et al., 2016). Zum anderen wurde gezeigt, dass experimentell konditionierte Angsterfahrungen in

Ratten durch Inhibition von MMP-9 reduziert werden können (Bach et al., 2017). Nach zwei bereits veröffentlichten Studien (Lima et al., 2019, Yang and Jiang, 2020) ist dies erst die dritte Studie, die MMP-9 in PTBS-Patienten untersucht und als möglichen Biomarker für die Erkrankung in Erwägung zieht.

2 Zielsetzung

Für eine zuverlässigere Diagnostik der PTBS und eine Objektivierung des Therapieansprechens sind Biomarker erforderlich. Die Eignung der mRNA-Expression des Enzyms MMP-9 als ein solcher Biomarker soll im Rahmen dieser Arbeit evaluiert werden.

Zunächst wird die relative *MMP9* mRNA-Konzentration in Vollblutproben in zwei bereits publizierten Studienkohorten analysiert (Zaba et al., 2015, Schubert et al., 2018), in denen PTBS-Patienten und gesunde Kontrollprobanden entweder einem sozialen oder einem pharmakologischen Stressor ausgesetzt wurden. Hierdurch soll die Abhängigkeit der *MMP9* Konzentration von der Stresshormonregulation bzw. im Kontext von psychologischer und pharmakologischer Stressexposition untersucht sowie die durch die PTBS bedingten potentiellen Abweichungen der *MMP9* Expression erfasst werden. Zudem soll festgestellt werden, ob eine erfolgreich durchgeführte psychotherapeutische Behandlung die Expression des Enzyms beeinflussen kann. Daher werden die *MMP9* Expressionswerte in einer Patientensubgruppe der Studienkohorte unter pharmakologischem Stress vor und nach 12-wöchiger kognitiver Psychotherapie analysiert. Ergänzend werden die Expressionsniveaus von vier Regulatoren, nämlich vier Zytokinrezeptoren, vor und nach Psychotherapie betrachtet.

3 Material und Methoden

3.1 Bezugsnachweis

3.1.1 Chemikalien

Tab. 1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Isopropanol	Höfer Chemie GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
Aqua Bidest	C+V Pharma-Depot GmbH, Versmold, Deutschland
RNase AWAY® Decontamination Agent	Molecular BioProducts, San Diego, USA

3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenz / Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
PAXgene™ Blood RNA Tubes 2.5 ml	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz
PAXgene™ Blood RNA Kit	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz
Agilent™ RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Omniscript® RT Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pipettenspitzen (2-200 µl, 500-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Messpipetten Glas (5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml)	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes Quality™ (1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
384 Well PCR Platten	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
PCR Klebefolien	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

3.1.3 PCR Primer

Tab. 3 PCR Primer

Anmerkung: Sequenzen finden sich im Methodenteil, Kapitel 3.2.5.6.

Primer	Bezugsquelle
hMMP9	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg

hIL6R	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg
hIL1R1	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg
hIL1R2	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg
hTNFR1	Qiagen, Hilden, Deutschland
hGAPDH	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg

3.1.4 Geräte

Tab. 4 Geräte

Gerät	Hersteller
Pipetten Research® (0-2 µl, 2-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetus® Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Vortex Genie™ 2 Vortex Mixer	Scientific Industries Inc., New York, USA
IKA® Schüttler Vortex 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Eppendorf Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HLC MKR 13 KühlThermoMixer	Ditabis AG, Pforzheim, Deutschland
NanoPhotometer® Classic	Implen, München, Deutschland
2100 Agilent Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Tprofessional Standard Gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	Hofmann-LaRoche, Basel, Schweiz

3.1.5 Software

Tab. 5 Software

Software	Hersteller
Microsoft® Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SPSS® Statistical Software Package Version 24.0	SPSS Inc., Chicago, USA
GraphPad Prism Version 7	GraphPad Software, La Jolla, USA
LightCycler® 480 Software	Hofmann-LaRoche, Basel, Schweiz

3.2 Methoden

3.2.1 Fragebögen

Von den Kollegen/innen der Forschungsgruppe wurden die Studienprobanden der DST- und TSST-Kohorte mittels folgender Interviews und Fragebögen untersucht: DSM-IV Achse-I-psychiatrische Störungen und traumatische Ereignisse wurden mit dem Munich Composite International Diagnostic Interview (M-CIDI) (Wittchen and Pfister, 1997) erfasst. Die PTBS-Symptom-Intensität wurde mit der deutschen Version des Clinician Administered PTSD Scale Interview (CAPS) (Schnyder and Moergeli, 2002) quantifiziert. Die depressive Symptomatik wurde mit dem Beck Depression Inventory (BDI) (Hautzinger et al., 2006) erfragt. Zur Beurteilung von Angstsymptomatik wurde der State-Trait Anxiety Inventory I und II (STAI I/II) verwendet (Laux et al., 1981).

3.2.2 Studienpopulationen und Materialgewinnung

Voranzustellen ist, dass die Probengewinnung im Rahmen anderer Studien erfolgte (Zaba et al., 2015, Schubert et al., 2018). Die hier dargestellten molekularbiologischen Analysen, ihre statistische Auswertung, Interpretation und statistische Integration mit den ebenfalls im Rahmen der bereits publizierten Studien erhobenen psychometrischen Daten sind Gegenstand der hier vorliegenden Dissertation.

Für die molekularbiologischen Experimente wurden Vollblutproben zweier Studienpopulationen verwendet: der TSST-Kohorte und der DST-Kohorte (Zaba et al., 2015, Schubert et al., 2018). Beide Studien wurden in der Traumaambulanz des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie unter der Leitung von Frau Dr. Ulrike Schmidt durchgeführt und durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt, wie in den entsprechenden Publikationen (Zaba et al., 2015, Schubert et al., 2018) ebenfalls bereits dargestellt wurde. Nach Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien (Tab. 6 und Tab. 7) wurde von allen Teilnehmern eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

3.2.3 Trier Social Stress Test (TSST) - Kohorte

Die hier verwendete Stichprobe umfasst eine Teilstichprobe der in Zaba et al. (Zaba et al., 2015) publizierten und von ihr und Kollegen/innen der Forschungsgruppe rekrutierten Kohorte: In der hier vorliegenden Arbeit wurden 21 weibliche kaukasische PTBS-Patientinnen und 11 gleichaltrige (± 2 Jahre) kaukasische Kontrollprobanden (9 Frauen, 2 Männer) untersucht. Im Rahmen der Basisuntersuchung wurde eine vollständige Anamnese und umfangreiche Blutuntersuchung von allen Teilnehmern durchgeführt. Alle Teilnehmer waren körperlich gesund und nahmen weder Alkohol noch Drogen ein. Eine mindestens moderate Intensität des PTBS-Syndroms mit einem CAPS-Score von > 45 (Schnyder and Moergeli, 2002) war das primäre Einschlusskriterium für alle Patienten. Eine vollständige Ausführung der Ein- und

Ausschlusskriterien findet sich in Tab. 6. Traumatische DSM-IV-Ereignisse vor dem 17. Lebensjahr wurden als frühes Trauma (*engl. Early life trauma*, ELT) klassifiziert. Die ovarielle Zyklusphase von Patientinnen und Probandinnen, die keine Kontrazeptiva einnahmen oder sich in der Menopause befanden, wurde rechnerisch ab dem ersten Tag der Menstruation bestimmt und in follikuläre Phase, Ovulation und Lutealphase differenziert.

Im Rahmen des TSST, der gemäß Kirschbaum et al. (Kirschbaum et al., 1993) nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt wurde, waren die Studienteilnehmer einem definierten psychosozialen Stressor ausgesetzt. Der TSST besteht aus einer Vorlaufphase, einer Stress-Erholungsphase und der Stressexpositionsphase von 10 min. In der Stressexpositionsphase nehmen die Teilnehmer an einem Interviewgespräch mit einer bewusst emotional neutral erscheinenden Jury teil. Sie müssen in stehender Position eine freie Rede halten, Fragen beantworten und Rechenaufgaben lösen. Dabei gibt die Jury weder positive noch negative emotionale Rückmeldung auf die Antworten oder das Verhalten der Probanden. Blut wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten aus der Kubitalvene mittels Katheter entnommen: 30 Minuten vor (13.30 Uhr), 10 Minuten nach (14.10 Uhr), 35 Minuten nach (14.35 Uhr) und 75 Minuten nach (15.15 Uhr) Exposition mit dem sozialen Stressor.

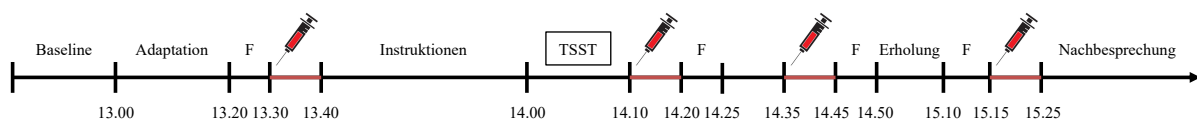


Abb. 2 Versuchsablauf TSST in Anlehnung an Zaba et al. 2015

Anmerkung. Abkürzungen: TSST: Trier Social Stress Test; F: Fragebögen.

Tab. 6 Einschluss- und Ausschlusskriterien der TSST-Kohorte in Anlehnung an Zaba et al. 2015

	Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
PTBS-Patienten und Kontrollprobanden	Schriftliche Einwilligung	Aktueller Substanzmissbrauch
	Alter 17 – 70 Jahre	Aktuelle oder chronische somatische Erkrankung
		Z.n. Krebserkrankung
		Schichtarbeit

		Transatlantischer Flug innerhalb von 6 Wochen vor Versuchsbeginn
		Akute Suizidalität
		<u>Frauen:</u>
		Schwangerschaft
		Stillzeit
		Kontrazeptivaeinnahme
Nur PTBS-Patienten	CAPS-Score > 40	Schizophrenie
Nur Kontrollprobanden		Akute oder vorangegangene psychiatrische Erkrankung
		Medikamenteneinnahme

3.2.4 Dexamethason-Suppressionstest (DST) - Kohorte

Die hier verwendete Stichprobe stellt eine Teilstichprobe der von Schubert et al. (Schubert et al., 2018) publizierten und von ihr und Kollegen/innen der Forschungsgruppe rekrutierten Kohorte dar: Die hier untersuchte DST-Studienkohorte umfasste 19 weibliche kaukasische PTBS-Patientinnen zu Beginn einer traumafokussierten Psychotherapie (Schmidt, 2010) und 13 weibliche kaukasische Kontrollprobanden. Ein CAPS-Score von > 40 war das primäre Einschlusskriterium für alle Patienten. Eine vollständige Darstellung der Ein- und Ausschlusskriterien findet sich in Tab. 7. Traumatische DSM-IV-Ereignisse, die vor dem 17. Lebensjahr aufgetreten waren, wurden als frühes Trauma (*engl. Early life trauma*, ELT) klassifiziert. Alle Teilnehmer waren zum Untersuchungszeitpunkt körperlich gesund und nahmen keine Drogen oder Alkohol. Die ovarielle Zyklusphase von Patientinnen und Probandinnen, die keine Kontrazeptiva einnahmen oder sich in der Menopause befanden, wurde rechnerisch ab dem ersten Tag der Menstruation bestimmt und in follikuläre Phase, Lutealphase und Ovulation differenziert. Eine Teilstichprobe von 10 PTBS-Patientinnen der DST-Patienten-Kohorte wurde anhand des Kriteriums „Abwesenheit von Veränderungen bei der medikamentösen Behandlung während des Beurteilungszeitraums“ ausgewählt und ergänzend untersucht. In dieser Untersuchung wurden die Patientinnen vor und nach 12 wöchentlichen Sitzungen mit traumafokussierter kognitiver Verhaltenspsychotherapie evaluiert sowie mit 13 gesunden Kontrollprobanden verglichen.

PTBS-Patientinnen und Kontrollprobanden nahmen nicht später als zwei Wochen nach der Basisuntersuchung am DST teil. Es wurde das Studienprotokoll von Menke et al. (Menke et al., 2014) verwendet. Nach der oralen Einnahme von 1.5 mg Dexamethason, das als pharmakologischer Stressor fungiert, wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten mittels Katheter

Blut aus der Kubitalvene entnommen: um 18.00 Uhr und 20.30 Uhr des Einnahmetages sowie um 15.00 Uhr und 16.30 Uhr des Folgetages.

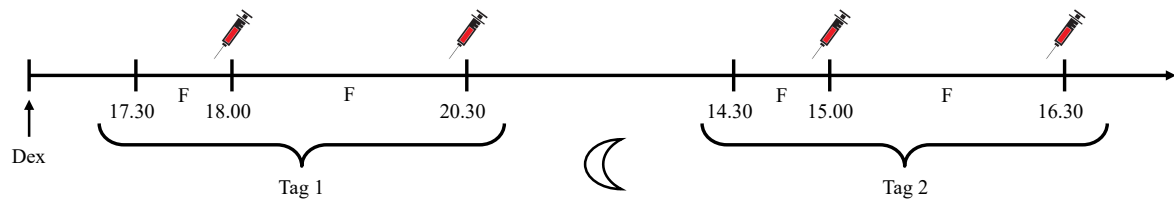


Abb. 3 Versuchsablauf DST in Anlehnung an Schubert et al. 2018

Anmerkung. Abkürzungen: Dex: Dexamethason; F: Fragebögen.

Tab. 7 Einschluss- und Ausschlusskriterien der DST-Kohorte in Anlehnung an Schubert et al. 2018

	Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
PTBS-Patienten und Kontrollprobanden	Schriftliche Einwilligung	Aktuelle oder vergangene komorbide psychiatrische Erkrankung
	Alter 18 – 70 Jahre	Akute oder chronische somatische Erkrankung
		Schichtarbeit
		Transatlantischer Flug innerhalb von 6 Wochen vor Versuchsbeginn
		Frauen: Schwangerschaft
Nur PTBS-Patienten	CAPS-Score > 45	Akute Suizidalität

3.2.5 Molekularbiologische Methoden

3.2.5.1 Arbeiten mit Ribonukleinsäure

Ribonukleinsäure-(RNA) Proben zur Analyse der Expression von *MMP9*, *IL1R1*, *IL1R2*, *IL6R* und *TNFR1* wurden in 2.5 ml PAXgene Blood RNA[™] Röhrchen bis unmittelbar vor Versuchsbeginn bei -80°C gelagert.

Wegen der hohen Anfälligkeit der RNA gegenüber enzymatischem Abbau durch RNasen wurde auf die Verwendung von RNase-freien Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräten geachtet. Oberflächen wurden mit RNase AWAY® Decontamination Agent behandelt.

3.2.5.2 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des PAXgene[™] Blood RNA Kit gemäß den Herstellerangaben extrahiert (Hombrechtikon, Schweiz). Vor Beginn der Isolation wurden die PAXgene[™] Blood RNA Tubes und die Kit Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Die RNA wurde im Anschluss an die Extraktion bei -80°C gelagert.

3.2.5.3 Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe des NanoPhotometer® Classic (München, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Nach Kalibrierung mit RNase-freiem Wasser wurden je 4 µl RNA-Lösung zur Analyse aufgetragen. In einem spektrophotometrischen Verfahren wurde durch das Gerät die Optical Density (OD) einer Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Anhand der OD wurde die Konzentration enthaltener RNA ermittelt.

3.2.5.4 Messung der RNA-Integrität

Um verlässliche Expressionsergebnisse in der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) zu erhalten, wurde die Qualität der isolierten RNA überprüft. Die Qualität wurde über die RNA-Integritätszahl (RIN) definiert und mit Hilfe des 2100 Agilent Bioanalyzer und Agilent RNA 6000 Nano Kit (Santa Clara, USA) gemäß des Herstellerprotokolls erfasst. In einer automatisierten Kapillar-Elektrophorese durch Lab-on-Chip-Technologie wurden die einzelnen Fraktionen der RNA, die mRNA und andere RNA Fragmente der Größe nach getrennt und in Form eines Elektropherogramms als virtuelles Gelbild visualisiert. Der vom Gerät errechnete RIN Wert lag zwischen 1 und 10. Ein RIN Wert von 10 entsprach einer intakten, nicht degradierten und qualitativ hochwertigen RNA. Bei einem Wert von 1 war die RNA komplett degradiert und damit unbrauchbar (Schroeder et al., 2006). Es wurden ausschließlich Proben mit einem RIN-Wert > 7.5 zur weiteren Verarbeitung genutzt.

3.2.5.5 Reverse Transkription

Zur Expressionsanalyse mittels PCR musste die isolierte mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben werden. Ein Oligo-dT Nukleotid, das an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet, diente als Primer. Ausgehend von dieser Sequenz wurde durch die Reverse Transkriptase ein zur mRNA komplementärer cDNA Strang ergänzt. Der noch hybridisierte RNA-Strang wurde durch das Enzym RNase H degradiert. Für die Transkription wurde das Omniscript® RT Kit (Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

3.2.5.6 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion

Die quantitative Echtzeit-PCR (*engl. quantitative real-time PCR*) hat gegenüber der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion den Vorteil, dass sich die gewonnene DNA in

Echtzeit, d.h. während des Laufes, quantifizieren lässt. Ein beigemischter Farbstoff, hier SYBR[™]Green, bindet an entstandene DNA-Produkte, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht. Durch Messung dieses Signals wird die Amplifikation der DNA in jedem Zyklus in Echtzeit registriert. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der entstandenen DNA-Produkte zu. Der vom Gerät ermittelte Ct Wert (*engl. cycle threshold*) beschreibt den Zyklus, an dem die durch spezifische DNA-Produkte erzeugte Fluoreszenz erstmals signifikant die Fluoreszenz im Hintergrund übersteigt. Die Expression des Zielgens wurde durch den Vergleich mit der Expression eines Referenzgens, hier Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), relativ quantifiziert. Hierzu wurde zunächst der Mittelwert der Ct-Werte der Doppelbestimmungen (Δ Ct) berechnet. Der Δ Ct-Wert des zu betrachtenden Gens wurde dann über eine exponentielle Funktion in Bezug zum Δ Ct-Wert des Referenzgens gesetzt. Die Formel hierzu lautete:

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-(\Delta Ct (\text{Analysegen}) - \Delta Ct (\text{Referenzgen}))}$$

Durch eine anschließende Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezifität der PCR überprüft. Doppelsträngige DNA spezifischer PCR-Produkte hat einen höheren Schmelzpunkt und kann so von unspezifisch entstandenen Bindungen mit niedrigerem Schmelzpunkt unterschieden werden.

Für die Bestimmung der Expression von *MMP9*, *IL6R* und *TNFR1* wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt. Die Proben zur Quantifizierung von *IL1R1* und *IL1R2* wurden in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Das Verdünnungsschema der Proben ist in Tab. 8 dargestellt. Die Sequenzen und Verdünnungen der verwendeten Primer finden sich in Tab. 9.

