

Aus der
Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Abteilung Allgemeine Psychiatrie und Psychotherapie mit
Poliklinik

Einfluss negativer Lebenserfahrungen
in Kindheit und Jugend
auf das Risiko einer späteren Depression:
Identifikation epigenetischer Biomarker

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

Vorgelegt von:
Falkenberg, Carolin Simone
2022

Dekan: Professor Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. V. Nieratschker

2. Berichterstatter: Professorin Dr. A. Conzelmann

Datum der Disputation: 15.03.2022

Inhaltsverzeichnis

TABELLENVERZEICHNIS	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	12
1.1 Frühkindliche Traumata	12
1.2 Schwere Depression (Major Depressive Disorder)	18
1.3 Epigenetik	24
1.4 Studiendesign	29
2 MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Materialien, Geräte und Hersteller	32
2.2 Probandenkollektiv	33
2.2.1 Gruppeneinteilung (Gruppe mit ELA und Kontrollgruppe)	34
2.2.2 Mini International Neuropsychiatric Interview M.I.N.I.	35
2.2.3 BaDo- Dokumentation der Lebensgewohnheiten	37
2.3 Psychometrische Skalen	38
2.3.1 Childhood Trauma Questionnaire (CTQ)	39
2.3.3 Beck's Depression Inventory II (BDI-II)	42
2.3.4 Beck's Anxiety Inventory (BAI)	44
2.3.5 Stress-Reaktivitäts-Skala (SRS)	45
2.3.6 Symptom-Checklist-90-Revised (SCL-90-R)	46
2.3.7 Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q)	49
2.3.8 Life Stressor Checklist-Revised (LSC- R)	50
2.4 Aufbereitung der Blutproben	51
2.4.1 DNA-Extraktion aus Vollblut	51
2.4.2 Messung der DNA-Konzentration	52
2.4.3 Bisulfit-Konvertierung	53
2.4.4 DNA-Vervielfältigung	55
2.5 Pyrosequenzierung	57
2.6 Genotypisierung	61
2.7 Statistik	64

3	ERGEBNISSE	65
3.1	BaDo- Dokumentation der Lebensgewohnheiten	66
3.2	Psychometrische Skalen	68
3.2.1	Beck's Depression Inventory II (BDI-II)	68
3.2.2	Beck's Anxiety Index (BAI)	69
3.2.3	Stressreaktivitätsskala (SRS)	70
3.2.4	Symptom-Checklist-90-Revised (SCL-90-R)	71
3.2.5	Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q)	72
3.3	Epigenetik: Die prozentuale Methylierung der CpG-Sites Chr3.108838388, Chr3.108838285 und Chr3.108838104	74
3.3.1	Early Life Adversities	74
3.3.2	Lebensgewohnheiten: Alkoholkonsum und Benzodiazepine	81
3.3.3	Depressive Symptomatik	82
4	DISKUSSION	85
4.1	BaDo- Unterschiede der Lebensgewohnheiten	86
4.2	Psychometrische Skalen	87
4.2.1	Beck's Depression Inventory II (BDI-II) und Beck's Anxiety Index (BAI)	87
4.2.2	Stressreaktivitätsskala (SRS)	88
4.2.3	Symptom-Checklist-90-Revised (SCL-90-R)	88
4.2.4	Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q)	89
4.3	Epigenetik: Die prozentuale Methylierung der CpG-Sites Chr3.108838388, Chr3.108838285 und Chr3.108838104	91
4.3.1	Der Einfluss von Early Life Adversities	91
4.3.2	Der Einfluss unterschiedlicher Lebensgewohnheiten: Alkoholkonsum und Benzodiazepine	96
4.3.3	Der Einfluss von depressiver Symptomatik	96
5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	LITERATURVERZEICHNIS	102
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	113
	ANHANG	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung und Diagnosekriterien depressiver Episoden nach dem ICD-10.....	21
Tabelle 2:	M.I.N.I.: Störungsbilder und die für die Diagnosestellung relevanten Zeiträume in dem die Kriterien des Störungsbild erfüllt werden müssen.	37
Tabelle 3:	CTQ: Kategorien der frühkindlichen Traumatisierung und die jeweiligen zugehörigen Items.....	41
Tabelle 4:	CTQ: Kategorien der frühkindlichen Traumatisierung und Einteilung in Schweregrade der Misshandlung	41
Tabelle 5:	Abgefragte Aussagen im BDI-II.....	43
Tabelle 6:	BDI-II: Einteilung in Schweregrade einer Depression und Gruppeneinteilung in SPSS.....	43
Tabelle 7:	BAI: Einteilung in Schweregrade der Angst und Gruppeneinteilung in SPSS.....	45
Tabelle 8:	SCL-90-R: Auswertung mit Hilfe von Globalen Kennwerten und Parametern	47
Tabelle 9:	SCL-90-R: Skalenniveaus und zugehörige Beschreibung der Symptome.....	47
Tabelle 10:	CECA.Q: Cut-Off-Werte nach erreichter Punktzahl	50
Tabelle 11:	Bisulfitkonvertierung: Schritte, Dauer und Temperatur des Inkubationsprogramms im Thermocycler.....	54
Tabelle 12:	PCR-Programm: Schritte, Dauer und Temperatur im Thermocycler	56
Tabelle 13:	Genotypisierung: StepOne-Inkubationsprogramm der Real Time PCR im Thermocycler	62
Tabelle 14:	Genotypisierung: Korrelation zwischen Floureszenzsignal und Genotyp der Probe	62

Tabelle 15: Psychometrische Skalen: Übersicht der Unterschiede zwischen
Probanden mit ELA und der Kontrollgruppe in der Beantwortung
..... 68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Reaktion der Bisulfit-Konvertierung	55
Abbildung 2:	Gelelektrophorese einer PCR für MORC_CpG2.....	57
Abbildung 3:	Prozentuale Methylierungswerte der analysierten CpG-Sites zur Darstellung möglicher Ausreißer	61
Abbildung 4:	TaqMan Reagents Detection Process	63
Abbildung 5:	Altersverteilung zwischen Probanden mit ELA (ELA=1) und der Kontrollgruppe (ELA=0)	67
Abbildung 6:	Vergleich der Mittelwerte des BDI-II Gesamtsummenscore zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1	69
Abbildung 7:	Vergleich der Mittelwerte des BAI Gesamtsummenscore zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1	70
Abbildung 8:	Vergleich der Mittelwerte des Gesamtsummenscore der SRS zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1	71
Abbildung 9:	Vergleich der Mittelwerte des GSI T-Wertes zwischen den beiden Gruppen ELA=0 und ELA=1	72
Abbildung 10:	Prozentuale Methylierungswerte der analysierten CpG-Sites im Vergleich zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1	75
Abbildung 11:	Vergleich der prozentualen Methylierung von MORC_Mittelwert zwischen den Schweregraden der Kategorie „Emotionale Vernachlässigung“	78
Abbildung 12:	Vergleich der Mittelwerte der Methylierung von MORC_Mittelwert zwischen den Gruppen Parentalloss=0 und Parentalloss=1.....	80
Abbildung 13:	Vergleich der prozentualen Methylierungswerte der CpG-Site MORC_CpG3 zwischen den einzelnen Schweregraden des BDI-II.....	84

Abkürzungsverzeichnis

5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5HTTLPR	Serotonin transporter length polymorphic region
5-mC	5-Methylcytosin
ACTH	Adrenocorticotropin
ALS2	Alsin Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BaDo	Basisdokumentation
BAI	Beck's Anxiety Inventory
BDI-II	Beck's Depression Inventory-II
BDNF	Brainderived Neurotrophic Factor
CCD	Charged Coupled Devices
CECA.Q	Childhood Expierence of Care and Abuse Questionnaire
COMT	Catechol-o-methyltransferase
CRCh37 (hg19)	Genome Reference Consortium Human Build 37 (Synonym: hg19)
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CRH-R1	Corticotropin-releasing-Hormon-Rezeptor 1
CRH-R2	Corticotropin-releasing-Hormon-Rezeptor 2
CRP	C-reaktives Protein
CTQ	Childhood Trauma Questionnaire
DALYs	Disability adjusted life years
dATP	Desoxyadenosintriposphat
dATP α S	Desoxyadenosin-Alpha-Thio-Triphosphat

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM-V	Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen-V
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELA	Early Life Adversities
ELS	Early Life Stress
Eppi	Eppendorf-Reaktionsgefäß
FKBP5	FK506-Bindungsprotein 5
FKBP51	FK506-binding protein 51
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GSI	Global Severity Index
GTP	Guanosintriphosphat
GWAS	Genome-wide association study
HOMER1	Homer Scaffold Protein 1
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
hs-CRP	high sensitivity C-reaktives Protein
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10
IL-6	Interleukin-6
IQR	Interquartilsabstand
LSC-R	Life-Stressor-Checklist-Revised
M.I.N.I.	Mini International Neuropsychiatric Interview
MDD	Major Depressive Disorder
MeCP2	Methyl-CpG-binding-protein 2

MeDIP	methylierte DNA-Immunopräzipitation
MGB	Minor Groove Binder
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MORC_CpG2	CpG-Site Chr.3.108838388
MORC_CpG3	CpG-Site Chr.3.108838285
MORC_CpG5	CpG-Site Chr.3.108838104
MORC_Mittelwert	gemittelte prozentuale Methylierung aller drei analysierten CpG-Sites
MORC1	Microorchidia 1
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
NFQ	Non-Fluorescent Quencher
NR3C1	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1
o.g.	oben genannt
PCR	Polymerasekettenreaktion
PM20D1	Peptidase M20 Domain Containing 1
PPi	Pyrophosphat
PSDI	Positive Symptom Distress Index
PST	Positive Symptom Total
Psy-BaDo	Basisdokumentation in der Psychotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SAM	S-Adenosin-Methionin
SCL-90-R	Symptom-Checklist-90-Revised
SD	Standardabweichung
SLC6A4	Solute Carrier Family 6 Member 4
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. Single Nucleotide)

Polymorphism)

SRS	Stress-Reaktivitätsskala
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TET1	Ten Eleven Translocation 1
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WHO	World Health Organization
YLD	Years lost due to disability
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Frühkindliche Traumata

Frühkindliche Traumata (Early Life Adversities [ELA] und Early Life Stress [ELS]) und die daraus folgenden Konsequenzen sind ein großes Problem des öffentlichen Gesundheits- und Sozialsystems, verbunden mit hohen gesellschaftlichen Kosten (1, 2). Die daraus resultierenden negativen Effekte beeinflussen die Betroffenen nicht nur unmittelbar nach Erleben des Traumas, sondern persistieren bis ins Erwachsenenalter (1, 3) und erhöhen das Risiko für eine Reihe von physischen und psychischen Erkrankungen. Dies betrifft insbesondere die Angst- und affektiven Störungen, zu denen auch die Major Depressive Disorder (MDD), die schwere Depression gehört (4).

Die zuverlässige Aufzeichnung von Prävalenzraten von Traumata in der Kindheit gestaltet sich schwierig. Dies ist mitunter begründet in uneinheitlichen Erfassungssystemen (1, 2). Kindliche Traumatisierung ist jedoch ein weit verbreitetes Phänomen. In retrospektiven Befragungen von repräsentativen Stichproben in Ländern mit hohem Einkommen erlitten im Schnitt circa 30 bis 35% der erwachsenen Bevölkerungen ein frühkindliches Trauma (1, 2, 5, 6). Oft zeigt sich eine große Diskrepanz zwischen den von Kinderschutzbehörden angegebenen niedrigeren Prävalenzraten und deutlich höheren Raten aus retrospektiven Befragungen von repräsentativen Stichproben (1).

Der Begriff „Trauma“ umfasst nach dem Diagnostischem und Statistischem Manual Psychischer Störungen V (DSM-V) ein breites Spektrum an Erlebnissen oder der Beobachtung von Ereignissen, die auf unterschiedliche Weise mit dem Tod, der Androhung des Todes, schweren Leids, einer schweren Verletzung oder einer Bedrohung der körperlichen Unversehrtheit von einem selbst oder einer anderen Person und dem Erleben von Angst, Hilflosigkeit und Entsetzen einhergehen (7).

Early Life Stress oder Early Life Adversities beinhalten ein breites Spektrum von schon früh im Leben erlebter traumatischer Ereignisse, beginnend mit pränatalen Stressfaktoren, die die Entwicklung des Kindes in Utero beeinflussen können (8, 9), bis hin zu traumatischen Erlebnissen in der Kindheit und Adoleszenz (10-14). In der vorliegenden Studie sind vor allem traumatische Erlebnisse in der Kindheit bis zum Abschluss der Adoleszenz von Bedeutung, wie zum Beispiel körperlicher, seelischer und sexueller Missbrauch, Gewalt, Verlust der Eltern oder körperliche oder emotionale Vernachlässigung (10-14). Zur Vereinfachung wird in die folgenden fünf Kategorien eingeteilt:

1. Sexueller Missbrauch: Sexueller Missbrauch beschreibt jegliche Art sexueller Handlungen mit einem Kind. Das Kind ist aufgrund seiner entwicklungsrechtlichen Unterlegenheit unfähig Zustimmung oder Ablehnung zu erteilen oder die Handlungen zu verstehen. Als Täter kommen jegliche Personen in Frage, die in einem Art Machtverhältnis gegenüber dem Kind stehen, das heißt Täter können erwachsene Männer oder Frauen, sowie andere Kinder und Jugendliche sein. Der Täter nutzt dabei seine Machtposition und beutet die Verletzlichkeit des Kindes aus (15).
2. Körperlicher Missbrauch: Unter körperlichem Missbrauch werden alle körperlichen Übergriffe, die in einer Verletzung der Gesundheit, Entwicklung oder Würde des Kindes resultieren oder resultieren könnten, zusammengefasst.
3. Emotionaler Missbrauch: Emotionaler Missbrauch sind nicht-physische Angriffe auf den Selbstwert oder das Wohlbefinden eines Kindes, sowie erniedrigendes, bedrohliches oder beschämendes Verhalten gegenüber dem Kind.
4. Körperliche Vernachlässigung: Die körperliche Vernachlässigung beschreibt das Versagen der Eltern, eines Elternteils, des Erziehungsberechtigten oder einer anderen für das Kind verantwortlichen Person die physischen Grundbedürfnisse des Kindes, wie Nahrung, Obdach und Schutz zu gewährleisten.

5. Emotionale Vernachlässigung: Emotionale Vernachlässigung beschreibt ergänzend dazu das Versagen die psychischen Grundbedürfnisse des Kindes, wie Liebe, Zuneigung, Gesundheit und Unterstützung zu sichern.

Nicht aufgeführt in der oben genannten kategorischen Einteilung frühkindlicher Traumata ist der Verlust eines Elternteils oder eines Elternteilersatzes durch Tod, Trennung oder Scheidung der Eltern, das Verlassen werden durch die Eltern oder psychiatrische Erkrankungen der Eltern. Aber auch diese Faktoren frühkindlicher Traumatisierung sind mit gravierenden Auswirkungen auf mitunter die psychische Gesundheit bis ins Erwachsenenalter assoziiert. So erhöht beispielsweise der Verlust eines Elternteils in der Kindheit durch Tod oder dauerhafte Trennung von den Eltern die Wahrscheinlichkeit im Erwachsenenalter an einer Depression, Bipolaren Störung oder an Schizophrenie zu erkranken (16, 17). Somit ist auch der Verlust eines Elternteils in der Kindheit ein wichtiger Faktor frühkindlicher Traumatisierung.

Der Begriff Early Life Stress (ELS) oder Early Life Adversities (ELA) bezeichnet wie oben genannt nicht nur die aufgeführten traumatischen Erlebnisse in der Kindheit und Adoleszenz, sondern auch pränatale Stressfaktoren, die die Entwicklung des Kindes nachhaltig beeinflussen. Dazu gehören belastende Lebensereignisse, Krankheit und Drogenabhängigkeit der werdenden Mutter oder Umweltfaktoren, mit negativen Auswirkungen auf die Gesundheit der Mutter. So führen beispielsweise Depressionen und Stress während der Schwangerschaft zu Defiziten der frühen Gehirnentwicklung des Fötus mit dauerhaften Veränderungen der neuroendokrinen Funktionen resultierend in einer beeinträchtigten neurologischen, kognitiven und motorischen Entwicklung des Kindes, sowie zu einer Überempfindlichkeit gegenüber Stress (9). Auch Mangelernährung während der Schwangerschaft hat gravierende Auswirkungen auf das heranwachsende Kind und führt später zu einem erhöhten Risiko des Kindes selbst an Schizophrenie oder Depressionen, Koronarer Herzkrankheit oder an Diabetes Mellitus Typ 2 zu erkranken (8).

Zahlreiche Studien belegen, dass ELA, einschließlich der oben genannten traumatischen Erlebnisse wie sexuelle, körperliche und emotionale

Misshandlung, körperliche und emotionale Vernachlässigung oder Verlust eines Elternteils, das Risiko im späteren Leben psychische oder physische Krankheiten zu entwickeln deutlich erhöhen (1, 18-20).

Körperlicher Missbrauch in der Kindheit ist mit einem erhöhten Risiko für Gastrointestinale Ulzera, Rheumatoide Arthritis und Lungenerkrankungen, wie Asthma bronchiale oder Bronchitis assoziiert. Sexueller Missbrauch im Kindesalter ist mit einem erhöhten Risiko für Herzerkrankungen verbunden und Vernachlässigung in der Kindheit steigert das Risiko im späteren Leben an Diabetes Mellitus und anderen Autoimmunerkrankungen, wie Lupus zu erkranken (21). Auch leiden durch ELA traumatisierte Erwachsene häufiger an altersbedingten Krankheiten, unabhängig von familiärer Prädisposition oder persönlichem gesundheitlichem Risikoverhalten. Betroffene weisen gehäuft hohe Entzündungswerte, gemessen am hs-CRP und gehäuft metabolische Risikofaktoren, wie unter anderem Adipositas, arterielle Hypertonie, ein hohes Gesamtcholesterin oder ein erniedrigtes HDL-Cholesterin auf. Diese anhaltenden emotionale, immunologischen und metabolischen Abweichungen, tragen zur Erklärung des Risikos für altersbedingte Krankheiten bei (22).

Frühkindliche Traumata bedingen vor allem auch ein erhöhtes Risiko an psychischen Krankheiten (23), die umgekehrt ebenfalls mit zahlreichen negativen körperlichen und sozialen Effekten einhergehen, wie ein geringeres Einkommen, eine höhere Rate an Scheidungen, Alleinlebenden, Rauchen und wiederum gehäuft körperliche Erkrankungen (17). Sexueller und körperlicher Missbrauch, Gewalt innerhalb der Familie, sowie emotionale und körperliche Vernachlässigung zeigen unter anderem die signifikantesten Effekte auf das spätere Auftreten einer psychischen Erkrankung. Es konnten sogar subadditive Effekte in Bezug auf das Auftreten psychischer Störungen nachgewiesen werden, wenn diese Traumata gemeinsam auftreten (24, 25).

Es spielen vor allem Angst- und affektive Störungen eine besonders große Rolle (4, 22). Das Risiko nach erlebtem sexuellem Missbrauch an einer Depression zu erkranken ist dreifach erhöht im Vergleich zu nicht betroffenen Kontrollen und das Suizidrisiko ist sogar achtfach erhöht (26). Bei einer von vier Frauen und 24%

der Männer mit affektiver Störung, wie der MDD oder auffälligen psychopathologischen Befunden sind diese bedingt durch das Erleben von frühkindlichen Traumata (27).

ELA erhöhen nicht nur das Risiko eine psychische Erkrankung zu erleiden, sie zeigen auch statistisch signifikante Auswirkungen auf die Persistenz und Chronifizierung einer solchen (24) und verlängern die Dauer depressiver Episoden (28, 29). Zusätzlich zeigt sich, dass die Wahrscheinlichkeit an einer Depression zu erkranken auch von Schwere, Häufigkeit und Dauer des Missbrauchs abhängt. Nehmen diese Faktoren zu, steigt auch die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Depression (30). Sexueller Missbrauch, sowie körperliche und emotionale Vernachlässigung führen beispielsweise schon in jungem Erwachsenenalter und der Adoleszenz zu vermehrtem Auftreten, früherem Krankheitsbeginn sowie lebenslanger Persistenz einer MDD (29). Auch der Verlust eines Elternteils führt zu einem erhöhten Risiko an einer Depression, einer bipolaren Persönlichkeitsstörung oder an einer Schizophrenie zu erkranken (17).

Kinder reagieren besonders empfindlich auf schädliche Einflüsse, die das Depressionsrisiko erhöhen da ELA persistierende neurobiologische Auswirkungen auf das sich entwickelnde Gehirn haben (17, 30-32). Dies führt im Erwachsenenalter zu einem Phänotyp der anfällig für Stress, Depression und Angst ist. Auch Kendler et al 2004 zeigen, dass sexueller Missbrauch an Mädchen in der Kindheit die Stresssensitivität gegenüber depressiogenen Faktoren im späteren Leben erhöht. So erkranken die betroffenen Frauen später in belastenden oder fordernden Lebenssituationen gehäuft an einer MDD (32).

Als Ursache der erhöhten Vulnerabilität gegenüber psychischen Erkrankungen wird angenommen, dass ELA Auswirkungen auf verschiedene Systeme des Körpers haben, die eine chronische Überaktivierung der Stressreaktivität bedingen (30). Dieser Effekt ist sogar unabhängig von möglichen vorhandenen klinischen Komorbiditäten (33). In der Stressantwort des Körpers wird unter anderem der Zusammenhang zwischen ELA und dem Auftreten vieler der oben genannten Krankheiten, aber vor allem der MDD vermutet: Es liegt eine

dauerhafte Veränderung des endogenen Stressregulationssystems und des Immunsystems des Körpers vor, vermittelt unter anderem durch eine Überaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse). Die HPA-Achse und die zugehörigen hormonellen Schaltkreise stellen das wichtigste neuroendokrine Stressreaktionssystem von Säugetieren dar. Bei Exposition gegenüber Stress wird das Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus freigesetzt. CRH führt daraufhin im Hypophysenvorderlappen zur Freisetzung von u.a. Adrenocorticotropin (ACTH), das wiederum die Produktion und Freisetzung in den Blutkreislauf von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde stimuliert. Zwei Arten von Glukokortikoidrezeptoren, der Glukokortikoid- und der Mineralokortikoidrezeptoren im Hypothalamus, im Hippocampus und in der Hypophyse vermitteln eine negative Rückkopplung, um die HPA-Stressreaktion zu regulieren. Der Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 1 (CRH-R1) vermittelt die Stressreaktion und der Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 2 (CRH-R2) hilft dabei diese abzuschwächen. Frühkindliche Traumata und die MDD gehen mit schwerwiegenden bleibenden Veränderungen der HPA-Achse einher: Die Aktivität des CRH-R1 ist dauerhaft beeinträchtigt und es lässt sich u.a. eine erhöhte Liquorkonzentration von CRH bei depressiven Patienten nachweisen. Im Vergleich zu nicht traumatisierten Erwachsenen weisen Traumatisierte eine höhere ACTH- und Cortisol-Antwort auf Stressereignisse auf. Zusammengenommen führen diese Veränderungen in der CRH-vermittelten Stressreaktion aufgrund eines frühkindlichen Trauma bei genetisch prädisponierten Personen zu einer erhöhten Stressempfindlichkeit und einem erhöhten Risiko für Depressionen (30, 33-36).

Zum anderen bedingen ELA höhere grundsätzliche Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, des CRP oder TNF- α . Dies kann bei Betroffenen zu einer höheren Stressanfälligkeit, einem sogenannten proinflammatorischen Phänotyp und somit Vulnerabilität gegenüber depressiogenen Faktoren führen (37, 38).

Eine Ursache des Zusammenhangs zwischen frühkindlichen Traumata, also externen beeinflussbaren Stimuli und verschiedenen stressassoziierten

psychischen Krankheiten wie der MDD sind möglicherweise epigenetische Modifikationen: Die Grundlage der vorliegenden Studie (39-41). Epigenetische Modifikationen sind ein Mechanismus, durch den Umwelteinflüsse zu Veränderungen der Genexpression führen können, wovon manche langanhaltend sind. Man glaubt, die Empfindlichkeit des Einzelnen gegenüber Stressereignissen ist teilweise von seinem Genotyp abhängig (4). Die Epigenetik in Kombination mit der genetischen Ausstattung eines Individuums könnte so die Übersetzung von psychischen Stressfaktoren in langanhaltende biologische Veränderungen bieten (39). Die genauen Mechanismen der Epigenetik und die bisher bekannten Zusammenhänge zwischen ELA, psychischen Krankheiten und epigenetischen Veränderungen werden in Kapitel 1.3 beschrieben.

1.2 Schwere Depression (Major Depressive Disorder)

Depressive Störungen gehören nicht nur zu den häufigsten Erkrankungen mit einer Lebenszeitprävalenz von 16-20% (42), sie gehören auch zu den Erkrankungen, die in einkommensstarken Ländern das beschwerdefreie und normale Leben der Betroffenen am stärksten einschränken. Dies wird gemessen an „Years lost due to Disability (YLD)“ als Maß der Belastung durch das Leben mit der Krankheit und an den „Disability adjusted life years (DALYs)“, die zusätzlich zu den YLD noch verlorene Lebensjahre durch frühzeitigen Tod miteinbeziehen (43, 44). Auch die wirtschaftliche Belastung durch Patienten mit einer MDD ist erheblich. Grund sind zum einen die Inanspruchnahme medizinischer Dienstleistungen wie z.B. stationäre Aufenthalte, Arztbesuche oder Rehabilitationsmaßnahmen und zum anderen Ausfälle am Arbeitsplatz (45-47). Allein in Deutschland verursachen depressive Störungen 8717 Mio. Euro der jährlichen direkten Krankheitskosten (48). Die hohen Kosten sind nicht ausschließlich durch die MDD bedingt, sondern in den meisten Fällen zusätzlich verursacht durch verschiedene Komorbiditäten einhergehend mit einer MDD (45, 46). Die häufigsten Komorbiditäten depressiver Störungen sind andere psychische Erkrankungen, wie Angst- und Panikstörungen oder Suchterkrankungen, aber auch Essstörungen, Zwangsstörungen oder

Persönlichkeitsstörungen werden häufig im Zusammenhang mit einer MDD beobachtet (42, 49-51). Lebenszeitprävalenzen unter Patienten mit einer MDD für beispielsweise Angststörungen liegen bei bis zu 37,7%, für Suchterkrankungen bei bis zu 57,9% und für Persönlichkeitsstörungen bei bis zu 31,9% (52). Zudem sind zahlreiche Wechselwirkungen zwischen kardialen, vaskulären oder onkologischen somatischen Erkrankungen, wie z.B. Diabetes Mellitus, koronarer Herzkrankheit oder Parkinson und depressiven Störungen bekannt (42, 53, 54). Zum einen treten Depressionen gehäuft aufgrund der psychischen Belastung dieser somatischen Erkrankungen auf und zum anderen fördern Depressionen das Auftreten ebensolcher und wirken gleichzeitig als negativer Prädiktor für Mortalität und Krankheitsverlauf (49).

Depressive Störungen gehören zu der Gruppe der affektiven psychischen Störungen, gekennzeichnet durch eine Änderung der Affektivität hin zu gedrückter Stimmung. Innerhalb der Gruppe der depressiven Störungen gibt es zahlreiche Formen angefangen mit der Dysthymia, einer leichten depressiven Verstimmung bis hin zu rezidivierenden depressiven Episoden auch Major Depressive Disorder (MDD) (49). Nach dem ICD-10, ein von der WHO herausgegebenes Klassifikationssystem für medizinische Diagnosen, sind die Hauptsymptome depressiver Episoden gedrückte, depressive Stimmung, Interessensverlust und Freudlosigkeit sowie eine Verminderung des Antriebs mit erhöhter Ermüdbarkeit, häufig verbunden mit einer starken Einschränkung der Aktivität. Zusätzlich auftreten können verminderte Konzentration und Aufmerksamkeit, vermindertes Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen, Schuldgefühle und Gefühle von Wertlosigkeit, Schlafstörungen, suizidale Gedanken, Handlungen oder Selbstverletzungen. Weiterhin werden häufig sogenannte „somatische“ Symptome wie Früherwachen oder ein morgendliches Tief, deutliche psychomotorische Hemmung, Agitiertheit, verminderter Appetit, Gewichtsverlust oder Libidoverlust beobachtet. Entscheidend für die Diagnose einer depressiven Episode ist das Vorhandensein von mindestens zwei Symptomen über einen Zeitraum von zwei Wochen. Weiterhin wird je nach Anzahl, Schwere der vorhandenen Symptome und Einschränkung der Alltagsaktivitäten zwischen einer leichten, mittelgradigen oder schweren

depressiven Episode unterschieden. Bestehen bei einer schweren depressiven Episode zusätzlich ausgeprägte, den Alltag einschränkende psychotische Symptome wie Halluzinationen, Wahnideen, psychomotorische Hemmung oder Stupor wird von einer schweren depressiven Episode mit psychotischen Symptomen gesprochen. Diese können so weit reichend sein, dass Lebensgefahr durch Suizid oder unzureichende Flüssigkeits- oder Nahrungsaufnahme für den Patienten besteht. Auch bei Depressionen ohne psychotische Anteile sind Suizide häufig. Bei circa 30% der durch Suizid bedingten Tode liegt eine affektive Störung vor, zu der auch die MDD gehört (55). Bei mindestens einmaliger Wiederholung ebensolcher depressiver Episoden in der Vorgeschichte des Patienten wird von rezidivierenden depressiven Episoden unterschiedlichen Schweregrades gesprochen (49, 56). Der ICD-10 klassifiziert noch zahlreiche weitere Formen depressiver Störungen, wie beispielsweise die Dysthymia, als anhaltende depressive Verstimmung oder beispielsweise depressive Verhaltensstörungen im Wochenbett (56). Nach dem weltweit angewandten diagnostischen und statistischen Manual psychischer Störungen-V (DSM-V) müssen zur Diagnosestellung einer depressiven Episode mindestens fünf der im DSM-V aufgeführten Symptome an fast jedem Tag während derselben zweiwöchigen Periode bestehen. Die aufgeführten Symptome stimmen annähernd mit dem ICD-10 überein. Analog zum ICD-10 wird nach einmaligen oder wiederkehrenden Episoden mit unterschiedlichem Schweregrad unterschieden. Auch das DSM-V bietet weitere Kategorien zur zusätzlichen Einteilung depressiver Störungen, wie zusätzlich vorhandene ängstliche, manische oder psychotische Symptome oder peripartalem Beginn (57).

Tabelle 1: Einteilung und Diagnosekriterien depressiver Episoden nach dem ICD-10 (42, 56)

Schweregrad nach ICD-10	Diagnosekriterien
Leichte depressive Episode	<ul style="list-style-type: none"> • 2 Hauptsymptome und 2 Zusatzsymptome • Fortsetzen alltäglicher Aktivitäten möglich
Mittelgradige depressive Episode	<ul style="list-style-type: none"> • 2 Hauptsymptome und 2-4 Zusatzsymptome • Fortsetzen alltäglicher Aktivitäten nur sehr schwierig möglich
Schwere depressive Episode	<ul style="list-style-type: none"> • 3 Hauptsymptome und min. 4 Zusatzsymptome • Verlust des Selbstwertgefühls, Schuldgefühle und Suizidgedanken und -handlungen typisch • Meist mit somatischen Symptomen

Rezidivraten depressiver Störungen sind hoch und die Wahrscheinlichkeit erneut zu erkranken liegt bei ca. 50% und steigt mit der Anzahl der bereits durchgemachten depressiven Episoden. Nach der dritten Episode erleiden ca. 90% der Patienten ein Rezidiv (42, 49). Depressive Störungen treten familiär gehäuft auf, mit einer Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen von bis zu 50% (42).

Die Pathogenese depressiver Störungen kann nicht abschließend geklärt werden. Angenommen wird ein multifaktorielles Zusammenspiel zwischen biologischen Faktoren (wie genetische Veranlagung, Gleichgewichtsstörungen von neuronalen Transmittern, erhöhte Stressanfälligkeit oder strukturelle Gehirnveränderungen) und umweltbedingten Faktoren (wie traumatische Erlebnisse und die Fähigkeit diese zu bewältigen oder hormonelle Faktoren) (42).

Die genetische Disposition an einer MDD zu erkranken kann 40% bis 50% betragen (58). Einzelne MDD verursachende Gene konnten bisher nicht identifiziert werden, vielmehr ist die MDD eine polygene Erkrankung, die durch Veränderungen auf verschiedenen Genen mit verursacht wird (59). Diese genetischen Veränderungen können als genetische Risikofaktoren fungieren, die im Zusammenspiel mit umweltbedingten externen Faktoren das Auftreten einer MDD begünstigen oder abschwächen (60). Die Pathogenese der MDD ist also ein Zusammenwirken zwischen der variablen Verletzlichkeit des Individuums basierend auf genetischer Prädisposition mit umweltbedingten Einflussfaktoren, die einerseits die Erkrankung begünstigen können und andererseits protektiv wirken können.