Tab. 8 Verdünnungsschema der PCR Proben

Verdünnung	cDNA	H2o
1:10	10 µl	90 µl H2o
1:100	10 µl der 1:10 Verdünnung	90 µl H2o
1:500	10 µl der 1:100 Verdünnung	90 µl H2o

Tab. 9 Sequenzen und Verdünnung der PCR Primer

Primer (5' – 3')	Forward Sequenz	Reverse Sequenz	Bezugsquelle	Verdünnung
hMMP9	TTGACAGCGACA AGAAGTGG	CCCTCAGTGAAGCG GTACAT	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg	hMMP9fw/hMMP9rev: 1:10
hIL6R	ATTGCCATTGTTC TGAGGT (19)	TAGTCTGTATTGCTG ATGTC (20)	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg	hIL6Rfw/ hIL6Rrev: 1:20

hIL1R1	AGAGGAAAACAA CTGGCCGGTGACAT ACCCACAAGG TACAGAT (21) (22)	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg	hIL1R1fw/ hIL1R1rev: 1:20
hIL1R2	TGGCACCTACGT TTGCGGGTATGAGA CTGCACTACT (22) TGAACG (20)	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg	hIL1R2fw/ hIL1R2rev: 1:20
hTNFR1	TNFRSF1A RefSeq Accession No. NM_001065.3	Qiagen, Hilden, Deutschland	TNFRSF1A: 1:10
hGAPDH	AATGAAGGGGTCAA AAGGTGAAGGTCGGA TTGATGG (20) GTCAA (20)	Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg	hGAPDHfw/ hGAPDHrev: 1:20

Als Master Mix wurde je 1 µl forward-Primer, 1 µl reverse-Primer, 1 µl H₂O und 5 µl SYBR[™]Green Farbstoff zusammengegeben. In die Vertiefungen der 384-Well PCR-Platte wurden je 8 µl dieses Master Mix vorgelegt. Anschließend wurden je 2 µl cDNA bzw. H₂O als Negativkontrolle hinzugegeben. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung angelegt. Eine Verdünnungsreihe von 1:10 - 1:100 - 1:500 für *MMP9*, *IL6R*, *TNFR1* und 1:10 - 1:50 - 1:100 für *IL1R1* und *IL1R2* fungierte als Standard. Die PCR wurde anschließend mit dem LightCycler® 480 Real-Time PCR System von Roche (Basel, Schweiz) durchgeführt und mit der LightCycler® 480 Software ausgewertet. Die einzelnen Schritte des PCR Programms sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10 PCR Programm des Lightcycler® 480 Systems

	Dauer	Zyklen	Temperatur
Präinkubation	10 min	1	95 ° C
Amplifikation	10 sec	45	95 ° C
	30 sec		60 ° C
Schmelzkurve	01 sec	1	95 ° C
	10 sec		50 ° C
Kühlung	30 sec	1	40 ° C

3.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das SPSS® Statistical Software Package Version 24.0 (Chicago, USA) verwendet.

Gruppenunterschiede in der deskriptiven Statistik zwischen PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (separate one-way ANOVA) für metrische Variablen oder mittels Chi-Quadrat-Test (separate two-tailed Chi-squared test) für nominale Variablen berechnet. Gruppenunterschiede für metrische Variablen zwischen PTBS-Patientinnen zu Therapiebeginn und im Therapieverlauf wurden mittels abhängigem T-Test (paired t-test) berechnet. Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik wurden mittels absoluter Häufigkeit sowie Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. In der anschließenden Statistik wurde zunächst die Normalverteilung der Daten graphisch anhand eines Histogramms und rechnerisch mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Alle Daten mit Ausnahme der *IL1R2*-Daten im TSST-Experiment zum ersten und zweiten Zeitpunkt sowie im DST-Experiment bei Patienten zu Beginn der Therapie im zweiten Zeitpunkt waren normalverteilt. Die Ergebnisse der anschließenden Statistik wurden in Form des Mittelwertes und des Standardfehlers des Mittelwertes dargestellt. Ausreißer wurden vorab mit dem Grubbs-Test (Signifikanzlevel $p < 0.05$) identifiziert, von den Analysen ausgeschlossen und in den Legenden der Abbildungen 4 und 5 vermerkt. Gruppenunterschiede in der Genexpression zwischen PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden sowie zwischen PTBS-Patientinnen vor und während Therapie wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholungen (separate two-way ANOVA with repeated measures) berechnet. Bei Verletzung der Sphärizität wurden Greenhouse-Geisser-Korrekturen angewendet. Korrelationen zwischen Variablen wurden bei normalverteilten Daten mittels Pearson-Korrelationen berechnet. Die Stärke der Korrelation wurde nach Cohen et al. bewertet (Cohen, 1988).

4 Ergebnisse

4.1 Demographische Charakteristika der Studienpopulationen

4.1.1 TSST-Kohorte

Die aufgeführte TSST-Kohorte ist eine Teilstichprobe der in Zaba et al. publizierten Stichprobe. Für letztere wurden die hier gezeigten Werte bereits publiziert (Zaba et al., 2015). Da sich in dieser Teilstichprobe Abweichungen ergeben, wurden die Daten erneut berechnet (Tab. 11)

Insgesamt wurden 21 weibliche PTBS-Patientinnen mit 11 gesunden altersadjustierten Kontrollprobanden verglichen, hierunter 9 Frauen und 2 Männer. Anhand von Fragebögen (s. Material und Methoden Kapitel 3.2.1) wurden die psychiatrischen Komorbiditäten Depression, Angststörung und Suchterkrankungen, die depressive Symptomatik, die Angstsymptomatik und die Schwere des PTBS-Syndroms von Kollegen/innen der Forschungsgruppe erhoben. PTBS-Patientinnen zeigten ein schweres DSM-IV PTBS-Syndrom mit einem durchschnittlichen CAPS-Score von 73 Punkten. Dieses war in 71,4% der Fälle auf ein sexuelles Trauma zurückzuführen. 80,9% der Patientinnen wurden zum Untersuchungszeitpunkt medikamentös behandelt. Die Kontrollprobanden nahmen keine Medikamente und berichteten von keinem aktuellen oder stattgehabten traumatischen Ereignis. Sie wiesen auch keine sonstigen psychiatrischen Komorbiditäten auf.

Tab. 11 Demographische und klinische Charakteristika der TSST-Kohorte

Traumatische Ereignisse und DSM-IV Achse-I Erkrankungen wurden mit dem Munich Composite International Diagnostic Interview (M-CIDI) erfasst. Gruppenunterschiede zwischen PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden wurden mit (1) einer einfaktoriellen Varianzanalyse (separate one-way ANOVA) (F) oder (2) mittels Chi-Quadrat-Test (separate two-tailed Chi-squared test) (χ^2) berechnet. Fehlende Werte wurden zugehörig für die jeweilige Gruppe mit (n = x) vermerkt. Statistisch signifikante Resultate: *t, $p \leq 0.1$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. Abkürzungen: PTBS: posttraumatische Belastungsstörung; SD: Standardabweichung; BDI: Beck Depression Inventory; STAI: State-Trait Anxiety Inventory; CAPS: Clinician-Administered PTSD Scale.

	Patienten (n = 21) Mean $\pm$ SD	Kontroll- probanden (n = 11) Mean $\pm$ SD	F Wert/ χ^2
Alter (Jahre)	39.57 $\pm$ 11.25	39.36 $\pm$ 11.88	0.002 ¹
Geschlecht (weiblich/ männlich)	21/0	9/2	4.073 ^{*2}
Medikation (keine/ Antidepressiva/ Benzodiazepine/ Kombination)	4/9/1/7	10/0/0/0 (n=1)	17.93 ^{***2}
Trauma (keines/ frühes Trauma/ Trauma im Erwachsenenalter/ beides)	0/5/10/6	11/0/0/0	32.00 ^{***2}

Traumatyp (keine/ sexuell/ nicht-sexuell/ beides)	0/15/5/1	11/0/0/0	32.00 ^{***2}
Raucher (ja/ nein)	9/12	2/9	1.948 ²
Ovarielle Zyklusphase (follikulär/ luteal/ menopausal/ Ovulation/ Kontrazeption)	6/4/0/11/0	5/2/0/0/0 (n=4)	6.343 ^{*2}
Komorbidität Depression (keine/ aktuelle/ vergangene)	11/6/4	11/0/0	7.619 ^{*2}
Komorbidität Angststörung (keine/ aktuelle/ vergangene)	5/15/1	11/0/0	16.762 ^{***2}
Komorbidität Suchterkrankung (keine/ Missbrauch/ Abhängigkeit)	14/2/5	11/0/0	4.69 ^{t2}
Depression (BDI)	18.00 ± 8.45	2.18 ± 3.31	35.24 ^{***1}
Anxiety Trait (STAI I)	51.86 ± 10.90	33.27 ± 6.00	27.33 ^{***1}
Anxiety State (STAI II)	57.00 ± 10.35	31.36 ± 7.70	52.05 ^{***1}
PTBS Symptome (CAPS Gesamt Score)	73.00 ± 17.00	-	-
CAPS Subskalen			
Wiedererleben	23.86 ± 7.84	-	-
Vermeidung	26.14 ± 10.96	-	-
Hyperarousal (nervöse Übererregbarkeit)	22.19 ± 6.76	-	-

4.1.2 DST-Kohorte

Die hier gezeigte Kohorte ist eine Teilstichprobe der in Schubert et al. publizierten Stichprobe. Für letztere wurden die hier präsentierten Werte bereits publiziert (Schubert et al., 2018). Da sich in der hier verwendeten Teilstichprobe Abweichungen ergeben, wurden diese Daten erneut berechnet (Tab. 12).

Die DST-Kohorte umfasste 19 weibliche PTBS-Patientinnen zu Beginn einer psychotherapeutischen Behandlung und 13 gesunde weibliche altersadjustierte Kontrollprobanden. Alle PTBS-Patientinnen berichteten von einem traumatischen Ereignis gemäß der DSM-IV Diagnosekriterien (APA, 1994). 42,1% erlitten ein sexuelles Trauma, 47,3% ein frühes Trauma (vor dem 17. Lebensjahr) und 47,3% ein frühes Trauma kombiniert mit einem Trauma im Erwachsenenalter. 57,9% der Patientinnen standen unter medikamentöser Behandlung mit Antidepressiva oder Benzodiazepinen. Zu Beginn der Therapie wiesen PTBS-Patientinnen einen durchschnittlichen Gesamt-CAPS-Wert von 76 auf, der ein schweres DSM-IV-PTSD-Syndrom widerspiegelt. Der Chi-Quadrat-Test ergab keine signifikanten Unterschiede im Raucherstatus oder der ovariellen Zyklusphase zwischen beiden Gruppen. Daher wurden in die Analysen keine Kovariaten eingeschlossen.

Tab. 12 Demographische und klinische Charakteristika der DST-Kohorte

Traumatische Ereignisse und DSM-IV Achse-I Erkrankungen wurden mit dem Munich Composite International Diagnostic Interview (M-CIDI) erfasst. Gruppenunterschiede zwischen PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden wurden mit (1) einer einfaktoriellen Varianzanalyse (separate one-way ANOVA) (F) oder (2) mittels Chi-Quadrat-Test (separate two-tailed Chi-squared test) (χ^2) berechnet. Fehlende Werte wurden zugehörig für die jeweilige Gruppe mit (n=x) vermerkt. Statistisch signifikante Resultate: *t, $p \leq 0.1$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. Abkürzungen: PTBS: posttraumatische Belastungsstörung; SD: Standardabweichung; BDI: Beck Depression Inventory; STAI: State-Trait Anxiety Inventory; CAPS: Clinician-Administered PTSD Scale.

	Patienten zu Beginn der Therapie (n = 19) Mean $\pm$ SD	Kontroll- probanden (n = 13) Mean $\pm$ SD	F value/ χ^2
Alter (Jahre)	37.89 $\pm$ 10.83	38.85 $\pm$ 12.92	0.05 ¹
Geschlecht (weiblich/ männlich)	19/0	13/0	-
Medikation (keine/ Antidepressiva/ Benzodiazepine/ Kombination)	8/3/0/8	13/0/0/0	11.47 ^{**1}
Trauma (keines/ frühes Trauma/ Trauma im Erwachsenenalter/ beides)	0/9/1/9	13/0/0/0	32.00 ^{***2}
Traumatyp (keine/ sexuell/ non-sexuell/ beides)	0/8/3/8	13/0/0/0	32.00 ^{***2}
Raucher (ja/ nein)	10/9	3/10	2.80 ^{t2}
Ovarielle Zyklusphase (follikulär/ luteal/ menopausal/ Ovulation/ Kontrazeption)	2/3/2/1/7 (n=4)	3/2/3/2/3	5.61 ²
Komorbidität Depression (keine/ aktuelle/ vergangene)	6/11/2	13/0/0	14.98 ^{**2}
Komorbidität Angststörung (keine/ aktuelle/ vergangene)	5/13/1	13/0/0	17.03 ^{***2}
Komorbidität Suchterkrankung (keine/ Missbrauch/ Abhängigkeit)	19/0/0	13/0/0	-
Depression (BDI)	25.48 $\pm$ 12.25	2.31 $\pm$ 2.75	44.53 ^{***1}
Anxiety Trait (STAI I)	58.42 $\pm$ 12.95	44.67 $\pm$ 4.38	12.50 ^{***1}
PTBS Symptome (CAPS Gesamt Score wöchentlich)	76.00 $\pm$ 16.00	-	
CAPS Subskalen			
Wiedererleben	26.50 $\pm$ 5.89	-	
Vermeidung	26.22 $\pm$ 8.84	-	
Hyperarousal (nervöse Übererregbarkeit)	20.61 $\pm$ 6.33	-	

Die Teilstichprobe der oben beschriebenen DST-Kohorte, die in der folgenden Tabelle beschrieben wird, wurde anhand des Kriteriums "Abwesenheit von Veränderungen bei der

medikamentösen Behandlung während des Beurteilungszeitraums" ausgewählt. Sie ist ebenfalls eine Teilstichprobe der in Schubert et al. publizierten Stichprobe. Für letztere wurden die hier berechneten Werte bereits publiziert (Schubert et al., 2018). Da sich in der hier verwendeten Teilstichprobe Abweichungen ergeben, wurden diese Daten erneut berechnet (Tab. 13).

Es wurden 10 der PTBS-Patientinnen vor und nach 12 wöchentlichen Sitzungen mit traumafokussierter kognitiver Verhaltenspsychotherapie verglichen (Schmidt, 2010). Als Referenzgruppe wurden zudem 13 gesunde Kontrollprobanden in die Beobachtung eingeschlossen. Die Gesamt-PTBS-Symptomatik verbesserte sich im zwölfwöchigen Beobachtungsintervall unter Psychotherapie deutlich. Dies war an der Abnahme des CAPS-Gesamt-Scores von 74 auf 47 Punkte ersichtlich. Hierbei zeigten sich vor allem das Wiedererleben von Traumainhalten und das Vermeidungsverhalten rückläufig. Die nervöse Übererregbarkeit verbesserte sich nicht signifikant (Tab. 13).

Tab. 13 Demographische und klinische Charakteristika der Teilstichprobe der prä-post Therapie DST-Kohorte

Traumatische Ereignisse und DSM-IV Achse-I Erkrankungen wurden mit dem Munich Composite International Diagnostic Interview (M-CIDI) erfasst. Gruppenunterschiede zwischen PTBS-Patientinnen vor und nach 12 Therapiesitzungen wurden mit (1) einem abhängigen T-test für verbundene Stichproben (paired two-sample t-test) (T) oder (2) mittels Chi-Quadrat-Test (separate two-tailed Chi-squared tests) (χ^2) berechnet. Fehlende Werte wurden zugehörig für die jeweilige Gruppe mit (n=x) vermerkt. Statistisch signifikante Resultate: *t, $p \leq 0.1$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. Abkürzungen: PTBS: posttraumatische Belastungsstörung; SD: Standardabweichung; BDI: Beck Depression Inventory; STAI: State-Trait Anxiety Inventory; CAPS: Clinician-Administered PTSD Scale.

	Patienten zu Beginn der Therapie (n = 10) Mean $\pm$ SD	Patienten nach 12 Therapiesitzungen (n = 10) Mean $\pm$ SD	T value/ χ^2
Alter (Jahre)	37.50 $\pm$ 12.65	38.00 $\pm$ 12.48	-
Geschlecht (weiblich/ männlich)	10/0	10/0	-
Medikation (keine/ Antidepressiva/ Benzodiazepine/ Kombination)	6/1/0/3	6/1/0/3	-
Trauma (keines/ frühes Trauma/ Trauma im Erwachsenenalter/ beides)	0/5/0/5	0/5/0/5	-
Traumotyp (keine/ sexuell/ non-sexuell/ beides)	0/4/2/4	0/4/2/4	-
Raucher (ja/ nein)	4/6	3/7	0.22 ²
Ovarielle Zyklusphase (follikulär/ luteal/ menopausal/ Ovulation/ Kontrazeption)	2/1/1/0/5 (n=1)	3/0/2/1/4	3.64 ²
Depression (BDI)	22.70 $\pm$ 12.67	19.70 $\pm$ 14.14	1.65 ¹

PTBS Symptome (CAPS Gesamt Score wöchentlich)	73.00 ± 16.00	47.00 ± 28.00	2.77* ¹
CAPS Subskalen			
Wiedererleben	25.10 ± 6.79	17.30 ± 10.11	2.49* ¹
Vermeidung	28.00 ± 10.08	20.70 ± 11.30	1.75 ¹
Hyperarousal (nervöse Übererregbarkeit)	19.40 ± 4.33	25.40 ± 27.18	-0.72 ¹

4.2 Molekularbiologische Ergebnisse

4.2.1 Stressmodulation der *MMP9* Expression in PTBS-Patienten in Ruhe und im Therapieverlauf vs. in gesunden Kontrollprobanden

Die Analyse der *MMP9* mRNA-Expression in der TSST-Kohorte ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden, weder zu Beginn (13.30h), noch unmittelbar nach der TSST-Exposition (14.10h - 15.15h) (Abb. 4A). Dementsprechend fand sich kein statistisch signifikanter Haupteffekt „Gruppe“ ($F(1, 27) = 0.46, p < 0.501$). Auch ein signifikanter Haupteffekt „Zeit“ ließ sich nicht nachweisen ($F(2.04, 54.97) = 2.16, p < 0.125$). Die *MMP9* Expression blieb über die Versuchsdauer von 1h und 45 min in beiden Gruppen weitestgehend unverändert. Um die Expression über einen längeren Zeitraum zu erfassen und einen anderen Stressor zu testen, wurden die Untersuchungen der DST-Kohorte angeschlossen.

In der DST-Kohorte ergab der Vergleich der *MMP9* mRNA-Ausgangswerte (18.00h), d.h. vor Dexamethasongabe, entsprechend der TSST-Studie keine Unterschiede zwischen PTBS-Patientinnen und Kontrollprobanden (Abb. 4B). Darüber hinaus wiesen Patientinnen nach erfolgreicher Psychotherapie keine signifikanten Unterschiede in den basalen *MMP9* Expressionswerten verglichen zu vor Therapie auf. Die Behandlung hatte folglich keinen Effekt auf die basale *MMP9* Expression (Abb. 4C).

Im Verlauf des DST zeigten sich jedoch Veränderungen. Es konnte eine deutliche Reaktion der *MMP9* Expression auf die Gabe von 1.5 mg Dexamethason bei PTBS-Patientinnen festgestellt werden: Von 18.00 Uhr bis 20.30 Uhr des ersten Tages, d.h. 2.5 Stunden nach der Gabe, kam es zu einem signifikanten Anstieg der *MMP9* mRNA-Spiegel in der PTBS-Patientengruppe (Abb. 4B, 1800h-2030h, $p < 0.015$). Über Nacht, von 20.30 Uhr bis 15.00 Uhr des Folgetages, fielen die Expressionswerte wieder ab (Abb. 4B, 2030h-1500h, $p < 0.036$, 1500h-1630h, $p < 0.097$) und blieben im Vergleich zum Ausgangsniveau leicht erhöht. Dementsprechend gab es einen signifikanten Haupteffekt „Zeit“ (Abb. 4B $F(1.58, 34.81) = 11.19, p < 0.000$). Auch für die Untersuchung der Teilstichprobe ergab sich ein signifikanter Haupteffekt „Zeit“ (Abb. 4C $F(1.50, 35.89) = 16.74, p < 0.000$). Während die 10 PTBS-Patientinnen der Teilstichprobe zu Beginn der Therapie einen signifikanten Anstieg in ihren *MMP9* Expressionswerten zeigten (Abb. 4C, 1800h-2030h, $p < 0.008$), verlor dieser post-Dexamethason-Anstieg nach

zwölfwöchiger Psychotherapie seine statistische Signifikanz (Abb. 4C, 1800h-2030h, $p < 0.101$). Die Expressionswerte verliefen nun ähnlich derer gesunder Kontrollprobanden.

Nicht nur im zeitlichen Verlauf, sondern auch im Gruppenvergleich konnten interessante Beobachtungen gemacht werden. Die Konzentration der *MMP9* mRNA war um 15.00 Uhr des zweiten Tages bei PTBS-Patientinnen gegenüber Kontrollprobanden erhöht. Statistisch zeigte sich ein Trend im Bonferroni Post-Hoc-Wert (Abb. 4B, 1500h, $p < 0.75$). Im Gruppenvergleich der Teilstichprobe fand sich ein signifikanter Haupteffekt „Gruppe“ (Abb. 4B, $F(2, 24) = 3,91$, $p < 0.034$) mit erhöhten *MMP9* Spiegeln der PTBS-Patientinnen gegenüber Kontrollprobanden um 15.00 Uhr und 16.30 Uhr (Abb. 4B, 1500h, $p < 0.016$; 1600h, $p < 0.020$). Dieser Unterschied verlor seine statistische Signifikanz mit der Teilremission des PTBS-Syndroms nach 12-wöchiger Therapie (Abb. 4C, 1500h, $p < 0.277$; 1600h, $p < 0.874$). Die *MMP9* Expressionswerte der Patientinnen kehrten auf das Niveau gesunder Kontrollprobanden zurück.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die orale Gabe von 1.5 mg Dexamethason eine periphere *MMP9* Hyperexpression bei PTBS-Patientinnen, aber nicht bei gesunden Kontrollprobanden induzierte, die sich unter erfolgreicher Psychotherapie zurückbildete.

Ergänzend durchgeführte Korrelationsanalysen zur *MMP9* Expression und den psychopathologischen Daten der PTBS-Patienten der DST-Kohorte zeigten keine signifikanten Korrelationen (Tab. 14).

Legende:

- PTSD Patienten zu Beginn der Therapie (PTSD-start)
- - - PTSD Patienten nach 12 Therapiesitzungen (PTSD-mid-treatment)
- Gesunde Kontrollprobanden (HC)

Zwischen Gruppen:

PTSD-start vs. HC: * $t, p \leq 0.1$; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

ns: nicht signifikant

Zwischen Zeitpunkten der Analyse:

† $t, p \leq 0.1$; † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$

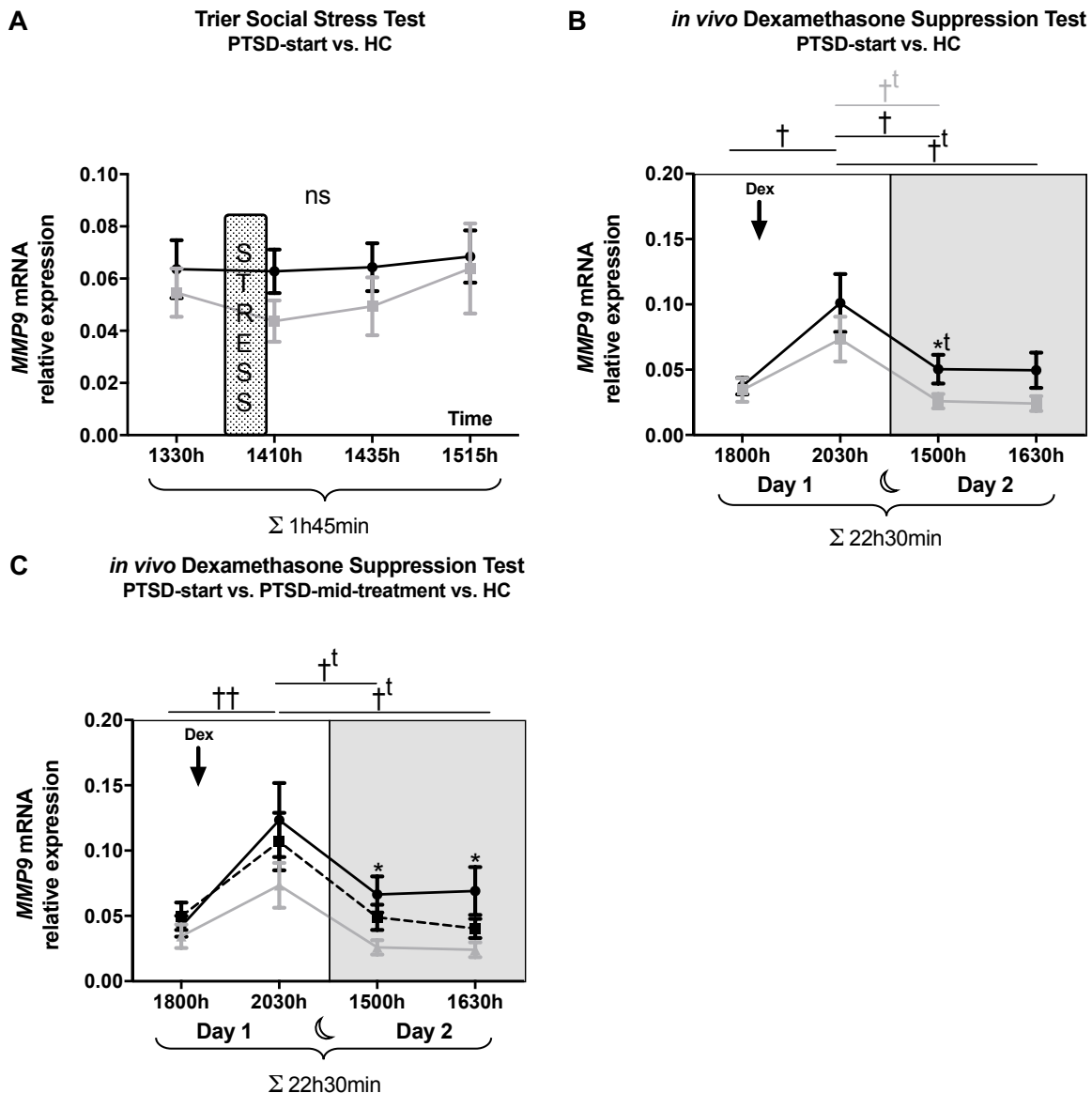


Abb. 4 *MMP9* Expression in PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden während des TSST und DST

Gezeigt sind die *MMP9* mRNA-Konzentrationen im Vollblut in Relation zu Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA-Konzentrationen, erfasst mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR), in (A) 21 weiblichen PTBS-Patientinnen und in 11 altersadjustierten gesunden Kontrollprobanden (9 Frauen, 2 Männer) im Rahmen des Trier Social Stress Test (TSST). Die Vollblut-*MMP9* mRNA-Konzentrationen nach Gabe von 1.5 mg Dexamethason im Rahmen des Dexamethason-Suppressionstests (DST) wurden in (B) einer unabhängigen Kohorte von 19 PTBS-Patientinnen zu Beginn einer traumafokussierten Psychotherapie und in 13 weiblichen gesunden Kontrollprobanden untersucht. Eine Subgruppenanalyse hiervon (Selektionskriterium: Abwesenheit von Veränderungen bei der medikamentösen Therapie während des Beurteilungszeitraums) zeigt (C)

den Vergleich der Vollblut-*MMP9* mRNA-Konzentrationen in 10 PTBS-Patientinnen zu Beginn einer traumafokussierten Verhaltenspsychotherapie, nach 12 Therapiesitzungen sowie in 13 gesunden Kontrollprobanden. Die hier aufgeführten Kohorten sind Teilstichproben zweier bereits publizierter Studien (Zaba et al., 2015, Schubert et al., 2018). Die hier untersuchten Blutproben und jene, die für vorangegangene, publizierte endokrine Analysen verwendet wurden, wurden im Rahmen derselben Blutentnahme gewonnen. Gruppenunterschiede in der Genexpression zwischen PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden sowie zwischen PTBS-Patientinnen vor und während Therapie wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen (separate two-way ANOVA with repeated measures) berechnet. Bei Verletzung der Sphärizität wurden Greenhouse-Geisser-Korrekturen angewendet. Statistisch signifikante Ergebnisse: (A) keine; outliers: ein gesunder Kontrollproband um 1410h, ein gesunder Kontrollproband um 1515h; (B) Haupteffekt „Zeit“ $F(1.58, 34.81) = 11.19, p < 0.000$; outliers: ein Patient zu Beginn der Therapie um 1800h, ein Patient zu Beginn der Therapie um 2030h, ein Patient zu Beginn der Therapie um 1630h, ein gesunder Kontrollproband um 2030h; (C) Haupteffekt „Zeit“ $F(1.50, 35.89) = 16.74, p < 0.000$, und „Gruppe“ $F(2, 24) = 3.91, p < 0.034$; outliers: ein Patient während Therapie um 1800h, ein Patient während Therapie um 1630h, ein gesunder Kontrollproband um 2030h. Statistisch signifikante Ergebnisse der post-hoc Analysen: (B) Zwischen Gruppen: 1500h Tag 2: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.075$; Zeiteffekt: Patienten vor Therapie: zwischen 1800h und 2030h Tag 1: $p < 0.015$; zwischen 2030h Tag 1 und 1500h Tag 2: $p < 0.036$; zwischen 2030h Tag 1 und 1630h Tag 2: $p < 0.097$; HC: zwischen 2030h Tag 1 und 1500h Tag 2: $p < 0.094$; (C) Zwischen Gruppen: 1500h Tag 2: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.016$; 1630h Tag 2: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.020$; Zeiteffekt: Patienten vor Therapie: zwischen 1800h und 2030h Tag 1: $p < 0.008$; zwischen 2030h Tag 1 und 1500h Tag 2: $p < 0.089$; Patienten während Therapie: zwischen 2030h Tag 1 und 1500h Tag 2: $p < 0.081$; zwischen 2030h Tag 1 und 1630h Tag 2: $p < 0.086$. Weitere Abkürzungen: (A): „Stress“ bedeutet die Exposition gegenüber dem TSST Stressor (von 1400h bis 1410h); (C, D): „Dex“ bedeutet die orale Applikation von 1.5 mg Dexamethason.

Tab. 14 Korrelation der *MMP9* Expression und psychopathologischen Daten in PTBS-Patienten der DST-Kohorte

Diese Korrelationsanalysen nach Pearson schließen Expressionsanalysen von *MMP9* zu den vier verschiedenen Zeitpunkten des DST und den durch Fragebögen erhobenen psychopathologischen Daten ein. Statistisch signifikante Resultate: t, $p \leq 0.1$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. Abkürzungen: *MMP9*: Matrix-Metalloproteinase-9; BDI: Beck Depression Inventory; STAI: State-Trait Anxiety Inventory; CAPS: Clinician-Administered PTSD Scale.

		Psychopathologische Parameter					
		BDI	STAI I	CAPS_total	Wiedererleben	Vermeidung	Hyperarousal
MMP9 Expression	Zeitpunkt 1	-0.14	-0.14	-0.30	-0.40	-0.06	-0.34
	Zeitpunkt 2	-0.24	-0.15	0.14	0.28	0.10	-0.07
	Zeitpunkt 3	-0.18	-0.05	-0.24	-0.34	-0.04	-0.15
	Zeitpunkt 4	-0.04	0.23	-0.01	-0.13	0.05	0.04

4.2.2 Expressionsniveaus der Regulatoren von *MMP9* im Blut von PTBS-Patienten vs. Kontrollprobanden während des DST

Im Folgenden wurden Regulatoren von MMP-9 untersucht: Die HPA-Achsenreaktivität und vier Zytokinrezeptoren, nämlich *IL1R1*, *IL1R2*, *IL6R* und *TNFR1*.

4.2.2.1 HPA-Achsen-Reaktivität und *MMP9* Hyperexpression

Die Ergebnisse zur HPA-Achsen-Reaktivität der Studienteilnehmer, d.h. der Cortisol- und ACTH-Reaktion auf 1.5 mg Dexamethason, wurden von unserer Forschungsgruppe bereits veröffentlicht (Schubert et al., 2018). In dieser Arbeit wurden die *MMP9* mRNA-Spiegel mit den Cortisol- und ACTH-Spiegeln in einer Teilstichprobe verglichen. Patientinnen mit nahezu identischer Cortisol- und ACTH-Antwort (Schubert et al., 2018) wiesen deutlich unterschiedliche *MMP9* mRNA-Spiegel auf. Zudem blieb die HPA-Achsenreaktivität mit erfolgreicher Therapie unverändert, während die *MMP9* Expressionswerte im Blut während der Teilremission der PTBS durch die Therapie abnahmen. Somit erscheint die HPA-Achsenreaktivität als Modulator der *MMP9* Expression unwahrscheinlich.

4.2.2.2 Zytokinrezeptoren und *MMP9* Hyperexpression

Wie schon in der Einleitung beschrieben, induzieren *IL1R1* (Girard et al., 2010, Li et al., 2001, Vecil et al., 2000), *IL6R* (Meszaros et al., 2015, Kong et al., 2018, Sun et al., 2014) und *TNFR1* (Chattopadhyay et al., 2007, Nee et al., 2004, Roh et al., 2000) eine verstärkte *MMP9* Expression, während *IL1R2* (Guay and Akoum, 2007) dagegen eine Abnahme der Expression bewirkt.

IL1R1 konnte in den hier getesteten Blutproben nur in sehr niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden. Es kam zu geringfügigen, nicht wegweisenden und größtenteils nicht signifikanten Veränderungen von *IL1R1* während des DST: PTBS-Patientinnen vor Therapiebeginn wiesen einen statistisch signifikanten leichten Abfall in der *IL1R1* Expression zwischen 20.30 Uhr des ersten Tages und 16.30 Uhr des zweiten Tages auf (Abb. 5A, 2030h-1630h, $p < 0.035$). Im Vergleich der drei Gruppen untereinander zeigten sich die *IL1R1* Expressionswerte der Patienten nach, aber nicht vor Therapie gegenüber denen gesunder Kontrollprobanden im Ruhezustand, also basal, signifikant erniedrigt (Abb. 5A, 1800h, $p < 0.027$). Dementsprechend gab es einen signifikanten Effekt „Gruppe“ ($F(2, 29) = 4.21$, $p < .025$) und signifikanten Haupteffekt „Zeit“ ($F(2.36, 68.54) = 9.34$, $p < .000$). Die nur punktuellen Veränderungen in der Expression und die ergänzend durchgeführten, nicht aussagekräftigen Korrelationsanalysen von *MMP9* und *IL1R1* (Tab. 15) ermöglichen insgesamt jedoch keine konkrete Schlussfolgerung.

Der MMP-9-Inhibitor *IL1R2* lag bei PTBS-Patientinnen vor und nach Therapie im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden zu allen vier Untersuchungspunkten des DST signifikant geringer exprimiert vor (Abb. 5B). Statistisch ergab sich entsprechend ein signifikanter

Haupteffekt „Gruppe“ (Abb. 5B, $F(2, 30) = 14,50$, $p < 0.000$) und signifikanter Haupteffekt „Zeit“ (Abb. 5B, $F(1.11, 33.38) = 28.81$, $p < 0.000$). Nach Dexamethasongabe, um 20.30 Uhr des ersten Tages, konnte darüber hinaus bei gesunden Kontrollprobanden ein Peak in *IL1R2* mRNA-Spiegeln (Abb. 5B, Anstieg 1800h-2030h, $p = 0.001$; Abfall 2030h-1500h, $p = 0.001$) nachgewiesen werden. Dieser zeigte sich bei PTBS-Patientinnen deutlich geringer ausgeprägt und war zudem unabhängig von der psychotherapeutischen Behandlung, da sich die *IL1R2* Expressionswerte von Patientinnen vor und nach Therapie nicht unterschieden (Abb. 5B). Zu den übrigen Zeitpunkten fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den *IL1R2* Expressionsspiegeln von Patientinnen vor und nach 12 Psychotherapie-Sitzungen (Abb. 5B). Pearson-Korrelationsanalysen in PTBS-Patienten zur Korrelation der *MMP9* Expression und *IL1R2* Expression (Tab. 16) ergaben eine insgesamt inverse Korrelation mit signifikanten Ergebnissen für mehrere Zeitpunkte des DST. Insbesondere korrelierten *MMP9* Spiegel zum Zeitpunkt 2, um 20.30 Uhr des ersten Tages, moderat bis stark invers mit *IL1R2* Spiegeln zum Zeitpunkt 1, um 18.00 Uhr des ersten Tages (Tab. 16, $r = -0.46$, $p < 0.056$), zum Zeitpunkt 3, um 15.00 Uhr des zweiten Tages (Tab. 16, $r = -0.52$, $p < 0.094$), und zum Zeitpunkt 4, um 16.30 Uhr des zweiten Tages (Tab. 16, $r = -0.50$, $p < 0.034$). Dies unterstützt die These, dass die durch Dexamethason erhöhte *MMP9* Expression mit den erniedrigten *IL1R2* Spiegeln zusammenhängen könnte.