Umweltbedingte Einflussfaktoren und Risiken beinhalten vor allem das familiäre und soziale Umfeld, aber auch religiöse, moralische, arbeitsplatz- oder ausbildungsbezogene Aspekte, die Auswirkungen auf das einzelne Individuum haben. Wichtige negative umweltbedingte Einflussfaktoren stellen die oben genannten frühkindlichen Traumata dar. Bei genetisch anfälligen Personen erhöht die Exposition gegenüber frühem Stress, insbesondere während neurobiologisch anfälliger Entwicklungsphasen die Wahrscheinlichkeit einer Depression. Auf der anderen Seite kann beispielsweise familiäre Unterstützung die Folgen von sexuellem und emotionalem Missbrauch in der Familie abschwächen. Eine MDD ist somit häufig die Folge genetischer Veranlagung, früher kindlicher Traumata und kürzlicher Stressereignisse, wie z.B. finanzielle Probleme, Scheidung, schwere Krankheit oder Schwierigkeiten am Arbeitsplatz (32).

Diese sogenannte Gen-Umwelt-Interaktionen beinhalten verschiedene Mechanismen: Dazu gehören Variationen der Erblichkeit je nach Umweltbedingungen, Gen-Umwelt Korrelationen und Wechselwirkungen zwischen spezifischen identifizierten Genen und spezifischen umweltbedingten Risiken. Ebenfalls dazu zählen epigenetische Modifikationen, als Mechanismus durch den Umwelteinflüsse zu bleibenden Veränderungen der Genexpression führen können. Aufgrund der besonderen Relevanz für die vorliegende Studie

werden epigenetische Modifikationen im Zusammenhang mit ELA und der MDD in Kapitel 1.3 gesondert vorgestellt.

Die Auswirkungen von diesen externen umweltbedingten Einflüssen hängen von der individuellen genetischen Ausstattung ab. In genomweiten Analysen (GWAS) konnten einige mit einer MDD assoziierte Gen-Loci und SNPs identifiziert werden (39, 60-64). Dazu gehören beispielsweise die genetischen Polymorphismen des Serotonin-Transporter-Gens (SLC6A4), des CRH-Rezeptors, des FK506-Bindungsproteins 5 (FKBP5) und der Gene des Brainderived Neurotrophic Factor (BDNF), sowie die Gen-Loci HOMER1 und Microorchidia 1 (MORC1), einem CW-Typ Zink Finger Protein.

Bei einigen Gen-Loci dieser SNPs konnte bereits in Tierexperimenten und auch beim Menschen ein Zusammenhang zur MDD und zu dem Erleben frühkindlicher Traumata als wichtiger umweltbedingter Einflussfaktor geschaffen werden. Auch im Zusammenhang mit dem Erleben von Stress konnten durch genomweite Screenings verschiedene Gen-Loci identifiziert werden, die mit dem HPA-Achsen System in Verbindung stehen und somit mit Depressionen assoziiert sind (65) oder die in verschiedene Signalwege involviert sind, wie der Entzündungsregulation, der Immunantwort, der Apoptose oder der Transkription (66, 67). Nach dem Erleben von ELA erhöht die kurze Form der Promotorregion 5HTTLPR des Serotonin-Rezeptorgens SLC6A4 die Anfälligkeit von Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen an einer anhaltenden MDD zu erkranken, wobei die lange Form eben dieser Promotorregion einen protektiven Faktor darstellt. Dieser Effekt wird allerdings durch andere Polymorphismen moderiert und sowohl steigendes Alter als auch Geschlechtsunterschiede spielen möglicherweise eine Rolle bei der Interaktion zwischen 5-HTTLPR, ELA und der MDD. Weiterhin konnte auch in Bezug auf den CRH-H1-Rezeptor eine protektive Genvariante festgestellt werden. Träger des protektiven CRH-R1-Polymorphismus weisen eine weniger ausgeprägte Überreaktivität der HPA-Achse nach dem Erleben von körperlichem Missbrauch auf (30). FKBP5 kodiert für das Bindungsprotein FKBP51. Dieses greift als Kofaktor in den Signalweg der Stressantwort ein und verringert durch Bindung an Glukokortikoidrezeptoren im

ZNS die Empfindlichkeit dieser Rezeptoren für Cortisol. Unterschiedliche Varianten des FKBP5-Gens moderieren ebenfalls das Risiko an einer MDD nach dem Erleben von ELA zu erkranken (39), darüber hinaus weisen Non-Responder einer Therapie mit Antidepressiva eine steigende Expression des FKBP5-Proteins auf. Wohingegen bei Patienten, die gut auf die Therapie ansprechen eine verminderte Expression beobachtet werden konnte. Dieser Effekt ist ebenfalls zurückzuführen auf einen SNP des Gens FKBP5 (68). Zusammengenommen implizieren diese Ergebnisse, dass das FKBP5-Gen ebenfalls stark in die Pathogenese der stressbedingten Depression eingreift, wahrscheinlich vermittelt durch Eingreifen in den Glukokortikoid-Rezeptor-Signalweg und so durch Eingreifen in die Stressantwort des Körpers (39).

Auch Gen-Gen-Interaktionen können zum Depressionsrisiko beitragen. Bei frühkindlich traumatisierten Individuen interagiert z.B. der BDNF-Gen Polymorphismus Val66Met mit der Promotorregion 5HTTLPR des Serotonin-Rezeptorgens SLC6A4 und erhöht bei Trägern des s/s5HTTLPR-Genotyps das Risiko an einer Depression zu erkranken zusätzlich (30). Auch SNP des CRH-H1-Rezeptors interagiert mit 5HTTLPR bei der Vorhersage einer MDD nach dem Erleben von ELA (39). Zuletzt zeigen MORC1 und HOMER1 knockout Mäuse einen depressionsähnlichen Phänotyp (63, 64).

1.3 Epigenetik

Die Epigenetik umfasst verschiedene stabile Mechanismen funktioneller Veränderungen in der Genregulation ohne Veränderung der zugrundeliegenden DNA-Sequenz. Epigenetische Veränderungen beeinflussen die Gentranskription und somit Genexpression und verändern dadurch den Phänotyp des Organismus ohne entsprechende Veränderungen des Genotyps hervorzurufen. Sie sind mitotisch und meiotisch vererblich, bleiben über die Zellteilung hinaus und teilweise auch zwischen Generationen erhalten (69-72). Folgende Mechanismen gehören unter anderem zu diesen Veränderungen: posttranslationale Histonmodifikationen, die Aktivität von nichtcodierenden RNAs, DNA-Methylierung und Hydroxymethylierung (70, 72-74).

Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Studie wird im Folgenden genauer auf den Prozess der DNA-Methylierung, die funktionelle Bedeutung dieser, sowie den bisher bekannten Zusammenhang zwischen epigenetischen Veränderungen, frühkindlichen Traumata und der MDD eingegangen.

Von allen epigenetischen Mechanismen sind DNA-Methylierungen mitunter am besten erforscht und man glaubt somit, dass sie ausschlaggebende Auswirkungen auf die Regulation der Genexpression (75) haben. Die DNA-Methylierung ist ein aktiver, anpassungsfähiger und beeinflussbarer Vorgang, der in vulnerablen Phasen prä- und sogar postnatal die Adaptation des Genoms auf Umweltaforderungen darstellt (72, 76, 77).

In eukaryotischen Zellen wird eine Methylgruppe (CH_3) des S-Adenosin-Methionins (SAM) zu dem Kohlenstoffatom an Position 5 des Cytosin-Pyrimidinrings addiert. Es entsteht ein 5-Methylcytosin (5-mC). Diese Reaktion wird durch DNA-Methyltransferase-Enzyme (DNMT1, DNMT3A und DNMT3B) katalysiert und findet vor allem an sogenannten CpG-Sites statt: Nukleotidsequenzen, bei denen ein Guanin auf ein Cytosin folgt. Sie befinden sich hauptsächlich in sogenannten CpG-Islands: Abschnitte des DNA-Stranges mit einem hohen Gehalt an Cytosin und Guanin. Diese sind im Gesamtbild des Genoms unterrepräsentiert, kommen jedoch gehäuft in Promotorregionen vor (70, 72, 78-80). 56% davon überlappen dort Startpunkte der Transkription und haben potentielle regulative Funktionen (81). In Promotorregionen führen höhere DNA-Methylierungen funktionell meist zu verminderter Gen-Transkription, bzw. zu „Gene-Silencing“, also zu einer verminderten Genexpression oder sogar zu einem Abschalten des entsprechenden Gens (72), (82). Aufgrund der chemischen Modifikation der DNA können Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden, gleichzeitig werden Proteine die an Methylgruppen binden (z.B. Methyl-CpG-Binding-Protein 2 (MeCP2) angezogen und fungieren als zusätzliche Repressoren der Transkription (72, 78, 80, 83-85). DNA-Methylierungen im „Gene Body“, also innerhalb von Introns und Exons, führen meist wiederum zum gegenteiligen Effekt: der Hochregulierung der Genexpression (80, 86).

Epigenetische Veränderungen eignen sich ideal für die Untersuchung von Umweltfaktoren, die potentiell Einfluss auf die Entstehung von Krankheiten haben könnten, da sie erstens der Regulierung interner und externer Stimuli unterliegen und zweitens zumindest teilweise in peripheren Zellen, wie beispielsweise in Blutzellen nachweisbar sind (76). Zu den oben genannten Stimuli gehören, neben Geschlecht, Alter und vor allem genetischen Variationen auch extern beeinflussbare Faktoren, wie Essverhalten, Rauchen, Drogenabusus oder sogar psychosoziale Einflüsse (87-89). Einige Studien deuten darauf hin, dass epigenetische Modifikationen das Bindeglied zwischen externen beeinflussbaren Stimuli, wie das Erleben von frühkindlichen Traumata und verschiedenen stressassoziierten psychischen Krankheiten, zu denen auch die MDD gehört, sein könnten (39, 40). Epigenetische Mechanismen spielen eine entscheidende Rolle in der Verknüpfung von Umwelteinflüssen mit der Biologie des Menschen.

Zahlreiche vorangegangene Studien konnten nicht nur eine Verbindung zwischen verschiedenen DNA-Methylierungsmustern und dem Erkranken an einer MDD zeigen (90), sondern auch zahlreiche Gene identifizieren, die aufgrund frühkindlicher Traumata verschieden methyliert sind (40, 62, 91, 92). Zum Teil beeinflussen diese Gene die Regulation des Stresshormonsystems des Körpers und sind so in der pathophysiologischen Entwicklung affektiver Störungen involviert (93-95). Die Gene beeinflussen beispielweise die neuronale Plastizität und Konnektivität (z.B. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) oder die Regulation von Neurotransmitter Signalwegen (z.B. den Serotonin Rezeptor 5-HT, Serotonin Transporter SCL6A4, 5-HHT; Catechol-o-methyltransferase COMT; Glukokortikoid-Rezeptor NR3C1; Bindungsprotein FKBP5). ELA und familiär auftretende MDD, hohe Stressanfälligkeit und auffällige weitere psychopathologische Befunde sind so beispielsweise mit einer höheren prozentualen Methylierung der SLC6A4-Promotorregion assoziiert (92). Das Glukokortikoid-Rezeptor-Gen NR3C1 ist ein wichtiger Bestandteil der Stressregulationssystems des Körpers, der HPA-Achse. Ein Link zwischen der lebenslang veränderte Stressreaktion bei Mensch und Tier nach dem Erleben

von frühkindlichen Traumata sind möglicherweise neben verminderten Leveln der Glukokortikoid-Rezeptor NR3C1 mRNA (bei Ratten des homologen Glukokortikoid-Rezeptors γ GR) ebenfalls Methylierungsunterschiede des Glukokortikoid-Rezeptorgens NR3C1: Zum einen innerhalb der NR3C1 Promotorregion, zum anderen fernab von Promotorregionen dieses Gens. So war die Expression der Glukokortikoid-Rezeptoren, vermittelt durch die unterschiedliche Methylierung bei Selbstmordopfern mit Kindesmissbrauch signifikant niedriger als bei Selbstmordopfern ohne Missbrauch in der Kindheit. Auch korreliert die Schwere von sexuellem Missbrauch in der Kindheit und die Anzahl der Misshandlungen positiv mit der NR3C1-Methylierung (96-99). Bestimmte Risikovarianten des FKBP5-Gens erhöhen das Risiko für die Entwicklung stressbedingter psychiatrischer Störungen im Erwachsenenalter in Abhängigkeit vom Erleben frühkindlicher Traumata durch allelspezifische DNA-Demethylierung. Diese Demethylierung ist mit einer erhöhten stressbedingten Gentranskription verbunden und somit mit einer Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren und führt so zu einer langfristigen Dysregulation des Stresshormonsystems (100).

Mittlerweile konnten in Genomweiten Methylierungsanalysen auch zahlreiche Gene identifiziert werden die unabhängig von der Stressantwort des Körpers unterschiedliche Methylierungsmuster nach dem Erleben frühkindlicher Traumata aufweisen und fernab von Gen-Loci liegen die bisher mit der MDD in Verbindung gebracht wurden (93, 101, 102). ALS2 ist beispielsweise ein Gen, dass vor allem in zentralnervösen Motoneuronen exprimiert wird und so an der zellulären und neuronalen Plastizität beteiligt ist. Es kodiert für das Protein Alsin, das GTPasen aktiviert. Suizidopfer mit frühkindlicher Traumatisierung zeigen eine vermehrte ALS2 Methylierung und so eine verminderte Promotortranskriptionsaktivität, die mit einer verminderte ALS2 Expression im Hippocampus verbunden ist (102). Ein weiteres Beispiel ist das Gen PM20D1. Es kodiert für das Enzym Peptidase M20 Domain Containing 1, ein Enzym, dass die Biosynthese von Aminosäuren katalysiert (103). Die Hypermethylierung von PM20D1 konnte ebenfalls in Verbindung mit kindlichem Missbrauch gebracht

werden. Zusätzlich besteht eine Assoziation zu Adipositas im späteren Leben (101).

Die Grundlage der vorliegenden Studie, das von Nieratschker et al. (2014) (62) identifizierte Gen *Microorchidia 1* (*MORC1*), ist innerhalb der Promotorregion in drei verschiedenen Spezies (Rhesusaffe, Ratte und Mensch), in verschiedenen Gewebearten (CD34+ und CD3+ T-Blutzellen, Gewebe aus dem Präfrontalen Cortex, Zellen aus Nabelschnurblut) und zu verschiedenen Zeitpunkten (Geburt, Kindheit/Adoleszenz, Erwachsenenleben) im Zusammenhang mit dem Erleben von frühkindlichen Traumata hypomethyliert. *MORC1* ist dadurch das erste identifizierte Gen, dass in Antwort auf ELA sowohl in Progenitorblutzellen bei Geburt als auch im adulten Gehirn verschieden methyliert ist. Dies suggeriert, dass einmal etablierte epigenetische Veränderungen von *MORC1* von der Geburt bis ins Erwachsenenleben persistieren. Allerdings wurde die Persistenz der epigenetischen Veränderungen von *MORC1* assoziiert mit dem Erleben von ELA nur bei Tieren untersucht. Zusätzlich konnten Nieratschker et al. (2014), durch eine weiterführende Analyse mit Daten einer vorangehenden genomweiten MDD Assoziationsstudie einen signifikanten Zusammenhang des Gens *MORC1* mit einer MDD zeigen (62).

MORC1 ist ein CW-Typ Zink Finger Protein und ist sowohl bei Pflanzen, Tieren und Menschen involviert in epigenetischen Mechanismen, wie dem „Gene Silencing“ und spielt bei Pflanzen ebenfalls eine Rolle in der Heterochromatinkondensation (104-106). *MORC1* mRNA wird in fast jedem menschlichen somatischem Gewebe exprimiert unter anderem im männlichen Hoden und spielt eine Rolle in der Spermatogenese (107-109). Vorangegangene Genomweite Analysen entdeckten eine Assoziation der *MORC* Familie mit dem späteren Auftreten einer MDD, sowie weiteren neuropsychiatrischen Krankheiten (61, 62, 109, 110). Diese Assoziation zwischen depressiven Symptomen und der spezifischen Methylierung der Promotorregion von *MORC1* konnte auch in Zellen der Wangenschleimhaut beim Menschen gezeigt werden (111). Außerdem zeigen *MORC1* Knockout Mäuse einen depressionsähnlichen Phänotyp (63).

Im Rahmen dieser Studie soll durch die Beantwortung im folgenden Kapitel beschriebener Fragestellungen an die genannten Entdeckungen angeschlossen werden.

1.4 Studiendesign

Bisher wurde die Persistenz der epigenetischen Veränderungen von der Geburt bis ins Erwachsenenalter von MORC1 assoziiert mit dem Erleben von ELA nur bei Tieren untersucht. Nun stellt sich die Frage, ob das Gen MORC1 auch beim psychisch gesunden erwachsenen Menschen im Zusammenhang mit dem Erleben von ELA unterschiedlich methyliert ist. Daraus ergibt sich das primäre Ziel dieser Studie: Epigenetische Modifikationen von drei CpG-Sites (Chr3.108838388, Chr3.108838285 und Chr3.108838104, hg19) innerhalb der Promotorregion des Gens MORC1 im Zusammenhang mit dem Erleben frühkindlicher Traumata mittels peripherer Vollblutproben an gesunden menschlichen Probanden zu replizieren.

Von den zuvor aufgeführten ELA lag der Fokus in der vorliegenden Studie ausschließlich auf postnatalen, in der frühen Kindheit bis Jugend erlebten Stressfaktoren: Sexueller, körperlicher und emotionaler Missbrauch, körperliche und emotionale Vernachlässigung, wie beispielsweise der Mangel an elterlicher Fürsorge sowie der Verlust eines Elternteils. Dies hat zum einen praktische Gründe: Die Studie wurde an einer Kohorte erwachsener Probanden durchgeführt, somit ist es kaum möglich pränatale Stressfaktoren zuverlässig und valide zu erheben, wohingegen postnatale Stressfaktoren mittels Selbstbeurteilungsfragebögen erfasst werden können. Zum anderen gehören insbesondere die genannten postnatalen Stressoren zu den stärksten Risikofaktoren später an einer Depression zu erkranken (26, 34). Des Weiteren wurde die differentielle DNA-Promotormethylierung des Gens MORC1, die Grundlage der vorliegenden Studie, bisher im Menschen nur als Folge von vorgeburtlichem Stress gezeigt (62). Die unterschiedliche Methylierung soll auch bei erwachsenen ELA-exponierten Menschen nachgewiesen werden.

Die Auswahl der genannten CpG-Sites erfolgte ebenfalls anhand Nieratschker et al. (2014) (62): Hier wurden sechs CpG-Sites innerhalb der MORC1 Promotorregion mittels Pyrosequenzierung analysiert (CRCh37 (hg19), Position: 108.838.104-108.383.644). Hiervon wurden für die vorliegende Studie die drei oben genannten CpG-Sites ausgewählt.

Bei der vorliegenden Kohorte handelt es sich ausschließlich um gesunde Erwachsene ohne manifeste klinische Depression und ohne andere manifeste psychische Erkrankung. Ziel der Untersuchung von gesunden Probanden und somit subklinischen Phänotypen ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen vermehrter subklinischer depressiver Symptomatik und spezifischer Methylierung zu detektieren und aufzuklären wie sich die epigenetischen Veränderungen auch bereits in einer gesunden Kohorte manifestieren. Es muss geklärt werden, ob die unterschiedlichen Methylierungsmuster auch an peripheren menschlichen Vollblutproben gesunder Individuen mittels Pyrosequenzierung reproduzierbar sind. Das Gen MORC1 könnte somit möglicherweise als peripherer Proxymarker für das Erleben von frühkindlichen Traumata dienen und gleichzeitig auf Vulnerabilität des Kandidaten bezüglich einer Depression hindeuten. Basierend auf diesen Ergebnissen könnten klinische Screenings entwickelt werden, um Hochrisikopatienten zu identifizieren, um früh präventive Maßnahmen, vor Ausbruch einer MDD, ergreifen zu können. Zusätzlich sollen mögliche Effekte frühkindlicher Traumata auf das Empfinden von Angst, depressiven Symptomen, Stress und auf die Wahrnehmung alltäglicher psychischer Belastung aufgezeigt werden.

Hierzu wird den Probanden peripher venöses Blut entnommen und die drei CpG-Sites (Chr3.108838388, Chr3.108838285 und Chr3.108838104, hg19) innerhalb der Promotorregion von MORC1 werden analysiert. Zusätzlich beantworten die Probanden eine Reihe von psychometrischen Fragebögen, um Aufschluss über verschiedene weitere Faktoren, wie beispielsweise Stressreaktivität, die im Zusammenhang mit frühkindlichen Traumata stehen könnte, zu untersuchen.

Das Probandenkollektiv besteht aus zwei Gruppen: Probanden mit erlebten frühkindlichen Traumata und Kontrollen ohne solche Erfahrungen. Keiner der Probanden leidet unter einer manifesten klinischen psychischen Erkrankung, alle

Probanden sind somit psychisch gesund. Beide Gruppen sind bezüglich ihres Alters, Geschlechts und einiger weiterer Faktoren (z.B. Rauchverhalten), die Einfluss auf die Epigenetik haben könnten, gleich.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien, Geräte und Hersteller

Materialien und Geräte	Hersteller
Agarose	GE Healthcare, Amersham, UK
Borsäure krist.	MERCK KGaA, Darmstadt
Cyanfarbstoff	SYBR®Safe DNA-Gel Stain, lifetechnologies™, Carlsbad, CA, USA (=Invitrogen)
DNA-Ladder	Promega, Fitchburg, WI, USA
EDTA	Titriplex®, MERCK KGaA, Darmstadt
EDTA-Röhrchen	S-Monovette®, SARSTEDT, Nürnberg
Elektrophorese-Kämme	PEQLAB, Darmstadt
Eppendorf- Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Ethanol	AnalaR NORMAPUR Ethanol absolute, VWR Chemicals, Prolab
Falcons	BD, Heidelberg
Fluorometer	Qubit® 2.0 Fluorometer, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA
Geldokumentation	E-Box, PEQLAB, Darmstadt
Heizblock	RSM-10HS, Phoenix Instruments, Garbsen
IBM® SPSS® Statistics	Version 26, IBM Corp., Armonk, NY, USA
Loading Dye	Blue/Orange 6x Loading Dye, Promega, Fitchburg, WI, USA
PCR-MasterMix	GoTaq-MasterMix, 2x, Promega, Fitchburg, WI, USA PyroMark PCR-MasterMix, 2x, QIAGEN, Hilden
PCR-Platte	96 Multiply PCR-Platte, SARSTEDT, Nürnberg

PCR-Tubes	8 strip-reaction tube (0,2ml) + domed caps, Biometra, Göttingen
RNAse-freies Wasser	Promega, Fitchburg, WI, USA
Schüttler	DPC MicroMix® 5, DPC, Los Angeles, CA, US
Sepharose Beads	GE-Healthcare, Amersham, UK
Stromquelle für Elektrophorese	Electrophoresis Power Supply EPS 300, GE Healthcare, Amersham, UK
Thermocycler	peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler, PEQLAB, Darmstadt
Tris	Trizma®-base, SIGMA-ALDRICH, St.Louis, MO, USA
Vortexer	VortexMixer neolab® 7-2020, neolab®, Heidelberg
Waage	Mettler PM 4600 DeltaRange®, Mettler Toledo, Gießen
Wasserbad	GFL®, Burgwedel
Zentrifuge	HERAEUS Multifuge 3L-R, Heraeus Holding, Hanau

2.2 Probandenkollektiv

Das Aktenzeichen des Ethikvotums der Eberhard-Karls-Universität Tübingen lautet 431/2014BO2. Das Probandenkollektiv beinhaltet insgesamt 61 erwachsene Probanden. Mögliche Kandidaten wurden mittels öffentlichen Aufrufes über den E-Mailverteiler der Eberhard-Karls-Universität Tübingen rekrutiert. Die Auswahl und Einteilung der Probanden erfolgte anhand des Vorhandenseins oder der Abwesenheit frühkindlicher Traumata, ermittelt durch den CTQ. Außerdem wurden alle potenziellen Probanden anhand der Kriterien des Mini International Neuropsychiatric Interviews M.I.N.I. auf das Vorhandensein von psychischen Vorerkrankungen, wie z.B. Angst, Sucht und Depression (MDD) gescreent und bei Hinweisen auf eben solche aus dem

Kollektiv ausgeschlossen. Auf die Kriterien des CTQ und des M.I.N.I. wird in Unterkapitel 2.3.1 und in Unterkapitel 2.2.2 spezifisch eingegangen.

Bei unauffälligem M.I.N.I. erfolgte eine einmalige venöse Blutentnahme mittels einer Butterfly Kanüle. Verwendet wurden EDTA-Röhrchen. Der Chelatbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) verhindert die Blutgerinnung innerhalb des Röhrchens.

Anhand von insgesamt acht Fragebögen, der Basisdokumentation in der Psychotherapie (Psy-BaDo), dem Beck's Depression Inventory II (BDI-II), dem Beck's Anxiety Inventory (BAI), der Stress-Reaktivitätsskala (SRS), der Symptom-Checklist-90-Revised (SCL-90-R), dem Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q) und der Life-Stressor-Checklist-Revised (LSC-R) wurde ein Eindruck der generellen und aktuellen psychischen Verfassung der Probanden gewonnen. In diesem Zusammenhang wurden spezifisch frühkindliche Traumata (ELA) mittels des Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) abgefragt.

2.2.1 Gruppeneinteilung (Gruppe mit ELA und Kontrollgruppe)

Aufgrund der Ergebnisse des CTQ wurden die Probanden in zwei Gruppen eingeteilt, Probanden mit ELA (ELA=1) und Probanden ohne ELA (ELA=0) als Kontrollgruppe. Als Grenzwert dient ein Wert größer oder gleich 43 Punkten. Dieser Cut-Off Wert wurde basierend auf zwei deutschen Studien ausgewählt, die den CTQ anhand unterschiedlicher Stichproben validieren: Zum einen handelt es sich um eine bevölkerungsrepräsentative Stichprobe, zum anderen um eine Stichprobe psychiatrischer Patienten (112, 113). Aus den dort identifizierten Durchschnittswerten des Gesamtsummenscore wurde ein Mittelwert gebildet und grundlegend auf diesem Mittelwert der Grenzwert von 43 Punkten für die Gruppeneinteilung ausgewählt (siehe Kapitel 2.3.1.).

Insgesamt wurden im Rahmen der Studie 25 Probanden mit einem Score größer oder gleich 43 Punkten rekrutiert und somit in die Gruppe der Probanden mit ELA (ELA=1) eingeschlossen. 36 Teilnehmer erreichten im CTQ einen Score kleiner als 43 Punkte und wurden somit in die Kontrollgruppe (ELA=0) eingeschlossen.

2.2.2 Mini International Neuropsychiatric Interview M.I.N.I.

Das Mini International Neuropsychiatric Interview M.I.N.I. ist ein kurzes strukturiertes diagnostisches Interview (114).

Es erfasst psychiatrische Achse-I-Störungen klassifiziert im Diagnostischen und Statistischen Manual Psychischer Störungen IV (DSM-IV) und in der internationalen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10 (ICD-10). Generell gehören alle klinischen psychischen Störungen und alle anderen relevanten psychischen klinischen Probleme, mit Ausnahme von Persönlichkeitsstörungen und geistigen Behinderungen zu den Achse-I-Störungen.

Das Diagnostische und Statistische Manual Psychischer Störungen DSM-IV ist ein weltweit angewandtes System für die Klassifikation psychischer Störungen und enthält diagnostische Kriterien für jede psychische Störung mit korrespondierenden ICD-10 Kodierungen (115). Das ICD-10 ist ein von der WHO herausgegebenes Klassifikationssystem für medizinische Diagnosen. Unter Kapitel V: F00 bis F99 sind Psychische und Verhaltensstörungen aufgeführt (116).

Die Durchführung des Interviews dauert im Mittel 15 Minuten. Damit ist das M.I.N.I. ein geeignetes Instrument, um eine kurze, aber akkurate Einschätzung der psychischen Verfassung der Probanden durchzuführen und eventuelle relevante psychische Vorerkrankungen grob zu erfassen (114).

Im Folgenden werden alle Störungsbilder aufgeführt, die im M.I.N.I. abgefragt werden. Erfragt werden affektive Störungen (Episode einer Major Depression, Melancholie, Dysthymie, Suizidalität, Hypomanische Episode); Angststörungen (Panikstörung, Agoraphobie, Soziale Phobie, Generalisierte Angststörung); Störungen der Impulskontrolle (Zwangsstörung), dissoziative Störungen (Posttraumatische Belastungsstörung), Störungen im Zusammenhang mit psychotropen Substanzen (Alkoholabhängigkeit/-Missbrauch, Drogenabhängigkeit/-Missbrauch); Schizophrenie und andere psychotische Störungen sowie Essstörungen (Anorexia Nervosa, Bulimia Nervosa). Zusätzlich wird das Bestehen einer antisozialen Persönlichkeitsstörung abgefragt. Relevant für die Stellung einer Diagnose ist ebenfalls der Zeitraum, in dem die Kriterien

der einzelnen Störungsbilder erfüllt sein müssen. Dabei handelt es sich immer um das aktuelle Befinden, sowie je nach Störungsbild Zeiträume zwischen den letzten zwei Wochen bis hin zu den letzten zwei Jahren. Zur besseren Übersicht werden die abgefragten Störungsbilder und die für die Diagnosestellung relevanten Zeiträume noch einmal in Tabelle 2 aufgeführt.

Die meisten Fragen sind vom Interviewer wörtlich vorzulesen. Vereinzelt extra gekennzeichnete Fragen können paraphrasiert werden.

Die Fragen sind fast ausschließlich mit Ja oder Nein zu beantworten und erlauben es so dem M.I.N.I. genau zu folgen und ihn vom Interviewer unabhängig objektivierbar zu machen (7, 114). Von der Studie ausgeschlossen wurden Probanden, bei denen im Rahmen des Interviews eine Auffälligkeit festgestellt werden konnte.

Tabelle 2: M.I.N.I.: Störungsbilder und die für die Diagnosestellung relevanten Zeiträume in dem die Kriterien des Störungsbild erfüllt werden müssen.

Störungsbild	Zeitraum, in dem die Kriterien erfüllt werden müssen
Episode einer Major Depression	Aktuell (2 Wochen) + Lifetime
Episode mit melancholischem Anteil	Aktuell (2 Wochen)
Dysthymie	Aktuell (letzte 2 Jahre)
Suizidalität	Aktuell (letzter Monat)
(Hypo-) manische Episode	Aktuell + Lifetime
Panikstörung	Lifetime + im vergangenen Monat
Agoraphobie	Aktuell
Soziale Phobie	Aktuell (letzter Monat)
Zwangsstörung	Aktuell (letzter Monat)
Posttraumatische Belastungsstörung	Aktuell (letzter Monat)
Alkoholabhängigkeit/ -Missbrauch	Letzte 12 Monate
Drogenabhängigkeit/ -Missbrauch	Letzte 12 Monate
Psychotische Störungen	Aktuell + Lifetime
Anorexia Nervosa	Aktuell (letzte 3 Monate)
Bulimia Nervosa	Aktuell (letzte 3 Monate)
Generalisierte Angststörung	Aktuell (letzte 3 Monate)
Antisoziale Persönlichkeitsstörung	Lifetime

2.2.3 BaDo- Dokumentation der Lebensgewohnheiten

Der BaDo-Fragebogen wurde von der Abteilung „Molekulare Psychiatrie“ der Eberhard-Karls-Universität Tübingen entwickelt und dient dazu soziodemographische Eckdaten, sowie die Gesundheits-, Alkohol- und Rauchanamnese zu erfassen.

Zu den soziodemographischen Eckdaten gehört das Alter, das Geschlecht, die Nationalität laut Pass, der höchste Schul- und Berufsabschluss, die derzeitige

berufliche Situation, die derzeitige Tätigkeit, der derzeitige Familienstand und der Tag-Nacht-Rhythmus. Bei der Gesundheitsanamnese werden neben Körpergröße und -gewicht verschiedene jemals und in den letzten drei Monaten diagnostizierte Krankheiten abgefragt, sowie die derzeitige Einnahme von Medikamenten, Antidepressiva oder Neuroleptika. Außerdem wird erfasst, ob der Proband jemals regelmäßig illegale Drogen oder Benzodiazepine konsumiert hat.