Im Gegensatz zu *IL1R2* konnte in den *IL6R* mRNA-Expressionsspiegeln keine signifikante Reaktion auf Dexamethason beobachtet werden. Die Spiegel blieben im Zeitverlauf weitestgehend konstant und zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Die Haupteffekte „Gruppe“ und „Zeit“ waren entsprechend auch nicht signifikant (Abb. 5C). In der Pearson-Korrelation zeigte sich lediglich ein statistischer Trend mit moderat positiver Korrelation zwischen der *IL6R* Expression und *MMP9* Expression um 20.30 Uhr des ersten Tages nach Dexamethasongabe (Tab. 17, $r = 0.48$, $p < 0.051$).

Auch die *TNFR1* mRNA-Spiegel blieben von der Dexamethasongabe unbeeinflusst (Abb. 5D). Es ergab sich kein signifikanter Haupteffekt „Zeit“. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Haupteffekt „Gruppe“ (Abb. 5D, $F(2, 29) = 54.74$, $p < 0.000$) mit einer schon zu Beginn des DST vorhandenen und über die Zeit konstanten Erniedrigung der *TNFR1* Werte bei PTBS-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (Abb. 5D). PTBS-Patientinnen vor und nach Therapie unterschieden sich in ihren niedrigen *TNFR1* Spiegeln nicht. Durch Binden an TNFR1 kann TNF-alpha die Expression von MMP-9 induzieren. Da die *TNFR1* Spiegel der Patientinnen vermindert waren, trug TNF-alpha hier höchstwahrscheinlich nicht zur *MMP9* Hyperexpression bei. Die Korrelationsanalysen von *MMP9* und *TNFR1* nach Pearson ergaben kein aussagekräftiges Ergebnis (Tab. 18).

Zusammenfassend lagen die *IL1R2* und *TNFR1* mRNA-Expressionswerte bei PTBS-Patientinnen gegenüber gesunden Kontrollprobanden deutlich erniedrigt vor und zeigten anders als *MMP9* nach Teilremission des PTBS-Syndroms keine Veränderungen.

Legende:

- PTSD Patienten zu Beginn der Therapie (PTSD-start)
- - - PTSD Patienten nach 12 Therapiesitzungen (PTSD-mid-treatment)
- Gesunde Kontrollprobanden (HC)

Zwischen Gruppen:

PTSD-start vs. HC: * $t, p \leq 0.1$; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

PTSD-mid-treatment vs. HC: # $t, p \leq 0.1$; # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$

ns: nicht signifikant

Zwischen Zeitpunkten der Analyse:

† $t, p \leq 0.1$; † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$

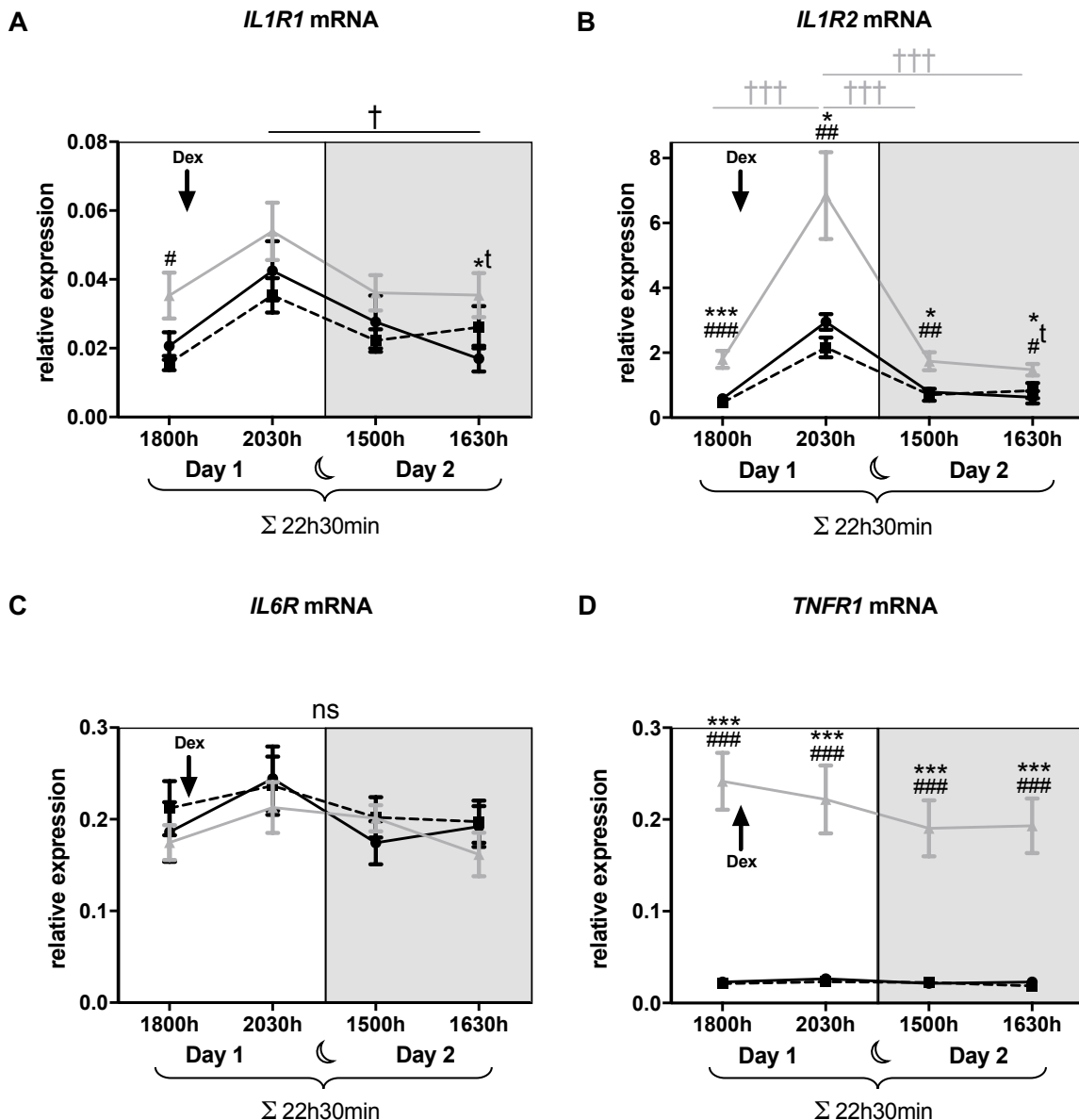


Abb. 5 Zytokinrezeptorexpressionen in PTBS-Patientinnen und gesunden Kontrollprobanden während des DST

Gezeigt sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse der Zytokinrezeptoren IL-1R1 (A), IL-1R2 (B), IL6R (C) und TNFR1 (D) mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) aus dem peripheren Blut von 10 weiblichen PTBS-Patientinnen vor Therapiebeginn, nach 12 Sitzungen traumafokussierter Psychotherapie sowie von 13 gesunden Kontrollprobanden im Rahmen des Dexamethason-Suppressionstests (DST). Die hier aufgeführte Kohorte ist Teil einer bereits publizierten Studie und wurde anhand des Selektionskriteriums einer unveränderten medikamentösen Therapie ausgewählt (Schubert et al., 2018). Statistisch signifikante Ergebnisse:

(A) Haupteffekt „Zeit“ $F(2.36, 68.54) = 9.34, p < 0.000$, und „Gruppe“ $F(2, 29) = 4.21, p < 0.025$; outliers: ein Patient zu Beginn der Therapie um 1500h, ein gesunder Kontrollproband um 2030h; (B) Haupteffekt „Zeit“ $F(1.11, 33.38) = 28.81, p < 0.000$, und „Gruppe“ $F(2, 30) = 14.50, p < 0.000$, outliers: ein Patient zu Beginn der Therapie um 2030h; (C) Haupteffekt „Zeit“ $F(2.31, 71.44) = 2.95, p < 0.051$, outliers: keine; (D) Haupteffekt „Gruppe“ $F(2, 29) = 54.74, p < 0.000$; outliers: ein Patient zu Beginn der Therapie um 1630h, ein gesunder Kontrollproband um 2030h. Statistisch signifikante Ergebnisse der post-hoc Analysen: (A) Zwischen Gruppen: 1800h Tag 1: Patienten während Therapie vs. HC: $p < 0.027$; 1630h Tag 2: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.085$; Zeiteffekt: Patienten vor Therapie: zwischen 2030h Tag 1 und 1630h Tag 2: $p < 0.035$; (B) Zwischen Gruppen: 1800h Tag 1: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < .001$; Patienten während Therapie vs. HC: $p < 0.001$; 2030h Tag 1: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.018$; Patienten während Therapie vs. HC: $p < 0.004$; 1500h Tag 2: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.019$; Patienten während Therapie vs. HC: $p < 0.009$; 1630h Tag 2: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.014$; Patienten während Therapie vs. HC: $p < 0.084$; Zeiteffekte: HC: zwischen 1800h und 2030h Tag 1: $p < 0.001$; zwischen 2030h Tag 1 und 1500h Tag 2: $p < 0.001$; zwischen 2030h Tag 1 und 1630h Tag 2: $p < 0.001$; (D) Zwischen Gruppen: 1800h Tag 1: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.001$; Patienten während Therapie vs. HC: $p < 0.001$; 1630h Tag 1: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.001$; Patienten während Therapie vs. HC: $p < 0.001$; 1500h Tag 2: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.001$; Patienten während Therapie vs. HC: $p < 0.001$; 1630h Tag 2: Patienten vor Therapie vs. HC: $p < 0.001$; Patienten während Therapie vs. HC: $p < 0.001$. Weitere Abkürzungen: „Dex“ bedeutet die orale Applikation von 1.5 mg Dexamethason.

Tab. 15 Korrelation der *MMP9* Expression und *IL1RI* Expression in PTBS-Patienten der DST-Kohorte

Diese Korrelationsanalysen nach Pearson schließen Expressionsanalysen von *MMP9* und *IL1RI* zu den vier verschiedenen Zeitpunkten des DST ein. Statistisch signifikante Resultate: $t, p \leq 0.1$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. Abkürzungen: *IL1RI*: Interleukin-1 Rezeptor 1; *MMP9*: Matrix-Metalloproteinase-9.

		<i>IL1RI</i> Expression			
		Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3	Zeitpunkt 4
<i>MMP9</i> Expression	Zeitpunkt 1	0.07	0.11	-0.04	-0.36
	Zeitpunkt 2	0.02	-0.06	-0.26	-0.38
	Zeitpunkt 3	0.22	0.21	-0.12	-0.52*
	Zeitpunkt 4	0.16	-0.01	-0.06	-0.15

Tab. 16 Korrelation der *MMP9* Expression und *IL1R2* Expression in PTBS-Patienten der DST-Kohorte

Diese Korrelationsanalysen nach Pearson schließen Expressionsanalysen von *MMP9* und *IL1R2* zu den vier verschiedenen Zeitpunkten des DST ein. Statistisch signifikante Resultate: t, $p \leq 0.1$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. Abkürzungen: *IL1R2*: Interleukin-1 Rezeptor 2; *MMP9*: Matrix-Metalloproteinase-9.

		<i>IL1R2</i> Expression			
		Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3	Zeitpunkt 4
<i>MMP9</i> Expression	Zeitpunkt 1	-0.44 ^t	-0.29	-0.27	-0.49*
	Zeitpunkt 2	-0.46 ^t	-0.32	-0.41 ^t	-0.50*
	Zeitpunkt 3	-0.50*	-0.34	-0.52*	-0.60*
	Zeitpunkt 4	-0.15	-0.11	-0.29	-0.06

Tab. 17 Korrelation der *MMP9* Expression und *IL6R* Expression in PTBS-Patienten der DST-Kohorte

Diese Korrelationsanalysen nach Pearson schließen Expressionsanalysen von *MMP9* und *IL6R* zu den vier verschiedenen Zeitpunkten des DST ein. Statistisch signifikante Resultate: t, $p \leq 0.1$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. Abkürzungen: *IL6R*: Interleukin-6 Rezeptor; *MMP9*: Matrix-Metalloproteinase-9.

		<i>IL6R</i> Expression			
		Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3	Zeitpunkt 4
<i>MMP9</i> Expression	Zeitpunkt 1	-0.03	0.11	0.38	0.24
	Zeitpunkt 2	0.05	0.48 ^t	-0.17	-0.15
	Zeitpunkt 3	-0.23	0.05	-0.06	-0.11
	Zeitpunkt 4	0.01	0.23	0.32	0.00

Tab. 18 Korrelation der *MMP9* Expression und *TNFR1* Expression in PTBS-Patienten der DST-Kohorte

Diese Korrelationsanalysen nach Pearson schließen Expressionsanalysen von *MMP9* und *TNFR1* zu den vier verschiedenen Zeitpunkten des DST ein. Statistisch signifikante Resultate: t, $p \leq 0.1$; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. Abkürzungen: *TNFR1*: TNF-alpha Rezeptor 1; *MMP9*: Matrix-Metalloproteinase-9.

		<i>TNFR1</i> Expression			
		Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3	Zeitpunkt 4
<i>MMP9</i> Expression	Zeitpunkt 1	-0.25	-0.17	-0.16	-0.27
	Zeitpunkt 2	-0.27	-0.27	-0.33	-0.36
	Zeitpunkt 3	-0.35	-0.43 ^t	-0.46 ^t	-0.51*
	Zeitpunkt 4	-0.04	-0.08	-0.15	-0.26

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der TSST-Kohorte konnten für PTBS-Patienten und Kontrollprobanden keine signifikanten Gruppenunterschiede oder signifikante Veränderungen über die Zeit in der *MMP9* Expression nachgewiesen werden (Abb. 4A).

Bei der Untersuchung der DST-Kohorte konnten drei wichtige Beobachtungen gemacht werden. Erstens, weibliche PTBS-Patientinnen wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine erhöhte *MMP9* Expression nach Dexamethasongabe im Vollblut auf (Abb. 4B). Zweitens, die *MMP9* Hyperexpression trat parallel zu einer reduzierten Expression des MMP-9-Inhibitors *IL1R2* auf und könnte folglich durch diese hervorgerufen sein (Abb. 5B). Drittens, die *MMP9* Hyperexpression der Patientinnen zeigte sich unter erfolgreicher Psychotherapie rückläufig (Abb. 4C).

Nach aktuellem Kenntnisstand ist diese Studie nach den 2019 und 2020 publizierten Untersuchungen (Lima et al., 2019, Brahmajothi and Abou-Donia, 2020) die dritte Arbeit, die die *MMP9* Expression in PTBS-Patienten untersucht und zudem bislang die erste, die die *MMP9* Expression während eines in-vivo DST erfasst.

Durch die Auswahl der zwei Studienmodelle, des TSST und des DST, konnte der Einfluss unterschiedlicher Stressoren - eines sozialen Stressors und eines pharmakologischen Stressors - untersucht werden. Das Beobachtungsintervall des TSST umfasste 1 h 45 min. Der DST deckte einen längeren Beobachtungszeitraum von 22 h 30 min ab, wodurch auch langfristige Veränderungen ermittelt werden konnten.

5.2 MMP-9 in der Pathogenese der PTBS

Bisher untersuchten nur zwei Studien MMP-9 in an PTBS erkrankten Kollektiven. Lima et al. verglichen die Proteinkonzentration von MMP-9 und anderen proinflammatorischen Biomarkern nach Exposition mit einem psychosozialen Stressor im peripheren Blut von post-Myokardinfarkt-Patienten mit und ohne Diagnose einer PTBS (Lima et al., 2019). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne PTBS. Die MMP-9 Spiegel der PTBS-Patienten blieben nach Stressexposition unverändert. Im Gesamtkollektiv (PTBS-Patienten und Kontrollprobanden) konnte jedoch ein leichter Anstieg in der MMP-9 Konzentration nachgewiesen werden (Lima et al 2019). Eine andere Studie zeigte in gesunden Probanden dagegen eine Konzentrationsabnahme von MMP-9 im Anschluss an einen non-TSST psychosozialen Stresstest (Szymanowski et al., 2011). Die Abweichungen der Ergebnisse könnten durch Unterschiede im Abnahmezeitpunkt der Blutproben hervorgerufen worden sein. Lima et al. führten die Blutentnahmen bereits 90 Minuten nach dem Stresstest durch,

Szymanowski et al. erst am Folgetag nach 24 h. Ein kurzfristiger Anstieg könnte daher durch das Protokoll der letztgenannten Studie nicht abgebildet worden sein. Zudem wurden verschiedene Methoden zur Quantifizierung der MMP-9 Proteinkonzentration gewählt. Im Falle von Lima et al. wurde ein Elektrochemilumineszenz-Assay mit einer unteren Nachweisgrenze für MMP-9 von 0.011 ng/ml verwendet, verglichen mit einer Nachweisgrenze von 0.31 ng/ml für den von Szymanowski et al. verwendeten Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Die zweite Studie von Brahmajothi et al. analysierte die MMP-9 Enzymaktivität mittels Zymographie in Veteranen mit Diagnose einer PTBS und in gesunden Veteranen. Es konnte eine gesteigerte MMP-9 Aktivität in PTBS-Patienten gegenüber gesunden Kontrollprobanden dokumentiert werden (Brahmajothi and Abou-Donia, 2020).

Das zentrale Anliegen dieser Studie war es, ergänzend zu den oben erwähnten Studien, die Rolle von MMP-9 in der PTBS zu ergründen und als potentiellen Biomarker für die Erkrankung zu evaluieren. Es wurde eine durch Dexamethason induzierte erhöhte *MMP9* Expression in PTBS-Patientinnen gegenüber gesunden Kontrollprobanden gefunden (Abb. 4 B,C).

Ein Grund für den Unterschied zu den Ergebnissen von Lima et al. (Lima et al., 2019) könnte darin liegen, dass in der vorliegenden Studie die *MMP9* mRNA-Expression und in der Studie von Lima et al. dagegen die MMP-9 Proteinexpression analysiert wurde. Frühere Studien zur peripheren *MMP9* Expression in psychiatrischen Erkrankungen unterstützen die hier beobachtete *MMP9* Überexpression (Abb. 4B,C) mit der Ausnahme, dass die Studien diese teilweise auch unabhängig von der Exposition mit einem Stressor nachwiesen (Vafadari et al., 2016, Domenici et al., 2010). Hierbei wurde MMP-9 vor allem auch bei depressiven Syndromen erforscht. Verschiedene Studien konnten erhöhte MMP-9 Protein- und mRNA-Spiegel in depressiven Patienten nachweisen (Domenici et al., 2010, Lutgendorf et al., 2008, Bobinska and Szemraj, 2016). Yehuda et al. konnten eine Korrelation zwischen der MMP-9-Expression und dem Schweregrad depressiver Symptomatik detektieren (Yoshida et al., 2012). Shibasaki et al. konnten interessanterweise beobachten, dass Patienten, die nach Elektrokrampftherapie (EKT) kein Rezidiv einer depressiven Symptomatik zeigten, eine signifikante Abnahme von Serum-MMP-9-Spiegeln aufwiesen (Shibasaki et al., 2016). Darüber hinaus wurde im Tiermodell gezeigt, dass eine Inhibition von Mmp-9 im Bereich des Hippocampus Stress-induzierte Verhaltensänderungen, wie eine reduzierte soziale Exploration und aggressives Verhalten, verhindern konnte (van der Kooij et al., 2014).

Die Auswirkungen einer erhöhten *MMP9* Expression bei der PTBS und die Bedeutung, die MMP-9 daher in der Pathogenese der Erkrankung möglicherweise zukommen könnte, werden auch ersichtlich, wenn man die Funktion des Enzyms im Gehirn betrachtet. Wie schon erwähnt, kann MMP-9 die synaptische Plastizität beeinflussen, indem es extrazelluläre Matrix degradiert (Benson and Huntley, 2012, Stawarski et al., 2014) und Dendriten ausdünnert. Eine Studie von Michaluk et al. wies diesen Effekt in Nervenzellen des Hippocampus von transgenen Ratten mit Überexpression von autoaktivierenden Mmp-9 Mutanten nach (Michaluk et al., 2011). In

einer anderen Studie im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Angstkonditionierung der Tiere die *Mmp9* Transkription induzierte, begleitet von erhöhten *Mmp-9* Proteinkonzentrationen in den drei Hirnarealen, die maßgeblich am Erlernen von Angst beteiligt sind, der Amygdala, dem Hippocampus und dem präfrontalen Kortex (Ganguly et al., 2013). Modifizierte synaptische Verknüpfungen in diesen Hirnarealen könnten die Verarbeitung angstinduzierender Ereignisse oder Traumata nachteilig beeinflussen (Furini et al., 2014). Die Glucocorticoid-induzierte *MMP9* Hyperexpression im Blut der PTBS-Patientinnen (Abb. 4B,C) könnte auch im Gehirn bzw. in bestimmten Regionen des Gehirns auftreten. *MMP-9* könnte folglich das Prozessieren von traumaassoziierten Inhalten stören und ihr Wiedererleben fördern. Die hier durchgeführte Pearson-Korrelationsanalyse mit Nachweis einer schwach bis moderat positiven, jedoch nicht signifikanten Korrelation (Tab. 14, $r = 0.28$, $p < 0.269$) der post-Dexamethason *MMP9* Expression um 20.30 Uhr des ersten Tages des DST mit dem CAPS-Subskalen Symptom „Wiedererleben“ könnte ein weiterer Hinweis hierfür sein.

Eine in mehreren Studien verfolgte Hypothese zur Rekonsolidierung von Gedächtnisinhalten (Przybylski and Sara, 1997, Przybylski et al., 1999, Nader et al., 2000) besagt, dass die Reaktivierung von Erinnerungen durch pharmakologischen Einfluss unterbunden werden kann. Beispielsweise zeigten Ratten nach Applikation des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 (Przybylski and Sara, 1997) oder Gabe von Betarezeptorantagonisten (Przybylski et al., 1999) ein reduziertes Erinnerungsvermögen in kognitiven und emotionalen Experimenten. Eine Studie von Brown et al. konnte durch Anwendung des Breitspektrum-MMP-Inhibitors FN-439 die Rekonsolidierung einer durch Stromstoß hervorgerufenen angstbesetzten Erinnerung in Ratten erfolgreich unterbrechen (Brown et al., 2009). Eine 2017 von Bach et al. veröffentlichte Studie zur pharmakologischen Inhibition von Erinnerungen bekräftigt darüber hinaus die Theorie einer Beteiligung von *MMP-9* an der Prozessierung von Traumainhalten. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass die pharmakologische Hemmung von *Mmp-9* durch den *MMP*-Inhibitor Doxycyclin die Entstehung von experimentell erworbenen angstvollen Erinnerungen reduzierte (Bach et al., 2017). Die Autoren schlussfolgerten, dass die medikamentöse Inhibition von *MMP-9* auch beim kontrollierten Reaktivieren einer Erinnerung während einer therapeutischen Sitzung hilfreich sein könnte. Falls die medikamentöse Hemmung von *MMP-9* auch im Menschen umsetzbar ist, könnte dieser Mechanismus in der Behandlung der PTBS Anwendung finden.

5.3 Remission der *MMP9* Expression durch psychotherapeutische Behandlung – post-Dexamethason *MMP9* als Biomarker

Im Ergebnisteil wurde bereits aufgezeigt, dass PTBS-Patientinnen nach 12 Wochen Traumafokussierter Psychotherapie auf Dexamethasongabe nicht länger mit einer *MMP9* Hyperexpression reagierten. Interessanterweise nahm auf psychopathologischer Ebene gleichzeitig insbesondere die Häufigkeit des Wiedererlebens von Traumainhalten ab,

ersichtlich an einem verminderten CAPS Subskalen Score (Tab. 13). Die psychotherapeutische Behandlung könnte maßgeblich an der Remission der Hyperexpression von *MMP9* beteiligt gewesen sein, da sich die medikamentöse Behandlung in diesem Zeitraum nicht geändert hatte (Tab. 13).

Daher erscheint es sinnvoll, Post-Dexamethason *MMP9* als möglichen Biomarker für die PTBS weiter zu verfolgen, zumal bislang wenige Marker für die PTBS existieren, die sich im Therapieverlauf in Richtung der Kontrollprobanden verändern. Ein beschriebener, nicht serumbasierter, sondern bildgebungsbasierter Biomarker zum Monitoring des Therapieverlaufs ist die Aktivität des ACC als Teil des PFC. Zwei Studien konnten mittels funktioneller MRT (fMRT) nach erfolgreicher kognitiver Verhaltenstherapie bei PTBS-Patienten eine Normalisierung im Sinne einer erhöhten Aktivität (Felmingham et al., 2007) bzw. einem Volumenzuwachs in dieser Hirnregion (Bryant et al., 2008) nachweisen. Ein zweiter therapeutischer Biomarker ist der auch in der Einleitung angesprochene BDNF. Unter einer Therapie mit dem SSRI Escitalopram zeigte sich bei PTBS-Patienten mit geringeren BDNF-Konzentrationen eine verstärkte Rückbildung der PTBS-Symptomatik (Berger et al., 2010).

Sofern die Dexamethason- und damit die HPA-Achsen-Aktivierungs-induzierte Überexpression von *MMP9* und ihre Besserung während der Partialremission der PTBS auch in den relevanten Hirnregionen der PTBS-Patientinnen stattfinden sollte, könnte *MMP9* nicht nur einen potentiellen diagnostischen und Therapieverlaufsbiomarker für die PTBS darstellen, worauf die hier gezeigten Ergebnisse hinweisen (Abb. 4C), sondern auch in der Pathophysiologie der Remission der PTBS eine Rolle spielen. Diese Überlegung legt die Vermutung nahe, dass MMP-9 oder eines seiner Regulatoren ein potentielles drug target für Traumafolgestörungen sein könnte.

5.4 Einflussfaktoren der *MMP9* Expression

5.4.1 Einfluss der HPA-Achsenreaktivität auf die Dexamethason-induzierte *MMP9* Hyperexpression bei PTBS-Patientinnen

Die bereits publizierten Ergebnisse der DST-Studie zur HPA-Achsen-Reaktion nach Dexamethasongabe (Schubert et al., 2018) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen PTBS-Patienten und Kontrollprobanden und auch nicht bei PTBS-Patienten vor und während Therapie zeigen. Die Gruppen wiesen identische HPA-Antworten, d.h. identische Reaktionen der Cortisol- und ACTH-Spiegel auf 1.5 mg oral verabreichtes Dexamethason auf (Schubert et al., 2018). Es ist zu beachten, dass hierbei die Genexpressionsanalysen mit Blutproben durchgeführt wurden, die in ein und demselben Blutentnahmeverfahren wie die zuvor berichteten endokrinen Analysen gewonnen wurden. Die HPA-Achsen-Reaktivitätstypen, die Zaba et al. identifizieren (Zaba et al., 2015) und andere replizieren konnten (Wichmann et al., 2017), traten in der untersuchten DST-Kohorte nicht auf (Schubert et al., 2018), mit hoher

Wahrscheinlichkeit aufgrund der unterschiedlichen Wirkung des pharmakologischen Stressors im Vergleich zum sozialen Stressor. Der geringe Prozentsatz an Dexamethason-Non-Respondern der DST-Studie ermöglichte keinen Vergleich der HPA-Achsen-Reaktivitätstypen (Schubert et al., 2018). Die Beobachtung der vorliegenden Studie, dass *MMP9* mRNA in Gruppen mit nahezu identischen DST-Ergebnissen unterschiedlich exprimiert wurde, legt jedoch nahe, dass die *MMP9* Genexpression im Blut unabhängig vom Reaktivitätsphänotyp der HPA-Achse war und die durch Dexamethason hervorgerufene akute Veränderung der HPA-Achsen-Funktion die *MMP9* Expression modulierte. Studien, die die Frage einer Dexamethason-regulierten MMP-9 Expression untersuchten, beschreiben unterschiedliche Ergebnisse. Das Resultat dieser Arbeit (Abb. 4B,C) deckt sich mit einer in-vivo Studie von Berker et al. Die Autoren verglichen die MMP-9 Blutspiegel von Patienten mit Glucocorticoid-produzierenden Nebennierentumoren mit den Spiegeln von Patienten mit hormoninaktiven Tumoren. Die Patienten, die akut erhöhten Glucocorticoid-Spiegeln durch den Tumor ausgesetzt waren, wiesen auch höhere MMP-9 Spiegel auf (Berker et al., 2010). Auch Gelati et al. zeigten, dass sowohl die Serumproteinkonzentration von MMP-9 als auch die *MMP9* mRNA-Expression in den peripheren mononukleären Blutzellen von Patienten mit Multipler Sklerose 21 Stunden nach Gabe von Methylprednisolon anstieg und nachfolgend wieder abfiel (Gelati et al., 2002). Lutgendorf et al. beobachteten eine zweifache Erhöhung der MMP-9 Expression in humanen Makrophagen von Tumorpatientinnen nach Hydrocortisongabe (Lutgendorf et al., 2008). Dagegen wies eine Studie von Forster et al. in einer Endothelzelllinie eine durch Glucocorticoide induzierte supprimierte *MMP9* mRNA-Expression nach (Forster et al., 2007). Cundall et al. konnten wiederum keinen Effekt von Glucocorticoiden auf die MMP-9 Spiegel in neutrophilen Granulozyten asthmatischer Patienten feststellen (Cundall et al., 2003). Die heterogene Studienlage zeigt die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen auf, um die Beziehung zwischen Glucocorticoiden und MMP-9 genauer zu verstehen.

5.4.2 Einfluss der Zytokinrezeptoren auf die Dexamethason-induzierte *MMP9* Hyperexpression bei PTBS-Patientinnen

Um eine mögliche Beteiligung der Zytokinrezeptoren an der Dexamethason-induzierten *MMP9* Hyperexpression der Patienten aufzuzeigen, wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob basale Unterschiede in den Zytokinrezeptorexpressionen bei PTBS-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden vorlagen. In einem zweiten Schritt wurde die Reaktion der Rezeptorexpression auf die Dexamethasongabe analysiert.

Die basalen *IL6R* Expressionswerte der PTBS-Patientengruppe deckten sich mit den Expressionswerten gesunder Kontrollprobanden (Abb. 5C). Damit unterschieden sich die hier gezeigten Ergebnisse von bereits veröffentlichten einschlägigen Arbeiten. Maes et al. berichteten über höhere Spiegel des löslichen IL6R (sIL6R) bei Frauen im mittleren Lebensalter mit akuter PTBS im Vergleich zu Frauen mit remittierter PTBS (Maes et al., 1999). Auch Newton et al. wiesen in einer gemischtgeschlechtlichen Kohorte erhöhte sIL6R-Spiegel bei

PTBS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden nach (Newton et al., 2014). Die Diskrepanz zu den hier vorliegenden Ergebnissen könnte dadurch begründet sein, dass in beiden Arbeiten die *IL6R* Proteinexpression analysiert wurde, wohingegen in der vorliegenden Arbeit *IL6R* mRNA-Expressionswerte erfasst wurden.

Für die *TNFR1* Expression zeigten sich in der DST-Kohorte abweichende Expressionsniveaus mit stark erniedrigten Werten in der Patientengruppe (Abb. 5D). In zwei Studien von Himmerich et al. lagen die *TNFR1* Blutkonzentrationen bei PTBS-Patienten dagegen unverändert vor (Himmerich et al., 2016, Himmerich et al., 2015). Diese Differenz könnte ebenfalls auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Himmerich et al. Proteinkonzentrationen analysierten, während hier die mRNA-Expressionsniveaus von *TNFR1* quantifiziert wurden.

Die basalen Expressionswerte von *IL1R1* lagen in der Kontrollgruppe der DST-Studie leicht erhöht vor (Abb. 5A). Diese Aussage beruht jedoch auf insgesamt sehr niedrigen Expressionswerten des Rezeptors und vergleichsweise geringen Unterschieden. In einer Studie zu perinatalen Hirnschäden ließ sich immunhistochemisch eine verstärkte Expression sowohl von MMP-9 als auch von *IL-1R1* in geschädigten Arealen der weißen Hirnsubstanz im Vergleich zu gesunden Arealen nachweisen (Girard et al., 2010). Die für *IL-1* beta in der Literatur beschriebene MMP-9-induzierende Wirkung könnte in der letztgenannten Studie durch Signaltransduktion über den *IL-1R1* für die verstärkte Expression von MMP-9 verantwortlich gewesen sein.

In der Analyse von *IL1R2* fiel ausgehend von ähnlichen basalen Expressionswerten der post-Dexamethason Anstieg des Rezeptors bei PTBS-Patientinnen gegenüber Kontrollprobanden stark vermindert aus (Abb. 5B). Dagegen konnte in einer Studie von Guardado et al. in Microarrays eine verstärkte Expression von *IL1R2* bei Kriegsveteranen mit PTBS im Vergleich zu Veteranen ohne PTBS dokumentiert werden (Guardado et al., 2016). Der Unterschied der Ergebnisse könnte durch die Methodik mit Einsatz einer Hochdurchsatzanalyse in einem kleinen Kollektiv und ggf. auch durch einen Einfluss des Geschlechts bedingt sein, da Guardado und Kollegen im Gegensatz zu der hier durchgeführten Studie männliche PTBS-Patienten einschlossen.

Eine weitere Microarray-Studie, die Blut-mRNA-Profile von gesunden Probanden vor und nach der Einnahme von 1.5 mg Dexamethason verglich, zeigte, dass *IL1R1* und *IL1R2*, aber nicht *IL6R* und *TNFR1* zu den Dexamethason-regulierten Genen gehören. Die Expression von *IL1R2* wurde dabei am zweithäufigsten von allen untersuchten Genen induziert (Menke et al., 2014). Ähnliche Beobachtungen konnten auch im Rahmen dieser Studie gemacht werden (Abb. 5 A,B,C,D). *IL6R* und *TNFR1* zeigten im Patienten- und Kontrollkollektiv keine Veränderung ihrer Expression nach Dexamethasongabe (Abb. 5C,D). Die geringfügige Zunahme der *IL1R1* Expression direkt im Anschluss an die Dexamethasongabe erwies sich für alle Gruppen als nicht signifikant (Abb. 5A). Die *IL1R2* Expression zeigte bei gesunden Kontrollprobanden jedoch einen deutlichen und statistisch hochsignifikanten Anstieg (Abb. 5B). Eine Studie, in

der PhD-Studenten psychologischem Stress ausgesetzt wurden, fand ebenfalls eine verstärkte Expression von IL-1R2 (Morita et al., 2005).

IL6R, *IL1R1* und *TNFR1* scheinen an der Induktion der Post-Dexamethason *MMP9* Hyperexpression höchstwahrscheinlich nicht beteiligt zu sein, da sie keine signifikante Reaktion auf die Dexamethasongabe zeigten. Die fehlende *MMP-9*-stimulierende Wirkung von *TNFR1* konnte die *MMP9* Hyperexpression nicht verhindern. Grund hierfür könnte ein mutmaßlicher Anstieg von IL-1 beta sein. Eine Studie von Chattopadhyay et al. konnte belegen, dass IL1-beta in TNFR1/TNFR2-Knockout-Mäusen eine nahezu unveränderte *MMP-9* Expression aufrechterhielt (Chattopadhyay et al., 2007). Die Analysen zur Expression von *IL1R1* (Abb. 5A) und die ergänzend durchgeführten Pearson-Korrelationen der Expression von *IL1R1* und *MMP9* (Tab. 15) können diese Hypothese jedoch nicht bestätigen.

Die Expression von *IL1R2* unterschied sich deutlich von der Expression der übrigen Rezeptoren. Wie schon in der Einleitung erwähnt, wirkt IL-1R2 als *MMP-9*-Inhibitor. Die verminderten *IL1R2* Expressionsspiegel der Patientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden könnten im Rückschluss zur post-Dexamethason *MMP9* Hyperexpression beigetragen haben. Korrelationsanalysen nach Pearson ergaben ebenfalls eine insgesamt inverse Korrelation mit moderatem bis starkem Zusammenhang zwischen der *MMP9* und der *IL1R2* Expression der PTBS-Patienten mit signifikanten Ergebnissen für mehrere Zeitpunkte des DST. *MMP9* Spiegel im Zeitpunkt 2 nach Dexamethasongabe, um 20.30 Uhr des ersten Tages, korrelierten invers mit *IL1R2* Spiegeln im Zeitpunkt 1, um 18.00 Uhr des ersten Tages (Tab. 16, $r = -0.46$, $p < 0.056$), Zeitpunkt 3, um 15.00 Uhr des zweiten Tages (Tab. 16, $r = -0.52$, $p < 0.094$) und Zeitpunkt 4, um 16.30 Uhr des zweiten Tages (Tab. 16, $r = -0.50$, $p < 0.034$). Der *IL1R2* scheint aber nicht mit der behandlungsinduzierten Teilremission der Hyperexpression assoziiert zu sein, da Patientinnen nach Therapie weiterhin erniedrigte *IL1R2* Spiegel aufwiesen (Abb. 5B).