Bei der Alkohol- und der Rauchanamnese wird erfasst wie häufig und wie viel konsumiert wird und wann zum ersten Mal konsumiert wurde. Bei der Alkoholanamnese wird zusätzlich abgefragt, ob eine Abhängigkeit besteht und bei der Rauchanamnese wird zusätzlich erfasst, ob Bezugspersonen in der Kindheit geraucht haben.

Es wurde versucht die beiden Gruppen anhand dieser Daten weitestgehend bezüglich der Faktoren Alter, Geschlecht, Rauch- und Trinkverhalten zu paaren. In der vorliegenden Studie wurde das Rauch- und Trinkverhalten der Probanden folgendermaßen ausgewertet. Nichtraucher und Probanden die seltener als einmal pro Woche Zigaretten konsumieren werden als Nichtraucher gewertet, jede andere angegebene Häufigkeit (1-4x pro Woche; 1-2x täglich; 3x täglich oder häufiger) fiel in die Gruppe der Raucher. Probanden die nie oder seltener als einmal monatlich Alkohol trinken wurden in die Gruppe der „kein Alkoholkonsum“ eingeschlossen und jede andere angegebene Häufigkeit (1-4x pro Woche; 1-2x monatlich; 3x pro Woche; 4x pro Woche oder häufiger) fiel in die Gruppe der Probanden die regelmäßig Alkohol konsumieren.

2.3 Psychometrische Skalen

Jeder Proband hat folgende Fragebögen ohne bestimmte zeitliche Vorgabe ausgefüllt: Beck's Depression Inventory-II (BDI-II) und Becks' Anxiety Inventory (BAI): Die beiden Fragebögen erheben spezielle psychiatrische Vorerkrankungen. Symptom Checklist 90-R (SCL-90-R): Die SCL-90-R erfragt die derzeitige psychische Verfassung. Stress-Reagibilitäts-Skala (SRS): Die SRS gibt Auskunft über die Reagibilität auf Stress. Childhood Experience of Care

and Abuse Questionnaire (CECA.Q), Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) und Life Stressor Checklist Revised (LSC-R): Diese drei Fragebögen bestimmen traumatische Erfahrungen in der Kindheit, in der Jugend und im weiteren Leben. Im Folgenden werden die einzelnen Fragebögen detailliert beschrieben.

2.3.1 Childhood Trauma Questionnaire (CTQ)

Der Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) ist ein Screeninginstrument zur retrospektiven Selbstbeurteilung von traumatischen Erfahrungen bis zum 18. Lebensjahr (11, 12, 117). Der CTQ umfasst 28 Items, die fünf verschiedenen Kategorien (körperlicher, sexueller und emotionaler Missbrauch, sowie körperliche und emotionale Vernachlässigung) zugeordnet werden. Verwendet wurde die deutsche Version, validiert von Klinitzke et al. (113).

Die einzelnen Kategorien bestehen aus jeweils fünf Items, plus zusätzlich drei Items, die überprüfen, ob der Proband zu einer Bagatellisierung, d.h. Verharmlosung oder Verleugnung der traumatischen Ereignisse tendiert. Die jeweiligen Kategorien und die zugehörigen Items sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Items sind jeweils auf einer Skala nach der Häufigkeit ihres Auftretens von 1 („überhaupt nicht“) bis 5 („sehr häufig“) zu bewerten (12, 117). Die Häufigkeiten der einzelnen Items der fünf Skalen werden addiert und zum Teil vor der Addition invertiert, d.h. 5 wird zu 1, 4 wird zu 2 usw. Die zu invertierenden Werte sind in mit einem R für „Reversed“ markiert (12, 113, 117). In jeder Skala können 5 bis 25 Punkte erreicht werden. Je höher die Punktzahl, um so traumatischer hat der Proband das Erlebte wahrgenommen (118) und das Trauma kann anschließend je nach Punktzahl einem entsprechenden Schweregrad („Nicht bis minimal“=1, „Gering bis mäßig“=2, „Mäßig bis Schwer“=3, „Schwer bis Extrem“=4) zugeordnet werden (siehe Tabelle 4) (113).

In dieser Studie dient der CTQ als zentrales Instrument um die Probanden in zwei Gruppen einzuteilen: Probanden mit frühkindlichen Traumata und Probanden ohne erlebte ELA. Hierzu verwendeten wir einen Cut-Off Wert von 43 Punkten. Alle Probanden mit einem Wert größer oder gleich 43 Punkten wurden in der

Gruppe mit ELA (ELA=1; n=25) zugeordnet und alle Probanden mit einem Score kleiner 43 Punkten wurden der Kontrollgruppe (ELA=0; n=36) zugeordnet. Ein genereller Cut-Off Wert des Gesamtsummenscore, um traumatisierte von nicht traumatisierten Personen zu unterscheiden existiert für den CTQ nicht. Der CTQ wurde mehrfach für verschiedene Stichproben validiert (12, 112, 113, 119, 120). Im deutschsprachigen Raum validierten Klinitzke et al. den CTQ anhand einer bevölkerungsrepräsentativen Stichprobe. Hier zeigte sich im Schnitt ein Gesamtsummenscore von 35,97 Punkten (113). Wingefeld et al. validierten den CTQ anhand einer Stichprobe psychiatrischer Patienten, zusammengesetzt aus Patienten mit Borderline-Persönlichkeitsstörung, Abhängigkeitserkrankungen, depressiven Störungen, Schizophrenie und verwandten Störungen, Angst- und Zwangserkrankungen, sowie dissoziative und somatoforme Störungen. Für den CTQ Gesamtsummenscore konnte innerhalb Stichprobe psychiatrischer Patienten ein Durchschnitt von 48,3 Punkten ermittelt werden (112). Basierend auf diesen beiden vorangehenden Studien wurde der Cut-Off Wert von 43 Punkten für die vorliegende Studie ausgewählt. Bildet man einen Mittelwert aus dem durchschnittlichen Gesamtsummenscore der bevölkerungsrepräsentativen Stichprobe und dem durchschnittlichen Gesamtsummenscore der psychiatrischen Patienten erhält man einen Wert von 42,1 Punkten. Bei einem Gesamtsummenscore von >43 Punkten kann somit davon ausgegangen werden, dass der Proband schwerwiegende Traumata erlebte und oberhalb des Mittelwertes zwischen Bevölkerungsdurchschnitt und dem Durchschnitt psychiatrischer Patienten liegt.

Tabelle 3: CTQ: Kategorien der frühkindlichen Traumatisierung und die jeweiligen zugehörigen Items
Items markiert mit R werden bei der Auswertung invertiert

Kategorie	Item
Emotionaler Missbrauch	3, 8, 14, 18, 25
Körperlicher Missbrauch	9, 11, 12, 15, 17
Sexueller Missbrauch	20, 21, 23, 24, 27
Emotionale Vernachlässigung	5 (R), 7 (R), 13 (R), 19 (R), 28 (R)
Körperliche Vernachlässigung	1, 2 (R), 4, 6, 26 (R)
Bagatellisierung	10, 16, 22 („1“ Bis „4“ werden zu „0“, „5“ wird zu „1“)

Tabelle 4: CTQ: Kategorien der frühkindlichen Traumatisierung und Einteilung in Schweregrade der Misshandlung (121)
Die Einteilung erfolgt nach Punkten. Schweregrad ist abgekürzt mit SG.

Skala	Nicht bis minimal (SG=1)	Gering bis mäßig (SG=2)	Mäßig bis schwer (SG=3)	Schwer bis extrem (SG=4)
Emotionaler Missbrauch	5-8	9-12	13-15	16-25
Körperlicher Missbrauch	5-7	8-9	10-12	13-25
Sexueller Missbrauch	5	6-7	8-12	13-25
Emotionale Vernachlässigung	5-9	10-14	15-17	18-25
Körperliche Vernachlässigung	5-7	8-9	10-12	13-25

2.3.3 Beck's Depression Inventory II (BDI-II)

Das Beck Depression Inventory II (BDI-II) dient als Indikator für das Vorhandensein depressiver Symptomatik. Er wird vor allem dazu verwendet, nach stattgehabter Diagnosestellung die klinische Schwere einer Depression zu bestimmen. Der BDI-II entstammt aus einer Überarbeitung des BDI-I und wurde 1996 veröffentlicht. Der BDI wurde überarbeitet, um ihn an die im DSM-IV aufgeführten Kriterien einer Depression anzupassen. Er ist bei Jugendlichen ab 13 Jahren und bei Erwachsenen durchführbar. Der Fragebogen erfasst das Befinden der Probanden innerhalb der letzten zwei Wochen einschließlich des Tages, an dem der Fragebogen ausgefüllt wird. Die 21 Aussagen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Jede Aussage wird vom Probanden auf einer aufsteigenden Skala von 0 bis 3 bewertet. Diese Zahlen werden bei der Auswertung addiert und es ergibt sich, je nach Höhe der Punktzahl, die aktuelle Schwere depressiver Symptomatik: von keiner Depression oder klinisch remittierter bis milder, mittlerer und schwerer Depression (122, 123).

In der vorliegenden Studie wurden Probanden mit manifesten psychischen Erkrankungen vom Probandenkollektiv ausgeschlossen (siehe Kapitel 2.2.2). Probanden die laut dem BDI-II an einer Depression leiden wurden nicht aus dem Probandenkollektiv ausgeschlossen, da Screening Instrumente wie der BDI-II zwar verlässliche Hinweise auf das Vorliegen depressiver Symptomatik geben können, allerdings ist eine entsprechende Diagnosestellung nur durch die klinische Erfassung aller relevanten Haupt- und Zusatzsymptome nach dem ICD-10 oder DSM-V und der zusätzlichen Erfassung der Dauer und des Verlaufs der Symptome möglich (124). Für die spätere statistische Auswertung wurden die einzelnen Schweregrade von 0 bis 3 aufsteigend durchnummeriert (siehe Tabelle 6).

Tabelle 5: Abgefragte Aussagen im BDI-II

Nummer	Aussage
1.	Traurigkeit
2.	Pessimismus im Bezug auf die Zukunft
3.	Versagensgefühle
4.	Verlust an Freude
5.	Schuldgefühle
6.	Bestrafungsgefühle
7.	Selbstablehnung
8.	Selbstkritik
9.	Suizidgedanken
10.	Weinen
11.	Unruhe
12.	Interessensverlust
13.	Entschlusslosigkeit
14.	Wertlosigkeit
15.	Energieverlust
16.	Veränderung des Schlafverhaltens
17.	Reizbarkeit
18.	Appetitveränderung
19.	Konzentrationsschwierigkeiten
20.	Ermüdung
21.	Verlust an sexuellem Interesse

Tabelle 6: BDI-II: Einteilung in Schweregrade einer Depression und Gruppeneinteilung in SPSS
 Einteilung der Schweregrade erfolgt nach Punkten. Die Gruppeneinteilung in SPSS dient der späteren Auswertung. n=Anzahl der Probanden.

Punkte	Schweregrad	Gruppeneinteilung SPSS
0 bis 13	Keine Depression oder remittiert	0
14 bis 19	Milde Depression	1
20 bis 28	Mittlere Depression	2
29 bis 63	Schwere Depression	3

2.3.4 Beck's Anxiety Inventory (BAI)

Das Beck Anxiety Inventory (BAI) bestimmt die Schwere von Angst in Form eines Fragebogens zur Selbstbeurteilung. Er wurde 1988 von Beck et al. veröffentlicht (125).

Grundlage für den BAI sind im DSM-IV aufgeführte diagnostische Kriterien für eine Panikstörung und eine generalisierte Angststörung, sowie drei vorbestehende Fragebögen: Die Anxiety Checklist, die Physician's Desk Reference Checklist, und die Situational Anxiety Checklist. Dadurch sind BAI Werte weniger hoch als andere allgemeine Angstmaße mit Depressivität korreliert und der BAI kann zwischen ängstlichen Gruppen (mit Panikstörungen oder generalisierter Angststörung, etc.) und nichtängstlichen Gruppen (MDD, Dysthymie, etc.) unterscheiden. Der Test besteht aus 21 Items, die sowohl physiologische Aspekte der Angst (z.B. Herzrasen/ -klopfen, Schwitzen, Zittern) sowie kognitive Aspekte der Angst (z.B. „Angst zu Sterben“, „Angst, die Kontrolle zu verlieren“) verbinden. Jedes Item ist auf einer vierstufigen Skala von 0 („Überhaupt nicht“) bis 3 („Stark“) zu bewerten und bezieht sich auf die letzten sieben Tage, einschließlich des Tages, an dem der Test ausgefüllt wird. Die Durchführung dauert circa 5 bis 10 Minuten (125, 126).

Die Auswertung erfolgt in der Regel über die Addition der einzelnen Werte und somit Bildung eines Summenwerts (0 bis 63 Punkte) der einzelnen Items. Daraus ergibt sich, je nach Höhe der Punktzahl, die Schwere der Angst: von keiner Angst bis milde, moderate und schwere Angst (siehe Tabelle 7). Ab 12 Jahre (126) existieren Normen zur Auswertung und Einschätzung der Intensität der Angst (127).

Tabelle 7: BAI: Einteilung in Schweregrade der Angst und Gruppeneinteilung in SPSS
 Einteilung der Schweregrade erfolgt nach Punkten. Die Gruppeneinteilung in SPSS dient der späteren Auswertung. n=Anzahl der Probanden.

Punkte	Schweregrad
0- 9	Keine Angst
10- 18	Milde bis Moderate Angst
19- 29	Moderate bis Schwere Angst
30- 63	Schwere Angst

2.3.5 Stress-Reaktivitäts-Skala (SRS)

Die Stress-Reaktivitäts-Skala (SRS) misst die individuelle Stressanfälligkeit in dem sie Stressreaktionen auf verschiedene Belastungssituationen in Ausmaß und Dauer erfasst.

Sie beinhaltet 29 Items mit je drei Antwortmöglichkeiten, die verschiedene Ausprägungen von Stressanfälligkeit auf die beschriebene Situation darstellen. Die Ausprägungen entsprechen in etwa keiner bzw. leichter, mittlerer oder schwerer Stressanfälligkeit. Zur Auswertung existieren 6 Subskalen (Stressreaktivität bei Arbeitsüberlastung, sozialen Konflikten und sozialer Bewertung, Misserfolg, in der Vorbereitungsphase und in der Post-Stress-Phase), aus denen kann jeweils ein Summenwert gebildet werden, sowie ein gesamter Summenwert für alle Subskalen (allgemeine Stressreaktivität). Für jede dieser Skalen wurden Normwerte festgelegt. Allerdings gibt es keine Grenzwerte, die eine pathologische von einer normalen Stressreaktivität trennen würden. Allgemein gilt: hohe Summenwerte deuten auf eine erhöhte Stressreaktivität, also Stressanfälligkeit hin (128).

In der vorliegenden Studie wurde die SRS verwendet, um die gesamte Stressanfälligkeit zwischen den beiden Gruppen Probanden mit ELA (ELA=1; n=25) und Probanden ohne ELA (ELA=0; n=36) zu vergleichen. Es wurden also die Summenwerte aller Items miteinander verglichen.

2.3.6 Symptom-Checklist-90-Revised (SCL-90-R)

Die Symptom-Checklist-90-Revised (SCL-90-R) ist ein Fragebogen zur Messung der individuell empfundenen psychischen Belastung innerhalb der letzten sieben Tage einschließlich des Tages, an dem der Fragebogen ausgefüllt wird. Es handelt sich um ein Selbstbeurteilungsverfahren, das 90 Items umfasst, die 9 Skalenniveaus zugeordnet werden. Sieben der Fragen werden keiner Skala zugeordnet. Es handelt sich um Zusatzitems, sie behandeln unter anderem Appetit, Schlaf und Gedanken an den Tod/ Suizid. Die einzelnen Items müssen auf einer Likert-Skala von 0 („überhaupt nicht“) bis 4 („sehr stark“) beurteilt werden. Die einzelnen Skalen sind näher in Tabelle 9 beschrieben.

Die Auswertung erfolgt über die Bildung verschiedener Werte (siehe Tabelle 8) für jede Skala, die anschließend unter Berücksichtigung von soziodemographischen Faktoren (Alter und Geschlecht) zu T-Werten von 0-80 transformiert werden. Dadurch lassen sich Abweichungen vom Durchschnitt besser beurteilen und so der Einzelfall besser einordnen. Im Allgemeinen gilt, ein T-Wert größer 60 ist als erhöht einzustufen. Die drei globalen Kennwerte (Global Severity Index [GSI], Positive Symptom Distress Index [PSDI], Positive Symptom Total [PST]) dienen dazu, Auskunft über das Antwortverhalten bei allen 90 Items zu erhalten (125, 129, 130). Die Autoren beschreiben einen genauen Ablaufplan der Auswertung, in der vorliegenden Studie wurde jedoch hauptsächlich der GSI-Rohwert und T-Wert, als Maß der grundsätzlichen psychischen Belastung mit in die Auswertung einbezogen (125, 129, 130).

Tabelle 8: SCL-90-R: Auswertung mit Hilfe von Globalen Kennwerten und Parametern
 Die globalen Kennwerte und die Parameter werden gebildet aus den verschiedenen Skalen. Zusätzlich wird die Bedeutung der Kennwerte beschrieben.

Wert	Beschreibung
Summenwert S_n	Addition der einzelnen Items
Skalenwert G_n	Summenwert geteilt durch die Anzahl der Items der Skala
Belastungstendenz P_n	Anzahl der Items mit einem Wert größer null
GSI	Maß der grundsätzlichen psychischen Belastung, bzw. ein Indikator für das Ausmaß der aktuellen gesamten Belastung (Summe der Summenwerte geteilt durch die gesamte Anzahl der Items)
PST	Anzahl der mit Belastung angegebenen Items (Summe der Belastungstendenzen)
PSDI	Ausmaß/ Schwere der Belastung bei den Items mit Belastung (Summe der Summenwerte geteilt durch den PST)

Tabelle 9: SCL-90-R: Skalenniveaus und zugehörige Beschreibung der Symptome

Skala	Name	Beschreibung
Skala 1	Somatisierung	Symptome der Dysfunktion in autonomen Systemen (kardiovaskulär, gastrointestinal, respiratorisch)
Skala 2	Zwanghaftigkeit	Mit Zwanghaftigkeit assoziierte Symptome (Gedanken, Impulse Handlungen die als konstant vorhanden, unveränderbar und ungewollt empfunden werden) Die Items umfassen leichte

		Konzentrationsstörung bis hin zur ausgeprägten Zwangsstörung.
Skala 3	Unsicherheit im Sozialkontakt	Symptome der Unsicherheit, Selbstabwertung, Minderwertigkeit, Unvermögen der sozialen Kommunikation und Interaktion
Skala 4	Depressivität	Symptome der Traurigkeit bis zur ausgeprägten Depression und ihrer Bandbreite an klinischen Manifestationen
Skala 5	Ängstlichkeit	Symptome von Nervosität und manifester Angst
Skala 6	Aggressivität/ Feindseligkeit	Symptome von Gereiztheit, Unausgeglichenheit, Aggressivität (Ärger, Zorn, Verstimmung) und Feindseligkeit
Skala 7	Phobische Angst	Symptome des Gefühls von Bedrohung bis zur phobischen Angst
Skala 8	Paranoides Denken	Symptome von paranoidem Verhalten als inhaltliche Denkstörung über Misstrauen und Minderwertigkeitsgefühle
Skala 9	Psychozitismus	Symptome der Entfremdung und Isolation bis zu psychotischem Erleben

2.3.7 Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q)

Das Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q) ist ein strukturierter, retrospektiver Fragebogen zur Erfassung verschiedener erlebter Traumata bis zum 17. Lebensjahr und wurde als Screening Methode aus dem gleichnamigen Interview CECA entwickelt.

Er bezieht sich vor allem auf den Verlust eines Elternteils, sowie auf die Eltern-Kind- Beziehung und behandelt den Mangel an elterlicher Fürsorge im Sinne von Vernachlässigung materieller (z.B. angemessene Kleidung), körperlicher (z.B. ausreichend Nahrung) und emotionaler (z.B. Desinteresse der Eltern an dem Kind) Bedürfnisse des Kindes und Antipathie in Bezug auf die Menge an Kritik, Feindseligkeit, Kälte und Aversion gegenüber dem Kind. Außerdem behandelt der CECA.Q körperlichen, im Rahmen von Schlägen und daraus resultierenden Verletzungsfolgen und sexuellen Missbrauch, im Rahmen von Berührungen der eigenen Geschlechtsteile, Berührungen der Geschlechtsteile der anderen Person bis hin zu Geschlechtsverkehr. Abgefragt wird auch der Missbrauch durch andere Autoritätspersonen. Im Falle des Verlustes eines Elternteils beziehen sich die Fragen nicht nur auf die leiblichen Eltern, sondern auch auf mögliche Ersatzelternteile. Zudem werden wichtige unterstützende Beziehungen im Leben des Kindes evaluiert.

In Kapitel 2.3.1 beschriebenen CTQ wird der Verlust eines Elternteils nicht abgefragt. Da dieser Faktor frühkindlicher Traumatisierung für die vorliegende Studie ebenfalls bedeutsam ist, liegt der Fokus der Auswertung des CECA.Q auf dem Verlust eines Elternteils. Hierfür wurden die Probanden je nach Aspekt frühkindlicher Traumatisierung in jeweils zwei Gruppen eingeteilt: Probanden mit erlebtem Trauma und einer Kontrollgruppe, ohne erlebtes Trauma. Eine Gruppe bilden Probanden, die angeben ein Elternteil oder beide Elternteile verloren zu haben (Parentalloss=1; n=19). Die übrigen Probanden, die kein Elternteil verloren haben (Parentalloss=0; n=42) bilden die zugehörige Kontrollgruppe. Diese Einteilung erfolgt unabhängig davon, ob die Probanden Auffälligkeiten bei der Beantwortung der restlichen Fragen des CECA.Q zeigen und unabhängig

von der Einteilung anhand des CTQ. Außerdem erfolgte eine weitere Gruppeneinteilung anhand der anderen abgefragten Aspekte frühkindlicher Traumatisierung und der zugehörigen Cut-Off-Werte (siehe Tabelle 10) (131-134).

Tabelle 10: CECA.Q: Cut-Off-Werte nach erreichter Punktzahl
 Probanden, die Werte größer oder gleich der angegebenen Cut-Off Punktzahl erreichen erkranken mit höherer Wahrscheinlichkeit an einer MDD im Erwachsenenalter.

Skala	Cut-Off
Antipathie der Mutter	≥ 28
Antipathie des Vaters	≥ 30
Vernachlässigung durch die Mutter	≥ 25
Vernachlässigung durch den Vater	≥ 26
Körperlicher Missbrauch durch die Mutter	≥ 3
Körperlicher Missbrauch durch den Vater	≥ 3
Sexueller Missbrauch	≥ 1
Schwere des sexuellen Missbrauchs (wird zu SevereSexualAbuse)	≥ 2

2.3.8 Life Stressor Checklist-Revised (LSC- R)

Die Life Stressor Checklist-Revised (LSC-R) erfasst 30 potenziell traumatische Lebensereignisse aus verschiedenen Bereichen (z.B. Naturkatastrophen, physische oder sexuelle Übergriffe/ Missbrauch/ Vernachlässigung, Tod naher Angehöriger oder von Freunden, lebensbedrohliche Erkrankungen der Person selber oder naher Angehöriger/ Freunde, bei Frauen Fehlgeburt und oder Abort etc.).

Für bestätigte Erlebnisse folgen weitere Fragen um das Ereignis besser einordnen zu können: Alter des Probanden bei Beginn und am Ende bzw. Dauer des Ereignisses (Fragen a und b), Gefühle der potentiellen Bedrohung, Hilfslosigkeit, Angst vor schweren Verletzungen oder Todesangst (Fragen c und d), sowie Auswirkungen auf das Leben der Betroffenen im letzten Jahr (Frage e) (135, 136).

Für die Auswertung können verschiedene Methoden verwendet werden (136):

1. Für jedes bestätigte Erlebnis wird ein Punkt verteilt. Diese Punkte werden addiert und die Summe ergibt einen sogenannten Life Stressor Score mit einem möglichen Umfang von 0 bis 30 Punkten.
2. Die zweite Option bezieht die Auswirkungen der traumatischen Ereignisse auf das Leben der Betroffenen mit ein (Frage e). Die angegebene Punktzahl in Frage e wird addiert. Dieser Score rangiert zwischen 0 und 150 Punkten.
3. Die dritte Option bezieht sich auf die Kriterien des DSM-IV für eine Posttraumatische Belastungsstörung. Nur wenn das Ereignis selbst und die Fragen c und d positiv beantwortet werden wird ein Punkt vergeben. Aus diesem Grund werden Fragen c und d nur bei Ereignissen aufgeführt, die die Kriterien des DSM-IV erfüllen. Diese Methode ist in Verbindung mit Option 1 anwendbar.

2.4 Aufbereitung der Blutproben

Um die verschiedenen Genabschnitte aus den vorliegenden Blutproben mittels Pyrosequenzierung (siehe Kapitel 2.5) analysieren zu können, müssen zuerst einige Verfahren angewendet werden, um die DNA aufzubereiten.

Als Erstes wird die DNA aus dem Vollblut extrahiert, dann wird durch eine Bisulfit-Konvertierung die Analyse des Unterschieds zwischen Cytosin und 5-Methylcytosin vereinfacht und als finaler Schritt vor der Analyse wird die DNA vervielfältigt.

2.4.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

Für die DNA-Extraktion aus Vollblut wurde das QIAamp DNA Blood Maxi Kit verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Grundsätzlich beginnt das Verfahren mit der Lyse der Blutzellen durch eine Protease (frei von Desoxyribonuklease DNase- und Ribonuklease RNase-Aktivität) in Kombination mit einem Lysepuffer (AL). Nach Übertragen des Lysats in einen geladenen Filter (Spin Column), kann die negativ geladene DNA an die Membran der Spin Column binden und durch zwei Waschvorgänge von

Unreinheiten befreit werden. Abschließend wird die DNA in 1ml des Puffers AE eluiert (von der Membran gelöst) und kann so gelagert werden. Verwendet wurden Blutproben von jeweils 5- 10ml.

Zu Beginn werden 500µl QIAGEN Protease in ein 50ml Falcon pipettiert, die Blutprobe hinzugefügt und gemischt. Nach anschließendem Hinzugeben von 12ml Puffer AL wird die Probe erneut gut durchgemischt. Um eine adäquate Lyse der Blutzellen und somit später eine möglichst maximale DNA-Ausbeute zu gewährleisten, ist darauf zu achten die Probe für mindestens 1 Minute stark zu schütteln sowie mehrmals zu invertieren. Anschließend werden die Proben in einem Wasserbad bei 70°C für 10 Minuten inkubiert.

Danach werden 10ml Ethanol (100%) hinzugefügt und die Probe erneut sorgfältig durch starkes Schütteln gemischt, bevor die Hälfte der Lösung in eine QIAamp Maxi Column überführt und bei 3000 rpm (1850x g) 3 Minuten lang zentrifugiert wird. Das Filtrat wird verworfen. Derselbe Schritt wird mit der anderen Hälfte der Lösung wiederholt. Das Filtrat wird ebenfalls verworfen.

Anschließend wird die DNA von Unreinheiten (z.B.: restlichen Zellbestandteilen) befreit. Hierzu werden 5ml Puffer AW1 auf die Maxi Column gegeben und sie wird bei 5000 rpm (4500 x g) für 1 Minute zentrifugiert. Im zweiten Waschvorgang wird die Maxi Column mit 5ml des Puffers AW2 gefüllt und bei 5000rpm (5000 x g) für 15 Minuten zentrifugiert. Als letzter Schritt erfolgt die Elution der DNA. 1ml Puffer AE wird auf die Maxi Column pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin bei 5000 rpm (4500 x g) für 2 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Filtrat wird erneut auf die Maxi Column gegeben und ebenfalls zentrifugiert (5000rpm für 2 Minuten).

Die eluierte DNA wird anschließend in ein 1,5ml Eppi überführt und nach Messung der DNA-Konzentration (siehe Kapitel 2.4.2) bei -20°C gelagert.

2.4.2 Messung der DNA-Konzentration

Um eine ausreichende Ausbeute an extrahierter DNA aus den Vollblutproben sicherzustellen, wird die DNA-Konzentration der Elution durch Lichtabsorption bei 260nm mit Hilfe des Qubit 2.0 Fluorometers gemessen.

Vor der Messung wird 1µl der eluierten DNA mit 199µl Qubit Working Solution (bestehend aus Working Buffer und Fluoreszenzfarbstoff) durch einen Vortexmischer gemischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Verwendet wird ein Farbstoff, der in Verbindung mit DNA fluoresziert und es so dem Gerät ermöglicht die DNA-Konzentration anhand des Vergleichs mit einer Standardkurve zu bestimmen.

2.4.3 Bisulfit-Konvertierung

Die Bisulfit-Konvertierung dient dazu, bei der späteren Analyse durch Pyrosequenzierung (siehe Kapitel 2.5) den Unterschied zwischen nicht-methyliertem und methyliertem Cytosin sichtbar zu machen und somit den genauen Methylierungsstatus bestimmen zu können.

Nicht-methylierte Cytosin Nukleotide werden durch Bisulfitsalze zu Uracil-Nukleotiden entmineralisiert. Methyliertes 5-Methylcytosin zeigt sich hingegen resistent gegenüber Bisulfit und bleibt erhalten. Um eine vollständige Konvertierung nicht-methylierter Cytosin Nukleotide zu gewährleisten werden hohe Konzentrationen an Bisulfitsalzen, hohe Temperaturen und ein niedriger pH-Wert benötigt.

In der vorliegenden Studie wurde das EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit von QIAGEN verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zunächst wird ein Reaktionsgemisch aus der extrahierten DNA, einer Bisulfit-Lösung, sowie verschiedene Puffer in PCR-Tubes vorbereitet. Das Reaktionsgemisch inkubiert dann im Thermocycler nach einem bestimmten Programm (siehe Tabelle 11). Anschließend folgt eine Reinigung der Proben, um Bisulfitsalze und andere Chemikalien des Reaktionsgemisches zu entfernen, die eine spätere Analyse mittels Pyrosequenzierung verhindern.

Tabelle 11: Bisulfitkonvertierung: Schritte, Dauer und Temperatur des Inkubationsprogramms im Thermocycler
 Verwendet wurde das EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit von QIAGEN

Schritt	Dauer	Temperatur
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	15 min	60°C
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	15 min	60°C
Lagerung	Unendlich	-20°C

In einer PCR-Tube wird je nach Konzentration der vorliegenden DNA-Probe die DNA auf ein Volumen von 20 oder 40µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Zusätzlich werden in das PCR-Tube 85µl Bisulfite Solution, sowie 35 oder 15µl DNA-Protect Buffer pipettiert, so dass jede Tube ein Gesamtvolumen von 140µl Reaktionsgemisch enthält. DNA-Protect Buffer und die Bisulfite Solution sind im Kit enthalten. Anschließend werden die PCR-Tubes geschlossen und kräftig durchmischt, bevor sie im Thermocycler inkubiert werden.

Für die sich anschließende Reinigung wird der Inhalt der Tubes in ein 1,5ml Eppi überführt.

Nach jedem der folgenden beschriebenen Zentrifugationsschritte wird der entstandene Durchfluss verworfen. Falls nicht anders angegeben wird 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Es werden 310µl Buffer BL zur Lösung hinzugefügt, kurz gevortext, dann 250µl Ethanol (100%) hinzugefügt, ebenfalls kurz gevortext (15 Sekunden) und kurz zentrifugiert. Anschließend werden die Proben in Spin Columns, die sich in 2ml Sammelgefäßen befinden übertragen und für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Es folgt die Zugabe von 500µl Buffer BW und eine erneute Zentrifugation. Der Durchfluss wird ebenfalls verworfen. Es werden 500µl Buffer BD hinzugegeben, die Probe bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert, dann unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der Buffer BD dient dem letzten Schritt der eigentlichen Bisulfit-Konvertierung der Desulphonierung (siehe Abbildung 1).

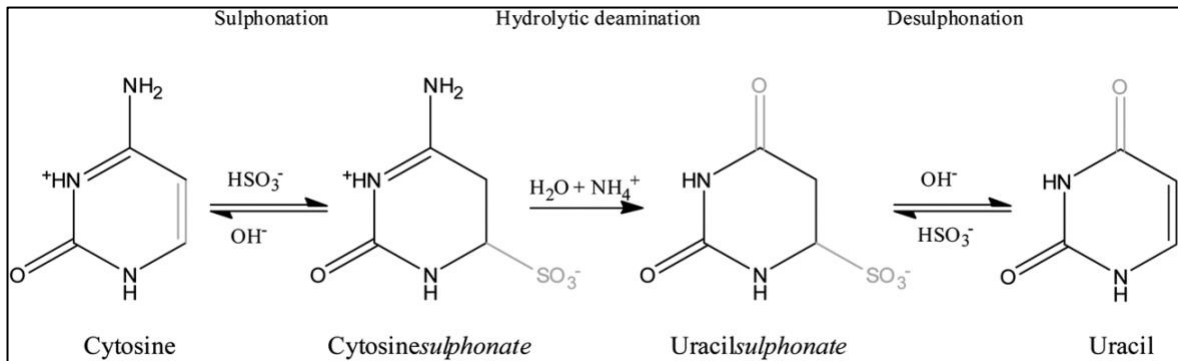


Abbildung 1: Reaktion der Bisulfit-Konvertierung (137)

Der Durchfluss wird erneut verworfen. 500µl Buffer BW werden zugegeben und ebenfalls zentrifugiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Im nächsten Schritt wird ebenfalls der Durchfluss verworfen, 250µl Ethanol hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Die Spin Columns werden in ein neues Sammelgefäß überführt und nochmals zentrifugiert, um eventuelle Flüssigkeitsrückstände zu entfernen, bevor die Spin Columns in ein 1,5ml Eppi überführt werden und 20µl Elutionspuffer EB zugegeben werden. Nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur wird zum Abschluss 1 Minute bei 15000 x g zentrifugiert. Abschließend wird die Spin Column verworfen und die eluierte DNA im Eppi bei minus 20°C gelagert.

2.4.4 DNA-Vervielfältigung

Vor der finalen Analyse der Methylierung einzelner Genabschnitte mittels Pyrosequenzierung (siehe Kapitel 2.5) werden spezifische Abschnitte der vorliegenden DNA mittels Polymerasekettenreaktion PCR vervielfältigt.

2.4.4.1 Polymerasekettenreaktion PCR

Die PCR beginnt mit der Trennung des DNA-Doppelstrangs in seine zwei Einzelstränge durch Hitze („Denaturierung“). Dadurch können sequenzspezifische Primer an die Stränge binden („Annealing“) und so kann eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase erneut doppelsträngige DNA synthetisieren, in dem sie die Primer verlängert („Elongation“). Dieser Vorgang wird im Thermocycler in mehreren Amplifikationszyklen wiederholt. Die PCR wurde mit dem PyroMark PCR-Kit von QIAGEN nach Herstelleranleitung durchgeführt. Die zugehörigen Primer finden sich im Anhang. Eine PCR-Tube enthält pro Ansatz

20ng Bisulfit konvertierte DNA, je 0,4µM Primer, 12,5µl PyroMark PCR Master Mix und 25µl RNase freies Wasser. Der PyroMark PCR Master Mix enthält die hitzestabile Taq-Polymerase (HotStarTaq DNA-Polymerase), einen 3mM MgCl₂ haltigen Reaktionspuffer sowie Desoxyribonukleotide (dNTPs). Die Ansätze wurden in PCR-Tubes pipettiert und nach der Inkubation im Thermocycler bei minus 20°C aufbewahrt.

Tabelle 12: PCR-Programm: Schritte, Dauer und Temperatur im Thermocycler.

PCR-Programm mit dem PyroMark PCR-Kit von Qiagen		
Schritt	Dauer	Temperatur
Initialer PCR Aktivierungsschritt	15min	95°C
Denaturierung	30s	94°C
Anlagerung/ Annealing	30s	56°C
Extension	30s	72°C
45 Amplifikationszyklen		
Finale Extension	10min	72°C

2.4.4.2 Gelelektrophorese

Das Gelingen der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Hierbei galt es vor allem Verunreinigungen der DNA auszuschließen. Dazu wurde zuvor bei jedem PCR-Zyklus eine Negativ-Kontrolle, die keine DNA enthielt, angefertigt.

Die Gelelektrophorese funktioniert mittels der Anlage eines elektrischen Feldes an das mit DNA-Proben gefüllte Gel. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern zum Pluspol. Hierbei werden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt, da kleinere Fragmente schneller durch die Gelmatrix wandern als größere. Folglich ist es ebenfalls möglich die Größe und Masse der Fragmente anhand einer Referenz DNA-Ladder mit bekannter Größe zu bestimmen.

In der vorliegenden Studie reicht der positive Nachweis von DNA in den einzelnen Proben und der Nachweis einer DNA freien Negativkontrolle aus.

Für das zweiprozentige Agarosegel werden 2g Agarose in 100ml TRIS-Borsäure-EDTA Puffer (TBE-Puffer) durch mehrmaliges Aufkochen gelöst. Zu 40 bis 50ml des hergestellten Trägermediums wird 1µl Cyanfarbstoff hinzugefügt, dieser färbt

später die DNA. Anschließend wird das Gel in eine Form gegossen und circa 20 Minuten bis zur Aushärtung ruhen gelassen. 5µl des PCR-Produktes werden mit 1µl Loading Dye vermischt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Als Referenz dient eine 100bp DNA Ladder. Dann wird eine Spannung von circa 150V für circa 30 Minuten angelegt. Das Gel wird abschließend unter ultraviolettem Licht analysiert (siehe Abbildung 2).

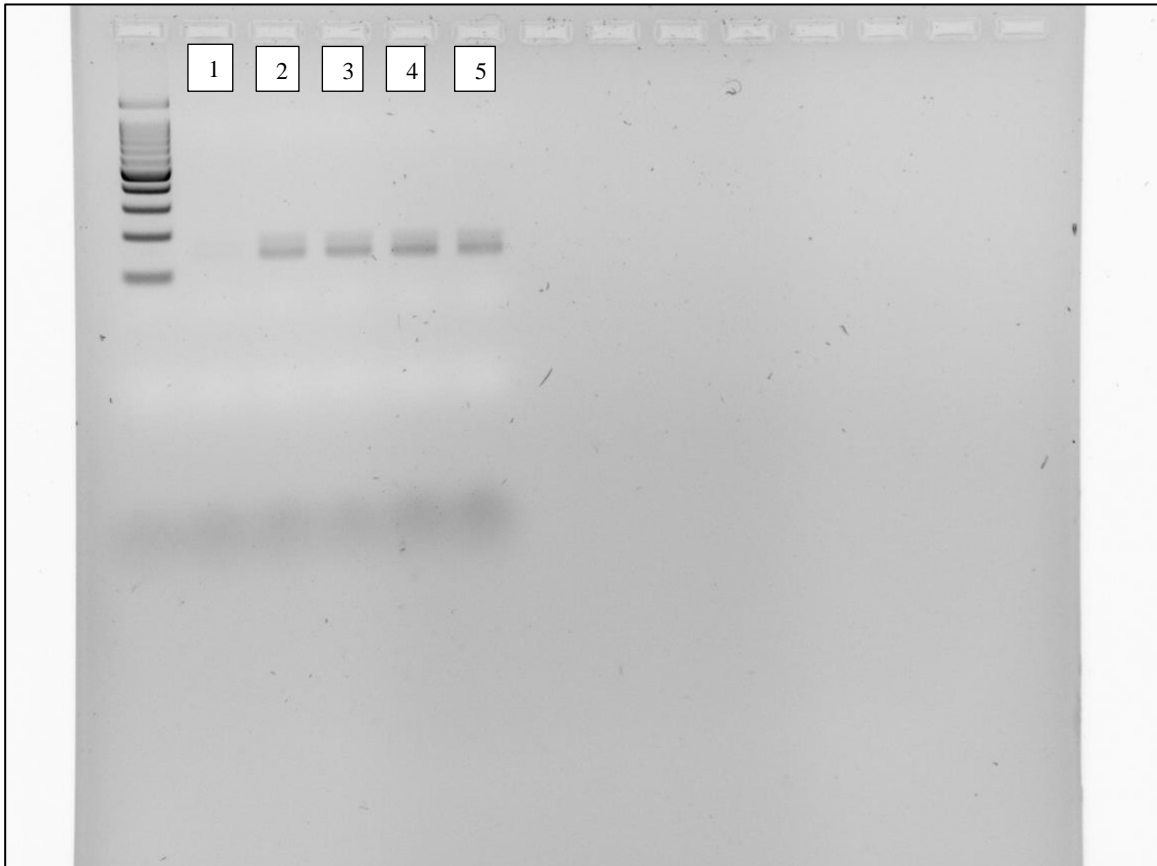


Abbildung 2: Gelelektrophorese einer PCR für MORC CpG2
Eine Negativkontrolle (Feld markiert mit 1) und vier Proben (Felder markiert mit 2 bis 5).

2.5 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung dient zur finalen Analyse der Methylierungsmuster bestimmter Genabschnitte. In der vorliegenden Studie wurde der PyroMark Q24 Pyrosequencer und die Pyromark Gold Reagents von QIAGEN verwendet. Bei der Pyrosequenzierung handelt es sich um ein Verfahren, das sich die DNA-Synthese durch DNA-Polymerase zu Nutzen macht. Wird ein Nukleotid erfolgreich in den DNA-Strang eingebaut, kommt es durch verschiedene

enzymatische Reaktionen zur Konvertierung von Pyrophosphat zu Adenosintriphosphat (ATP). Dies wird mit Hilfe von Luciferase in ein Licht (Biolumineszenz) übersetzt und registriert.

Vor der eigentlichen Analyse im Pyrosequencer wird das Bisulfit-konvertierte PCR Produkt wie folgt für die Sequenzierung vorbereitet. Das PCR-Produkt wird an Streptavidin Sepharose-Beads gebunden. Dieser Vorgang ist möglich, da bei der vorangegangenen PCR biotinylierte Reverse-Primer verwendet wurde. So konnte ein DNA-Strang mit Biotin markiert werden und kann nun spezifisch an die Sepharose-Beads binden. In jedes PCR-Tube (10µl Inhalt) wird 1µl der Beads, 40µl Binding Puffer und 29µl Wasser pipettiert und auf einem Schüttler bei 1.410rpm für 10 Minuten durchmischt.

Im nächsten Schritt erfolgt die Denaturierung der beiden DNA-Stränge auf der PyroMark Work Station. Die Station wird mit Ethanol (70%), Denaturierungspuffer und Waschpuffer befüllt und die PCR-Platte eingelegt. Außerdem wird eine PyroMark Platte vorbereitet in der später der biotinmarkierte Einzelstrang an den Sequenzierungs-Primer bindet. Dazu werden in jedes Well der Platte 24µl des Annealing Puffers und je 1µl des Sequenzierungs-Primers gefüllt.

Zunächst werden die Beads mit Hilfe eines Vakuum-Kamms der Station an spezielle Filterprobes gebunden. Daraufhin werden sie für fünf Sekunden in Ethanol, fünf Sekunden in Denaturierungspuffer sowie für zehn Sekunden im Waschpuffer inkubiert. Durch Ausschalten des Vakuums und leichtes Schütteln des Kamms lassen sich die Beads nun in die PyroMark Platte abschütteln. Damit der Sequenzierungs-Primer an den biotinylierten Einzelstrang binden kann, werden die Proben anschließend für zwei Minuten auf einem Heizblock bei 80°C erhitzt und dann für 15 Minuten abgekühlt.

Anschließend erfolgt die Analyse der Proben im Pyrosequencer. Mit der PyroMark Q24 Software wurde zuvor ein spezielles „Run File“ erstellt. Es enthält die Sequenz des Genabschnittes nach der Bisulfitkonvertierung und die Assay Form (hier ein CpG-Assay), sowie die von der Software erstellte Dispensierungsreihenfolge der Nukleotide. Entsprechend dieser Reihenfolge wird das erste der vier Nukleotide zur Reaktion hinzugefügt. Ist das Nukleotid

komplementär zur Base des Matrizenstrangs wird es mit Hilfe der DNA-Polymerase an den Sequenzierungsprimer angeknüpft. Dies führt zur Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) in äquimolarer Quantität zur Menge der eingebauten Nukleotide. Katalysiert durch ATP-Sulfurylase dient das Pyrophosphat nun zur Bildung von ATP in Anwesenheit von Adenosin 5'-Phosphosulfat. Die durch ATP bereitgestellte Energie ermöglicht die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin durch Luciferase. Hierbei entsteht sichtbares Licht, proportional zur Menge von ATP und somit zur Menge der eingebauten Nukleotide. Die Lichtintensität wird mit Hilfe von „Charged Coupled Devices (CCD)“ detektiert und im Pyrogramm als positiver Ausschlag dargestellt. Somit lässt sich die Sequenz des komplementären Stranges aus den positiven Ausschlägen (Peaks) des Pyrogramms ablesen.

Ist das eingespritzte Nukleotid nicht komplementär zum Matrizenstrang wird es zusammen mit überschüssigem ATP durch Apyrase abgebaut. Erst dann kann erneut ein Nukleotid eingespritzt werden. Anstelle von Desoxyadenosintriphosphat (dATP) wird Desoxyadenosin-Alpha-Thio-Triphosphat (dATP α S) verwendet, da dATP α S durch DNA-Polymerase in den komplementären Strang einbaut werden kann, aber nicht fälschlicherweise eine Reaktion mit Luciferase eingeht.

Aufgrund der zuvor erfolgten Bisulfit-Konvertierung ist es dem Gerät möglich den Grad der Methylierung zu bestimmen. Ein nicht methyliertes Cytosin in der Ursprungssequenz wurde bei der Bisulfit-Konvertierung zu Uracil modifiziert (siehe Kapitel 2.4.3). Komplementär zu Uracil ist Adenosin, folglich ist dieses in der komplementären Sequenz der PCR zu finden. Da bei der Pyrosequenzierung erneut ein komplementärer Strang synthetisiert wird, erfolgt der Einbau von Thymin. Im Gegensatz dazu befindet sich komplementär zu einem methylierten Cytosin erneut die Base Cytosin im komplementären Strang des Sequenzierungsvorgangs, über den Zwischenschritt Guanin in der PCR.

Die PyroMark 24 Software berechnet aus dem Verhältnis von Thymin und Cytosin die prozentuale Methylierung der CpG-Islands.

Um exakte Methylierungswerte zu erhalten, wurde die Pyrosequenzierung für jede Probe mehrmals wiederholt. Toleriert wurde ein Unterschied von weniger

als 3% im Methylierungsstatus der einzelnen CpG-Sites zwischen zwei Durchgängen. Traf diese Bedingung zu wurde keine weitere Analyse vorgenommen und der Mittelwert aller durchgeführten Analysen als Wert akzeptiert.

In der Auswertung der gesammelten Daten wurde ebenfalls eine Analyse ohne mögliche Ausreißer durchgeführt. Hierfür wurden prozentuale Methylierungswerte, die mehr als das 1,5-fache des Interquartilabstandes (IQR) von der 25. und 75. Perzentile entfernt lagen von der Analyse ausgeschlossen. Für die Analyse ohne Ausreißer der CpG-Site Chr.3.108838388 (MORC_CpG2) wurden drei Werte entfernt. Dabei handelte es sich um zwei Ausreißer die sich mehr als das 1,5-fache des IQR unterhalb der 25. Perzentile befanden mit Methylierungswerten von 91,24% und 91,82% und um einen Ausreißer, der sich mehr als das 1,5-fache des IQR oberhalb der 75. Perzentile befand mit einem Methylierungswert von 99,33%.

Für die Analyse ohne Ausreißer der CpG-Site Chr.3.108838285 (MORC_CpG3) wurden zwei mögliche Ausreißer entfernt. Dabei handelte es sich um zwei Ausreißer die sich mehr als das 1,5-fache des IQR unterhalb der 25. Perzentile befanden mit Methylierungswerten von 96,65% und 95,83%.

Für die Analysen ohne Ausreißer der CpG-Site Chr.3.108838104 (MORC_CpG5) handelt es sich um vier mögliche Ausreißer. Darunter fielen zwei Ausreißer die sich mehr als das 1,5-fache des IQR unterhalb der 25. Perzentile befanden mit Methylierungswerten von 93,17% und 93,49%, sowie ein Ausreißer der mehr als das 3-fache des IQR unterhalb der 25. Perzentile lag mit einer prozentualen Methylierung von 91,92%, sowie ein Wert der sich mehr als das 1,5-fache oberhalb der 75. Perzentile befand mit einem Methylierungswert von 98,14%.

Aus den Werten der gemittelten prozentualen Methylierung aller drei analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert) wurden insgesamt zwei Ausreißer entfernt. Ein Ausreißer befand sich mehr als das 1,5-fache des IQR unterhalb der 25. Perzentile, mit einem Wert von 94,71% und ein Ausreißer befand sich mehr als das 1,5-fache des IQR oberhalb der 75. Perzentile mit einem Methylierungswert von 98,203% (siehe Abbildung 3).

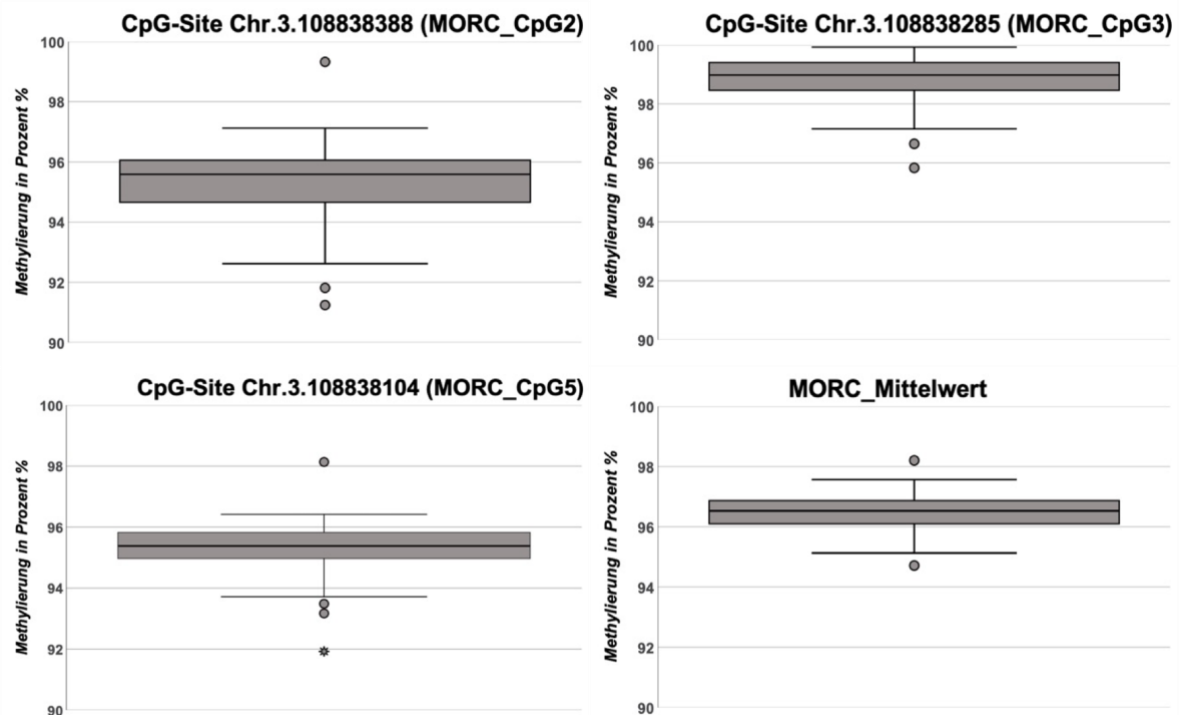


Abbildung 3: Prozentuale Methylierungswerte der analysierten CpG-Sites zur Darstellung möglicher Ausreißer
 Dargestellt sind Chr.3.108838388 (MORC_CpG2), Chr.3.108838285 (MORC_CpG3), Chr.3.108838104 (MORC_CpG5) und die gemittelte prozentuale Methylierung der drei analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert). Werte, die mehr als das 1,5-fache des Interquartilabstandes (markiert mit einem °) von der 25. und 75. Perzentile entfernt lagen, wurden als Ausreißer eingestuft und von der Analyse ausgeschlossen. Werte mit 3-fachem IQR sind mit einem Stern (*) markiert.

2.6 Genotypisierung

Mit der extrahierten DNA wurde außerdem eine Genotypisierung mit der TaqMan SNP Genotyping Technologie nach Herstellerangaben durchgeführt. Genotypisierung dient dazu Unterschiede in der genetischen Information einzelner Individuen zu analysieren. Mit den TaqMan SNP Genotyping Assays lassen sich Einzelnukleotid Polymorphismen, d.h. Unterschiede einzelner Basenpaare innerhalb eines Genabschnittes, untersuchen.

Zunächst verdünnt man die extrahierte DNA auf 10ng/µl. Anschließend wird ein Assay Mix vorbereitet. Für eine Reaktion enthält der Assay Mix 3µl Master Mix, 0,15µl des Assays und 1,85µl RNase freies Wasser. In eine StepOne Genotyping Platte mit 96 Wells werden nun 2µl der verdünnten DNA pro Well nach einem zuvor erstellten Plan vorgelegt. Anschließend werden 5µl Assay Mix pro Well hinzugegeben und die Platte wird kurz zentrifugiert, um mögliche Luftblasen zu

entfernen. Im nächsten Schritt erfolgt die Real Time PCR mit dem StepOne System nach in Tabelle 13 aufgeführtem Programm. Anschließend kann die Platte mit der TaqMan Genotyper Software analysiert werden.

Tabelle 13: Genotypisierung: StepOne-Inkubationsprogramm der Real Time PCR im Thermocycler

Stage	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
1	1x	60°C	00:30 min
2	1x	95°C	10:00 min
3	40x	95°C 60°C	00:15 min 01:00 min
4	1x	60°C	00:30 min

Bei der TaqMan SNP Genotypisierung wird die 5' Nuklease Aktivität der Taq-Polymerase ausgenutzt, um durch ein fluoreszierendes Signal spezifische Polymorphismen in DNA-Proben zu detektieren.

Jedes Assay enthält zwei Primer und zwei TaqMan Minor Groove Binder Probes (MGB-Sonde), um beide Ausprägungen des Alleles detektieren zu können: eine komplementär zum Wild Typ, die andere komplementär zur Variante des Allels. Das 5' Ende der Sonde ist mit einer spezifischen fluoreszierenden Farbe (siehe Tabelle 14) markiert. Am 3' Ende befindet sich ein Non-Fluorescent Quencher (NFQ), der in der Lage ist die Fluoreszenz der beiden Farben am 5' Ende zu unterdrücken.

Tabelle 14: Genotypisierung: Korrelation zwischen Fluoreszenzsignal und Genotyp der Probe

Fluoreszenz Signal	Genotyp der Probe
VIC. signal	Homozygosity for Allele 1
FAM™ signal	Homozygosity for Allele 2
VIC. and FAM™ signals	Heterozygosity Allele 1-Allele 2

Ist die MGB-Sonde also noch intakt, d.h. ungebunden und beide Enden sind nah beieinander, unterdrückt der NFQ die jeweilige fluoreszierende Farbe (Reporter Dye). Während dem Annealing Schritt der PCR kann die Sonde an eine komplementäre Sequenz zwischen Forward und Reverse Primer binden. Wird

der DNA-Strang nun während der Elongation durch die Exonuklease-Aktivität der Gold DNA-Polymerase gespalten, erfolgt eine Trennung der Reporter Dye vom NFQ. Dies erlaubt es der Reporter Dye zu fluoreszieren. Eine vermehrte Fluoreszenz ist also nur sichtbar, wenn die MGB-Sonde komplementär zur Zielsequenz der DNA ist. Diese Fluoreszenz wird folglich durch die PCR vermehrt, kann detektiert werden und es kann bestimmt werden welche Allele sich in der DNA- Probe befinden. Zur Vereinfachung siehe Abbildung 4.

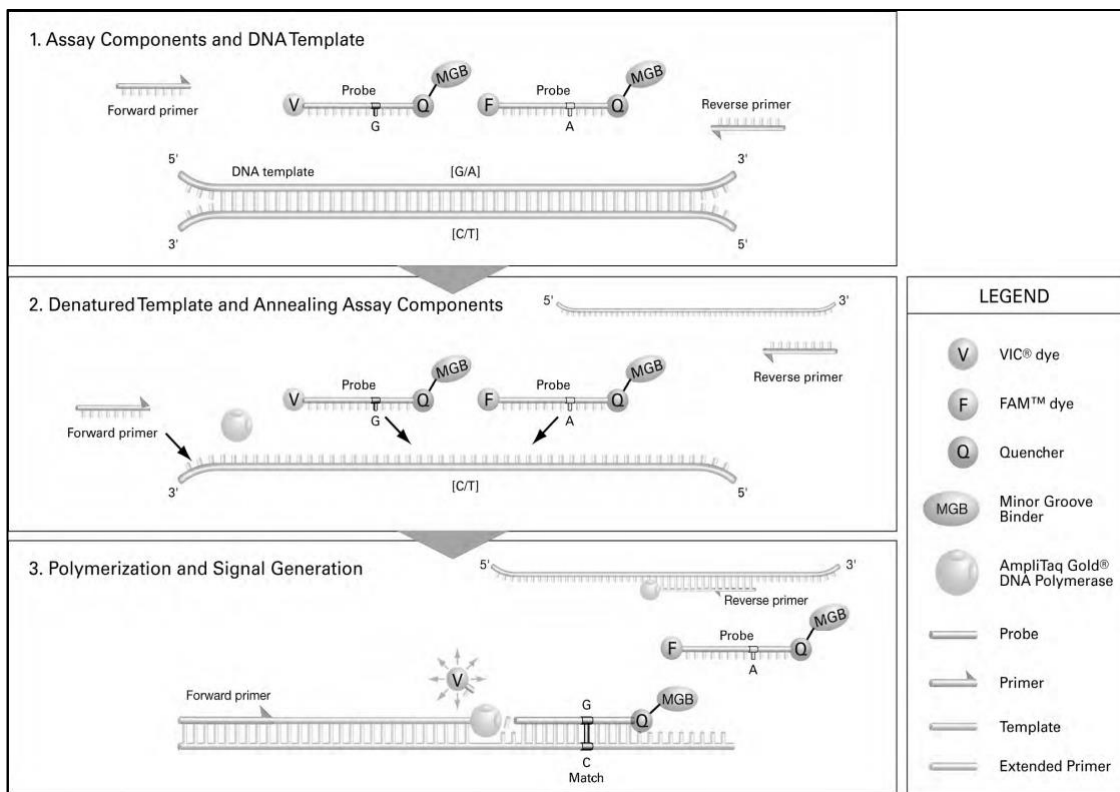


Abbildung 4: TaqMan Reagents Detection Process

2.7 Statistik

Die Auswertung der Fragebögen sowie der Pyrosequenzierung erfolgte mit IBM SPSS Statistics Version 26. Die vorliegenden Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk Test und dem Kolmogorov-Smirnov Test und der bildlichen Darstellung durch Histogramme auf Normalverteilung geprüft und entsprechend dem Ergebnis weitere Testverfahren ausgewählt. Um die Daten deskriptiv darzustellen wurden Mittelwert und Standardabweichungen ermittelt.

Bei den vorliegenden Daten handelt es sich ausschließlich um nicht normalverteilte Stichproben, deshalb wurde mit dem Mann-Whitney-U Test und dem Kruskal-Wallis Test als nicht parametrische Verfahren zur Varianzanalyse gearbeitet. Um relative Häufigkeiten zu vergleichen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Rangkorrelationen wurden bivariat mittels Spearman-Rho berechnet. Die Signifikanzniveaus wurden auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Das Hauptaugenmerk der Datenanalyse ist der Vergleich zwischen Probanden mit erlebten ELA (ELA=1; n=25) und der Kontrollgruppe (ELA=0; n=36). Mögliche Zusammenhänge oder Unterschiede in der Beantwortung der Fragebögen und in der prozentualen Methylierung der untersuchten CpG-Sites, ermittelt durch Pyrosequenzierung, sollen identifiziert werden. So erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse der ausgefüllten Fragebögen zwischen Probanden mit ELA und der Kontrollgruppe. So sollen mögliche Effekte frühkindlicher Traumata auf das Empfinden von Angst, Depressiven Symptomen, Stress und auf die Wahrnehmung alltäglicher psychischer Belastung aufgezeigt und statistisch belegt werden. Des Weiteren wurden Effekte von ELA auf die prozentuale Methylierung der spezifischen CpG-Sites des Gens MORC1 betrachtet.

Die Einteilung in die Gruppen ELA=0 und ELA=1 erfolgte mittels des CTQ und wurde bereits im Kapitel 2.2.1 ausführlich beschrieben. Insgesamt wurden im Rahmen der Studie 25 Probanden mit einem Score größer oder gleich 43 Punkten rekrutiert und somit in die Gruppe der Probanden mit ELA (ELA=1; n=25) eingeschlossen. Innerhalb dieser Gruppe sind 20 Probanden weiblich und 5 Probanden männlich mit einem Durchschnittsalter von 31,48 Jahren (SD 11,565). 36 Teilnehmer erreichten im CTQ einen Score kleiner als 43 Punkten und wurden somit in die Kontrollgruppe (ELA=0; n=36) eingeschlossen. Hiervon waren 23 Probanden weiblich und 13 Probanden männlich. Das Durchschnittsalter der Gruppe betrug 27,06 Jahre (SD 9,988).

Da depressive Symptomatik möglicherweise in epigenetische Regulationsmechanismen involviert ist, soll auch unabhängig von dem Erleben frühkindlicher Traumata zusätzlich ein möglicher Zusammenhang zwischen vermehrter depressiver Symptomatik und der spezifischen Methylierung von MORC1 überprüft werden. Diese Analyse erfolgt also unabhängig von der Gruppeneinteilung in ELA=0 und ELA=1.

3.1 BaDo- Dokumentation der Lebensgewohnheiten

Mittels der BaDo wurden soziodemographische Eckdaten, wie Alter und Geschlecht der Probanden, sowie bestimmte Lebensgewohnheiten, die potenziellen Einfluss auf die Epigenetik haben, abgefragt. Dazu gehört das Rauch- und Trinkverhalten, sowie die Einnahme von Benzodiazepinen, illegalen Drogen, Neuroleptika und Antidepressiva.

Anhand dieser Informationen wurden die Probanden bezüglich der Faktoren Alter, Geschlecht und Rauchverhalten gepaart. Der Mann-Whitney-U Test zeigt bei $p=0,068$ keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ELA=1 ($n=25$) und ELA=0 ($n=36$) bezüglich des Alters. Allerdings befinden sich 78,7% der Studienteilnehmer in einem Alter zwischen 18 und 30 Lebensjahren. Lediglich 21,3% der Studienteilnehmer befinden sich in einem Alter zwischen 31 und 65 Lebensjahren. In der Gruppe ohne ELA befinden sich 86,1% der Probanden in einem Alter zwischen 18 und 30 Jahren. Innerhalb der Gruppe mit ELA befinden sich 68% der Probanden in einem Alter zwischen 18 und 30 Jahren. Probanden innerhalb der Kontrollgruppe sind mit einem Durchschnittsalter von 27,06 Jahren (SD: 9,988) im Durchschnitt jünger als Probanden innerhalb der Gruppe mit ELA. In dieser Gruppe beträgt das Durchschnittsalter 31,48 Jahre (SD: 11,565). Außerdem zeigt sich, im Vergleich mit der Kontrollgruppe innerhalb der Gruppe mit ELA eine größere Varianz der Altersverteilung (Varianz: ELA=0: 99,768; ELA=1: 133,760) (siehe Abbildung 5).

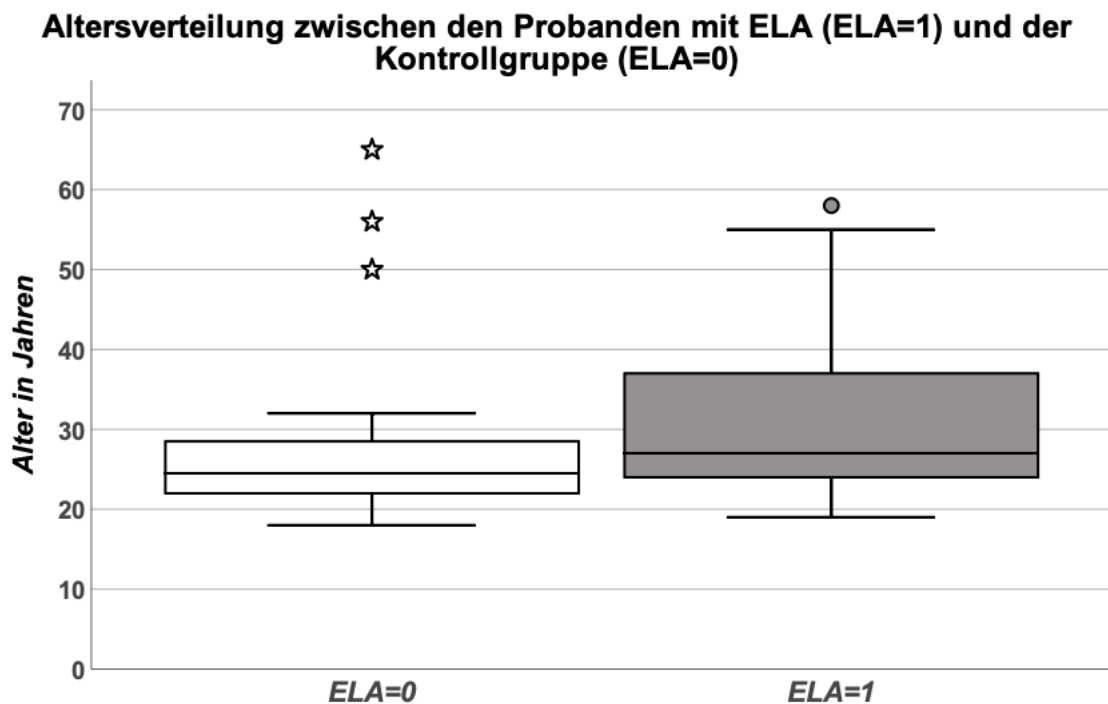


Abbildung 5: Altersverteilung zwischen Probanden mit ELA (ELA=1) und der Kontrollgruppe (ELA=0)
 ELA=0: n=36. ELA=1: n=25. Werte, die mehr als das 1,5-fache des Interquartilabstandes von der 25. und 75. Perzentile entfernt lagen sind mit einem ° markiert. Werte mit 3-fachem IQR sind mit einem Stern (*) markiert.

Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant in Bezug auf das Geschlecht (Chi-Quadrat Test: $p=0,175$) und das Rauchverhalten (Chi-Quadrat Test: $p=0,945$) voneinander. Beim Alkoholkonsum unterscheiden sich die Gruppen. Die Probanden mit ELA trinken signifikant weniger Alkohol als die Gruppe ohne ELA (Chi-Quadrat Test: $p=0,044$).

Mit in die Auswertung einbezogen wurden außerdem die Einnahme von Benzodiazepinen, illegalen Drogen, Neuroleptika und Antidepressiva. Keiner der Probanden gab an Neuroleptika oder Antidepressiva einzunehmen. Vier der Probanden mit ELA (ELA=1) und keiner der Probanden ohne ELA (ELA=0) gab an Benzodiazepine einzunehmen. Es zeigt sich somit, dass signifikant mehr Probanden mit ELA Benzodiazepine einnehmen als die Kontrollen (Chi-Quadrat Test: $p=0,013$). Eine solche Auffälligkeit konnte in Bezug auf den Konsum illegaler Drogen nicht nachgewiesen werden (Chi-Quadrat Test: $p=0,184$).

3.2 Psychometrische Skalen

Alle Psychometrischen Skalen zeigen eine signifikante Divergenz zwischen frühkindlich traumatisierten Probanden und der Kontrollgruppe ohne ELA. Probanden mit ELA weisen ausnahmslos in allen Fragebögen höhere Summenwerte als die Kontrollgruppe auf. Zur besseren Übersicht sind die Unterschiede in Tabelle 15 aufgeführt und werden in den nächsten Kapiteln näher beschrieben. Der CECA.Q fragt wie der CTQ ebenfalls eine Form von ELA ab und wurde deshalb gesondert ausgewertet und erscheint nicht in folgender Tabelle.

Tabelle 15: Psychometrische Skalen: Übersicht der Unterschiede zwischen Probanden mit ELA und der Kontrollgruppe in der Beantwortung
 ELA=0; n=36. ELA=1: n=25. Angegeben ist jeweils der Mittelwert in erreichter Punktzahl oder zugehörigem Wert. Die Ergebnisse wurden mittels einem Mann-Whitney-U Test ermittelt.

Psychometrische Skala	ELA=0 (Mittelwerte)	ELA=1 (Mittelwerte)	Differenz	p-Wert
CTQ	31,06 Pkte.	55,44 Pkte.	24,38 Pkte.	<0,001
BDI-II	3,31 Pkte.	7,80 Pkte.	4,49 Pkte.	0,004
BAI	4,08 Pkte.	7,64 Pkte.	3,56 Pkte.	0,036
SRS	52,83 Pkte.	59,72 Pkte.	6,89 Pkte.	0,040
SCL-90-R (GSI)	T-Wert: 48,08 Rohwert: 0,3072	T-Wert: 52,68 Rohwert: 0,5092	T-Wert: 4,60 Rohwert: 0,2020	T-Wert: 0,008 Rohwert: 0,005

3.2.1 Beck's Depression Inventory II (BDI-II)

Mittels des Beck's Depression Index II (BDI-II) wurde das Vorhandensein und die Schwere von Symptomen einer Depression abgefragt.

Im Mittel erreichen Probanden mit ELA (ELA=1; n=25) 7,80 Punkte im BDI-II. Bei Probanden ohne Trauma (ELA=0; n=36) liegt der Mittelwert bei 3,31 Punkten und somit signifikant niedriger (Mann-Whitney-U: p=0,004) (siehe Abbildung 6). Auch die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman-Rho zwischen dem Gesamtsummenscore des BDI-II und dem Gesamtsummenscore des CTQ zeigt

ein signifikantes Ergebnis ($r=0,483$; $p<0,001$). Ein hoher Summenwert im CTQ korreliert somit signifikant mit einem höheren Gesamtsummenscore im BDI.

$N=55$ der Probanden erreichten eine Punktzahl zwischen Null und 13 Punkten und zählten somit zur Kategorie „Keine oder remittierte Depression“. Für alle weiteren Kategorien erreichten jeweils $n=2$ Probanden die entsprechenden Punktzahlen.

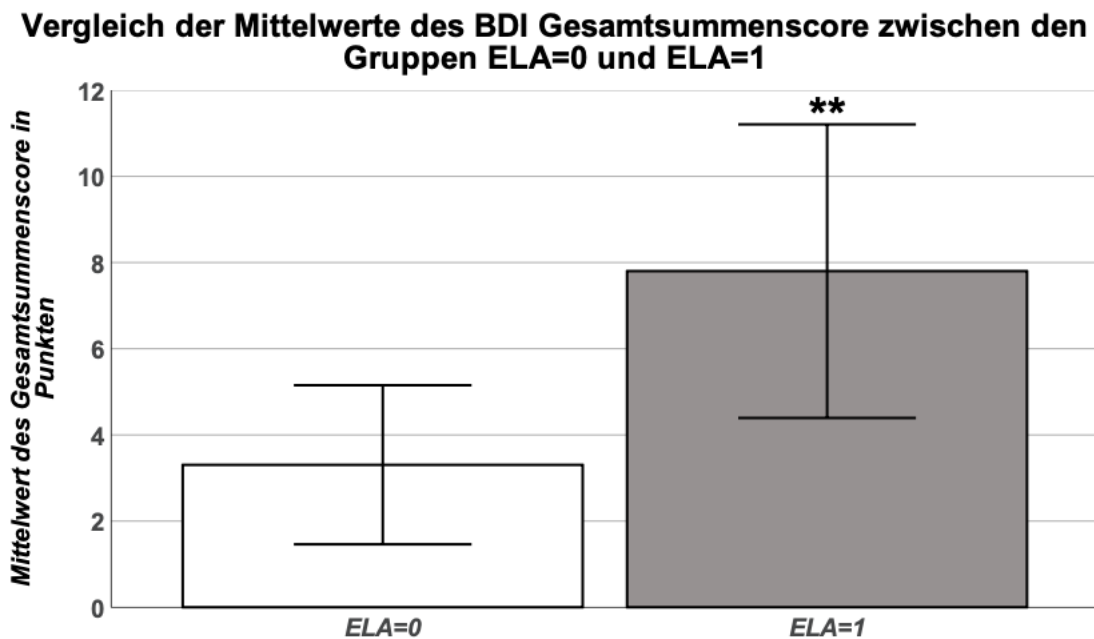


Abbildung 6: Vergleich der Mittelwerte des BDI-II Gesamtsummenscore zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1
ELA=0: $n=36$. ELA=1: $n=25$. Mittelwerte: ELA=0: 3,31 Punkte; ELA=1: 7,80 Punkte.
Fehlerbalken: ± 2 SE.
** markiert einen p -Wert $<0,05$.

3.2.2 Beck's Anxiety Index (BAI)

Mittels des Beck's Anxiety Index (BAI) wurde das Vorhandensein und die Schwere von Symptomen einer Angststörung abgefragt.

Im Mittel erreichen Probanden mit ELA (ELA=1: $n=25$) 7,64 Punkte im BAI. Bei Probanden ohne Trauma (ELA=0; $n=36$) liegt der Mittelwert bei 4,08 Punkten und somit signifikant niedriger (Mann-Whitney-U: $p=0,036$) (siehe Abbildung 7). Auch die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman-Rho zwischen dem Gesamtsummenscore des BAI und dem Gesamtsummenscore des CTQ zeigt ein signifikantes Ergebnis ($r=0,378$; $p=0,003$). Ein hoher Summenwert im CTQ korreliert somit signifikant mit einem höheren Gesamtsummenscore im BAI.

Vergleich der Mittelwerte des BAI Gesamtsummenscore zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1

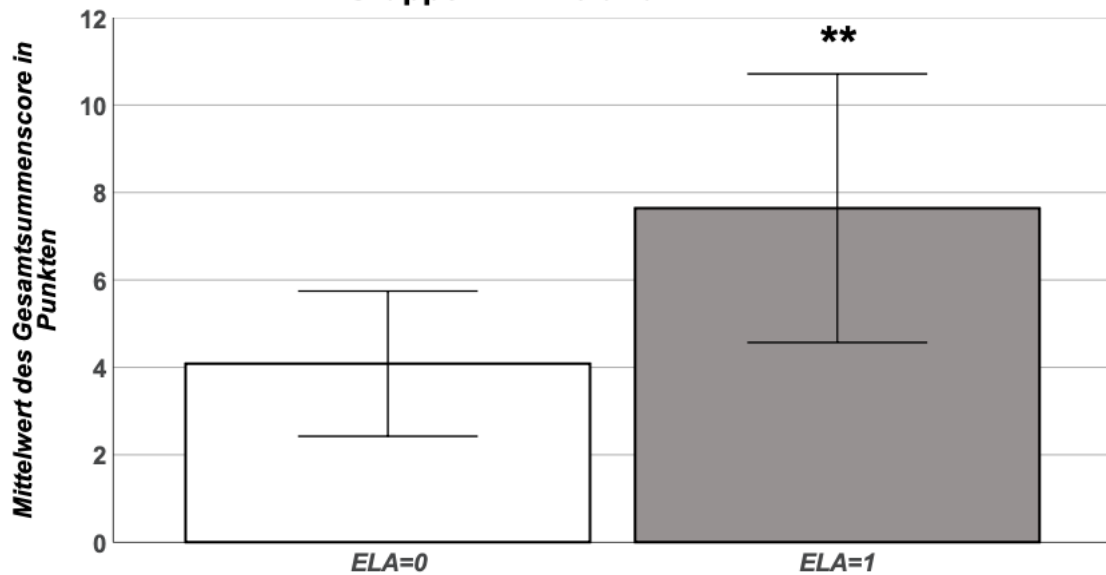


Abbildung 7: Vergleich der Mittelwerte des BAI Gesamtsummenscore zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1
ELA=0: n=36. ELA=1: n=25. Mittelwerte: ELA=0: 4,08 Punkte; ELA=1: 7,64 Punkte.
Fehlerbalken: +/- 2 SE.
** markiert einen p-Wert <0,05.

3.2.3 Stressreaktivitätsskala (SRS)

Die Stressreaktivitätsskala SRS erfasst die individuelle Stressanfälligkeit einer Person.

Hier zeigt sich, dass die Gruppe mit ELA (ELA=1: n=25; Mittelwert: 59,72 Punkte) signifikant höhere Summenwerte in der SRS erreicht, also signifikant stressanfälliger ist als die Kontrollgruppe (ELA=0: n=36; Mittelwerte: 52,83 Punkte) (Mann-Whitney-U: p=0,040) (siehe Abbildung 8). Höhere Summenwerte in der SRS korrelieren signifikant mit höheren Summenwerten im CTQ (Spearman-Rho: r=0,314; p=0,014).

Vergleich der Mittelwerte des SRS-Gesamtsummenscore zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1

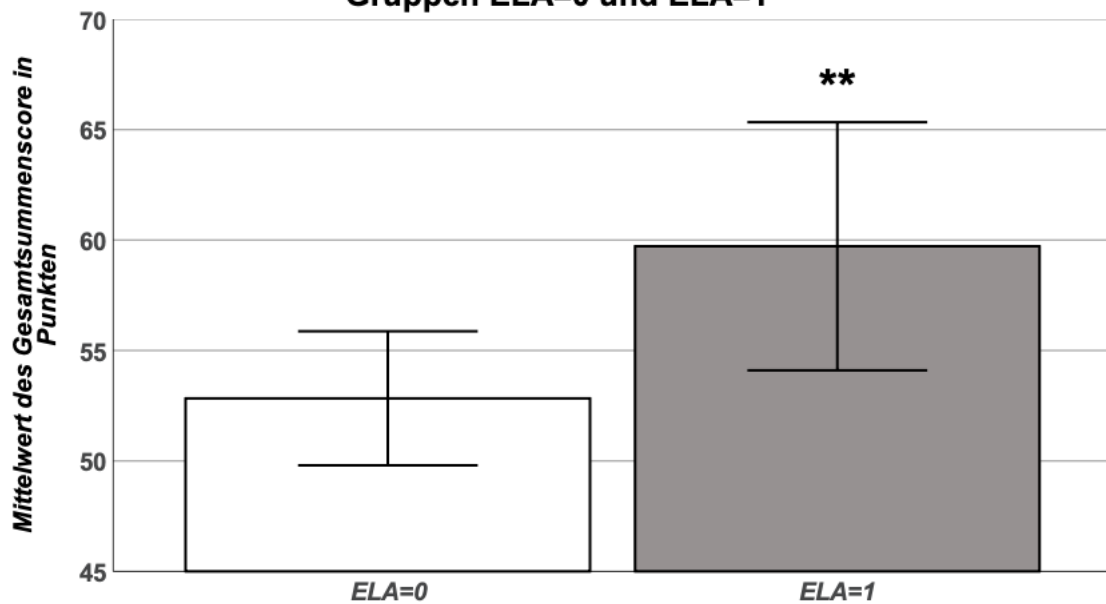


Abbildung 8: Vergleich der Mittelwerte des Gesamtsummenscore der SRS zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1
ELA=0: n=36. ELA=1: n=25. Mittelwerte: ELA=0: 52,83 Punkte; ELA=1: 59,72 Punkte.
Fehlerbalken: +/- 2 SE. ** markiert einen p-Wert <0,05.

3.2.4 Symptom-Checklist-90-Revised (SCL-90-R)

Die Betrachtung des GSI der Symptom-Checklist-90-Revised SCL-90-R, als Maß der aktuellen grundsätzlichen psychischen Belastung, zeigt ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Probanden mit ELA (ELA=1: n=25) und den Kontrollprobanden (ELA=0: n=36). Analysiert wurden sowohl die standardisierten GSI T-Werte als auch die GSI- Rohwerte.

Probanden mit ELA (ELA=1: n=25) weisen eine signifikante höhere aktuelle grundsätzliche psychische Belastung auf, nicht nur bei der Analyse der GSI-Rohwerte (Mann-Whitney-U: $p=0,005$; ELA=0: 0,3072; ELA=1: 0,5092), sondern auch bei der Analyse der standardisierten T-Werte (Mann-Whitney-U: $p=0,008$; ELA=0: 48,08; ELA=1: 52,68) (siehe Abbildung 9).

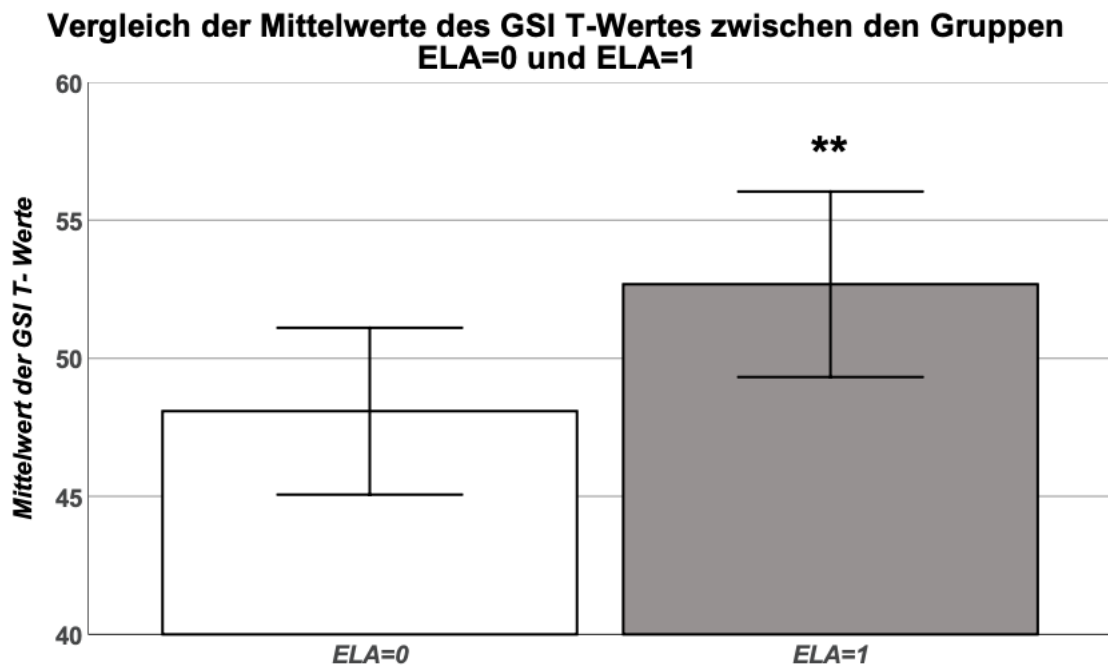


Abbildung 9: Vergleich der Mittelwerte des GSI T-Wertes zwischen den beiden Gruppen ELA=0 und ELA=1
 ELA=0: n=36. ELA=1: n=25. Mittelwerte: ELA=0: 48,08; ELA=1: 52,68. Fehlerbalken: +/- 2 SE. ** markiert einen p-Wert <0,05.

3.2.5 Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q)

Mittels des Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q) wurden weitere Aspekte erlebter Traumata abgefragt. Insbesondere bezieht sich der Fragebogen auf den Verlust eines Elternteils, sowie die Eltern-Kind-Beziehung im Rahmen von Vernachlässigung und Antipathie gegenüber dem Kind.

Die Probanden wurden wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben anhand der abgefragten Aspekte frühkindlicher Traumatisierung in verschiedene Gruppen eingeteilt: Verlust eines oder beider Elternteile, Antipathie, Vernachlässigung oder körperlicher Missbrauch jeweils mütterlicher- oder väterlicherseits, sowie sexueller Missbrauch und schwerer sexueller Missbrauch. Mittels Mann-Whitney-U Test wurden die genannten Gruppen bezüglich möglicher Unterschiede in der Beantwortung der anderen erhobenen psychometrischen Skalen verglichen, um die Auswirkungen dieser Traumata auf das Empfinden von Angst (BAI), Depressiven Symptomen (BDI-II), Stress (SRS) und auf die Wahrnehmung

alltäglicher psychischer Belastung (SCL-90-R) zu untersuchen. Es zeigen sich nur vereinzelt signifikante Unterschiede in der Beantwortung der Fragebögen.

Probanden, die körperlichen Missbrauch durch die Mutter erlebten (n=3) erreichten signifikant höhere Summenwerte im BDI-II (Mann-Whitney-U: $p=0,045$), in der SRS (Mann-Whitney-U: $p=0,027$), sowie signifikant höhere GSI-Rohwerte der SCL-90-R (Mann-Whitney-U: $p=0,042$) als die Kontrollgruppe. Probanden, die körperlichen Missbrauch durch den Vater erlebten (n=2) erreichten lediglich höhere Summenwerte im BDI-II (Mann-Whitney-U: $p=0,047$) als die Kontrollgruppe.

Probanden, die sexuellen Missbrauch erlebten (n=13) erreichen in allen erhobenen Fragebögen signifikant höhere Summenwerte. Der Mann-Whitney-U Test zeigte für den BDI-II $p=0,023$, für den BAI $p=0,022$, für die SRS $p=0,007$ und bei der Betrachtung des GSI der SCL-90-R für den T-Wert $p=0,007$ und für den Rohwert $p=0,002$. Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich bei Probanden, die schweren sexuellen Missbrauch erlebten (Severity of Sexual Abuse ≥ 2 Punkte; n=9). Der Mann-Whitney-U Test zeigte für den BDI-II $p=0,011$, für den BAI $p=0,003$ und bei der Betrachtung des GSI der SCL-90-R für den T-Wert $p=0,015$ und für den Rohwert $p=0,006$. Hier zeigt sich allerdings kein signifikanter Unterschied in der SRS.

Probanden, die starke Antipathie der Mutter erlebten (n=12) erreichten signifikant höhere GSI-Rohwerte der SCL-90-R (Mann-Whitney-U: $p=0,039$) als die Kontrollgruppe.

Zwischen Probanden die ein oder beide Elternteile verloren haben (Parentalloss=1; n=19) und der zugehörigen Kontrollgruppe (Parentalloss=0: n=42) zeigen sich in der Beantwortung aller oben genannten Fragebögen keine signifikanten Unterschiede. Bei der Auswertung wurden die Hintergründe des Verlustes eines Elternteils nicht miteinbezogen. Bei n=8 Probanden, des vorliegenden Kollektivs verstarb ein Elternteil. Nur einer der Probanden gibt an dauerhaft von einem Elternteil getrennt gewesen zu sein. N=9 Probanden verloren ein Elternteil zeitweise durch Trennung/ Scheidung der Eltern.

3.3 Epigenetik: Die prozentuale Methylierung der CpG-Sites Chr3.108838388, Chr3.108838285 und Chr3.108838104

Innerhalb des Gens MORC1 wurden drei CpG-Sites (Chr3.108838388, Chr3.108838285 und Chr3.108838104) analysiert.

Zuerst erfolgte der Vergleich zwischen Probanden mit ELA und der Kontrollgruppe.

Die Gruppen ELA=1 und ELA=0 unterscheiden sich im Konsum von Alkohol und bei der Einnahme von Benzodiazepinen (siehe Kapitel 3.1). Deshalb wurde ebenfalls untersucht, ob das Trinkverhalten oder der Konsum von Benzodiazepinen einen Effekt auf die prozentuale Methylierung hat.

Außerdem erfolgte unabhängig von dem Erleben von ELA, eine weitere statistische Analyse des BDI-II als Maß depressiver Symptomatik, um auch hier mögliche Unterschiede oder Zusammenhänge der Methylierungswerte zu entdecken.

Wie in Kapitel 2.5 beschrieben wurden die Analysen anschließend noch einmal unter Ausschluss von möglichen Ausreißern durchgeführt.

3.3.1 Early Life Adversities

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Aspekte frühkindlicher Traumata mittels CTQ und CECA.Q abgefragt. In den folgenden zwei Kapiteln werden mögliche Effekte auf die prozentuale Methylierung der analysierten CpG-Sites von ELA insgesamt, abgefragt mit dem CTQ, von den einzelnen Kategorien des CTQ und mögliche Effekte mit dem CECA.Q zusätzlich erhobener Aspekte frühkindlicher Traumata vorgestellt.

3.3.1.1 Childhood Trauma Questionnaire CTQ

Probanden mit frühkindlichen Traumata (ELA=1) weisen für alle analysierten CpG-Sites eine geringere mittlere prozentuale Methylierung auf als die Kontrollprobanden (ELA=0) (siehe Abbildung 10).

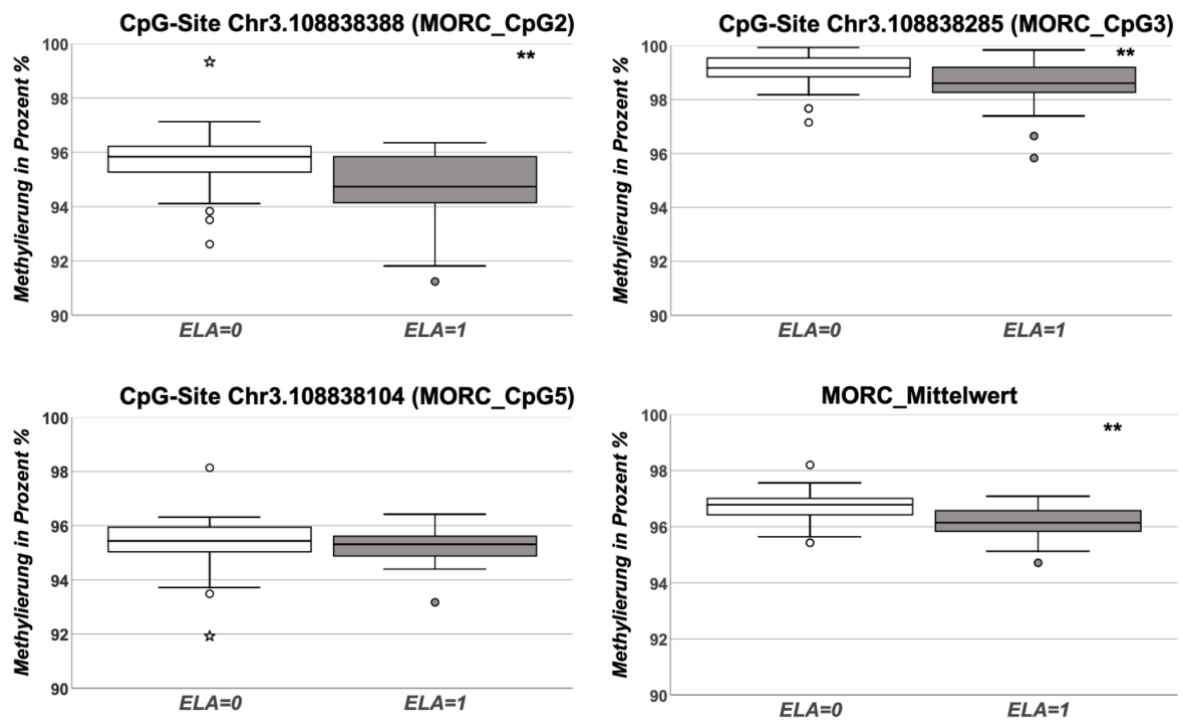


Abbildung 10: Prozentuale Methylierungswerte der analysierten CpG-Sites im Vergleich zwischen den Gruppen ELA=0 und ELA=1.

Dargestellt sind die CpG-Sites Chr3.108838388 (MORC_CpG2), Chr3.108838285 (MORC_CpG3), Chr3.108838104 (MORC_CpG5) und die gemittelte prozentuale Methylierung der drei analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert). ELA=0: n=36. ELA=1: n=25. Werte, die mehr als das 1,5-fache des Interquartilabstandes von der 25. und 75. Perzentile entfernt liegen sind mit einem ° markiert. Werte mit 3-fachem IQR sind mit einem Stern (*) markiert. ** markiert einen p-Wert <0,05.

Einen signifikanten Unterschied zeigt der Mann-Whitney-U Test für die CpG-Sites Chr3.108838388 (MORC_CpG2) (Mann-Whitney-U: $p=0,005$; ELA=0 [n=36]: 95,7317% [SD 1,13193]; ELA=1 [n=21]: 94,6751% [SD 1,39818]; Differenz: 1,0566%) und Chr3.108838285 (MORC_CpG3) (Mann-Whitney-U: $p=0,029$; ELA=0 [n=36]: 99,0491% [SD 0,66723]; ELA=1 [n=25]: 98,5625% [SD 0,95037]; Differenz: 0,4866%), sowie für die gemittelte prozentuale Methylierung aller drei analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert) (Mann-Whitney-U: $p<0,001$; ELA=0 [n=36]: 96,7141% [SD 0,5738044]; ELA=1 [n=25]: 96,1592% [SD 0,5599274]; Differenz: 0,5549%). Jedoch nicht für die CpG-Site Chr3.108838104 (MORC_CpG5) (Mann-Whitney-U: $p=0,305$; ELA=0 [n=36]: 95,3617 % [SD 0,99139]; ELA=1 [n=25]: 95,24% [SD 0,67327]; Differenz: 0,1217%).

Bei der Analyse der Daten ohne Ausreißer zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied der zentralen Tendenzen von ELA=1 und ELA=0 für die CpG-Sites Chr3.108838388 (MORC_CpG2) (Mann-Whitney-U: $p=0,007$; ELA=0 [n=33]:

95,7239% [SD 0,20467]; ELA=1 [n=24]: 94,6751% [SD 0,28540]; Differenz: 1,0488%) und Chr3.108838285 (MORC_CpG3) (Mann-Whitney U: p=0,026; ELA=0: [n=35] 99,0536% [SD 0,67641]; ELA=1: [n=23] 98,5393% [SD 0,96479]; Differenz: 0,5143%), sowie für die gemittelte prozentuale Methylierung aller drei analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert) (Mann-Whitney-U: p=0,001; ELA=0: [n=33] 96,725842% [SD 0,58990]; ELA=1: [n=23] 96,161582% [SD 0,5723874]; Differenz: 0,5643%). Jedoch abermals nicht für die CpG-Site Chr3.108838104 (MORC_CpG5) (Mann-Whitney-U: p=0,234; ELA=0 [n=33]: 95,4159% [SD 0,99236]; ELA=1 [n=23]: 95,2435% [SD 0,68818]; Differenz: 0,1724%).

Die einzelnen Items des CTQ werden fünf verschiedenen Kategorien (körperlicher, sexueller und emotionaler Missbrauch, sowie körperliche und emotionale Vernachlässigung) zugeordnet. Der genaue Aufbau, die kennzeichnenden Items und die zugehörigen Schweregrade (1 [„Nicht bis minimal“] bis 4 [„Schwer bis extrem“]) der einzelnen Kategorien sind in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Es erfolgte ebenfalls ein Vergleich der prozentualen Methylierungswerte innerhalb dieser Kategorien. Es wurde überprüft ob bestimmte Methylierungsmuster vorhanden sind, wie beispielsweise die Zu- oder Abnahme der prozentualen Methylierung mit steigendem Schweregrad. Diese Analyse erfolgte für jede der untersuchten CpG-Sites.

Ein klares Methylierungsmuster zeigt sich nur vereinzelt. Bei der Analyse der CpG-Site Chr3.108838388 (MORC_CpG2) zeigt sich in der Kategorie „Emotionale Vernachlässigung“ ein kontinuierlicher Abfall der prozentualen Methylierung (SG1 [n=31]: 95,6453% [SD 0,88053], SG2 [n=10]: 95,6380% [SD 1,7199], SG3 [n=9]: 94,7034% [SD 1,28721], SG4 [n=11]: 94,5028% [SD 1,72418]). Bei der Analyse der CpG-Site Chr3.108838285 (MORC_CpG3) zeigt sich ein solcher kontinuierlicher Abfall der prozentualen Methylierung mit steigendem Schweregrad für die Kategorien „Sexueller Missbrauch“ (SG1 [n=48]: 98,9917% [SD 0,63964], SG2 [n=3]: 98,6550% [SD 1,12531], SG3 [n=8]: 98,5211% [SD 1,02430], SG4 [n=2]: 97,26% [SD 2,02233]) und „Emotionaler Missbrauch“ (SG1 [n=32]: 98,9540% [SD 0,82453], SG2 [n=7]: 98,7971% [SD 0,99671], SG3 [n=11]: 98,7226% [SD 0,55468], SG4 [n=11]: 98,7212% [SD

0,96186]). Bei der Analyse des gemittelten prozentualen Methylierungswertes aller analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert) zeigt sich in der Kategorie „Emotionale Vernachlässigung“ ein kontinuierlicher Abfall der prozentualen Methylierung (SG1 [n=31]: 96,6225% [SD 0,55374], SG2 [n=10]: 96,4845% [SD 0,83122], SG3 [n=9]: 96,3140% [SD 0,49936], SG4 [n=11]: 96,2614% [SD 0,68119]).