Zusammenfassend ergaben sich keine Hinweise für einen signifikanten Einfluss von *IL1R1*, *IL6R* oder *TNFR1* auf die *MMP9* Expression. Die verminderten *IL1R2* Spiegel der Patientinnen und die damit eingeschränkte Inhibition der *MMP9* Expression könnte jedoch für die post-Dexamethason *MMP9* Hyperexpression mitverantwortlich sein.

5.5 Limitationen

Wie die meisten bisher vorgeschlagenen Biomarker ist auch *MMP9* derzeit noch weit von der klinischen Anwendung entfernt. Zum einen ist eine Replikation der Ergebnisse in einer größeren Kohorte notwendig. Zum anderen erscheint die Differenzierung schwierig, inwieweit die *MMP9* Veränderungen tatsächlich der PTBS-Symptomatik und nicht etwa einer komorbiden depressiven Verstimmung der Patienten (Tab. 12) zuzuordnen sind. Die biologischen Merkmale vieler psychischer Erkrankungen überlappen sich, weshalb die Bestimmung einer krankheitsspezifischen Variante schwerfällt (Schmidt et al., 2013b). Dies ist

sicherlich auch darauf zurückzuführen, dass bis dato und auch in der vorliegenden Arbeit nach biologischen Äquivalenten psychopathologischer Syndrome und nicht nach denen einzelner Symptome gesucht wurde. Es ist zu erwarten, dass Kohorten, die von Expertengremien nach phänotypischen Merkmalen zusammengestellte Diagnosekriterien erfüllen, eine hohe Varianz in ihren krankheitsassoziierten biologischen Veränderungen aufweisen (Schmidt, 2015). Die fehlende Veränderung in der depressiven Symptomatik der PTBS-Patienten des DST im Therapieverlauf, ersichtlich an einem nicht signifikant veränderten BDI-Score vor und während der Therapie (Tab. 13), macht den Einfluss einer komorbiden depressiven Symptomatik jedoch unwahrscheinlich.

Mit den ausschließlich weiblichen PTBS-Patienten-Kohorten sowie der ausschließlich weiblichen Kontroll-Kohorte der DST-Studie sollte der Einfluss des Geschlechts auf die Expressionswerte kontrolliert werden. Allerdings konnten nicht genügend weibliche Probanden für die DST-Kontrollprobandenstichprobe rekrutiert werden, sodass zwei männliche Kontrollprobanden eingeschlossen wurden. Geschlechtsspezifische Unterschiede für biologische Veränderungen in psychiatrischen Erkrankungen, wie etwa die Modulierung der HPA-Achse, wurden in mehreren Studien beschrieben (Vamvakopoulos and Chrousos, 1993, Rhodes and Rubin, 1999). Carpenter et al. stellten beispielsweise fest, dass weibliche Nachkommen nach Exposition mit pränatalen Stressoren eine verstärkte HPA-Achsen-Reaktivität im Vergleich zu Männern aufwiesen (Carpenter et al., 2017). Andere Studien führten die Heterogenität von Ergebnissen im DST ebenfalls auf einen möglichen Einfluss des Geschlechts zurück (Sandner, 2017). Die Rolle des biologischen Geschlechts auf die *MMP9* Expression in psychiatrischen Erkrankungen wurde bisher nur äußerst unzureichend erforscht. In einer an Depression erkrankten Kohorte konnten Carboni et al. geringe, aber signifikant erhöhte *MMP9* Werte bei männlichen Patienten im Vergleich zu weiblichen Patienten feststellen (Carboni et al., 2019).

Sonstige Einschränkungen der Studien ergaben sich aus der relativ kleinen Stichprobengröße, aus der Medikation einiger Patienten und dem Fehlen einer Kohorte traumatisierter Kontrollprobanden. Letztere könnte klären, ob die beobachteten Effekte krankheitsspezifisch für das PTBS-Syndrom auftreten oder auch im Rahmen einer Traumatisierung ohne PTBS-Syndrom vorkommen. Die medikamentöse Behandlung bedingt Einschränkungen, da hierdurch insbesondere die Immunparameter und HPA-Achse beeinflusst werden können (Hannestad et al., 2011). Da die Patientinnen jedoch eine stark ausgeprägte PTBS-Symptomatik aufwiesen, war der Verzicht auf eine medikamentöse Behandlung ethisch nicht zu vertreten. Um dennoch medikamentenunabhängige Effekte erfassen zu können, wurden in die DST-Teilstichprobe lediglich Patientinnen eingeschlossen, deren Medikation im Beobachtungszeitraum unverändert blieb (Tab. 13). Die Analyse einer nicht medikamentös behandelten PTBS-Patientengruppe wäre jedoch eine sinnvolle Ergänzung für zukünftige Untersuchungen.

Limitationen in den molekulargenetischen Verfahren zeigten sich vor allem in der Expressionsanalyse von *IL1R1*. Diese Studie liefert soweit eruierbar die ersten Daten zur *IL1R1* Expression in der PTBS, die nicht durch Microarrays erhoben wurden. Trotz adäquater Handhabung der Proben konnten im Vergleich zu anderen Rezeptoren für *IL1R1* jedoch nur sehr niedrige Expressionswerte nachgewiesen werden. Dies könnte einerseits auf eine tatsächlich stark verminderte in-vivo-Expression zurückzuführen sein, andererseits an der fehlenden Tauglichkeit der Methoden liegen, den Rezeptor in adäquaten Konzentrationen zu detektieren. Zwei Studien verwendeten den gleichen PCR-Primer zur Erfassung der Expression von *IL1R1*, jedoch nicht in humanen Vollblutproben, sondern in kultivierten humanen Fibroblasten (King et al., 2014) und Neuroblasten (Pang et al., 2012). Eine weitere Studie bei 1846 Teilnehmern der Framingham Offspring-Kohorte untersuchte die *IL1R1* Expression in aus Blutproben isolierten Blutplättchen und Leukozyten mittels Hochdurchsatz-RT-PCR (Freedman et al., 2010). Eine adäquat vergleichbare Studie zu den hier durchgeführten *IL1R1* mRNA-Expressionsanalysen fehlt daher. Es wäre nützlich, die Untersuchungen für *IL1R1*, ggf. unter Verwendung eines anderen PCR-Primers, zu wiederholen.

5.6 Ausblick

Für potentielle PTBS-Biomarker, insbesondere Therapiemonitoring-Marker, wurde bisher keine praktische Anwendbarkeit berichtet. Daher sind insbesondere Studien zu blutbasierten Markern sinnvoll, da diese im Vergleich zu Analysen von Hirnfunktionen und Hirnvolumina (Bryant et al., 2008, Felmingham et al., 2007) auch für große Stichprobengrößen einfacher und kostengünstiger umzusetzen wären.

Aufgrund von beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschieden in psychiatrischen Erkrankungen und naheliegenden geschlechtsspezifischen Unterschieden in der MMP-9 Expression, die bereits in einer Studie für depressive Patienten belegt werden konnten (Carboni et al., 2019), sollten die Ergebnisse in einer Kohorte mit männlichen PTBS-Patienten reproduziert werden.

In der vorliegenden Studie konnte keine Assoziation der *MMP9* Expression zum HPA-Achsenreaktivitätstyp erfasst werden, aufgrund der Glucocorticoid-Induzierbarkeit ist MMP-9 jedoch mit der HPA-Achse verbunden. Die HPA-Achse wurde bereits als erfolgreicher Ansatzpunkt in der Behandlung der PTBS diskutiert (Yehuda et al., 2014, Yehuda et al., 2013a). Nähere Analysen zur Interaktion zwischen MMP-9 und der HPA-Achse erscheinen daher ebenfalls sinnvoll.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz zur Erforschung des molekularen Mechanismus, der der Post-Dexamethason-Hyperexpression von MMP-9 in der PTBS zugrunde liegt, wäre die Analyse der IL-1R-Regulatoren wie IL1RA oder Toll Interleukin-1 Rezeptor 8 (TIR8) mittels molekularbiologischer Methoden (Dinarello, 2013).

Ergänzend sollte mittels Tiermodell basierter Studien untersucht werden, ob die Dexamethason- und damit HPA-Achsen-Aktivierungs-induzierte Überexpression von MMP-9 und ihre Besserung während der Partialremission der PTBS auch in den relevanten Hirnregionen der PTBS-Patienten stattfindet.

Um aufzuzeigen, ob die Post-Dexamethason *MMP9* Hyperexpression eine Auswirkung der PTBS darstellt oder durch Traumatisierung allgemein hervorgerufen wird, ist auch der Einschluss einer Gruppe traumatisierter Kontrollprobanden anzustreben.

Eine entscheidende Frage für zukünftige klinische Studien bleibt, ob die medikamentöse Hemmung von MMP-9 im Menschen möglich ist und auf die gleiche Weise der Konsolidierung von angstassoziierten Erinnerungen vorbeugen kann. Tetracyclin-Antibiotika, die als MMP-Inhibitoren fungieren, könnten dann zur Prävention bei potentiell exponierten Personen genutzt werden (Bach et al., 2017).

6 Zusammenfassung

Das komplexe Krankheitsbild der Posttraumatischen Belastungsstörung (PTBS), die häufigen Komorbiditäten und die bislang nur in wenigen Aspekten verstandene Pathophysiologie erschweren die Diagnosestellung und Therapie dieser Erkrankung. Es ist daher notwendig, objektivierbare Biomarker für die PTBS zu etablieren. In der vorliegenden Studie wurde das Enzym Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) als ein möglicher Biomarker untersucht. Für die Proteinase wurde bereits ein Zusammenhang mit unterschiedlichen psychiatrischen Erkrankungen nachgewiesen. Darüber hinaus bewirkte die pharmakologische Inhibition von MMP-9 im Tiermodell die Reduktion experimentell erworbener angstvoller Erinnerungen (Bach et al., 2017).

Die Genexpression von MMP-9 und einiger seiner Regulatoren, nämlich von vier Zytokinrezeptoren, wurde im Vollblut von zwei Kohorten von PTBS-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden untersucht, die zwei unterschiedlichen Stressexperimenten unterzogen wurden: In der Trier Social Stress Test (TSST) Studie, in der die Teilnehmer einem sozialen Stressor ausgesetzt worden sind, wurden 21 PTBS-Patientinnen mit 11 nicht-traumatisierten gesunden Kontrollprobanden verglichen. In der Dexamethason-Suppressionstest (DST) Studie, die das niedrig dosierte Glucocorticoid Dexamethason als pharmakologischen Stressor verwendete, wurden 19 PTBS-Patientinnen mit 13 gesunden Kontrollprobandinnen verglichen. Abschließend wurden 10 Patientinnen der DST-Kohorte vor und nach erfolgreicher Psychotherapie verglichen, um einen möglichen Effekt der Therapie und damit der Teilremission des PTBS-Syndroms auf die Expression der fünf untersuchten Gene zu erfassen.

Die Untersuchungen in der TSST-Kohorte zeigten, dass die Expression von *MMP9* nicht durch psychosozialen Stress verändert werden konnte, und dass sich die basale und die Post-Stress *MMP9* Expression nicht signifikant zwischen PTBS-Patientinnen und Kontrollprobanden unterschied. Entsprechend zeigten auch die PTBS-Patientinnen der DST-Kohorte im Vergleich zu den Kontrollprobanden eine unveränderte basale *MMP9* mRNA-Blutkonzentration. Interessanterweise stiegen die *MMP9* mRNA-Spiegel im Blut der PTBS-Patientinnen nach Gabe von Dexamethason jedoch deutlich über die der gesunden Kontrollprobanden an. Diese Dexamethason-induzierte *MMP9* Überexpression war mit erfolgreicher psychotherapeutischer Behandlung rückläufig und trat parallel zu einer reduzierten Induktion des MMP-9-Inhibitors *IL1R2* auf, die sich allerdings mit der Teilremission der PTBS nicht zurückbildete. Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Expression von *MMP9* im Blut von PTBS-Patienten auf mRNA-Ebene im Verlauf einer Behandlung sowie eines DST untersucht. Die Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass sich Post-Dexamethason *MMP9* Vollblut-mRNA-Konzentrationen als diagnostischer und als Therapieverlaufs-Biomarker für die PTBS eignen könnten. Die hier präsentierte Studie ist durch die relativ kleine Stichprobe und das Fehlen von traumatisierten Kontrollprobanden limitiert.

Literaturverzeichnis

- AIKINS, D. E., JACKSON, E. D., CHRISTENSEN, A., WALDERHAUG, E., AFROZ, S. & NEUMEISTER, A. 2011. Differential conditioned fear response predicts duloxetine treatment outcome in male veterans with PTSD: a pilot study. *Psychiatry Res*, 188, 453-5.
- APA 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, *American Psychiatric Publishing*.
- APA 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Arlington, *American Psychiatric Publishing*.
- APTE, S. S. & PARKS, W. C. 2015. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol*, 44-46, 1-6.
- BACH, D. R., TZOVARA, A. & VUNDER, J. 2017. Blocking human fear memory with the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline. *Mol Psychiatry*.
- BAJOR, M. & KACZMAREK, L. 2013. Proteolytic remodeling of the synaptic cell adhesion molecules (CAMs) by metzincins in synaptic plasticity. *Neurochem Res*, 38, 1113-21.
- BENSON, D. L. & HUNTLEY, G. W. 2012. Building and remodeling synapses. *Hippocampus*, 22, 954-68.
- BERGER, W., MEHRA, A., LENOCI, M., METZLER, T. J., OTTE, C., TARASOVSKY, G., MELLON, S. H., WOLKOWITZ, O. M., MARMAR, C. R. & NEYLAN, T. C. 2010. Serum brain-derived neurotrophic factor predicts responses to escitalopram in chronic posttraumatic stress disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34, 1279-84.
- BERKER, D., ISIK, S., ERDEN, G., TUTUNCU, Y. A., OZCAN, H. N., CANER, S., TEKELEK, B., AYDIN, Y. & GULER, S. 2010. Serum matrix metalloproteinase-9 levels in the diagnosis of functioning adrenal tumors. *Endocr Pract*, 16, 419-27.
- BESEDOVSKY, H., CHROUSOS, G. & REY, A. 2008. *The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*, Elsevier Science.
- BLANCHARD, E. B., KOLB, L. C., PRINS, A., GATES, S. & MCCOY, G. C. 1991. Changes in plasma norepinephrine to combat-related stimuli among Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis*, 179, 371-3.
- BOBINSKA, K. & SZEMRAJ, J. 2016. Expression and Activity of Metalloproteinases in Depression. *Med Sci Monit*.
- BOOKWALTER, D. B., ROENFELDT, K. A., LEARDMANN, C. A., KONG, S. Y., RIDDLE, M. S. & RULL, R. P. 2020. Posttraumatic stress disorder and risk of selected autoimmune diseases among US military personnel. *BMC Psychiatry*, 20, 23.
- BOSCARINO, J. A. & CHANG, J. 1999. Electrocardiogram abnormalities among men with stress-related psychiatric disorders: implications for coronary heart disease and clinical research. *Ann Behav Med*, 21, 227-34.
- BRAHMAJOTHI, M. V. & ABOU-DONIA, M. B. 2020. PTSD Susceptibility and Challenges: Pathophysiological Consequences of Behavioral Symptoms. *Mil Med*, 185, 279-285.
- BREMNER, J. D. 2006. The relationship between cognitive and brain changes in posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci*, 1071, 80-6.

- BREMNER, J. D., ELZINGA, B., SCHMAHL, C. & VERMETTEN, E. 2008. Structural and functional plasticity of the human brain in posttraumatic stress disorder. *Prog Brain Res*, 167, 171-86.
- BROWN, T. E., WILSON, A. R., COCKING, D. L. & SORG, B. A. 2009. Inhibition of matrix metalloproteinase activity disrupts reconsolidation but not consolidation of a fear memory. *Neurobiol Learn Mem*, 91, 66-72.
- BRYANT, R. A., FELMINGHAM, K., KEMP, A., DAS, P., HUGHES, G., PEDUTO, A. & WILLIAMS, L. 2008. Amygdala and ventral anterior cingulate activation predicts treatment response to cognitive behaviour therapy for post-traumatic stress disorder. *Psychol Med*, 38, 555-61.
- BUISSON, A. C., ZAHM, J. M., POLETTE, M., PIERROT, D., BELLON, G., PUCHELLE, E., BIREMBAUT, P. & TOURNIER, J. M. 1996. Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *J Cell Physiol*, 166, 413-26.
- BUTLER, R. W., BRAFF, D. L., RAUSCH, J. L., JENKINS, M. A., SPROCK, J. & GEYER, M. A. 1990. Physiological evidence of exaggerated startle response in a subgroup of Vietnam veterans with combat-related PTSD. *Am J Psychiatry*, 147, 1308-12.
- CARBONI, L., MCCARTHY, D. J., DELAFONT, B., FILOSI, M., IVANCHENKO, E., RATTI, E., LEARNED, S. M., ALEXANDER, R. & DOMENICI, E. 2019. Biomarkers for response in major depression: comparing paroxetine and venlafaxine from two randomised placebo-controlled clinical studies. *Transl Psychiatry*, 9, 182.
- CARPENTER, T., GRECIAN, S. M. & REYNOLDS, R. M. 2017. Sex differences in early-life programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans suggest increased vulnerability in females: a systematic review. *J Dev Orig Health Dis*, 8, 244-255.
- CASTRO, M., ELIAS, L. L., ELIAS, P. C. L. & MOREIRA, A. C. 2010. Physiology and Pathophysiology of the HPA Axis. *Cushing's Syndrome: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*. Totowa: Humana Press.
- CHATTOPADHYAY, S., MYERS, R. R., JANES, J. & SHUBAYEV, V. 2007. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav Immun*, 21, 561-8.
- COHEN, J. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, Hillsdale, L. Erlbaum Associates.
- CONANT, K., ALLEN, M. & LIM, S. T. 2015. Activity dependent CAM cleavage and neurotransmission. *Front Cell Neurosci*, 9, 305.
- CORBO, V., CLÉMENT, M. H., ARMONY, J. L., PRUESSNER, J. C. & BRUNET, A. 2005. Size versus shape differences: contrasting voxel-based and volumetric analyses of the anterior cingulate cortex in individuals with acute posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 58, 119-24.
- CUNDALL, M., SUN, Y., MIRANDA, C., TRUDEAU, J. B., BARNES, S. & WENZEL, S. E. 2003. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*, 112, 1064-71.
- DASKALAKIS, N. P., COHEN, H., NIEVERGELT, C. M., BAKER, D. G., BUXBAUM, J. D., RUSSO, S. J. & YEHUDA, R. 2016. New translational perspectives for blood-based biomarkers of PTSD: From glucocorticoid to immune mediators of stress susceptibility. *Exp Neurol*, 284, 133-140.