Bei der Analyse ohne Ausreißer können lediglich bei der Analyse der CpG-Site Chr3.108838285 (MORC_CpG3) und dem gemittelten prozentualen Methylierungswertes aller analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert) Muster im Sinne eines kontinuierlichen Abfalls der prozentualen Methylierung gezeigt werden. Für die CpG-Site Chr3.108838285 (MORC_CpG3) gilt dies für die Kategorie „Sexueller Missbrauch“ (SG1 [n=46]: 98,9917% [SD 0,65365], SG2 [n=3]: 98,655% [SD 1,12531], SG3 [n=8]: 98,5211% [SD 1,02430], SG4 [n=2]: 97,26% [SD 2,02233]) und für den gemittelten Methylierungswert gilt dies für die Kategorie „Emotionale Vernachlässigung“ (SG1 [n=29]: 96,6119% [SD 0,56829], SG2 [n=10]: 96,4845% [SD 0,8312197], SG3 [n=8]: 96,314028% [SD 0,49936], SG4 [n=11]: 96,261439% [SD 0,6811928])

Für diese vereinzelt Kategorien, die einen Abfall der prozentualen Methylierung mit steigendem Schweregrad aufwiesen, wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman-Rho durchgeführt, um mögliche signifikante lineare Korrelationen aufzudecken. Es zeigen sich jedoch lediglich signifikante Ergebnisse für die CpG-Site Chr3.108838388 (MORC_CpG2) und für den gemittelten prozentualen Methylierungswert aller analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert) in der Kategorie „Emotionale Vernachlässigung“ (MORC_CpG2: $r=-0,300$; $p=0,02$; MORC_Mittelwert: $r=-0,284$; $p=0,028$. Ohne Ausreißer: MORC_Mittelwert: $r=-0,267$; $p=0,047$) Die prozentuale Methylierung sinkt jeweils signifikant mit steigendem Schweregrad in der Kategorie „Emotionale Vernachlässigung“ (siehe Abbildung 11).

Vergleich der prozentualen Methylierung von MORC_Mittelwert zwischen den Schweregraden der Kategorie "Emotionale Vernachlässigung"

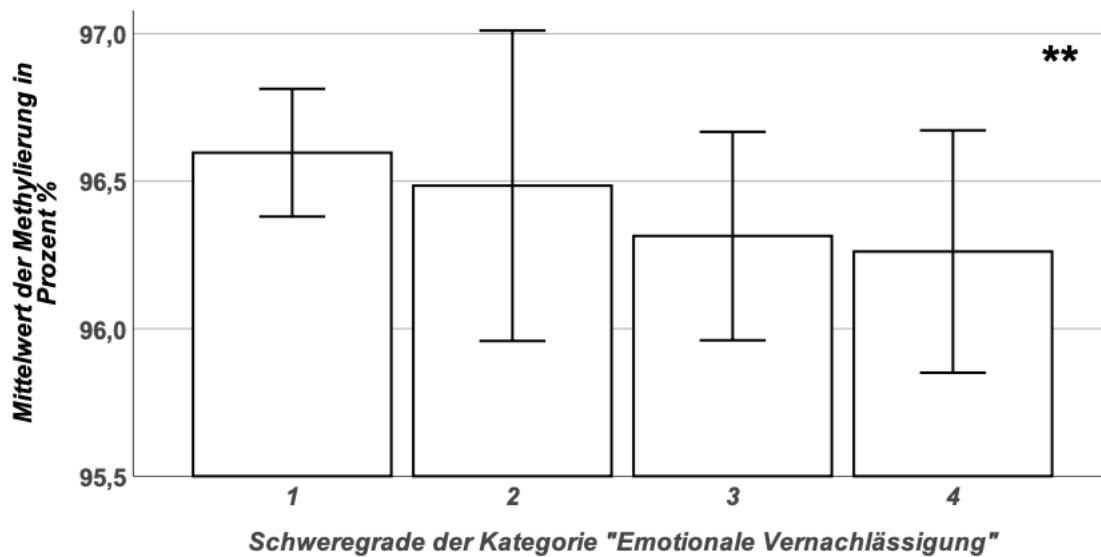


Abbildung 11: Vergleich der prozentualen Methylierung von MORC_Mittelwert zwischen den Schweregraden der Kategorie „Emotionale Vernachlässigung“

Mit steigendem Schweregrad (1 bis 4) sinkt die prozentuale mittlere Methylierung. MORC_Mittelwert beschreibt die gemittelte prozentuale Methylierung der drei analysierten CpG-Sites (Chr3.108838388, Chr3.108838285 und Chr3.108838104). Mittelwerte: SG1 (n=31): 96,6225%, SG2 (n=10): 96,4845%, SG3(n=9): 96,3140%, SG4 (n=11): 96,2614%. Fehlerbalken: +/- 2 SE. ** markiert einen p-Wert <0,05.

Die Einnahme von Benzodiazepinen und das Vorhandensein einer Depression (MDD) können Auswirkungen auf die Epigenetik haben. Um einen solchen potenziellen Einfluss auf die spezifische Methylierung der analysierten CpG-Sites zu betrachten wurde der Datensatz anschließend noch einmal unter Ausschluss von Probanden die Benzodiazepine einnehmen und gleichzeitig unter Ausschluss von Probanden die im BDI-II einen Score von >14 Punkten erreichten analysiert. Ein Score von >14 Punkten im BDI-II deutet auf das Vorhandensein depressiver Symptomatik innerhalb der letzten zwei Wochen hin (siehe Kapitel 2.3.2).

Probanden mit ELA weisen für die CpG-Sites Chr.3.108838388 (MORC_CpG2), Chr.3.108838285 (MORC_CpG3), sowie für den gemittelten Wert (MORC_Mittelwert) abermals eine geringere mittlere prozentuale Methylierung auf als die Kontrollprobanden. Der genannte Unterschied zeigt sich signifikant für die CpG-Site Chr3.108838388 (MORC_CPG2) (Mann-Whitney U: p=0,004; ELA=0: [n=34] 96,6769% [SD 0,5282735]; ELA=1: [n=19] 94,6495% [SD 1,22549]; Differenz: 0,9893%. Ohne Ausreißer: p=0,004; ELA=0: [n=31]

95,6216% [SD 1,01275]; ELA=1: [n=19] 94,6495% [SD 1,22549]; Differenz: 0,9721%) und für die gesamten mittleren Methylierung aller analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert) (Mann-Whitney U: $p=0,003$; ELA=0: [n=34] 95,6388% [SD 0,97621]; ELA=1: [n=19] 96,2282% [SD 0,67327]; Differenz: 0,4487%. Ohne Ausreißer: $p=0,001$; ELA=0: [n=34] 96,710539% [SD 0,58801]; ELA=1: [n=24] 96,15192% [SD 0,5599274]; Differenz: 0,55862%). Der genannte Unterschied ist jedoch nicht signifikant für die CpG-Site Chr.3.108838285 (MORC_CpG3) (Mann-Whitney U: $p=0,0110$; ELA=0: [n=34] 99,1108% [SD 0,59813]; ELA=1: [n=19] 98,7279% [SD 0,91500]; Differenz: 0,3829%. Ohne Ausreißer: $p=0,0110$; ELA=0: [n=33] 99,1175% [SD 0,60612]; ELA=1: [n=18] 98,7075% [SD 0,93707]; Differenz: 0,41%).

Auffällig ist, dass die CpG-Site Chr3.108838104 (MORC_CpG5), sowohl bei der Analyse vor Ausschluss der Ausreißer als auch unter Ausschluss der Ausreißer, bei Probanden mit ELA geringfügig höher methyliert ist als bei der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant (Mann-Whitney U: $p=0,656$; ELA=0: [n=34] 95,2810% [SD 0,89589]; ELA=1: [n=19] 95,3071% [SD 0,69496]; Differenz: -0,0261%. Ohne Ausreißer: $p=0,561$; ELA=0: [n=31] 95,3310% [SD 0,89234]; ELA=1: [n=18] 95,3153% [SD 0,71417; Differenz: -0,0157%).

3.3.1.2 Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire CECA.Q

Der CECA.Q erhebt ebenfalls Aspekte frühkindlicher Traumatisierung: Verlust eines oder beider Elternteile, Vernachlässigung, Antipathie und körperlichen Missbrauch, jeweils mütterlicher und väterlicherseits und sexuellen Missbrauch. Die Probanden wurden wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben anhand der abgefragten Aspekte in verschiedene Gruppen eingeteilt. Mittels Mann-Whitney-U Test wurde überprüft, ob sich die oben genannten Gruppen bezüglich der prozentualen Methylierung der analysierten CpG-Sites unterscheiden.

Bei Probanden, die ein oder beide Elternteile verloren, ist die mittlere prozentuale Methylierung aller analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert) signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U: $p=0,010$; Parentalloss=0 [n=42]: 96,5978% [SD 0,506803]; Parentalloss=1 [n=19]: 96,1996% [SD

0,680855]; Differenz: 0,3982%) (siehe Abbildung 12). Dies zeigt sich ebenfalls bei der Analyse ohne Ausreißer (Mann-Whitney-U: $p=0,034$; Parentalloss=0 [n=38v]: 96,609064% [SD 0,5720703]; Parentalloss=1 [n=19]: 96,24174% [SD 0,6809313]; Differenz: 0,3673%).

Vergleich der Mittelwerte von MORC_Mittelwert zwischen den Gruppen Parentalloss=0 und Parentalloss=1

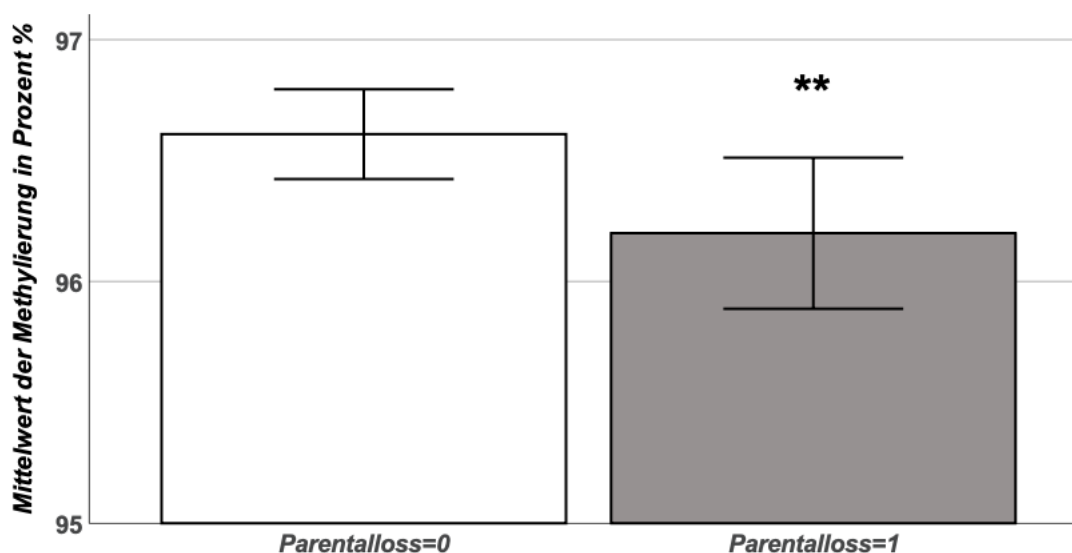


Abbildung 12: Vergleich der Mittelwerte der Methylierung von MORC_Mittelwert zwischen den Gruppen Parentalloss=0 und Parentalloss=1
 Parentalloss=0: n=42. Parentalloss=1: n=19. Mittelwerte: ELA=0: 3,31 Punkte; ELA=1: 7,80 Punkte. Fehlerbalken: +/- 2 SE. ** markiert einen p-Wert <0,05.

Bei Probanden, die starke Antipathie der Mutter erlebten ist die mittlere prozentuale Methylierung aller analysierten CpG-Sites (MORC_Mittelwert) ebenfalls signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U: $p=0,042$; Mutter_Antipathie=0 [n=49]: 96,5294% [SD 0,617714]; Mutter_Antipathie=1 [n=12]: 96,2295% [SD 0,437412]; Differenz: 0,2999%). Dies zeigt sich nicht bei der Analyse ohne Ausreißer (Mann-Whitney-U: $p=0,053$; Mutter_Antipathie=0 [n=46]: 96,54836% [SD 0,66375]; Mutter_Antipathie=1 [n=12]: 96,2295% [SD 0,437412]; Differenz: 0,3189%).

Bei Probanden, die sexuellen Missbrauch erlebten ist die prozentuale Methylierung der CpG-Site Chr3.108838285 (MORC_CpG3) signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U: $p=0,023$; Sexueller_Missbrauch=0 [n=46]: 99,057% [SD 0,599307]; Sexueller_Missbrauch=1 [n=13]: 98,301% [SD 1,124255]; Differenz: 0,7565%). Ebenso zeigt sich dies bei Probanden die

schweren sexuellen Missbrauch erlebten (Mann-Whitney-U: $p=0,011$; Schwere_Sexueller_Missbrauch=0 [n=50]: 99,044% [SD 0,602311]; Schwere_Sexueller_Missbrauch=1 [n=9]: 98,04% [SD 1,207886]; Differenz: 1,004%). Dies lässt sich auch bei der Analyse ohne Ausreißer reproduzieren (Mann-Whitney-U: Sexueller_Missbrauch: $p=0,017$; Sexueller_Missbrauch=0 [n=44]: 99,0612% [SD 0,69569]; Sexueller_Missbrauch=1 [n=12]: 98,2347% [SD 1,14750]; Differenz: 0,8265%. Schwere_Sexueller_Missbrauch: $p=0,002$; Schwere_Sexueller_Missbrauch=0 [n=48]: 99,0555% [SD 0,61198]; Schwere_Sexueller_Missbrauch=1 [n=8]: 97,8556% [SD 1,14794]; Differenz: 1,1999%).

Innerhalb der übrigen genannten Kategorien zeigen sich für keine der analysierten CpG-Sites signifikanten Unterschiede.

3.3.2 Lebensgewohnheiten: Alkoholkonsum und Benzodiazepine

Für die statistische Analyse der Auswirkung unterschiedlicher Lebensgewohnheiten auf die prozentuale Methylierung wurden die Probanden, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben in je zwei Gruppen eingeteilt.

Zwischen Probanden, die Alkohol trinken (Alkoholkonsum=1: n=49) und solchen die es nicht bzw. selten tun (Alkoholkonsum=0: n=12) zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der prozentualen Methylierung der untersuchten CpG-Sites (Mann-Whitney-U: MORC_CpG2: $p=0,091$. MORC_CpG3: $p=0,344$. MORC_CpG5: $p=0,626$. MORC_Mittelwert: $p=0,280$). Unter Ausschluss der Ausreißer ändert sich dieses Ergebnis nicht (Mann-Whitney-U: MORC_CpG2: $p=0,085$; Alkoholkonsum=0 [n=10]; Alkoholkonsum=1 [n=47]. MORC_CpG3: $p=0,364$; Alkoholkonsum=0 [n=11]; Alkoholkonsum=1 [n=47]. MORC_CpG5: $p=0,490$; Alkoholkonsum=0 [n=11]; Alkoholkonsum=1 [n=45]. MORC_Mittelwert: $p=0,326$; Alkoholkonsum=0 [n=11]; Alkoholkonsum=1 [n=47]).

Bei der Analyse der Einnahme von Benzodiazepinen fallen lediglich signifikante Unterschiede in Bezug auf die Methylierung der CpG-Site Chr3.108838285 (MORC_CpG3), sowohl bei der Analyse mit als auch ohne Ausreißer auf. Bei der Analyse wurde der Unterschied der prozentualen Methylierung der untersuchten

CpG-Sites zwischen Probanden die Benzodiazepine einnehmen und Probanden, die dies nicht tun untersucht (Mann-Whitney-U: MORC_CpG3: $p=0,014$; Benzodiazepine=1 [n=4]: 97,811%; Benzodiazepine=2 [n=57]: 98,929%; Differenz: 1,1176%. MORC_CpG2: $p=0,447$. MORC_CpG5: $p=0,447$. MORC_Mittelwert: $p=0,156$. Ohne Ausreißer: MORC_CpG3: $p=0,021$; Benzodiazepine=1 [n=4]: 97,8113%; Benzodiazepine=2 [n=54]: 98,9266%; Differenz: 1,1153%. MORC_CpG2: $p=0,423$; Benzodiazepine=1 [n=4]; Benzodiazepine=2 [n=53]. MORC_CpG5: $p=0,396$; Benzodiazepine=1 [n=4]; Benzodiazepine=2 [n=52]. MORC_Mittelwert: $p=0,179$; Benzodiazepine=1 [n=4]; Benzodiazepine=2 [n=54]).

3.3.3 Depressive Symptomatik

Es soll ein möglicher Zusammenhang zwischen vermehrter depressiver Symptomatik und der spezifischen Methylierung von MORC1 überprüft werden. Depressive Symptomatik wurde anhand des BDI-II erhoben. Für den BDI-II existieren Richtwerte, die helfen die Schwere depressiver Symptomatik innerhalb der letzten zwei Wochen einzuordnen (siehe Kapitel 2.3.2). Um die Auswirkungen depressiver Symptome auf die DNA-Methylierung zu analysieren, wurden die Probanden dementsprechend noch einmal in zwei Gruppen eingeteilt: Probanden mit einem Score ≤ 13 Punkten und Probanden mit einem Score ≥ 14 Punkten. Vergleicht man die prozentuale Methylierung der CpG-Sites zwischen den oben genannten Gruppen (BDI ≥ 14 Punkte und BDI ≤ 13 Punkte) zeigt sich ein signifikanter Unterschied für die CpG-Site Chr3.108838285 (MORC_CpG3) (Mann-Whitney-U: $p=0,006$; BDI ≤ 13 [n=55]: 98,9426% [SD 0,75911]; BDI ≥ 14 [n=5]: 97,885% [SD 0,93829]; Differenz: 1,0576%). Probanden mit depressiver Symptomatik (BDI ≥ 14) weisen für die CpG-Site Chr3.108838285 (MORC_CpG3) eine geringere prozentuale Methylierung auf. Dies lässt sich auch bei der Analyse ohne Ausreißer für die CpG-Site Chr3.108838285 (MORC_CpG3) reproduzieren (Mann-Whitney-U: $p=0,008$; BDI ≤ 13 [n=53]: 98,9407% [SD 0,77325]; BDI ≥ 14 [n=5]: 97,885% [SD 0,93829]; Differenz: 1,0557%).

Für die anderen analysierten CpG-Sites kann, sowohl bei den Analysen mit als auch ohne Ausreißer kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U: MORC_CpG2: $p=0,585$; BDI \leq 13 [n=55]: 95,2844% [SD 1,15582]; BDI \geq 14 [n=5]: 95,5805% [SD 2,88698]; Differenz: -0,2961%. MORC_CpG5: $p=0,756$; BDI \leq 13 [n=55]: 95,2821% [SD 0,81853]; BDI \geq 14 [n=5]: 95,6530% [SD 1,43428]; Differenz: -0,3709%. MORC_Mittelwert: $p=0,498$; BDI \leq 13 [n=55]: 96,5030% [SD 0,5589038]; BDI \geq 14 [n=5]: 96,3728% [SD 1,2473379]; Differenz: 0,130177%. Ohne Ausreißer: MORC_CpG2: $p=0,555$; BDI \leq 13 [n=52]: 95,2536% [SD 1,17702]; BDI \geq 14 [n=5]: 95,5805% [SD 2,88698]; Differenz: -0,3269%. MORC_CpG5: $p=0,677$; BDI \leq 13 [n=51]: 95,3149% [SD 0,81958]; BDI \geq 14 [n=5]: 95,6530% [SD 1,43428]; Differenz: -0,3381%. MORC_Mittelwert: $p=0,535$; BDI \leq 13 [n=53]: 96,49274% [SD 0,56515]; BDI \geq 14 [n=5]: 96,3728% [SD 1,24734]; Differenz: -0,1199%;). Probanden mit depressiver Symptomatik weisen bei der Analyse der CpG-Sites Chr3.108838388 (MORC_CpG2) und Chr3.108838104 (MORC_CpG5) sogar eine geringfügig höhere prozentuale Methylierung auf.

Erfolgt eine Gruppeneinteilung anhand der möglichen Schweregrade des BDI-II zeigt sich eine signifikante negative lineare Korrelation zwischen der prozentualen Methylierung der CpG-Site Chr3.108838285 (MORC_CpG3) und den unterschiedlichen Schweregraden des BDI (Spearman-Rho: $r= -,343$; $p=0,007$; Schweregrad 0 [n=55]: 98,9426%; Schweregrad 1: [n=2]: 98,6375%; Schweregrad 2 [n=2]: 98,355%; Schweregrad 3: [n=2]: 96,8975%). Auch in der grafischen Darstellung mittels Balkendiagramm ist ein Abwärtstrend mit steigendem Schweregrad zu beobachten (siehe Abbildung 13). Dies gilt allerdings nicht für die anderen analysierten CpG-Sites oder den gemittelten prozentualen Methylierungswert. Hier lässt sich weder ein linearer Abwärtstrend mit steigendem Schweregrad im BDI-II erkennen, noch ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Schweregraden und Methylierungswerten messbar (Spearman-Rho: MORC_CpG2: $p=0,514$. MORC_CpG5: $p=0,797$. MORC_Mittelwert: $p=0,521$). Bei der Analyse der Daten ohne Ausreißer zeigt sich ebenfalls lediglich bei der Analyse der CpG-Site Chr3.108838285

(MORC_CpG3) eine signifikante negative lineare Korrelation zwischen der prozentualen Methylierung und den unterschiedlichen Schweregraden des BDI (Spearman-Rho: MORC_CpG3: $r = -,344$; $p = 0,008$; Schweregrad 0 [n=53]: 98,9407%; Schweregrad 1: [n=2]: 98,6375%; Schweregrad 2 [n=1]: 98,355%; Schweregrad 3: [n=2]: 96,8975%. MORC_CpG2: $p = 0,468$. MORC_CpG5: $p = 0,740$. MORC_Mittelwert: $p = 0,560$).

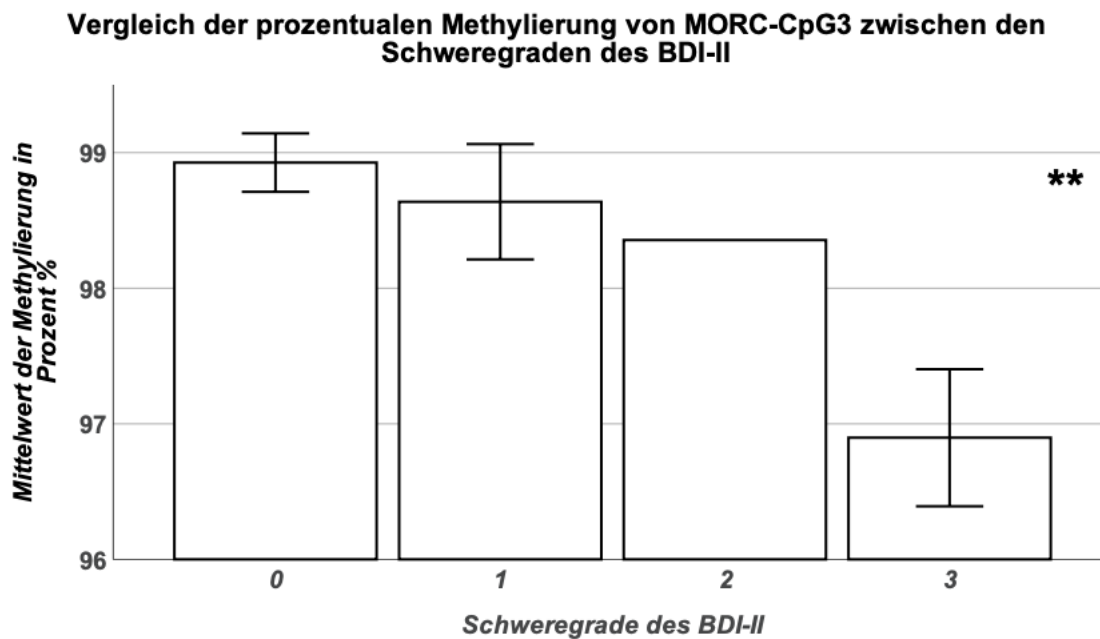


Abbildung 13: Vergleich der prozentualen Methylierungswerte der CpG-Site MORC_CpG3 zwischen den einzelnen Schweregraden des BDI-II
MORC_CpG3 ist CpG-Site Chr3.108838285. Mittelwerte: SG0 (n=55): 98,9426%; SG1 (n=2): 98,6375%; SG2 (n=1): 98,3350; SG3 (n=2): 98,8975%. Fehlerbalken: +/- 2 SE. SG=2 ergibt sich aus n=1, deshalb ergibt die Fehlerbalkenberechnung für SG=2 ein unendliches Ergebnis. Dieser Fehlerbalken wurde aus dem Diagramm entfernt. ** markiert einen p-Wert <0,05.

4 Diskussion

Fundament der vorliegenden Studie sind die Ergebnisse der genomweiten Methylierungsanalyse von Nieratschker et al.: Dort konnte das Gen MORC1 als erstes Gen identifiziert werden, das zusammenhängend mit dem Erleben frühkindlicher Traumata sowohl in Progenitorblutzellen bei der Geburt als auch im adulten tierischen Gehirn eine reduzierte prozentuale Methylierung aufweist. Zusätzlich zeigte eine tiefergehende Analyse mit Daten aus einer vorangehenden GWAS-MDD Studie eine signifikante Assoziation von MORC1 mit einer MDD (62).

Primäre Intention dieser Studie war es nun, diese Ergebnisse an erwachsenen menschlichen Probanden zu reproduzieren. Es sollten Methylierungsunterschiede zwischen Probanden mit ELA und der Kontrollgruppe ohne ELA detektiert werden, um so die Frage zu beantworten, ob das Gen MORC1 auch beim erwachsenen Menschen im Zusammenhang mit ELA unterschiedlich methyliert ist. Außerdem sollte eine mögliche Assoziation zwischen vermehrter depressiver Symptomatik und spezifischer Methylierung überprüft werden, um aufzuklären wie sich die epigenetischen Veränderungen auch bereits in einer gesunden Kohorte manifestieren. Nicht zuletzt sollten in der vorliegenden Studie mögliche Effekte frühkindlicher Traumatisierung auf die psychische Gesundheit belegt werden. Diesbezüglich erfolgte ein Vergleich zwischen Probanden mit ELA und der Kontrollgruppe hinsichtlich dem Empfinden von Angst, depressiven Symptomen, Stress und der Wahrnehmung alltäglicher psychischer Belastungen.

4.1 BaDo- Unterschiede der Lebensgewohnheiten

In der BaDo zeigten sich für die Faktoren Geschlecht, Rauchverhalten und dem Konsum illegaler Drogen keine signifikanten Unterschiede zwischen Probanden mit ELA und der Kontrollgruppe ohne ELA.

Auch in Bezug auf das Alter zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Allerdings befindet sich der Großteil (78,7%) der Studienteilnehmer in einem Alter zwischen 18 und 30 Lebensjahren. Dies ist vor allem in der Methodik der Probandenrekrutierung begründet. Mögliche Probanden wurden mittels öffentlichen Aufrufes via E-Mailverteiler der Eberhard-Karls-Universität Tübingen rekrutiert. Dadurch erreichte der Aufruf hauptsächlich junge Studierende und Mitarbeiter/innen der Universität. Außerdem ist der Altersdurchschnitt der Gruppe mit ELA höher und es zeigte sich eine größere Varianz der Altersverteilung innerhalb dieser Gruppe. Vermutlich ist dieses Phänomen darin begründet, dass Probanden mit ELA auch im höheren Alter vermehrtes persönliches Interesse daran haben, einen Beitrag zur Forschung bezüglich ELA zu leisten.

Außerdem auffällig war, dass die Gruppe der Probanden mit ELA signifikant weniger Alkohol konsumiert als die Kontrollgruppe. Dies suggeriert, dass ELA womöglich ein protektiver Faktor in Bezug auf den späteren Alkoholkonsum ist. Diese Vermutung kann in der Literatur nicht eindeutig belegt oder widerlegt werden. Viele vorrangegangene epidemiologische Studien und Studien Alkoholabhängiger in Behandlung berichten über eine starke Assoziation zwischen dem Erleben von ELA und dem späteren Missbrauch von Alkohol (138). Andererseits zeigen Konkoly Thege et. al in einem Literaturreview, dass bei 3054 eingeschlossenen Studien nur bei 35.1% positive Assoziationen zwischen dem Auftreten einer Suchterkrankung und dem Erleben interpersoneller Traumata bestehen, 1,3% kommen zu einem negativen Ergebnis und der Großteil 63,6% zeigt keine Signifikanz. Allerdings finden Studien, die frühkindliche Traumata untersuchen häufiger eine positive Assoziation (39,7% versus 29,7%) (139).

Eine weitere Auffälligkeit ist, dass Probanden mit frühkindlicher Traumatisierung signifikant häufiger die Einnahme von Benzodiazepinen bejahen. Allerdings handelt es sich um nur insgesamt vier Probanden, die Benzodiazepine einnehmen. Trotz der schwachen Aussagekraft solch geringer Fallzahlen deckt sich diese Feststellung mit vorangegangenen Studien, die sowohl bei Tier und Mensch klar eine Wechselbeziehung zwischen der Neigung zur Drogenabhängigkeit und dem Erleben von ELA belegen (140, 141).

4.2 Psychometrische Skalen

Alle Psychometrischen Skalen weisen eine Divergenz zwischen frühkindlich traumatisierten Probanden und der Kontrollgruppe ohne ELA auf. Die Unterschiede sind wie erwartet.

4.2.1 Beck's Depression Inventory II (BDI-II) und Beck's Anxiety Index (BAI)

Sowohl beim BDI-II als auch dem BAI, zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Probanden mit ELA und Probanden ohne ELA. Obwohl keine der beiden Gruppen im Schnitt eine Punktzahl erreicht, die darauf hindeuten würde, dass die Probanden an einer Angst- oder affektiven Störung leiden, erreicht die Gruppe mit ELA signifikant höhere Summenwerte. Probanden mit einem höheren Summenwert im CTQ erreichen signifikant höhere Summenwerte im BDI-II und im BAI. Diese Erkenntnisse decken sich mit der Literatur. ELA bedingen ein erhöhtes Risiko an einer Angst- oder affektiven Störung zu erkranken (siehe Kapitel 1.1). Ein hoher Score im BDI-II oder im BAI deutet auf eine vermehrte Belastung mit Symptomen einer solchen Störung hin. Allerdings gilt es dabei zu beachten, dass beide Fragebögen nur eine Momentaufnahme des psychischen Befindens darstellen. Sie wurden entwickelt um, die Schwere einer Angststörung bzw. MDD zu ermitteln (122, 123, 125, 126) und erfüllen keinesfalls die nach ICD-10 notwendigen Kriterien der Diagnosestellung (116).

Aufgrund der hohen Relevanz für die vorliegende Studie werden Auffälligkeiten im Rahmen unterschiedlicher Methylierungsmuster in Bezug auf den BDI-II in einem gesonderten Kapitel diskutiert (siehe Kapitel 4.3.3). Für den BAI zeigten sich keine Auffälligkeiten bezüglich der prozentualen Methylierung.

4.2.2 Stressreaktivitätsskala (SRS)

Die Stressanfälligkeit, gemessen mit der Stressreaktivitätsskala SRS ist für die Gruppe mit ELA signifikant höher und korreliert positiv linear mit dem Summenwert des CTQ: Diese Erkenntnisse fügen sich gut in die aus der Literatur bekannten Hypothesen ein. Frühkindliche Traumata schädigen die körperlichen Mechanismen der Stressantwort. Die HPA-Achse (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal-Achse) reagiert überempfindlich mit erhöhter Reaktivität und Aktivität. Daraus folgt später ein erhöhtes Risiko an einer mitunter durch Stress induzierten Depression zu erkranken (35, 66, 142). Es konnten keine veränderten Methylierungsmuster im Zusammenhang mit höheren Summenwerten im SRS beobachtet werden.

4.2.3 Symptom-Checklist-90-Revised (SCL-90-R)

Probanden mit frühkindlich erlebten Traumata zeigen eine signifikant höhere grundsätzliche psychische Belastung gemessen am GSI der SCL-90-R. Probanden mit ELA weisen signifikant höhere standardisierte T-Werte und Rohwerte des GSI auf, jedoch erreicht keine der Gruppen einen durchschnittlichen T-Wert größer als 60. Bei einem T-Wert > 60 ist von einer starken psychischen Belastung auszugehen (129, 130). Bisher gibt es keine vorangehenden Studien die speziell den GSI in Verbindung mit dem Erleben von ELA verwenden. Trotzdem ist bekannt, dass ELA mit einer höheren psychischen Belastung und damit auch Vulnerabilität für zahlreiche psychische Krankheiten assoziiert ist (13, 19, 21). Das Ergebnis deckt sich also mit den Erwartungen und auch mit bekanntem Wissen.

4.2.4 Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q)

Mittels des CECA.Q wurden weitere Aspekte frühkindlicher Traumatisierung abgefragt. Auch diese Faktoren von ELA wurden bezüglich möglicher Unterschiede in der Beantwortung der anderen erhobenen psychometrischen Skalen verglichen, um die Auswirkungen dieser Traumata auf das Empfinden von Angst (BAI), Depressiven Symptomen (BDI-II), Stress (SRS) und auf die Wahrnehmung alltäglicher psychischer Belastung (SCL-90-R) zu untersuchen.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Probanden die körperlich durch die Mutter misshandelt wurden und der Kontrollgruppe bei der Beantwortung des BDI-II, der SRS und des GSI-Rohwertes der SCL-90-R. Interessant ist, dass Probanden die körperlich durch den Vater misshandelt wurden lediglich im BDI-II einen signifikant höheren Summenwert erreichen, obwohl sich die Fallzahlen (Vater: n=2; Mutter: n=3) kaum unterscheiden. Probanden, die starke Antipathie der Mutter erlebten erreichten signifikant höhere GSI-Rohwerte. Ebenfalls interessant ist, dass sich in Bezug auf starke Antipathie des Vaters keine signifikanten Unterschiede in der Beantwortung der anderen Fragebögen zeigten. Dieses Ergebnis suggeriert, dass Missbrauch und Ablehnung von Seiten der Mutter einen stärkeren Effekt auf die psychische Verfassung haben könnte. Dies ist allerdings in der Literatur weder belegt noch widerlegt, somit ist hier weiterführende Forschung mit höheren Fallzahlen notwendig, um diese Hypothese zu überprüfen.

Probanden, die sexuellen Missbrauch erlebten zeigten signifikant höhere Summenwerte bei der Beantwortung des BAI, des BDI-II, der SRS und einen höheren GSI T-Wert und höhere GSI-Rohwerte. Ähnlich verhält es sich bei schwerem sexuellem Missbrauch, ausgenommen von der Beantwortung der SRS: Hier zeigt sich keine Signifikanz. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur: Sexueller Missbrauch hat u.a. den beträchtlichsten Effekt auf das spätere Auftreten psychischer Erkrankungen (24, 25) und auf die Stresssensitivität gegenüber depressiogenen Faktoren (32). Insbesondere eine MDD beginnt früher und persistiert bis zu lebenslang (29).

Probanden, die ein Elternteil verloren haben, unterscheiden sich wieder erwarten nicht signifikant in der Beantwortung der anderen psychometrischen Skalen. Der Verlust eines Elternteils scheint in der vorliegenden Studie somit keine Auswirkung auf die jetzige psychische Verfassung zu haben. Eine Erklärung könnte die Art der Datenauswertung sein. Es erfolgte keine Trennung der verschiedenen Verlustgründe, Zeitpunkte oder Zeiträume, da diese nur vage mit dem CECA.Q erfasst werden. Jedoch spielt der Hintergrund des Verlustes eines Elternteils beim Risiko im Erwachsenenalter an z.B. einer MDD zu erkranken eine entscheidende Rolle: dauerhafte Trennung und Verlust vor dem 9. Lebensjahr fällt stärker ins Gewicht als der Tod eines Elternteils oder Verlust in der Jugend (17). Vermutlich kann der Verlust eines Elternteils bei vielen Probanden des vorliegenden Kollektivs durch das andere Elternteil oder Ersatzelternteile kompensiert werden. Auch gibt nur einer der Probanden an dauerhaft von einem noch lebenden Elternteil getrennt gewesen zu sein. Bei den restlichen Probanden verstarb entweder ein Elternteil oder die Trennung erfolgte lediglich zeitweise aufgrund von zumeist Scheidung. Wie beschrieben stellen Tod oder zeitweise Trennung weniger ausschlaggebende Faktoren in Bezug auf die Vulnerabilität später an psychischen Störungen zu erkranken dar.

4.3 Epigenetik: Die prozentuale Methylierung der CpG-Sites Chr3.108838388, Chr3.108838285 und Chr3.108838104

In den folgenden Kapiteln wird zuerst auf die allgemeinen Unterschiede der prozentualen Methylierung der drei analysierten CpG-Sites in Abhängigkeit der Ergebnisse des CTQ eingegangen, dann werden die verschiedenen Kategorien des CTQ einzeln betrachtet und anschließend wird auf die Unterschiede der prozentualen Methylierung bei Probanden mit depressiver Symptomatik eingegangen.

4.3.1 Der Einfluss von Early Life Adversities

Probanden mit frühkindlichen Traumata weisen für alle analysierten CpG-Sites (Chr3.108838388, Chr3.108838285 und Chr3.108838104) eine geringere mittlere prozentuale Methylierung auf als die Kontrollprobanden. Allerdings ist dieser Unterschied nur für die CpG-Site Chr3.108838388 und Chr3.108838285, sowie für die gemittelte prozentuale Methylierung aller analysierten CpG-Sites signifikant.

Drogenabhängigkeit (36-38) oder das Vorhandensein einer MDD bzw. depressiver Symptomatik können epigenetische Modifikationen stimulieren (143). Deshalb wurden die Analysen noch einmal nach Ausschluss von Probanden, die Benzodiazepine einnehmen und die depressive Symptomatik (Score im BDI-II von >14 Punkten) zeigen wiederholt, um mögliche kumulative oder interferierende Effekte auszuschließen. Die prozentuale Methylierung der CpG-Site Chr3.108838285 unterscheidet sich nach Exklusion des oben genannten nicht mehr signifikant zwischen Probanden mit ELA und der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können teilweise an die Studie von Nieratschker et al. (62) anknüpfen und lassen die Vermutung zu, dass die Hypomethylierung des Gens MORC1 im Zusammenhang mit ELA auf erwachsene Menschen übertragbar sind, die epigenetischen Veränderungen bis

ins Erwachsenenalter persistieren und mittels peripherer Vollblutproben reproduzierbar sind. Damit könnte sich die CpG-Site Chr3.108838388 oder der mittlere Methylierungswert der drei analysierten CpG-Sites als peripherer, dauerhafter Indikator für das Erleben von ELA eignen. Auf der Basis eines peripheren Proxymarkers können beispielsweise klinische Screenings oder Tests zur Früherkennung entwickelt werden und so Hochrisikopatienten identifiziert oder präventive Maßnahmen ermöglicht werden, die das Auftreten ELA assoziierter Erkrankungen verhindern.

Allerdings sind diese Ergebnisse nicht ohne Einschränkungen zu betrachten. Thomas et al. analysierten bis zu 56 weitere CpG-Sites des Gens MORC1 unter Einschluss einer weit höheren Anzahl von Probanden und konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Erleben von ELA und spezifischen DNA-Methylierungen des Gens MORC1 zeigen. Es handelt sich um eine Studie multipler Kohorten, die zum Teil die Daten der Probanden der vorliegenden Studie in der Tuebingen Cohort (n=151) miteinschließt. Außerdem wurden die Daten anderer Kohorten (Grady Trauma Project Cohort [n=310], PReDICT Cohort [n=299]) in der Studie analysiert. Zur Erfassung frühkindlicher Traumata wird ebenfalls der CTQ verwendet und es wurden zur Analyse der Methylierungsunterschiede ebenfalls Methoden gewählt die einzelne CpG-Sites hochauflösen können (Bisulfit Konvertierung, Pyrosequenzierung und 450k Illumina Bead Chip Analyse) (144-146).

Eine Erklärung der verschiedenen Ergebnisse könnte die Stichprobengröße sein. Die vorliegende Stichprobe beinhaltet lediglich n=61 Probanden und es wurden insgesamt nur drei CpG-Sites des Gens MORC1 analysiert. Natürlich ist es möglich, dass die statistische Aussagekraft der Analysen aufgrund zu kleiner Stichproben und zu wenig analysierter CpG-Sites leidet.

Zur vorangehenden Studie von Nieratschker et al. gibt es neben der deutlich kleineren Stichprobe zahlreiche methodische Unterschiede. Diese können ebenfalls mögliche Einschränkungen in der Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse erklären. In der vorliegenden Studie wurde eine andere Methodik verwendet als in der vorherigen Studie. Methylierungsunterschiede wurden mittels Bisulfit-Konvertierung sichtbar gemacht und anschließend mittels

Pyrosequenzierung analysiert. Nieratschker et al. verwendeten methylierte DNA-Immunopräzipitation (MeDIP). Die Methoden ermitteln die prozentuale Methylierung auf unterschiedliche Weise. Bei der Bisulfitkonvertierung werden sowohl Signale von methyliertem als auch hydroxymethyliertem 5-Methylcytosin (5-hmC) empfangen. Im Gegensatz dazu detektiert die MeDIP-Immunopräzipitation lediglich Signale von methyliertem 5-Methylcytosin (147-149). Das Enzym TET1 katalysiert die Oxidation von 5-mC zu 5-hmC. Bis heute ist die Rolle von 5-hmC umstritten. 5-hmC ist unter den Cytosinen unterrepräsentiert (ca. 10% der 5-mC und ca. 0,4% aller Cytosine), aufgrund dessen könnte es lediglich ein Zwischenprodukt bei der Demethylierung von DNA, also bei der Beseitigung von 5-mC sein. Entgegengesetzt zu dieser Annahme könnte 5-hmC eine neuartige autonome epigenetische Modifikation sein, die selbstständig Chromatin- oder Transkriptionsmodifikatoren anzieht und so eine eigenständige Rolle in der Epigenetik spielt (150). Mögliche Unterschiede zwischen beiden Studien könnten somit in hydroxymethyliertem 5-Methylcytosin liegen.

Ferner erlebten die Probanden in der vorliegenden Studie andere frühkindliche Traumata (postnataler Missbrauch und Vernachlässigung), es wurde ein anderer Zeitpunkt der Analyse ausgewählt (mehrere Jahre nach dem Erleben von ELA) und anderes Gewebe (periphere Vollblutproben) analysiert. Nieratschker et al. untersuchten hauptsächlich die Effekte von pränatalem Stress und Stress kurze Zeit nach der Geburt, wie mütterliche Trennung. Möglicherweise findet sich auch hier eine Fehlerquelle. Die vorliegende Studie erhebt frühkindliche Traumata mittels eines retrospektiven Fragebogens, dem CTQ: Abgefragt werden nur postnatale Stressfaktoren, die dem Probanden ausdrücklich Erinnerung sind. Dies könnte dazu führen, dass traumatisierte Probanden übersehen werden. Zum einen durch die allgemein bekannte Tendenz, dass die retrospektive Beurteilung von ELA dazu neigt die Schwere des Traumas zu unterschätzen (151). Zum anderen da pränataler Stress oder frühkindlicher Stress, bevor das Erinnerungsvermögen einsetzt durch retrospektive Fragebögen schwierig, bis gar nicht abgefragt werden können. Somit werden diese Formen von ELA in der vorliegenden Studie kaum bis nicht erfasst. Außerdem ist bis dato unklar, ob

pränatale und postnatale ELA miteinander vergleichbar sind. Die vom CTQ ermittelten Stressoren rufen evtl. nicht die vermuteten epigenetischen Modifikationen hervor. Zwischen dem Erleben des Traumas und der Analyse der Probe vergingen in der vorliegenden Studie mehrere Jahre. Es lässt sich nicht ausschließen, dass andere nicht erhobene, sowie hier nicht kontrollierbare Umweltfaktoren, wie Lebensumstände, physische Krankheiten oder Ernährung die zuvor entstandenen epigenetischen Modifikationen veränderten.

Zuletzt bestehen periphere Vollblutproben hauptsächlich aus Erythrozyten und anderen kurzlebigen Zelltypen wie Monozyten und Granulozyten, die die gesuchten epigenetischen Veränderungen womöglich nicht tragen. Gegensätzlich dazu sind weiße Blutzellen (T-Zellen) langlebig und stammen von Progenitorblutzellen ab, die bereits bei der Geburt existieren und deshalb mit einer höheren Wahrscheinlichkeit epigenetische Veränderungen aufgrund von pränatalem Stress aufweisen (152). Auch konnte zuvor gezeigt werden, dass DNA-Methylierungen gewebespezifisch sind (111). Es bleibt also offen ob periphere Blutzellen die spezifische Methylierung der davor analysierten Gewebe (T-Zellen, präfrontaler Kortex, Zellen aus Nabelschnurblut) widerspiegeln.

Es erfolgte ebenfalls eine Analyse der prozentualen Methylierungswerte innerhalb der einzelnen Kategorien des CTQ. Von besonderem Interesse war dabei die lineare Zu- oder Abnahme der prozentualen Methylierung mit steigendem Schweregrad der Traumatisierung. Es zeigten sich allerdings nur vereinzelt signifikante Ergebnisse. Für die CpG-Site Chr3.108838388 und den Mittelwert aller analysierten CpG-Sites zeigte sich ein signifikanter linearer Abfall der prozentualen Methylierung mit steigendem Schweregrad in der Kategorie „Emotionale Vernachlässigung“. Dies wurde in vorherigen Studien weder belegt noch widerlegt und stellt damit einen Ansatzpunkt weiterer Forschung dar. Auch hier muss abermals auf die geringen Fallzahlen und die Notwendigkeit der Bestätigung mit größeren Probandenkollektiven hingewiesen werden.

Innerhalb der Kategorie „Sexueller Missbrauch“ zeigt sich ebenfalls ein kontinuierlicher Abfall der prozentualen Methylierung mit steigendem Schweregrad für die CpG-Site Chr3.108838285. Dieser Trend ist jedoch nicht

signifikant, aber trotzdem erwähnenswert, da sexueller Missbrauch in der Literatur unter den ELA als stärkster und von anderen Einflüssen unabhängiger Risikofaktor für das spätere Auftreten einer MDD, Suizidalität oder einer posttraumatischen Belastungsstörung identifiziert werden konnte (26, 153).

Bei der Auswertung des CECA.Q zeigt sich die CpG-Site Chr3.108838285 signifikant hypomethyliert bei Probanden die sexuellen oder schweren sexuellen Missbrauch erlebten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Beobachtung deckt sich mit der zuvor beschriebenen Literatur. Eine geringere prozentuale Methylierung nach dem Erleben von sexuellem Missbrauch und sogar ein kontinuierlicher Abfall je nach Schwere des Missbrauchs könnte ein zugrunde liegender Mechanismus für die große Signifikanz dieses Risikofaktors sein oder wie o.g. könnte die geringere Methylierung als peripherer Proxymarker dienen. Tiefergehende Forschung ist also notwendig, um zu beweisen, dass die Folgen sexuellen Missbrauchs durch epigenetische Veränderungen vermittelt werden.

Bei der Auswertung des CECA.Q zeigt sich außerdem, dass der Verlust eines oder beider Elternteile einen Einfluss auf die Methylierungswerte des Gens MORC1 zu haben scheint: Die mittlere prozentuale Methylierung aller analysierten CpG-Sites ist bei Probanden, die ein oder beide Elternteile verloren, signifikant geringer ist als bei der Kontrollgruppe. Dies könnte abermals wie o.g. daraufhin deuten, dass die unterschiedliche prozentuale Methylierung des Gens MORC1 ein Marker für das Erleben von ELA, in diesem Fall der Verlust eines Elternteils sein könnte.

Interessant ist, dass die mittlere prozentuale Methylierung aller analysierten CpG-Sites auch bei Probanden die starke Antipathie der Mutter (n=12) erlebten signifikant geringer ist als bei der Kontrollgruppe. Dies lässt sich jedoch nicht für das Erleben von Antipathie des Vaters nachweisen. Dieses Ergebnis suggeriert, dass Ablehnung von Seiten der Mutter einen stärkeren Effekt auf die Epigenetik und damit womöglich auch auf das Auftreten von späteren psychischen Erkrankungen hat. Dafür gibt es in der Literatur bisher keinen Nachweis, somit ist auch hier weiterführende Forschung mit höheren Fallzahlen notwendig, um diese Hypothese zu überprüfen. Allerdings könnte dieser Unterschied zwischen Vater und Mutter auch durch die unterschiedlichen Fallzahlen bedingt sein: Bei

n=3 Probanden, die starke Antipathie des Vaters erlebten, erreicht der Test womöglich keine ausreichende statistische Aussagekraft. N=12 Probanden erlebten starke Antipathie der Mutter. Auch lässt sich die Signifikanz nach Ausschluss der Ausreißer nicht mehr nachweisen.

4.3.2 Der Einfluss unterschiedlicher Lebensgewohnheiten: Alkoholkonsum und Benzodiazepine

Im vorliegenden Datensatz zeigt sich, dass die Einnahme von Benzodiazepinen mit einer geringeren prozentualen Methylierung der CpG-Site Chr3.108838285 korreliert. Da Drogenabusus ein nachgewiesener Stimulus epigenetischer Veränderungen (88) ist, könnte auch die Einnahme eines Benzodiazepins die geringere Methylierung bedingen. Allerdings fragt die BaDo lediglich mit einer Ja- oder Nein-Frage, ob der Proband jemals Schlaf- oder Beruhigungsmittel (Benzodiazepine) eingenommen hat. Deshalb stellt neben den geringen Fallzahlen, auch die unpräzise Fragestellung eine Einschränkung dar. Es bleibt also offen, ob das unterschiedliche Methylierungsmuster tatsächlich auf die Einnahme eines Benzodiazepins zurückzuführen ist. Um eine genaue Beantwortung der Frage zu erzielen, müssten die Umstände der Einnahme, beispielsweise bezüglich Frequenz, Dosierung, Dauer oder tatsächlicher Abhängigkeit genauer abgefragt werden, sowie die Anzahl der Probanden erhöht werden.

4.3.3 Der Einfluss von depressiver Symptomatik

Die CpG-Site Chr3.108838285 ist bei Probanden mit einem Summenwert von ≥ 14 Punkten im BDI-II signifikant geringer methyliert als bei Probanden mit einem Summenwert von ≤ 13 Punkten. Außerdem zeigt sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der prozentualen Methylierung dieser CpG-Site und steigendem Schweregrad depressiver Symptomatik im BDI-II.

Es lässt sich also schlussfolgern, dass die prozentuale Methylierung der CpG-Site Chr3.108838285 umso geringer ist, je mehr depressive Symptome vorhanden sind. Dies suggeriert einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten depressiver Symptomatik und der spezifischen Methylierung des Gens MORC1.

Auch Nieratschker et al. (2014) konnten eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten einer MDD und der spezifischen Methylierung des Gens MORC1 zeigen (62). Allerdings deckt sich das vorliegende Ergebnis bezüglich des Methylierungsmusters nicht immer mit vorangegangenen Studien. Zuvor konnte mehrfach eine höhere prozentuale Methylierung in Verbindung mit vermehrter depressiver Symptomatik gezeigt werden (62, 63, 111, 144). So konnten beispielsweise Mundorf et al. eine Hypermethylierung des Gens MORC1 in Zellen menschlicher Wangenschleimhaut in Assoziation mit vermehrter depressiver Symptomatik nachweisen (111). Da vermehrte prozentuale Methylierung in Promotorregionen generell mit verminderter Gen-Transkription und somit auch Expression des entsprechenden Proteins assoziiert (82) ist, deckt sich die Annahme dass die Hypermethylierung von MORC1 mit vermehrten depressiven Symptomen zusammenhängt auch mit dem Ergebnis von Schmidt et al., dass MORC1-Knockout Mäuse einen depressionsähnlichen Phänotyp zeigen (63).

Thomas et al., schlossen wie zuvor beschrieben die Daten der vorliegenden Probanden (Tuebingen Cohort) in ihre Analyse mit ein. Signifikante Assoziationen der mittleren DNA-Methylierung mit depressiver Symptomatik zeigten sich für die Grady und die PRoDICT Kohorte. Für die PRoDICT Kohorte zeigte sich eine geringere mittlere DNA-Methylierung bei Probanden mit einem höheren Score im BDI-I wohingegen sich für die Grady Kohorte im Mittel eine Hypermethylierung mit stärkerer depressiver Symptomatik zeigte. In der Tuebingen Kohorte zeigte sich im Mittel keine signifikante Assoziation, allerdings zeichnete sich ein positiver Trend im Sinne von steigender Methylierung mit steigender depressiver Symptomatik ab. Außerdem konnten in der Tuebingen und der Grady Kohorte einzelne CpG-Sites identifiziert werden, die mit dem Depressions-Score assoziiert waren (144). Insgesamt kann also kein eindeutiges Methylierungsmuster von MORC1 im Sinne einer durchweg positiven oder negativen Korrelation detektiert werden.

Die Gründe hierfür bleiben unklar. Es ist bis heute nicht geklärt, ob verschiedene Methylierungsmuster auch im Falle des Gens MORC1 einen Einfluss auf die Gen-Transkription und Expression haben. Außerdem erfolgte die

Blutuntersuchung mit einer Blutprobe, die direkt nach Beantwortung der Fragebögen entnommen wurde. Der BDI-II stellt eine Momentaufnahme der psychischen Verfassung dar und fragt lediglich den Zeitraum der letzten zwei Wochen ab. Es ist unklar in wie weit sich die letzten zwei Wochen in der Epigenetik der untersuchten Blutzellen widerspiegelt, wie kurzfristig eine solche Veränderung stattfinden kann und ob diese Zellen überhaupt die gesuchten epigenetischen Veränderungen abbilden. Da in den vorangegangenen Studien zum Teil andere Gewebe untersucht wurden, wie Zellen der Wangenschleimhaut (111) oder Zellen aus dem präfrontalen Kortex, aus Nabelschnurblut oder T-Zellen (62) könnte auch darin ein möglicher Unterschied begründet sein. Es lässt sich nicht ausschließen, dass die gefundenen epigenetischen Veränderungen Zell- oder Gewebespezifisch sind und sich das Methylierungsmuster nicht in allen Zellen gleich verhält.

Des Weiteren handelt es sich bei der vorliegenden Kohorte um Probanden ohne klinische Diagnose einer MDD. In vorangegangenen Studien wurden sowohl Probanden mit manifester MDD (144) als auch ohne analysiert (111). Es ist also möglich, dass sich das Methylierungsmuster mit steigender oder länger anhaltender depressiver Symptomatik nicht linear verhält. Zuvor wurden bereits nicht lineare Formen unterschiedlicher Methylierung beschrieben: Eine invertierte U-Form wurde beispielsweise zuvor im Zusammenhang mit der MGMT-Hypermethylierung nach persistierender Exposition gegenüber organischen Schadstoffen beobachtet (144, 154, 155). Außerdem wurden in der vorliegenden Kohorte andere aktuelle manifeste psychische Erkrankungen und Medikamenteneinnahme ausgeschlossen. Allerdings wurde nicht überprüft, ob die Probanden jemals Antidepressiva o.Ä. einnahmen. Aber auch solche Einflussfaktoren, wie die Einnahme oder Nicht-Einnahme von Antidepressiva können die Ergebnisse beeinflussen (156). Es wäre dementsprechend sinnvoll, die genannten Ergebnisse mit größeren Fallzahlen und einheitlicheren Kohorten, unter Ausschluss anderer Einflussfaktoren, wie beispielsweise die Einnahme von Medikamenten zu validieren. Ebenso gilt es detaillierter das Vorhandensein depressiver Symptome abzufragen sowie mittels z.B. einer Follow-Up-

Methylierungsanalyse zu ermitteln, ob die epigenetischen Veränderungen dauerhaft bestehen.

5 Zusammenfassung

Frühkindliche Traumata und die daraus folgenden Konsequenzen beeinflussen Betroffene lebenslang. Eine erhöhte Anfälligkeit für verschiedene psychische Erkrankungen, darunter vor allem die MDD zählt zu den gravierendsten Folgen von ELA. Diese erhöhte Vulnerabilität bleibt auch Jahre nach Erleben des Traumas bestehen. Auf der Suche nach einem möglichen Erklärungsansatz geriet die Epigenetik stark in den Fokus der Forschung. Epigenetische Modifikationen unterliegen u.a. der Regulierung durch modifizierbare externe Stimuli zu denen auch ELA gehören und stellen somit ein potenzielles Bindeglied im Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren und der Entstehung von Krankheiten dar.

Die genomweite Methylierungsanalyse von Nieratschker et al. identifizierte das Gen MORC1 als solchen epigenetischen Marker im Zusammenhang mit ELA und zeigte eine Assoziation des Gens mit dem Auftreten einer MDD. Ziel der vorliegenden Studie war es diese Erkenntnisse mittels insgesamt n=61 peripherer menschlicher Vollblutproben von Probanden mit erlebten ELA und einer Kontrollgruppe zu reproduzieren. Zusätzlich beantworteten die Probanden verschiedene psychometrische Fragebögen, um mögliche Unterschiede in der psychischen Verfassung zu detektieren. Nach Elimination potenzieller Einflussfaktoren zeigten in der Methylierungsanalyse der einzelnen CpG-Sites die CpG-Site Chr3.108838388 und der Mittelwert der drei analysierten CpG-Sites signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Vereinzelt konnten auch signifikante Abwärtstrends der prozentualen Methylierung innerhalb einzelner Kategorien frühkindlicher Traumatisierung nachgewiesen werden. So zeigte sich bei der Auswertung des CTQ ein signifikanter linearer Abfall der prozentualen Methylierung mit steigendem Schweregrad in der Kategorie „Emotionale Vernachlässigung“ für die CpG-Site Chr3.108838388 und den Mittelwert aller analysierten CpG-Sites und bei der Auswertung des CECA.Q zeigt sich die CpG-Site Chr3.108838285 signifikant geringer methyliert bei Probanden, die sexuellen Missbrauch erlebten. Deckungsgleich mit der Literatur scheint schwerer sexueller Missbrauch mitunter die größte Auswirkung auf die prozentuale Methylierung der

CpG-Site Chr3.108838285 zu haben. Auch der Verlust eines Elternteils und starke Antipathie der Mutter führt in der vorliegenden Kohorte zu einer signifikant geringeren prozentualen mittleren Methylierung.

Angesichts dieser Ergebnisse könnten die CpG-Sites Chr3.108838388, Chr3.108838285 oder der Mittelwert der Methylierung der drei analysierten CpG-Sites somit einen möglichen peripheren Proxymarker für das Erleben frühkindlicher Traumata oder das Erleben spezifischer frühkindlicher Traumata darstellen. Somit können bisherige Vermutungen, dass es sich bei MORC1 um einen peripheren Indikator von ELA handeln könnte für zwei der untersuchten CpG-Sites und den Mittelwert aller analysierten CpG-Sites belegt werden. Die gefundene Assoziation des Gens mit depressiver Symptomatik kann in der vorliegenden Studie ebenfalls statistisch belegt werden. Die CpG-Site Chr3.108838285 ist bei Probanden mit vermehrter depressiver Symptomatik signifikant geringer methyliert als bei Probanden mit wenig depressiver Symptomatik. Außerdem zeigt sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der prozentualen Methylierung dieser CpG-Site und steigendem Schweregrad depressiver Symptomatik im BDI-II. Dies suggeriert einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten depressiver Symptomatik und der spezifischen Methylierung des Gens MORC1. Das Gen MORC1 könnte somit möglicherweise als peripherer Proxymarker für das Erleben von frühkindlichen Traumata dienen und gleichzeitig auf Vulnerabilität des Kandidaten bezüglich einer Depression hindeuten. Aufgrund kleiner Fallzahlen dieser Studie, zum Teil fehlenden Informationen bezüglich potenzieller Einflussfaktoren der Epigenetik und aufgrund zum Teil widersprüchlicher Ergebnisse mit vorangehenden Studien ist tiefergehende Forschung mit zusätzlichen Datensätzen und größeren Fallzahlen unabdingbar. Probanden mit ELA erreichten in allen psychometrischen Skalen signifikant höhere Summenwerte: Sie zeigten vermehrt depressive Symptomatik, die Symptome einer Angststörung, eine vermehrte Stressanfälligkeit, sowie eine höhere grundsätzliche psychische Belastung.

6 Literaturverzeichnis

1. Gilbert R, Widom CS, Browne K, Fergusson D, Webb E, Janson S. Burden and consequences of child maltreatment in high-income countries. *Lancet* (London, England). 2009;373(9657):68-81.
2. Ferrara P, Corsello G, Basile MC, Nigri L, Campanozzi A, Ehrich J, et al. The Economic Burden of Child Maltreatment in High Income Countries. *The Journal of Pediatrics*. 2015;167(6):1457-9.
3. Fegert JM, Stötzel M. Child protection: a universal concern and a permanent challenge in the field of child and adolescent mental health. *Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health*. 2016;10.
4. Syed SA, Nemeroff CB. *Early Life Stress, Mood, and Anxiety Disorders. Chronic stress* (Thousand Oaks, Calif). 2017;1.
5. Witt A, Brown RC, Plener PL, Brähler E, Fegert JM. Child maltreatment in Germany: prevalence rates in the general population. *Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health*. 2017;11.
6. Scher CD, Forde DR, McQuaid JR, Stein MB. Prevalence and demographic correlates of childhood maltreatment in an adult community sample. *Child Abuse Negl*. 2004;28(2):167-80.
7. Falkai P. *Diagnostisches Und Statistisches Manual Psychischer Störungen - DSM-5 ®*. Göttingen ; Bern ; Wien [u.a.]: Hogrefe; 2015.
8. Roseboom TJ, Painter RC, van Abeelen AF, Veenendaal MV, de Rooij SR. Hungry in the womb: what are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas*. 2011;70(2):141-5.
9. Fatima M, Srivastav S, Mondal AC. Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates. *Int J Dev Neurosci*. 2017;60:1-7.
10. de Carvalho Tofoli SM, Von Werne Baes C, Martins CMS, Juruena M. Early life stress, HPA axis, and depression. *Psychology & Neuroscience*. 2011;4(2):229-34.
11. Bernstein DP, Fink L, Handelsman L, Foote J, Lovejoy M, Wenzel K, et al. Initial reliability and validity of a new retrospective measure of child abuse and neglect. *The American journal of psychiatry*. 1994;151(8):1132-6.
12. Bernstein DP, Stein JA, Newcomb MD, Walker E, Pogge D, Ahluvalia T, et al. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse & Neglect*. 2003;27(2):169-90.
13. Martins CMS, de Carvalho Tofoli SM, Von Werne Baes C, Juruena M. Analysis of the occurrence of early life stress in adult psychiatric patients: A systematic review. *Psychology & Neuroscience*. 2011;4(2):219-27.
14. Organization WH. *Preventing child maltreatment: a guide to taking action and generating evidence*: World Health Organization; 2006.
15. Mathews B, Collin-Vézina D. Child Sexual Abuse: Toward a Conceptual Model and Definition. *Trauma Violence Abuse*. 2019;20(2):131-48.

16. Zavaschi MLS, Satler F, Poester D, Vargas CF, Piazenski R, Rohde LAP, et al. Associação entre trauma por perda na infância e depressão na vida adulta. *Brazilian Journal of Psychiatry*. 2002;24(4):189-95.
17. Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, et al. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 1999;4(2):163-72.
18. Goodwin RD, Stein MB. Association between childhood trauma and physical disorders among adults in the United States. *Psychological medicine*. 2004;34(3):509-20.
19. Edwards VJ, Holden GW, Felitti VJ, Anda RF. Relationship between multiple forms of childhood maltreatment and adult mental health in community respondents: results from the adverse childhood experiences study. *The American journal of psychiatry*. 2003;160(8):1453-60.
20. Baumeister D, Akhtar R, Ciufolini S, Pariante CM, Mondelli V. Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α . *Molecular psychiatry*. 2016;21(5):642-9.
21. Goodwin RD, Stein MB. Association between childhood trauma and physical disorders among adults in the United States. *Psychological medicine*. 2004;34(3):509-20.
22. Danese A, Moffitt TE, Harrington HL, Milne BJ, Polanczyk G, Pariante CM, et al. Adverse Childhood Experiences and Adult Risk Factors for Age-Related Disease: Depression, Inflammation, and Clustering of Metabolic Risk Markers. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2009;163(12):1135-43.
23. Pietrek C, Elbert T, Weierstall R, Muller O, Rockstroh B. Childhood adversities in relation to psychiatric disorders. *Psychiatry Res*. 2013;206(1):103-10.
24. McLaughlin KA, Green JG, Gruber MJ, Sampson NA, Zaslavsky AM, Kessler RC. Childhood adversities and adult psychiatric disorders in the national comorbidity survey replication II: associations with persistence of DSM-IV disorders. *Archives of general psychiatry*. 2010;67(2):124-32.
25. Kessler RC, McLaughlin KA, Green JG, Gruber MJ, Sampson NA, Zaslavsky AM, et al. Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. *The British Journal of Psychiatry*. 2010;197(5):378-85.
26. Brown J, Cohen P, Johnson JG, Smailes EM. Childhood abuse and neglect: specificity of effects on adolescent and young adult depression and suicidality. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1999;38(12):1490-6.
27. Afifi TO, Enns MW, Cox BJ, Asmundson GJG, Stein MB, Sareen J. Population Attributable Fractions of Psychiatric Disorders and Suicide Ideation and Attempts Associated With Adverse Childhood Experiences. *American Journal of Public Health*. 2008;98(5):946-52.
28. Zlotnick C, Mattia J, Zimmerman M. Clinical features of survivors of sexual abuse with major depression☆. *Child Abuse & Neglect*. 2001;25(3):357-67.