- DE KLOET, C., VERMETTEN, E., LENTJES, E., GEUZE, E., VAN PELT, J., MANUEL, R., HEIJNEN, C. & WESTENBERG, H. 2008. Differences in the response to the combined DEX-CRH test between PTSD patients with and without co-morbid depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 313-20.
- DINARELLO, C. A. 2013. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin Immunol*, 25, 389-93.
- DOHRENWEND, B. P., TURNER, J. B., TURSE, N. A., ADAMS, B. G., KOENEN, K. C. & MARSHALL, R. 2006. The psychological risks of Vietnam for U.S. veterans: a revisit with new data and methods. *Science*, 313, 979-82.
- DOMENICI, E., WILLE, D. R., TOZZI, F., PROKOPENKO, I., MILLER, S., MCKEOWN, A., BRITTAIN, C., RUJESCU, D., GIEGLING, I., TURCK, C. W., HOLLSBOER, F., BULLMORE, E. T., MIDDLETON, L., MERLO-PICH, E., ALEXANDER, R. C. & MUGLIA, P. 2010. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One*, 5, e9166.
- DZIEMBOWSKA, M., MILEK, J., JANUSZ, A., REJMAK, E., ROMANOWSKA, E., GORKIEWICZ, T., TIRON, A., BRAMHAM, C. R. & KACZMAREK, L. 2012. Activity-dependent local translation of matrix metalloproteinase-9. *J Neurosci*, 32, 14538-47.
- DZIEMBOWSKA, M. & WLODARCZYK, J. 2012. MMP9: a novel function in synaptic plasticity. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 709-13.
- DZWONEK, J., RYLSKI, M. & KACZMAREK, L. 2004. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett*, 567, 129-35.
- EFTHIMIOU, P. & BLANCO, M. 2009. Pathogenesis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and potential biomarkers. *Mod Rheumatol*, 19, 457-68.
- FARINA, A. R. & MACKAY, A. R. 2014. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers (Basel)*, 6, 240-96.
- FELMINGHAM, K., KEMP, A., WILLIAMS, L., DAS, P., HUGHES, G., PEDUTO, A. & BRYANT, R. 2007. Changes in anterior cingulate and amygdala after cognitive behavior therapy of posttraumatic stress disorder. *Psychol Sci*, 18, 127-9.
- FENNEMA-NOTESTINE, C., STEIN, M. B., KENNEDY, C. M., ARCHIBALD, S. L. & JERNIGAN, T. L. 2002. Brain morphometry in female victims of intimate partner violence with and without posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 52, 1089-101.
- FORSTER, C., KAHLES, T., KIETZ, S. & DRENCKHAHN, D. 2007. Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol*, 580, 937-49.
- FRAGKOULI, A., TSILIBARY, E. C. & TZINIA, A. K. 2014. Neuroprotective role of MMP-9 overexpression in the brain of Alzheimer's 5xFAD mice. *Neurobiol Dis*, 70, 179-89.
- FREEDMAN, J. E., LARSON, M. G., TANRIVERDI, K., O'DONNELL, C. J., MORIN, K., HAKANSON, A. S., VASAN, R. S., JOHNSON, A. D., IAFRATI, M. D. & BENJAMIN, E. J. 2010. Relation of platelet and leukocyte inflammatory transcripts to body mass index in the Framingham heart study. *Circulation*, 122, 119-129.
- FRENCH, R. A., VANHOY, R. W., CHIZZONITE, R., ZACHARY, J. F., DANTZER, R., PARNET, P., BLUTHE, R. M. & KELLEY, K. W. 1999. Expression and localization

- of p80 and p68 interleukin-1 receptor proteins in the brain of adult mice. *J Neuroimmunol*, 93, 194-202.
- FRIES, G. R., GASSEN, N. C., SCHMIDT, U. & REIN, T. 2015. The FKBP51-Glucocorticoid Receptor Balance in Stress-Related Mental Disorders. *Curr Mol Pharmacol*, 9, 126-40.
- FURINI, C., MYSKIW, J. & IZQUIERDO, I. 2014. The learning of fear extinction. *Neurosci Biobehav Rev*, 47, 670-83.
- GANGULY, K., REJMAK, E., MIKOSZ, M., NIKOLAEV, E., KNAPSKA, E. & KACZMAREK, L. 2013. Matrix metalloproteinase (MMP) 9 transcription in mouse brain induced by fear learning. *J Biol Chem*, 288, 20978-91.
- GELATI, M., CORSINI, E., DE ROSSI, M., MASINI, L., BERNARDI, G., MASSA, G., BOIARDI, A. & SALMAGGI, A. 2002. Methylprednisolone acts on peripheral blood mononuclear cells and endothelium in inhibiting migration phenomena in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 59, 774-80.
- GERACIOTI, T. D., JR., BAKER, D. G., KASCKOW, J. W., STRAWN, J. R., JEFFREY MULCHAHEY, J., DASHEVSKY, B. A., HORN, P. S. & EKHATOR, N. N. 2008. Effects of trauma-related audiovisual stimulation on cerebrospinal fluid norepinephrine and corticotropin-releasing hormone concentrations in post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 416-24.
- GILL, J., VYTHILINGAM, M. & PAGE, G. G. 2008. Low cortisol, high DHEA, and high levels of stimulated TNF-alpha, and IL-6 in women with PTSD. *J Trauma Stress*, 21, 530-9.
- GIRARD, S., SÉBIRE, G. & KADHIM, H. 2010. Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69, 1116-29.
- GOLA, H., ENGLER, H., SOMMERSHOF, A., ADENAUER, H., KOLASSA, S., SCHEDLOWSKI, M., GROETTRUP, M., ELBERT, T. & KOLASSA, I. T. 2013. Posttraumatic stress disorder is associated with an enhanced spontaneous production of pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells. *BMC Psychiatry*, 13, 40.
- GOLUB, Y., KALTWASSER, S. F., MAUCH, C. P., HERRMANN, L., SCHMIDT, U., HOLSBOER, F., CZISCH, M. & WOTJAK, C. T. 2011. Reduced hippocampus volume in the mouse model of Posttraumatic Stress Disorder. *J Psychiatr Res*, 45, 650-9.
- GOPPELT-STRUEBE, M., REISER, C. O., SCHNEIDER, N. & GRELL, M. 1996. Modulation of tumor necrosis factor (TNF) receptor expression during monocytic differentiation by glucocorticoids. *Inflamm Res*, 45, 503-7.
- GRILLON, C., MORGAN, C. A., 3RD, DAVIS, M. & SOUTHWICK, S. M. 1998. Effect of darkness on acoustic startle in Vietnam veterans with PTSD. *Am J Psychiatry*, 155, 812-7.
- GRZELA, K., ZAGORSKA, W., KREJNER, A., LITWINIUK, M., ZAWADZKA-KRAJEWSKA, A., BANASZKIEWICZ, A., KULUS, M. & GRZELA, T. 2015. Prolonged Treatment with Inhaled Corticosteroids does not Normalize High Activity of Matrix Metalloproteinase-9 in Exhaled Breath Condensates of Children with Asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 63, 231-7.

- GUARDADO, P., OLIVERA, A., RUSCH, H. L., ROY, M., MARTIN, C., LEJBMAN, N., LEE, H. & GILL, J. M. 2016. Altered gene expression of the innate immune, neuroendocrine, and nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) systems is associated with posttraumatic stress disorder in military personnel. *J Anxiety Disord*, 38, 9-20.
- GUAY, S. & AKOUM, A. 2007. Stable inhibition of interleukin 1 receptor type II in Ishikawa cells augments secretion of matrix metalloproteinases: possible role in endometriosis pathophysiology. *Reproduction*, 134, 525-34.
- GURVITS, T. V., SHENTON, M. E., HOKAMA, H., OHTA, H., LASKO, N. B., GILBERTSON, M. W., ORR, S. P., KIKINIS, R., JOLESZ, F. A., MCCARLEY, R. W. & PITMAN, R. K. 1996. Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 40, 1091-9.
- HAN, H., HE, X., TANG, J., LIU, W., LIU, K., ZHANG, J., WANG, X., XU, Y. & CHEN, X. 2011. The C(-1562)T polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene is associated with schizophrenia in China. *Psychiatry Res*, 190, 163-4.
- HANNESTAD, J., DELLAGIOIA, N. & BLOCH, M. 2011. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*, 36, 2452-9.
- HARTMANN, J., TOUMA, C., WAGNER, K., LIEBL, C., SCHARF, S., WANG, X., WOLF, M., F., H., REIN, T., SCHMIDT, U., CHEUNG-FLYNN, J., COX, M., SMITH, D., HOLSBOER, F., MÜLLER, M. & SCHMIDT, M. 2011. The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. *Neuropharmacology*.
- HARTMANN, M., HEUMANN, R. & LESSMANN, V. 2001. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J*, 20, 5887-97.
- HAUTZINGER, M., KELLER, F. & KÜHNER, C. 2006. Beck depressions-inventar (BDI-II). *Harcourt Test Services Frankfurt*.
- HEIM, C., MLETZKO, T., PURSELLE, D., MUSSELMAN, D. L. & NEMEROFF, C. B. 2008. The dexamethasone/corticotropin-releasing factor test in men with major depression: role of childhood trauma. *Biol Psychiatry*, 63, 398-405.
- HENDRICKSON, R. C. & RASKIND, M. A. 2016. Noradrenergic dysregulation in the pathophysiology of PTSD. *Exp Neurol*, 284, 181-195.
- HERMAN, J., SCHAFER, M., YOUNG, E., THOMPSON, R., DOUGLASS, J., AKIL, H. & WATSON, S. 1989. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *The Journal of Neuroscience*, 9, 3072-3082.
- HERRMANN, L., IONESCU, I. A., HENES, K., GOLUB, Y., WANG, N. X., BUELL, D. R., HOLSBOER, F., WOTJAK, C. T. & SCHMIDT, U. 2012. Long-lasting hippocampal synaptic protein loss in a mouse model of posttraumatic stress disorder. *PLoS One*, 7, e42603.
- HIMMERICH, H., WILLMUND, G. D., ZIMMERMANN, P., WOLF, J. E., BUHLER, A. H., HOLDT, L. M., TEUPSER, D., KIRKBY, K. C. & WESEMANN, U. 2015. Serum concentrations of TNF-alpha, sTNF-R p55 and p75 and post-traumatic stress in German soldiers. *Eur Cytokine Netw*, 26, 57-60.
- HIMMERICH, H., WILLMUND, G. D., ZIMMERMANN, P., WOLF, J. E., BUHLER, A. H., KIRKBY, K. C., DALTON, B., HOLDT, L. M., TEUPSER, D. & WESEMANN, U.

2016. Serum concentrations of TNF-alpha and its soluble receptors during psychotherapy in German soldiers suffering from combat-related PTSD. *Psychiatr Danub*, 28, 293-298.
- HUNTER, G., YOON, J., BLONIGEN, D. M., ASCH, S. M. & ZULMAN, D. M. 2015. Health Care Utilization Patterns Among High-Cost VA Patients With Mental Health Conditions. *Psychiatr Serv*, 66, 952-8.
- HUNTLEY, G. W. 2012. Synaptic circuit remodelling by matrix metalloproteinases in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, 13, 743-57.
- IMAI, R., HORI, H., ITOH, M., LIN, M., NIWA, M., INO, K., OGAWA, S., ISHIDA, M., SEKIGUCHI, A., MATSUI, M., KUNUGI, H., AKECHI, T., KAMO, T. & KIM, Y. 2018. Inflammatory markers and their possible effects on cognitive function in women with posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res*, 102, 192-200.
- KANG, H. K., BULLMAN, T. A. & TAYLOR, J. W. 2006. Risk of selected cardiovascular diseases and posttraumatic stress disorder among former World War II prisoners of war. *Ann Epidemiol*, 16, 381-6.
- KARL, A., SCHAEFER, M., MALTA, L. S., DORFEL, D., ROHLEDER, N. & WERNER, A. 2006. A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD. *Neurosci Biobehav Rev*, 30, 1004-31.
- KARL, A. & WERNER, A. 2010. The use of proton magnetic resonance spectroscopy in PTSD research--meta-analyses of findings and methodological review. *Neurosci Biobehav Rev*, 34, 7-22.
- KING, S. N., BERCHTOLD, C. M. & THIBEAULT, S. L. 2014. Lipopolysaccharide responsiveness in vocal fold fibroblasts. *Journal of inflammation (London, England)*, 11, 42-42.
- KIRSCHBAUM, C., PIRKE, K. M. & HELLHAMMER, D. H. 1993. The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology*, 28, 76-81.
- KONG, X., ZHANG, X., LV, P., CUI, X., MA, L., CHEN, H., LIU, H., LIN, J. & JIANG, L. 2018. Treatment of Takayasu arteritis with the IL-6R antibody tocilizumab vs. cyclophosphamide. *Int J Cardiol*, 266, 222-228.
- KOTHARI, P., PESTANA, R., MESRAOUA, R., ELCHAKI, R., KHAN, K. M., DANNENBERG, A. J. & FALCONE, D. J. 2014. IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. *J Immunol*, 192, 349-57.
- LABRIE, M. & ST-PIERRE, Y. 2013. Epigenetic regulation of mmp-9 gene expression. *Cell Mol Life Sci*, 70, 3109-24.
- LAUX, L., GLANZMANN, P. & SCHAFFNER, P. 1981. Spielberger CD: Das State-Trait-Angstinventar (STAI)[The State-Trait Anxiety Inventory].
- LEPPERT, D., HUGHES, P., HUBER, S., ERNE, B., GRYGAR, C., SAID, G., MILLER, K. M., STECK, A. J., PROBST, A. & FUHR, P. 1999. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology*, 53, 62-70.
- LI, D. Q., LOKESHWAR, B. L., SOLOMON, A., MONROY, D., JI, Z. & PFLUGFELDER, S. C. 2001. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*, 73, 449-59.

- LIBRACH, C. L., FEIGENBAUM, S. L., BASS, K. E., CUI, T. Y., VERASTAS, N., SADOVSKY, Y., QUIGLEY, J. P., FRENCH, D. L. & FISHER, S. J. 1994. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J Biol Chem*, 269, 17125-31.
- LIMA, B. B., HAMMADAH, M., WILMOT, K., PEARCE, B. D., SHAH, A., LEVANTSEVYCH, O., KASEER, B., OBIDEEN, M., GAFEER, M. M., KIM, J. H., SULLIVAN, S., LEWIS, T. T., WENG, L., ELON, L., LI, L., BREMNER, J. D., RAGGI, P., QUYYUMI, A. & VACCARINO, V. 2019. Posttraumatic stress disorder is associated with enhanced interleukin-6 response to mental stress in subjects with a recent myocardial infarction. *Brain Behav Immun*, 75, 26-33.
- LUTGENDORF, S. K., LAMKIN, D. M., JENNINGS, N. B., AREVALO, J. M., PENEDO, F., DEGEEST, K., LANGLEY, R. R., LUCCI, J. A., 3RD, COLE, S. W., LUBAROFF, D. M. & SOOD, A. K. 2008. Biobehavioral influences on matrix metalloproteinase expression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 14, 6839-46.
- MAERCKER, A., FORSTMEIER, S., WAGNER, B., GLAESMER, H. & BRAHLER, E. 2008. [Post-traumatic stress disorder in Germany. Results of a nationwide epidemiological study]. *Nervenarzt*, 79, 577-86.
- MAES, M., LIN, A. H., DELMEIRE, L., VAN GASTEL, A., KENIS, G., DE JONGH, R. & BOSMANS, E. 1999. Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol Psychiatry*, 45, 833-9.
- MARTIN, C. G., KIM, H., YUN, S., LIVINGSTON, W., FETTA, J., MYSLIWIEC, V., BAXTER, T. & GILL, J. M. 2017. Circulating miRNA associated with posttraumatic stress disorder in a cohort of military combat veterans. *Psychiatry Res*, 251, 261-265.
- MAUTINO, G., OLIVER, N., CHANEZ, P., BOUSQUET, J. & CAPONY, F. 1997. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17, 583-91.
- MCGREGOR, N. W., DIMATELIS, J. J., VAN ZYL, P. J., HEMMINGS, S. M. J., KINNEAR, C., RUSSELL, V. A., STEIN, D. J. & LOCHNER, C. 2018. A translational approach to the genetics of anxiety disorders. *Behav Brain Res*, 341, 91-97.
- MEHTA, D., GONIK, M., KLENGEL, T., REX-HAFFNER, M., MENKE, A., RUBEL, J., MERCER, K. B., PUTZ, B., BRADLEY, B., HOLSBOER, F., RESSLER, K. J., MULLER-MYHSOK, B. & BINDER, E. B. 2011. Using polymorphisms in FKBP5 to define biologically distinct subtypes of posttraumatic stress disorder: evidence from endocrine and gene expression studies. *Arch Gen Psychiatry*, 68, 901-10.
- MEIGHAN, P. C., MEIGHAN, S. E., DAVIS, C. J., WRIGHT, J. W. & HARDING, J. W. 2007. Effects of matrix metalloproteinase inhibition on short- and long-term plasticity of schaffer collateral/CA1 synapses. *J Neurochem*, 102, 2085-2096.
- MEIGHAN, S. E., MEIGHAN, P. C., CHOUDHURY, P., DAVIS, C. J., OLSON, M. L., ZORNES, P. A., WRIGHT, J. W. & HARDING, J. W. 2006. Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J Neurochem*, 96, 1227-41.
- MENKE, A., ARLOTH, J., GERBER, M., REX-HAFFNER, M., UHR, M., HOLSBOER, F., BINDER, E. B., HOLSBOER-TRACHSLER, E. & BECK, J. 2014. Dexamethasone stimulated gene expression in peripheral blood indicates glucocorticoid-receptor hypersensitivity in job-related exhaustion. *Psychoneuroendocrinology*, 44, 35-46.