29. Widom CS, DuMont K, Czaja SJ. A prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up. *Archives of general psychiatry*. 2007;64(1):49-56.
30. Heim C, Shugart M, Craighead WE, Nemeroff CB. Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect. *Developmental Psychobiology*. 2010;52(7):671-90.
31. Katerndahl D, Burge S, Kellogg N. Predictors of Development of Adult Psychopathology in Female Victims of Childhood Sexual Abuse. *The Journal of Nervous and Mental Disease*. 2005;193(4):258-64.
32. Kendler KS, Kuhn JW, Prescott CA. Childhood sexual abuse, stressful life events and risk for major depression in women. *Psychological medicine*. 2004;34(8):1475-82.
33. Coelho R, Viola TW, Walss-Bass C, Brietzke E, Grassi-Oliveira R. Childhood maltreatment and inflammatory markers: a systematic review. *Acta Psychiatr Scand*. 2014;129(3):180-92.
34. Tofoli SMdC, Baes CVW, Martins CMS, Juruena M. Early life stress, HPA axis, and depression. *Psychology & Neuroscience*. 2011;4:229-34.
35. Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller A, Nemeroff C. The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans 2008. 693-710 p.
36. Heim C, Mletzko T, Purselle D, Musselman DL, Nemeroff CB. The dexamethasone/corticotropin-releasing factor test in men with major depression: role of childhood trauma. *Biological psychiatry*. 2008;63(4):398-405.
37. Slavich GM, Irwin MR. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychol Bull*. 2014;140(3):774-815.
38. Baumeister D, Akhtar R, Ciufolini S, Pariante CM, Mondelli V. Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha. *Molecular psychiatry*. 2016;21(5):642-9.
39. Hornung OP, Heim CM. Gene-environment interactions and intermediate phenotypes: early trauma and depression. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:14.
40. Klengel T, Pape J, Binder EB, Mehta D. The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders. *Neuropharmacology*. 2014;80:115-32.
41. Bustamante AC, Aiello AE, Galea S, Ratanatharathorn A, Noronha C, Wildman DE, et al. Glucocorticoid receptor DNA methylation, childhood maltreatment and major depression. *Journal of affective disorders*. 2016;206:181-8.
42. DGPPN B, KBV, AWMF für die Leitliniengruppe Unipolare Depression*. S3-Leitlinie/Nationale VersorgungsLeitlinie Unipolare Depression – Langfassung 2. Auflage. Version 5. 2015 [
43. World Health O. The global burden of disease : 2004 update. Geneva: World Health Organization; 2008.
44. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with

- disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2018;392(10159):1789-858.
45. Greenberg PE, Fournier AA, Sisitsky T, Pike CT, Kessler RC. The economic burden of adults with major depressive disorder in the United States (2005 and 2010). *The Journal of clinical psychiatry*. 2015;76(2):155-62.
 46. Gauthier G, Mucha L, Shi S, Guerin A. Economic burden of relapse/recurrence in patients with major depressive disorder. *J Drug Assess*. 2019;8(1):97-103.
 47. Kessler RC. The costs of depression. *Psychiatr Clin North Am*. 2012;35(1):1-14.
 48. Krankheitskosten: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen (ICD-10), Geschlecht, Altersgruppen: Statistisches Bundesamt (Destatis); 2020 [Available from: <https://www.genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23631-0003&sachmerkmal=ICD10Y&sachschluessel=ICD10-F32-F34&transponieren=true>].
 49. Möller H-J, Laux G, Deister A, Schulte-Körne G, Braun-Scharm H. Duale Reihe Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie. In: Möller H-J, Laux G, Deister A, Schulte-Körne G, Braun-Scharm H, editors. Duale Reihe Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie. 6. aktualisierte Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2015.
 50. Kessler RC, Nelson CB, McGonagle KA, Liu J, Swartz M, Blazer DG. Comorbidity of DSM-III-R major depressive disorder in the general population: results from the US National Comorbidity Survey. *Br J Psychiatry Suppl*. 1996(30):17-30.
 51. Jacobi F, Höfler M, Siegert J, Mack S, Gerschler A, Scholl L, et al. Twelve-month prevalence, comorbidity and correlates of mental disorders in Germany: the Mental Health Module of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1-MH). *Int J Methods Psychiatr Res*. 2014;23(3):304-19.
 52. Hasin DS, Sarvet AL, Meyers JL, Saha TD, Ruan WJ, Stohl M, et al. Epidemiology of Adult DSM-5 Major Depressive Disorder and Its Specifiers in the United States. *JAMA Psychiatry*. 2018;75(4):336-46.
 53. Ormel J, Vonkorff M, Oldehinkel AJ, Simon G, Tiemens BG, Ustün TB. Onset of disability in depressed and non-depressed primary care patients. *Psychological medicine*. 1999;29(4):847-53.
 54. Härter M, Baumeister H, Reuter K, Jacobi F, Höfler M, Bengel J, et al. Increased 12-month prevalence rates of mental disorders in patients with chronic somatic diseases. *Psychother Psychosom*. 2007;76(6):354-60.
 55. Bertolote JM, Fleischmann A, De Leo D, Wasserman D. Psychiatric diagnoses and suicide: revisiting the evidence. *Crisis*. 2004;25(4):147-55.
 56. ICD-10-GM Version 2020, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, German Modification. 10. Revision. Mit

Aktualisierungen vom 01.11.2019 und vom 13.02.2020 Stand: 20.09.2019 Köln: Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG); 2020 [Available from: <https://www.dimdi.de/dynamic/downloads/klassifikationen/icd-10-gm/version2020/icd10gm2020syst-pdf.zip>].

57. Falkai P, Wittchen H-U, Döpfner M, Gaebel W, Maier W, Rief W, et al., editors. Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen DSM-5®. 2. korrigierte Auflage ed. Göttingen: Hogrefe; 2018.
58. Riglin L, Thapar A, Shelton KH, Langley K, Frederickson N, Rice F. Profiling depression in childhood and adolescence: the role of conduct problems. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2016;57(4):481-90.
59. Tsuang MT, Faraone SV. The genetics of mood disorders. Baltimore, MD, US: Johns Hopkins University Press; 1990. ix, 220-ix, p.
60. Wray NR, Ripke S, Mattheisen M, Trzaskowski M, Byrne EM, Abdellaoui A, et al. Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nature genetics*. 2018;50(5):668-81.
61. Rietschel M, Mattheisen M, Frank J, Treutlein J, Degenhardt F, Breuer R, et al. Genome-wide association-, replication-, and neuroimaging study implicates HOMER1 in the etiology of major depression. *Biological psychiatry*. 2010;68(6):578-85.
62. Nieratschker V, et al. MORC1 exhibits cross-species differential methylation in association with early life stress as well as genome-wide association with MDD. *Transl Psychiatry*. 2014;4::p. e429.
63. Schmidt M, Brandwein C, Luoni A, Sandrini P, Calzoni T, Deuschle M, et al. Morc1 knockout evokes a depression-like phenotype in mice. *Behavioural brain research*. 2016;296:7-14.
64. Szumlinski KK, Kalivas PW, Worley PF. Homer proteins: implications for neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Neurobiology*. 2006;16(3):251-7.
65. Dalton VS, Kolshus E, McLoughlin DM. Epigenetics and depression: return of the repressed. *Journal of affective disorders*. 2014;155:1-12.
66. Bick J, Naumova O, Hunter S, Barbot B, Lee M, Luthar S, et al. Childhood adversity and DNA methylation of genes involved in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and immune system: Whole-genome and candidate-gene associations. 2012;24:1417-25.
67. Suderman MB, N.; Pappas, J.J.; Pereira, S.M.P.; Pembrey, M.; Hertzman, C.; Power, C.; Szyf, M. Childhood abuse is associated with methylation of multiple loci in adult DNA. *BMC Medical Genomics*. 2014;7(13).
68. Ising M, Maccarrone G, Brückl T, Scheuer S, Hennings J, Holsboer F, et al. FKBP5 Gene Expression Predicts Antidepressant Treatment Outcome in Depression. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
69. Sutherland JE, Costa M. Epigenetics and the environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;983:151-60.

70. Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2005;38(10):1531-41.
71. Cho KS, Elizondo LI, Boerkoel CF. Advances in chromatin remodeling and human disease. *Current opinion in genetics & development*. 2004;14(3):308-15.
72. Nieratschker V, Batra A, Fallgatter AJ. Genetics and epigenetics of alcohol dependence. *Journal of molecular psychiatry*. 2013;1(1):11.
73. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Current biology : CB*. 2004;14(14):R546-51.
74. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*. 2010;2(5):657-69.
75. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *Journal of cellular physiology*. 2005;204(1):21-35.
76. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(2):97-109.
77. Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M. DNA methylation is a reversible biological signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(11):6107-12.
78. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*. 2003;33 Suppl:245-54.
79. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5532):1068-70.
80. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(7):484-92.
81. Wang Y, Leung FC. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2004;20(7):1170-7.
82. Chodavarapu RK, Feng S, Bernatavichute YV, Chen PY, Stroud H, Yu Y, et al. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature*. 2010;466(7304):388-92.
83. Kass SU, Goddard JP, Adams RL. Inactive chromatin spreads from a focus of methylation. *Mol Cell Biol*. 1993;13(12):7372-9.
84. Eden S, Cedar H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Current opinion in genetics & development*. 1994;4(2):255-9.
85. Boyes J, Bird A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*. 1991;64(6):1123-34.
86. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*. 2014;26(4):577-90.
87. Szyf M, McGowan P, Meaney MJ. The social environment and the epigenome. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2008;49(1):46-60.

88. Lam LL, Emberly E, Fraser HB, Neumann SM, Chen E, Miller GE, et al. Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109 Suppl 2:17253-60.
89. Lillycrop KA, Burdge GC. Epigenetic mechanisms linking early nutrition to long term health. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2012;26(5):667-76.
90. Menke A, Binder EB. Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2014;16(3):395-404.
91. Weder N, Zhang H, Jensen K, Yang BZ, Simen A, Jackowski A, et al. Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2014;53(4):417-24.e5.
92. Kang HJ, Kim JM, Stewart R, Kim SY, Bae KY, Kim SW, et al. Association of SLC6A4 methylation with early adversity, characteristics and outcomes in depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2013;44:23-8.
93. Yang BZ, Zhang H, Ge W, Weder N, Douglas-Palumberi H, Perepletchikova F, et al. Child abuse and epigenetic mechanisms of disease risk. *Am J Prev Med*. 2013;44(2):101-7.
94. Labonte B, Suderman M, Maussion G, Navaro L, Yerko V, Mahar I, et al. Genome-wide epigenetic regulation by early-life trauma. *Archives of general psychiatry*. 2012;69(7):722-31.
95. Januar V, Saffery R, Ryan J. Epigenetics and depressive disorders: a review of current progress and future directions. *International journal of epidemiology*. 2015;44(4):1364-87.
96. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*. 2004;7(8):847-54.
97. Suderman M, McGowan PO, Sasaki A, Huang TC, Hallett MT, Meaney MJ, et al. Conserved epigenetic sensitivity to early life experience in the rat and human hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109 Suppl 2:17266-72.
98. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience*. 2009;12(3):342-8.
99. Perroud N, Paoloni-Giacobino A, Prada P, Olie E, Salzmann A, Nicastro R, et al. Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. *Transl Psychiatry*. 2011;1:e59.
100. Klengel T, Mehta D, Anacker C, Rex-Haffner M, Pruessner JC, Pariante CM, et al. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nature neuroscience*. 2013;16(1):33-41.
101. Suderman M, Borghol N, Pappas JJ, Pinto Pereira SM, Pembrey M, Hertzman C, et al. Childhood abuse is associated with methylation of multiple loci in adult DNA. *BMC Medical Genomics*. 2014;7(1):13.

102. Labonté B, Suderman M, Maussion G, Navaro L, Yerko V, Mahar I, et al. Genome-wide epigenetic regulation by early-life trauma. *Archives of general psychiatry*. 2012;69(7):722-31.
103. Long JZ, Svensson KJ, Bateman LA, Lin H, Kamenecka T, Lokurkar IA, et al. The Secreted Enzyme PM20D1 Regulates Lipidated Amino Acid Uncouplers of Mitochondria. *Cell*. 2016;166(2):424-35.
104. Li D-Q, Nair SS, Kumar R. The MORC family: new epigenetic regulators of transcription and DNA damage response. *Epigenetics*. 2013;8(7):685-93.
105. Koch A, Kang H-G, Steinbrenner J, Dempsey DMA, Klessig DF, Kogel K-H. MORC Proteins: Novel Players in Plant and Animal Health. *Front Plant Sci*. 2017;8:1720-.
106. Dong W, Vannozzi A, Chen F, Hu Y, Chen Z, Zhang L. MORC Domain Definition and Evolutionary Analysis of the MORC Gene Family in Green Plants. *Genome Biol Evol*. 2018;10(7):1730-44.
107. Inoue N, Hess KD, Moreadith RW, Richardson LL, Handel MA, Watson ML, et al. New gene family defined by MORC, a nuclear protein required for mouse spermatogenesis. *Human molecular genetics*. 1999;8(7):1201-7.
108. Watson ML, Zinn AR, Inoue N, Hess KD, Cobb J, Handel MA, et al. Identification of *morc* (microrchidia), a mutation that results in arrest of spermatogenesis at an early meiotic stage in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(24):14361-6.
109. Fishilevich S, Zimmerman S, Kohn A, Iny Stein T, Olender T, Kolker E, et al. Genic insights from integrated human proteomics in GeneCards. Database : the journal of biological databases and curation. 2016;2016.
110. Boukas L, Havrilla JM, Hickey PF, Quinlan AR, Bjornsson HT, Hansen KD. Coexpression patterns define epigenetic regulators associated with neurological dysfunction. *Genome Res*. 2019;29(4):532-42.
111. Mundorf A, Schmitz J, Gunturkun O, Freund N, Ocklenburg S. Methylation of MORC1: A possible biomarker for depression? *Journal of psychiatric research*. 2018;103:208-11.
112. Wingenfeld K, Spitzer C, Mensebach C, Grabe HJ, Hill A, Gast U, et al. Die deutsche Version des Childhood Trauma Questionnaire (CTQ): Erste Befunde zu den psychometrischen Kennwerten. *Psychother Psych Med*. 2010;60(11):442-50.
113. Klinitzke G, Romppel M, Hauser W, Brahler E, Glaesmer H. [The German Version of the Childhood Trauma Questionnaire (CTQ): psychometric characteristics in a representative sample of the general population]. *Psychotherapie, Psychosomatik, medizinische Psychologie*. 2012;62(2):47-51.
114. Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, et al. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *The Journal of clinical psychiatry*. 1998;59 Suppl 20:22-33;quiz 4-57.

115. Saß H. Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen : Textrevision ; DSM-IV-TR ; übersetzt nach der Textrevision der vierten Auflage des Diagnostic and statistical manual of mental disorders der American Psychiatric Association. Göttingen (u.a.): Hogrefe; 2003.
116. Dilling H, Mombour W, Schmidt MH, Schulte-Markwort E, Remschmidt H. Internationale Klassifikation psychischer Störungen : ICD-10 Kapitel V (F) klinisch-diagnostische Leitlinien. 10. Auflage, unter Berücksichtigung der Änderungen entsprechend ICD-10-GM 2015 ed. Bern: Hogrefe Verlag; 2015.
117. Bernstein D, & Fink, L. . Childhood Trauma Questionnaire: A retrospective self-report. San Antonio, TX: The Psychological Corporation. 1998.
118. Haeuser W, Schmutzer G, Braehler E, Glaesmer H. Misshandlungen in Kindheit und Jugend. Dtsch Arztebl International. 2011;108(17):287-94.
119. Scher CD, Stein MB, Asmundson GJ, McCreary DR, Forde DR. The childhood trauma questionnaire in a community sample: psychometric properties and normative data. J Trauma Stress. 2001;14(4):843-57.
120. Baker AJL, Maiorino E. Assessments of emotional abuse and neglect with the CTQ: Issues and estimates. Children and Youth Services Review. 2010;32(5):740-8.
121. Häuser W, Schmutzer G, Brähler E, Glaesmer H. Maltreatment in childhood and adolescence—results from a survey of a representative sample of the German population. Deutsches Ärzteblatt International. 2011;108(17):287-94.
122. Beck AT SRaBG. „Manual for the Beck Depression Inventory-II". San Antonio, TX: Psychological Corporation. 1996.
123. Kühner C, Bürger C, Keller F, Hautzinger M. Reliabilität und Validität des revidierten Beck-Depressionsinventars (BDI-II). Der Nervenarzt. 2007;78(6):651-6.
124. DGPPN B, KBV, AWMF (Hrsg.) für die Leitliniengruppe Unipolare Depression*. S3-Leitlinie/Nationale VersorgungsLeitlinie Unipolare Depression – Langfassung, 2. Auflage. Version 5. 2015.
125. Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring clinical anxiety: Psychometric properties. Journal of Consulting and Clinical Psychology. 1988;56(6):893-7.
126. Hoyer J, Helbig S, Margraf J. Diagnostik der Angststörungen 2005.
127. Julian LJ. Measures of Anxiety. Arthritis care & research. 2011;63(0 11):10.1002/acr.20561.
128. Schulz P, Jansen LJ, Schlotz W. Stressreaktivität: Theoretisches Konzept und Messung. Diagnostica. 2005;51(3):124-33.
129. Derogatis LR, Lipman RS, Covi L. SCL-90: an outpatient psychiatric rating scale--preliminary report. Psychopharmacology bulletin. 1973;9(1):13-28.
130. Franke GH. Symptom-Checkliste von L.R. Derogatis – Deutsche Version (SCL-90-R) Vol. 2. vollständig überarbeitete und neu normierte Auflage. Göttingen: Beltz Test. 2002;2.
131. Smith N, Lam D, Bifulco A, Checkley S. Childhood Experience of Care and Abuse Questionnaire (CECA.Q). Validation of a screening

- instrument for childhood adversity in clinical populations. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology*. 2002;37(12):572-9.
132. Bifulco A, Bernazzani O, Moran PM, Jacobs C. The childhood experience of care and abuse questionnaire (CECA.Q): validation in a community series. *The British journal of clinical psychology*. 2005;44(Pt 4):563-81.
 133. Bifulco A, Brown GW, Harris TO. Childhood Experience of Care and Abuse (CECA): a retrospective interview measure. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 1994;35(8):1419-35.
 134. Kaess M, Parzer P, Mattern M, Resch F, Bifulco A, Brunner R. [Childhood Experiences of Care and Abuse (CECA) - validation of the German version of the questionnaire and interview, and results of an investigation of correlations between adverse childhood experiences and suicidal behaviour]. *Zeitschrift für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie*. 2011;39(4):243-52.
 135. Wolfe J, Kimerling R, Brown PJ, Chrestman KR, Levin K. Psychometric review of the life stressor checklist-revised. *Measurement of stress, trauma, and adaptation*. 1996:198-201.
 136. Wolfe J, Kimberling, R., Brown, P., Chrestman, K., Levin, K. . The Life Stressor Checklist- Revised (LSC- R) (Measurement instrument) <http://www.ptsd.va.gov/1997> [Available from: <http://www.ptsd.va.gov/professional/assessment/te-measures/lsc-r.asp>.
 137. Saheb A, Patterson S, Josowicz M. Probing for DNA methylation with a voltammetric DNA detector. *Analyst*. 2014;139(4):786-92.
 138. Brady KT, Back SE. Childhood trauma, posttraumatic stress disorder, and alcohol dependence. *Alcohol research : current reviews*. 2012;34(4):408-13.
 139. Konkoly Thege B, Horwood L, Slater L, Tan MC, Hodgins DC, Wild TC. Relationship between interpersonal trauma exposure and addictive behaviors: a systematic review. *BMC psychiatry*. 2017;17(1):164.
 140. Teixeira CAB, Lasiuk G, Barton S, Fernandes MNF, Gherardi-Donato E. An exploration of addiction in adults experiencing early-life stress: a metasynthesis. *Revista latino-americana de enfermagem*. 2017;25:e2939.
 141. Hynes TJ, Thomas CS, Zumbusch AS, Samson A, Petriman I, Mrdja U, et al. Early life adversity potentiates expression of addiction-related traits. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2018;87(Pt A):56-67.
 142. Baes C, Martins CM, Tofoli SM, Juruena MF. Early Life Stress in Depressive Patients: HPA Axis Response to GR and MR Agonist. *Front Psychiatry*. 2014;5:2.
 143. Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, et al. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Human genetics*. 2012;131(10):1565-89.
 144. Thomas M, Coope A, Falkenberg C, Dunlop BW, Czamara D, Provencal N, et al. Investigation of MORC1 DNA methylation as biomarker of early life stress and depressive symptoms. *Journal of psychiatric research*. 2020;120:154-62.

145. Gillespie CF, Bradley B, Mercer K, Smith AK, Conneely K, Gapen M, et al. Trauma exposure and stress-related disorders in inner city primary care patients. *Gen Hosp Psychiatry*. 2009;31(6):505-14.
146. Dunlop BW, Binder EB, Cubells JF, Goodman MM, Kelley ME, Kinkead B, et al. Predictors of remission in depression to individual and combined treatments (PReDICT): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2012;13:106.
147. Jeong HM, Lee S, Chae H, Kim R, Kwon MJ, Oh E, et al. Efficiency of methylated DNA immunoprecipitation bisulphite sequencing for whole-genome DNA methylation analysis. *Epigenomics*. 2016;8(8):1061-77.
148. Branco MR, Ficz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nature reviews Genetics*. 2011;13(1):7-13.
149. Mohn F, Weber M, Schubeler D, Roloff TC. Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP). *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2009;507:55-64.
150. Branco MR, Ficz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13(1):7-13.
151. Varese F, Smeets F, Drukker M, Lieveise R, Lataster T, Viechtbauer W, et al. Childhood Adversities Increase the Risk of Psychosis: A Meta-analysis of Patient-Control, Prospective- and Cross-sectional Cohort Studies. *Schizophrenia Bulletin*. 2012;38(4):661-71.
152. Provencal N, Suderman MJ, Guillemin C, Massart R, Ruggiero A, Wang D, et al. The signature of maternal rearing in the methylome in rhesus macaque prefrontal cortex and T cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(44):15626-42.
153. Mueller-Pfeiffer C, Moergeli H, Schumacher S, Martin-Soelch C, Wirtz G, Fuhrhans C, et al. Characteristics of child maltreatment and their relation to dissociation, posttraumatic stress symptoms, and depression in adult psychiatric patients. *J Nerv Ment Dis*. 2013;201(6):471-7.
154. Na YK, Hong HS, Lee DH, Lee WK, Kim DS. Effect of body mass index on global DNA methylation in healthy Korean women. *Mol Cells*. 2014;37(6):467-72.
155. Vaiserman AM. Hormesis, adaptive epigenetic reorganization, and implications for human health and longevity. *Dose Response*. 2010;8(1):16-21.
156. Menke A, Binder EB. Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2014;16(3):395-404.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe für molekulare Psychiatrie der Universitätsklinik Tübingen für Psychiatrie und Psychotherapie unter Betreuung von Frau Apl. Prof. Dr. Vanessa Nieratschker durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte ebenfalls durch Frau Apl. Prof. Dr. Vanessa Nieratschker in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Mara Thomas.

Die Rekrutierung der Probanden, die Entnahme der Blutproben, sowie die Auswertung der Fragebögen wurden von mir durchgeführt. Die Durchführung sämtlicher Versuche erfolgte durch mich, nach Einarbeitung durch Dr. Mara Thomas und durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für molekulare Psychiatrie. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den

Falkenberg, Carolin

Anhang

1 MORC1 Promotor DNA-Sequenz

Die CpG-Sites Chr3.108838388 (MORC_CpG2), Chr3.108838285 (MORC_CpG3) und Chr3.108838104 (MORC_CpG5) sind jeweils in fetter Schriftart markiert und in Grau hinterlegt. Die verwendete forward und reverse Primer-Sequenz ist jeweils in fetter Schriftart markiert. Alle anderen CpG-Sites der MORC1-Promotor Sequenz sind nummeriert und mit den entsprechenden hochgestellten Zahlen nummeriert.

```
>hg19_dna range=chr3:108835789-108839063 5'pad=0 3'pad=0 strand=-  
repeatMasking=none
```

```
ATTTGTCTTGAGTTCAATATGTTTGTGAAGAGCAATGAAACACTGGTTCATA  
TAATAGCTGTTTAAATGAGAGGGAAAGTGTAGTCTGAAAGATTTGAGCCAT  
TATTTGTGACTACAATATGAATTTTACAAATCTGAAATGTTAAGTTAGGAAG  
AGCTGATGAGTCTTTTATCCCAAACAGGCTTTCCTTAATATCAGTACCAATC  
ATTAGATGATCAAATGGCATTCTTATTTTAAATTTCCCCTCCCTGCCACTCC  
CCCAGTATTTTTTTTTTACCATGAAATAATGTTAAAATGAATCTTGAGGCA  
GGGTTGAGGGATATGGCTGAAATAAGCAATCACAAAAGTACTCCTTGTGGA  
GAAACAAGGTTTGCCTTTATGATGGCAGAGTGGCTAACAGTGTTGAAATG  
GGGAGGCG1GGGAATGGCTTTTGGTGGATTCTGTGCAGTGACTTTCAGGC  
CTCTTTTAAAGCACAATCTAATGGATTCTCTCTGTCCCTGTCATCCAGGCTA  
ACCAGTACTGTCTGGTGCTTTGGGGCTGGCCACTTACTGTAGGAAGTCTC  
TGCTCAGATTATAAGAAGGAGTGCTTCTGCAATAATCACACCCTTCCCTCT  
GATAAAAATTAGATATTACAGCCTTTACTAATTATAGGCTGGTGGfor  
wardCTCCCGMORC_CpG2GTGCTCTTCCGMORC_CpG3ATAGTAAATTGCTTTGAG  
ATAGCAGCTGGAAATTGGGTAGTAAAATAAATCCAGAAGAGACTTGTCAAG  
CTTTTCTTGCTCATAAAATGAAAATAAAATATCG4TATTTGTGAAGTTCTATA  
GAAGGAAAAATTGGAAAGATCGMORC_CpG5CTCAAGTTGCTTAGTAAAGAGA  
ATTTTGCTGTCAAACATCACCCACATCAGCCACTGTAAAACAAAAATGCAA
```

TCAGGAAAATTACTTGAAATGTTTATGTTTACTTCCAGTTTTGAAATTAGAAC
ATCATGTTCCCTTCG⁶GGTTGCCATTCAAATTCTCTCTTCCCTCTCCTGATTCC
CATAAATGTAGTAGTTGATAAACTCCTCTCT**TTGGAAGTAGAATGACT**
ACTCCAAAACTAT^{reverse}TTTTTTTTTCTTTTCTGAGAGCTTCACTGCCTG
TATGATGCCTGGAAATTACAAACACATCTAGTTCAAGTTCTTTATTTAATAG
ATGTTTGTCTGACTTTATGACTATCATGTAAAATCTTTGCTGAGTATTATT
GAACTACCTTGTTTCCAAGTCAAAGACATTGAATCAGCTTGGGTTTTGG
TGACTTAAGAACTCAGGGCTTTGTGAGTAGAGAAACACCATTTATTTATACA
GCTGTTCTACACATCTGCG⁷CAGTCCTTCCATATTTATCTACCCG⁸CCCC
AACCCCG⁹CACCCCTACCTTCTACCTGCCTAGTTCTATCTTTTGGAGCAATA
CCG¹⁰AATATCTAGGCATTGAGCCAGGCCAGCAAGTGAATAGTCG¹¹CATG
TCAGCTGACAGGTAAAAAAGGTTAGTGATCCATTCAGGTGGGGGCAGCTA
TTCTCACCTAGGGACAAGCCG¹²CTATATTAAGTCCAAATTCTGTTCTGATT
GTCTTTAGTTATTCCTTTTGTCTCTCCG¹³GCTTGTCACCTTTTGTTTTCA
TTTTTCTCCAATAGAAAAACATGATCAACTCAAGAGACACAGGAAGG
TAAGTGCTAGGATTACAGGACAGAGCACTCTTACCTCTGTTCTATGTAACA
CAATGGACAAGCAAAGAGAACTACCCACTCACCTTCCCCG¹⁴CACTGTCCT
GCCTTGCCG¹⁵CCCACG¹⁶TTCCCCACCATCTTGTGTGAATGTGTAATCATT
TCG¹⁷AATCAAATTTAATACCAGTTTTGGGCTCCATTTTCCAGCTGGGGAG
TGATTGAGAGGAGCAGGGTGGGGAACAACCG¹⁸TCTGAAAAAGTTACATAA
ACCTCAATTCCAGGAGACTCTAACTCAGATACG¹⁹TCATTCTCAAATTGTGG
CTCCAAGACCAAGCAACAAACCTCG²⁰CG²¹AGACAACCTGAGTCG²²ACG²³AC
G²⁴CAGTGGGAGCTTCG²⁵CG²⁶GTCCCG²⁷CCG²⁸CAAGGGGGAGCACG²⁹TG
TTTGCTGAACCCG³⁰CCCTCTGCG³¹CG³²TGAGCG³³TGGGCG³⁴TGGGAGTG
GGCG³⁵CG³⁶GGCG³⁷CAGGCG³⁸AACG³⁹GCTGCCG⁴⁰GTCAGGTGTCCTTGT
CCCCTTGAGTTGCG⁴¹CG⁴²GGTCG⁴³TGTTGCG⁴⁴AGGGCATGGACG⁴⁵ACAGG
TACCCTGCG⁴⁶CTTCAGCG⁴⁷GGCCCAGCTGCG⁴⁸TCTGGATTTTCATCCACG⁴⁹
CCAACCTCG⁵⁰TGAGTGCCG⁵¹AGGTGGGGTTCG⁵²GGGTTCG⁵³GGGAGGGTCT
CTGCG⁵⁴CCCCG⁵⁵CCATGAAGAAAGTTTTGCCCG⁵⁶TCCCCTGAGGAATACT
CAGCAAGTGAACCTTGATTTATGGATTTATTTATTTATTTGAGCTGTATAGGC
TTTTTTTAAAACG⁵⁷ATGAAAGCATAATAAAGATATATTCTGGGCCAGGCTGA
ACCCTTTAGGTGCTCTTCAGTGAACACCAAGTGGTTGGAAGGCCCTACATT

TATCATTTAACACAACACTGTTTAATTGTTGGTCAGCAGAACTGTGATTCTACC
AATCCTGCCTAACCTTAGTCTGCCTAACACACTGACAATTTAAACATTAAG
TTGCCCTTCAAACAGAGTAATTTGCATATATTGATTTCAAACCTCTATGGCCT
CCTGAGTCTTTTCAAAAATGTAACCTCTCTAAGGATAGGAATCTCACCTTTT
AGTTATTTGGTCATTTCTTCTTCTCTGCCATGCCTGTCTGCCTTTTAGAGCT
TCTCAGGTGTCATTTTTCAGATAGTCAGATTGCAGAGGGGAATGACAGAGGTT
TTTTCTCTCATCTGCCATTTCCCATACAGCAAATTATAGCAGTTAGTGCTAT
TTAATTCACAGTGGAACG⁵⁸TCCG⁵⁹GGTTTTTCTTTATGTTTCTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTGACATCTTTTGGTAATTTGGATTTACTAAATATAGGAACAGA
TATCAGGGATGTACCAAATTTGAAACCACAGAAATGGAGGTATAAAGAAAG
CCAGGGAAGGCCACCCTTGCTCTGTGGGACAGACTGTATAATTTAACATA
GCAGAGTTAAACAGGCAATATTCAGCAGATACTCAGTTTTTCATCTCTCTTTA
GAGAATGATGTCAAGCTGGAAAAGGTGGAACAAAAAGTTAAAAGGTAGCT
GAGGTGGAAGACAAATGAAGAAATAATAGTTTTCG⁶⁰AGTGAGTTTAAGAAAA
ATGCTCAGGGCAGTGCTGGAAGGACTGTGAATTTTATCTCAGAAAAATTCC
TCAGCCTCAGTTTTATATGGATTTTGTGGCTACTGCTTCACAA

2 Sequenzierungs-Primer

CpG-Site	Primer-Sequenz
Chr3.108838388 (MORC_CpG2)	5'-ATTTTGTAGTTGTTATTTTAAAGT-3'
Chr3.108838285 (MORC_CpG3)	5'-ATTTTGTAGTTGTTATTTTAAAGT-3'
Chr3.108838104 (MORC_CpG5)	5'-AATTTTTTTTATTAAGTAATTTGAG-3'