- MESZAROS, E. C., DAHOUD, W., MESIANO, S. & MALEMUD, C. J. 2015. Blockade of recombinant human IL-6 by tocilizumab suppresses matrix metalloproteinase-9 production in the C28/I2 immortalized human chondrocyte cell line. *Integr Mol Med*, 2, 304-310.
- MICHALUK, P., KOŁODZIEJ, L., MIODUSZEWSKA, B., WILCZYŃSKI, G. M., DZWONEK, J., JAWORSKI, J., GORECKI, D. C., OTTERSEN, O. P. & KACZMAREK, L. 2007. Beta-dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *J Biol Chem*, 282, 16036-41.
- MICHALUK, P., WAWRZYNIAK, M., ALOT, P., SZCZOT, M., WYREMBEK, P., MERCIK, K., MEDVEDEV, N., WILCZEK, E., DE ROO, M., ZUSCHRATTER, W., MULLER, D., WILCZYŃSKI, G. M., MOZRZYMAS, J. W., STEWART, M. G., KACZMAREK, L. & WŁODARCZYK, J. 2011. Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J Cell Sci*, 124, 3369-80.
- MIZOGUCHI, H., TAKUMA, K., FUKUZAKI, E., IBI, D., SOMEYA, E., AKAZAWA, K. H., ALKAM, T., TSUNEKAWA, H., MOURI, A., NODA, Y., NABESHIMA, T. & YAMADA, K. 2009. Matrix metalloprotease-9 inhibition improves amyloid beta-mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 331, 14-22.
- MORITA, K., SAITO, T., OHTA, M., OHMORI, T., KAWAI, K., TESHIMA-KONDO, S. & ROKUTAN, K. 2005. Expression analysis of psychological stress-associated genes in peripheral blood leukocytes. *Neurosci Lett*, 381, 57-62.
- MOUTHAAAN, J., SIJBRANDIJ, M., LUITSE, J. S., GOSLINGS, J. C., GERSONS, B. P. & OLFF, M. 2014. The role of acute cortisol and DHEAS in predicting acute and chronic PTSD symptoms. *Psychoneuroendocrinology*, 45, 179-86.
- NADER, K., SCHAFE, G. E. & LE DOUX, J. E. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406, 722-6.
- NEE, L. E., MCMORROW, T., CAMPBELL, E., SLATTERY, C. & RYAN, M. P. 2004. TNF-alpha and IL-1beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells. *Kidney Int*, 66, 1376-86.
- NEWTON, T. L., FERNANDEZ-BOTRAN, R., MILLER, J. J. & BURNS, V. E. 2014. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor levels in posttraumatic stress disorder: associations with lifetime diagnostic status and psychological context. *Biol Psychol*, 99, 150-9.
- OPDENAKKER, G. & VAN DAMME, J. 2011. Probing cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases towards better immunotherapies of multiple sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22, 359-65.
- ORR, S. P., LASKO, N. B., SHALEV, A. Y. & PITMAN, R. K. 1995. Physiologic responses to loud tones in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *J Abnorm Psychol*, 104, 75-82.
- PAI, A., SURIS, A. M. & NORTH, C. S. 2017. Posttraumatic Stress Disorder in the DSM-5: Controversy, Change, and Conceptual Considerations. *Behav Sci (Basel)*, 7.
- PANG, T., WANG, J., BENICKY, J., SÁNCHEZ-LEMUS, E. & SAAVEDRA, J. M. 2012. Telmisartan directly ameliorates the neuronal inflammatory response to IL-1 β partly through the JNK/c-Jun and NADPH oxidase pathways. *J Neuroinflammation*, 9, 102.

- PARTRIDGE, C. A., JEFFREY, J. J. & MALIK, A. B. 1993. A 96-kDa gelatinase induced by TNF-alpha contributes to increased microvascular endothelial permeability. *Am J Physiol*, 265, L438-47.
- PENG, Z., WANG, H., ZHANG, R., CHEN, Y., XUE, F., NIE, H., CHEN, Y., WU, D., WANG, Y., WANG, H. & TAN, Q. 2013. Gastrodin ameliorates anxiety-like behaviors and inhibits IL-1beta level and p38 MAPK phosphorylation of hippocampus in the rat model of posttraumatic stress disorder. *Physiol Res*, 62, 537-45.
- PITMAN, R. K., RASMUSSEN, A. M., KOENEN, K. C., SHIN, L. M., ORR, S. P., GILBERTSON, M. W., MILAD, M. R. & LIBERZON, I. 2012. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci*, 13, 769-87.
- PRZYBYSLAWSKI, J., ROULLET, P. & SARA, S. J. 1999. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci*, 19, 6623-8.
- PRZYBYSLAWSKI, J. & SARA, S. J. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res*, 84, 241-6.
- QIU, L., LUO, D., ZHANG, H., SHI, Y., LI, Y., WU, D., CHEN, J., JI, M. & YANG, J. 2016. Nox-2-mediated phenotype loss of hippocampal parvalbumin interneurons might contribute to postoperative cognitive decline in aging mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8.
- RAM, M., SHERER, Y. & SHOENFELD, Y. 2006. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol*, 26, 299-307.
- RHODES, M. E. & RUBIN, R. T. 1999. Functional sex differences ('sexual diergism') of central nervous system cholinergic systems, vasopressin, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mammals: a selective review. *Brain Res Brain Res Rev*, 30, 135-52.
- RIVERA, S., KHRESTCHATISKY, M., KACZMAREK, L., ROSENBERG, G. A. & JAWORSKI, D. M. 2010. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci*, 30, 15337-57.
- ROH, C. R., OH, W. J., YOON, B. K. & LEE, J. H. 2000. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in human myometrium during labour: a cytokine-mediated process in uterine smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod*, 6, 96-102.
- ROHLEDER, N., JOKSIMOVIC, L., WOLF, J. M. & KIRSCHBAUM, C. 2004. Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-Inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 55, 745-51.
- RYBAKOWSKI, J. K., REMLINGER-MOLENDA, A., CZECH-KUCHARSKA, A., WOJCICKA, M., MICHALAK, M. & LOSY, J. 2013. Increased serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) levels in young patients during bipolar depression. *J Affect Disord*, 146, 286-9.
- RYBAKOWSKI, J. K., SKIBINSKA, M., KAPELSKI, P., KACZMAREK, L. & HAUSER, J. 2009. Functional polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene in schizophrenia. *Schizophr Res*, 109, 90-3.
- SANDNER, B., KRATZSCH, J. 2017. Influence of sex, body mass index and age on the results of the 2-mg overnight dexamethasone suppression test. *Journal of Laboratory Medicine*.

- SATO, T., ITO, A., OGATA, Y., NAGASE, H. & MORI, Y. 1996. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces pro-matrix metalloproteinase 9 production in human uterine cervical fibroblasts but interleukin 1alpha antagonizes the inductive effect of TNFalpha. *FEBS Lett*, 392, 175-8.
- SCHMIDT, U. 2015. A plea for symptom-based research in psychiatry. *Eur J Psychotraumatol*, 6, 27660.
- SCHMIDT, U., GALL-KLEEBACH, D. 2010. *Besonderheiten der Traumapsychotherapie von Soldaten und Kriegsveteranen - Ein Erfahrungsbericht*.
- SCHMIDT, U., HERRMANN, L., HAGL, K., NOVAK, B., HUBER, C., HOLSBOER, F., WOTJAK, C. T. & BUELL, D. R. 2013a. Therapeutic Action of Fluoxetine is Associated with a Reduction in Prefrontal Cortical miR-1971 Expression Levels in a Mouse Model of Posttraumatic Stress Disorder. *Front Psychiatry*, 4, 66.
- SCHMIDT, U., HOLSBOER, F. & REIN, T. 2011. Epigenetic aspects of posttraumatic stress disorder. *Dis Markers*, 30, 77-87.
- SCHMIDT, U., KALTWASSER, S. F. & WOTJAK, C. T. 2013b. Biomarkers in posttraumatic stress disorder: overview and implications for future research. *Dis Markers*, 35, 43-54.
- SCHNYDER, U. & MOERGELI, H. 2002. German version of Clinician-Administered PTSD Scale. *J Trauma Stress*, 15, 487-92.
- SCHOBITZ, B., DE KLOET, E. R., SUTANTO, W. & HOLSBOER, F. 1993. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci*, 5, 1426-35.
- SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.
- SCHUBERT, C. F., SCHRECKENBACH, M., KIRMEIER, T., GALL-KLEEBACH, D. J., WOLLWEBER, B., BUELL, D. R., UHR, M., ROSNER, R. & SCHMIDT, U. 2018. PTSD psychotherapy improves blood pressure but leaves HPA axis feedback sensitivity stable and unaffected: First evidence from a pre-post treatment study. *Psychoneuroendocrinology*, 100, 254-263.
- SCHUFF, N., NEYLAN, T. C., LENOCI, M. A., DU, A. T., WEISS, D. S., MARMAR, C. R. & WEINER, M. W. 2001. Decreased hippocampal N-acetylaspartate in the absence of atrophy in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 50, 952-9.
- SHIBASAKI, C., TAKEBAYASHI, M., ITAGAKI, K., ABE, H., KAJITANI, N., OKADA-TSUCHIOKA, M. & YAMAWAKI, S. 2016. Altered Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2, -9 in Response to Electroconvulsive Therapy for Mood Disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, 19.
- SHIN, L. M., RAUCH, S. L. & PITMAN, R. K. 2006. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci*, 1071, 67-79.
- SMITH, S. M. & VALE, W. W. 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience*, 8, 383-395.
- SONG, J., WU, C., KORPOS, E., ZHANG, X., AGRAWAL, S. M., WANG, Y., FABER, C., SCHAFERS, M., KORNER, H., OPDENAKKER, G., HALLMANN, R. & SOROKIN, L. 2015a. Focal MMP-2 and MMP-9 activity at the blood-brain barrier promotes chemokine-induced leukocyte migration. *Cell Rep*, 10, 1040-54.

- SONG, Z., ZHAO, X., LIU, M., JIN, H., WANG, L., HOU, M. & GAO, Y. 2015b. Recombinant human brain natriuretic peptide attenuates trauma-/haemorrhagic shock-induced acute lung injury through inhibiting oxidative stress and the NF-kappaB-dependent inflammatory/MMP-9 pathway. *Int J Exp Pathol*, 96, 406-13.
- STAWARSKI, M., STEFANIUK, M. & WLODARCZYK, J. 2014. Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines. *Front Neuroanat*, 8, 68.
- STEPHENS, M. A. C. & WAND, G. 2012. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol research : current reviews*, 34, 468-483.
- STOPPELBEIN, L., GREENING, L. & FITE, P. 2012. The role of cortisol in PTSD among women exposed to a trauma-related stressor. *J Anxiety Disord*, 26, 352-8.
- SUN, W., LIU, D. B., LI, W. W., ZHANG, L. L., LONG, G. X., WANG, J. F., MEI, Q. & HU, G. Q. 2014. Interleukin-6 promotes the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell lines and upregulates the expression of MMP-2 and MMP-9. *Int J Oncol*, 44, 1551-60.
- SZYMANOWSKI, A., NIJM, J., KRISTENSON, M. & JONASSON, L. 2011. Elevated levels of circulating matrix metalloproteinase-9 are associated with a dysregulated cortisol rhythm--A case-control study of coronary artery disease. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 139-43.
- THIERRY-MIEG, D. & THIERRY-MIEG, J. 2006. AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation, *Genome Biology* 2006, 7(Suppl 1):S12. *Genome Biology*.
- VAFADARI, B., SALAMIAN, A. & KACZMAREK, L. 2016. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J Neurochem*, 139 Suppl 2, 91-114.
- VAMVAKOPOULOS, N. C. & CHROUSOS, G. P. 1993. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J Clin Invest*, 92, 1896-902.
- VAN DER KOOIJ, M. A., FANTIN, M., REJMAK, E., GROSSE, J., ZANOLETTI, O., FOURNIER, C., GANGULY, K., KALITA, K., KACZMAREK, L. & SANDI, C. 2014. Role for MMP-9 in stress-induced downregulation of nectin-3 in hippocampal CA1 and associated behavioural alterations. *Nat Commun*, 5, 4995.
- VANDOOREN, J., VAN DAMME, J. & OPDENAKKER, G. 2014. On the structure and functions of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in neuroinflammation. *Prog Brain Res*, 214, 193-206.
- VANDOOREN, J., VAN DEN STEEN, P. E. & OPDENAKKER, G. 2013. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48, 222-72.
- VECIL, G. G., LARSEN, P. H., CORLEY, S. M., HERX, L. M., BESSON, A., GOODYER, C. G. & YONG, V. W. 2000. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res*, 61, 212-24.
- VIEWEG, W. V., JULIUS, D. A., FERNANDEZ, A., BEATTY-BROOKS, M., HETTEMA, J. M. & PANDURANGI, A. K. 2006. Posttraumatic stress disorder: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Am J Med*, 119, 383-90.

- VON KANEL, R., HEPP, U., KRAEMER, B., TRABER, R., KEEL, M., MICA, L. & SCHNYDER, U. 2007. Evidence for low-grade systemic proinflammatory activity in patients with posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res*, 41, 744-52.
- WANG, Y., LI, M., TANG, J., SONG, M., XU, X., XIONG, J., LI, J. & BAI, Y. 2011. Glucocorticoids facilitate astrocytic amyloid-beta peptide deposition by increasing the expression of APP and BACE1 and decreasing the expression of amyloid-beta-degrading proteases. *Endocrinology*, 152, 2704-15.
- WANG, Z. & YOUNG, M. R. 2016. PTSD, a Disorder with an Immunological Component. *Front Immunol*, 7, 219.
- WESSA, M. & FLOR, H. 2007. Failure of extinction of fear responses in posttraumatic stress disorder: evidence from second-order conditioning. *Am J Psychiatry*, 164, 1684-92.
- WHO 1993. *The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Diagnostic Criteria for Research.*, Geneva.
- WHO 2001. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation.
- WICHMANN, S., KIRSCHBAUM, C., BOHME, C. & PETROWSKI, K. 2017. Cortisol stress response in post-traumatic stress disorder, panic disorder, and major depressive disorder patients. *Psychoneuroendocrinology*, 83, 135-141.
- WILCZYNSKI, G. M., KONOPACKI, F. A., WILCZEK, E., LASIECKA, Z., GORLEWICZ, A., MICHALUK, P., WAWRZYNIAK, M., MALINOWSKA, M., OKULSKI, P., KOLODZIEJ, L. R., KONOPKA, W., DUNIEC, K., MIODUSZEWSKA, B., NIKOLAEV, E., WALCZAK, A., OWCZAREK, D., GORECKI, D. C., ZUSCHRATTER, W., OTTERSEN, O. P. & KACZMAREK, L. 2008. Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J Cell Biol*, 180, 1021-35.
- WILTFANG, J., BOUTER, C. & SCHMIDT, U. 2019. Alzheimer-Demenz: Neurobiologie, Diagnostik und experimentelle Ansätze. *PSYCH up2date*. Georg Thieme Verlag.
- WITTCHEN, H. & PFISTER, H. 1997. DIA-X-Interviews: Manual für Screening-Verfahren und Interview. *Interviewheft*.
- WONG, M. L. & LICINIO, J. 1994. Localization of interleukin 1 type I receptor mRNA in rat brain. *Neuroimmunomodulation*, 1, 110-5.
- WOODWARD, S. H., KALOUPEK, D. G., STREETER, C. C., MARTINEZ, C., SCHAEER, M. & ELIEZ, S. 2006. Decreased anterior cingulate volume in combat-related PTSD. *Biol Psychiatry*, 59, 582-7.
- WOON, F. L. & HEDGES, D. W. 2008. Hippocampal and amygdala volumes in children and adults with childhood maltreatment-related posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *Hippocampus*, 18, 729-36.
- YAFFE, K., VITTINGHOFF, E., LINDQUIST, K., BARNES, D., COVINSKY, K. E., NEYLAN, T., KLUSE, M. & MARMAR, C. 2010. Posttraumatic stress disorder and risk of dementia among US veterans. *Arch Gen Psychiatry*, 67, 608-13.
- YAMASUE, H., KASAI, K., IWANAMI, A., OHTANI, T., YAMADA, H., ABE, O., KUROKI, N., FUKUDA, R., TOCHIGI, M., FURUKAWA, S., SADAMATSU, M., SASAKI, T., AOKI, S., OHTOMO, K., ASUKAI, N. & KATO, N. 2003. Voxel-based analysis of MRI reveals anterior cingulate gray-matter volume reduction in posttraumatic stress disorder due to terrorism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9039-9043.

- YANG, J.-J. & JIANG, W. 2020. Immune biomarkers alterations in post-traumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 268, 39-46.
- YEHUDA, R. 2009. Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci*, 1179, 56-69.
- YEHUDA, R., CAI, G., GOLIER, J. A., SARAPAS, C., GALEA, S., ISING, M., REIN, T., SCHMEIDLER, J., MULLER-MYHSOK, B., HOLSBOER, F. & BUXBAUM, J. D. 2009. Gene expression patterns associated with posttraumatic stress disorder following exposure to the World Trade Center attacks. *Biol Psychiatry*, 66, 708-11.
- YEHUDA, R., DASKALAKIS, N. P., DESARNAUD, F., MAKOTKINE, I., LEHRNER, A. L., KOCH, E., FLORY, J. D., BUXBAUM, J. D., MEANEY, M. J. & BIERER, L. M. 2013a. Epigenetic Biomarkers as Predictors and Correlates of Symptom Improvement Following Psychotherapy in Combat Veterans with PTSD. *Front Psychiatry*, 4, 118.
- YEHUDA, R. & LEDOUX, J. 2007. Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron*, 56, 19-32.
- YEHUDA, R., NEYLAN, T. C., FLORY, J. D. & MCFARLANE, A. C. 2013b. The use of biomarkers in the military: from theory to practice. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 1912-22.
- YEHUDA, R., PRATCHETT, L. C., ELMES, M. W., LEHRNER, A., DASKALAKIS, N. P., KOCH, E., MAKOTKINE, I., FLORY, J. D. & BIERER, L. M. 2014. Glucocorticoid-related predictors and correlates of post-traumatic stress disorder treatment response in combat veterans. *Interface Focus*, 4, 20140048.
- YOSHIDA, T., ISHIKAWA, M., NIITSU, T., NAKAZATO, M., WATANABE, H., SHIRAISHI, T., SHIINA, A., HASHIMOTO, T., KANAHARA, N., HASEGAWA, T., ENOHARA, M., KIMURA, A., IYO, M. & HASHIMOTO, K. 2012. Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder. *PLoS One*, 7, e42676.
- ZABA, M., KIRMEIER, T., IONESCU, I. A., WOLLWEBER, B., BUELL, D. R., GALLKLEEBACH, D. J., SCHUBERT, C. F., NOVAK, B., HUBER, C., KOHLER, K., HOLSBOER, F., PUTZ, B., MULLER-MYHSOK, B., HOHNE, N., UHR, M., ISING, M., HERRMANN, L. & SCHMIDT, U. 2015. Identification and characterization of HPA-axis reactivity endophenotypes in a cohort of female PTSD patients. *Psychoneuroendocrinology*, 55, 102-15.
- ZATZICK, D. F., MARMAR, C. R., WEISS, D. S., BROWNER, W. S., METZLER, T. J., GOLDING, J. M., STEWART, A., SCHLENGER, W. E. & WELLS, K. B. 1997. Posttraumatic stress disorder and functioning and quality of life outcomes in a nationally representative sample of male Vietnam veterans. *Am J Psychiatry*, 154, 1690-5.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Chevalier, Céleste Marie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP9) mRNA als Biomarker für Diagnostik und Therapieverlauf der Posttraumatischen Belastungsstörung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, 17.02.2022

Ort, Datum

Céleste Chevalier

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand