

Universität Ulm

Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie

Amtierender Direktor: Prof. Dr. H. Gündel

Sektion für Molekulare Psychosomatik

Prof. Dr. S.O. Reber

**Die Effekte eines Glukokortikoid-Rezeptor-Dimerisierungs-Defizits auf
die HPA-Achsen Funktionalität und das Verhalten chronisch
psychozial gestresster Mäuse**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Lisa Glogger

geboren in Augsburg

2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Reber
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jan Tuckermann
Tag der Promotion: 24.06.2022

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Stresssystem	2
1.1.1 <i>Vegetatives Nervensystem</i>	2
1.1.2 <i>HPA-Achse</i>	3
1.2 Stressreaktionen	4
1.2.1 <i>Stressreaktionen auf akuten Stress</i>	4
1.2.2 <i>Auswirkungen von chronischem Stress</i>	5
1.3 Die HPA-Achse	6
1.4 „Chronic subordinate colony housing“ – Ein Mausmodell zur Untersuchung der durch chronischen Stress verursachten Veränderungen der HPA-Achse	10
1.5 GrDim Mäuse – Dimerisierungsdefizit des GRs	11
1.6 Fragestellung	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Material	14
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	14
2.1.2 <i>Lösungen und Puffer</i>	16
2.1.3 <i>Kits und Enzyme</i>	18
2.1.4 <i>Antikörper</i>	18
2.1.5 <i>Primer</i>	19
2.1.6 <i>Gebrauchsgegenstände</i>	19
2.1.7 <i>Geräte</i>	20
2.1.8 <i>Programme</i>	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 <i>Tiere</i>	22
2.2.2 <i>Experimentelles Design</i>	22
2.2.3 <i>Modell der chronisch subordinierten Koloniehaltung – CSC</i>	24
2.2.4 <i>Verhaltenstests</i>	25
2.2.5 <i>Sammeln des Blutes</i>	27
2.2.6 <i>Entnahme der Organe</i>	27
2.2.7 <i>ELISA für CORT- und ACTH Konzentration im Plasma</i>	27
2.2.8 <i>Stimulation der Nebennieren</i>	28
2.2.9 <i>RNA- und Proteinisolation</i>	28
2.2.10 <i>cDNA Synthese</i>	29
2.2.11 <i>qPCR</i>	30

2.2.12	<i>Proteinbestimmung</i>	31
2.2.13	<i>Westernblot</i>	32
2.2.14	<i>Färbungen</i>	33
2.2.15	<i>Statistik</i>	36
3	ERGEBNISSE	37
3.3	Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf das Verhalten während des CSCs	37
3.3.1	<i>OF/NO</i>	37
3.3.2	<i>FST</i>	40
3.4	Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf Thymus-, Hypophysen- und Nebennierengewicht	41
3.5	Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die Plasma CORT- und ACTH-Konzentration	43
3.6	Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die <i>in vitro</i> CORT Sekretion nach ACTH Stimulation	44
3.7	Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die relative CRHR1, AVP1b und POMC mRNA Expression in der Hypophyse	45
3.8	Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die relative CRHR1 Protein Expression in der Hypophyse	46
3.9	Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf absolute und relative Menge der Lipidvesikel in der Nebennierenrinde	47
3.10	Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4	DISKUSSION	50
4.1	Effekte des GR Dimerisierungsdefizits auf Ebene der Hypophyse und Nebenniere	51
4.1.1	<i>Effekte des GR Dimerisierungsdefizits auf Ebene der Hypophyse</i>	51
4.1.2	<i>Effekte auf physiologische Parameter der Nebennieren</i>	54
4.1.3	<i>Nebennierenstimulation</i>	56
4.1.4	<i>Lipidvesikel in der Nebennierenrinde</i>	57
4.2	Effekte des GR Dimerisierungsdefizits auf das Verhalten (OF/NO, FST)	59
4.3	Effekte des GR Dimerisierungsdefizits auf den Thymus	62
4.4	Optimierung der Vergleichbarkeit der Daten von GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) Mäusen mit C57BL/6N Tieren	63
4.5	Fazit und Ausblick	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	66
6	LITERATURVERZEICHNIS	68
	DANKSAGUNG	87
	LEBENS LAUF	88

Abkürzungsverzeichnis

11b-HSD	11b-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotropin
ANOVA	Analysis of variance
AP-1	Alkalische Phosphatase 1
AVP	Arginin-Vasopressin
AVP1b	Arginin-Vasopressin-Rezeptor 1b
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw	Beziehungsweise
c	Konzentration
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBG	Corticosteron-binde-Globulin
cDNA	Copy Desoxyribonucleinsäure
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlendioxid
CORT	Kortikosteron
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
CRHR1	Corticotropin-releasing Hormon Rezeptor 1
CSC	Chronisch subordinierte Koloniehaltung
ct-Wert	Cycle threshold
d	Durchmesser
DAX-1	Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene 1
ddH₂O	Zweifach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat

dPBS	Dulbecco's phosphate buffer solution
ECL	Enhanced luminol-based chemiluminescent
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPF	Elevated platform
EPM	Elevated Plus Maze
FKBP51	FK51 binding protein
FST	Forced Swim Test
g	Erdbeschleunigung
GABA A Rez.	γ -Aminobuttersäure A Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glucokortikoide
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRDim	Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit
GRE	Glucocorticoid response elements
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
hsp	Hitzeschockprotein
HPA Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse
HRP	Horseradish peroxidase
HSL	Hormon sensitive Lipase
Ig	Immunglobulin
Igepal	Octylphenoxypolyethoxyethanol
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LDLR	Low Density Lipoprotein Rezeptor
MC2R	Melanocortin-2-Rezeptor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

MP	Milchpulver
MR	Mineralokortikoidrezeptor
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nGRE	Negative glucorticoid response elements
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
O₂	Sauerstoff
OF/NO	Open Field / Novel Object
PBS	Phosphate buffered saline
POMC	Proopiomelanocortin
PSB-TCEP	Protein Solving Buffer-Tris(2-carboxyethyl)-phosphat
PTSD	Posttraumatische Belastungsstörung
PVN	Nucleus paraventricularis
qPCR	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPL	Ribosomales Protein L
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec / s	Sekunde
SEM	Standardfehler
SF-1	Steroidgenic factor 1
SHC	Einzel gehalten Kontrolltiere
Sog.	Sogenannt
SR-BI	Scavenger Receptor BI
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
Tab	Tabelle
TBS	Tris buffered salin
TBS-T	Tris-buffered salin – Tween

TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	Unter anderem
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
v.a.	Vor allem

1 Einleitung

Stress ist unabhängig von Gesellschaftsschicht und Lebensalter gerade in der heutigen Zeit im Leben der Menschen von großer Bedeutung [4, 56]. Zudem wird die öffentliche Wahrnehmung durch den Begriff „Burnout“ sowohl durch Berichterstattung in den klassischen Medien als auch durch Erfahrungen im privaten Umfeld weiter ins gesellschaftliche Zentrum gerückt [142, 168]. Für die 2016 durchgeführte Studie „Entspann dich, Deutschland“ der Techniker Krankenkasse wurden 1200 Personen ab 18 Jahren „zu ihrer Stressbelastung und ihren Entspannungsstrategien in Alltag, Freizeit und Beruf“ [4, S. 4] befragt. Sechs von 10 Menschen fühlten sich immer wieder gestresst, 23 % sogar häufig [4]. In einer weiteren Studie „Chronischer Stress bei Erwachsenen“ (DEGS1) aus dem Jahr 2013 (n = 5793) wurde gezeigt, dass 11 % der Befragten im Alter von 18-64 Jahren durch chronischen Stress stark belastet sind, wobei die Prävalenz bei Frauen mit 13,9 % höher lag als bei Männern (8,2 %). Ebenso gingen ein niedriger sozialer Status und geringe soziale Unterstützung mit einer höheren Stressbelastung einher [56].

Dabei geht der Begriff „Stress“, wie er im heutigen Sprachgebrauch verwendet wird, auf Hans Selye (1907-1982) zurück. In mit Ratten durchgeführten Versuchen fand er heraus, dass diese auf einen akuten unspezifischen Stimulus – zum Beispiel (z.B.) Kälte, chirurgischer Eingriff, Gabe von Medikamenten (Adrenalin, Atropin, ...) – jeweils mit den gleichen Symptomen reagieren [139]. Selye war der erste, der Stress als eine unspezifische Reaktion des Körpers auf verschiedene Stimuli definierte [162]. Zudem grenzte er „Stress“ vom „Stressor“ ab [140]. Letzteren definierte er als spezifische Herausforderung, die eine physiologische Stressantwort verursacht [85, 140]. Seitdem wurden zahlreiche Studien zur Untersuchung der Auswirkungen von akutem und chronischem Stress durchgeführt.

Stress beeinflusst nicht nur den Alltag der Menschen, chronische Stressbelastung ist zudem an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt, die mit hohen Kosten im Gesundheitssystem einhergehen. Dazu zählen neben somatischen Erkrankungen wie kardiovaskulären Erkrankungen [37, 83], Asthma [81] und entzündlichen Darmerkrankungen [40] auch psychische Erkrankungen wie posttraumatische Belastungsstörung (PTSD) [173], Fibromyalgie [21], das chronische Fatigue Syndrom [29] und Depressionen [59, 78].

Da die Mechanismen der Entstehung vieler dieser Erkrankungen noch nicht gut genug untersucht sind, ist für die gezielte Behandlung und Prävention dieser Krankheiten weitere Forschung nötig, welche sich mit der stressassoziierten Krankheitsentstehung beschäftigt.

Eine wichtige Rolle spielt dabei das körpereigene Stresssystem, dessen Bestandteile im nachfolgenden Abschnitt genauer erläutert werden.

1.1 Das Stresssystem

Zwei interagierende Komponenten bilden das Stresssystem im menschlichen Körper: zum einen die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse), zum anderen das vegetative / autonome Nervensystem, welches aus Sympathikus, Parasympathikus und enterischem Nervensystem besteht [42, 55, 153]. Beide Komponenten stehen unter dem Einfluss übergeordneter Strukturen des zentralen Nervensystems, wie z.B. der Amygdala oder dem Hippocampus. Ihre Wirkung an den Zielorganen vermitteln sie jedoch über verschiedene Mechanismen, auf welche in den nächsten Kapiteln eingegangen wird [153].

Die Hauptaufgabe des Stresssystems liegt darin, den menschlichen Körper an die durch Stress bedingten Veränderungen anzupassen [49, 97]. Da die Informationsweitergabe im vegetativen Nervensystem über Neurone läuft [68], erfolgt dies hier sehr schnell, über die HPA-Achse aufgrund der hormonell vermittelten Wirkung zeitlich verzögert [82, 85].

1.1.1 Vegetatives Nervensystem

Ein wichtiger Bestandteil der Stresssysteme im menschlichen Körper ist das vegetative / autonome Nervensystem. Fast alle Organe werden vom Sympathikus und Parasympathikus innerviert, wobei diese meist gegensätzliche Effekte auf die Organfunktion ausüben [55, 68, 88]. Das sympathische Nervensystem wird vor allem (v.a.) bei Stress und der damit verbundenen „fight and flight“ Reaktion aktiviert mit dem Ziel den Körper an bevorstehende Belastungen anzupassen. Dies geht unter anderem (u.a.) mit gesteigertem Blutfluss, Zunahme der Herzfrequenz und Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin einher. In ruhigen und entspannten Situationen überwiegt die Aktivität des Parasympathikus („rest and digest“), er nimmt dabei eine Regenerationsfunktion ein [55]. Die zentrale Steuerung des autonomen Nervensystems erfolgt über komplex untereinander verschaltete Strukturen im Gehirn und Hirnstamm. Dabei spielen das limbische System und der Hypothalamus eine wichtige Rolle [55, 88].

Sowohl beim Sympathikus als auch beim Parasympathikus erfolgt die Weiterleitung der Signale über Neurone, wobei sich u.a. deren Verschaltung und die Transmitter unterscheiden. Die Zellkörper der präganglionären Neurone des Parasympathikus befinden sich zum einen in Hirnnervenkernen des Hirnstammes, zum anderen in den Seitenhörner des

sakralen Rückenmarks (S2-S4) [55, 88]. Von dort ziehen die präganglionären Fasern zu parasympathischen Ganglien, die sich meist in der Nähe des Zielorgans befinden. Sowohl bei der Umschaltung auf postganglionäre Fasern in den Ganglien als auch bei der Impulsweitergabe an die Zielorgane dient Acetylcholin (ACh) als Transmitter [55].

Im Gegensatz dazu befinden sich die Zellkörper der präganglionären Neurone des Sympathikus im Seitenhorn des Thorakal- und Lumbalmarks (Nucleus intermediolateralis). Die Umschaltung auf postganglionäre Fasern erfolgt entweder im Grenzstrang (Truncus sympathicus) oder in paravertebralen und intramuralen Ganglien. Als Transmitter dient ACh. Die Impulse der postganglionären Neurone werden an das Zielorgan mittels Noradrenalin (NA) übertragen, an die Schweißdrüsen ebenfalls mittels ACh [55]. Eine Besonderheit stellt das Nebennierenmark dar. Präganglionäre Fasern ziehen direkt dorthin und stimulieren mittels ACh sogenannte (sog.) chromaffine Zellen, die als postganglionäre Fasern agieren. Sie entlassen ihre Transmitter (Katecholamine) direkt in den Blutkreislauf. Damit werden die Nebennieren unter Stresseinfluss sowohl vom Sympathikus als auch von der HPA-Achse innerviert beziehungsweise (bzw.) stimuliert [55, 88].

1.1.2 HPA-Achse

Die zweite Komponente des Stresssystems neben dem vegetativen Nervensystem im menschlichen Körper ist die HPA-Achse. In dieser sind Hypothalamus, Hypophyse und Nebennierenrinde (NNR) miteinander kaskadenartig verschaltet und führen zur Freisetzung von Glukokortikoiden (GC) aus der NNR. Über negatives Feedback hemmen diese ihre Freisetzung entweder direkt durch Bindung an Rezeptoren des Hypothalamus und der Hypophyse oder indirekt, indem sie an Rezeptoren im Hippocampus und präfrontalen Kortex binden, die wiederum eng mit dem Hypothalamus in Verbindung stehen [10, 106].

1.2 Stressreaktionen

Jegliche Art von Stress aktiviert das körpereigene Stresssystem abhängig von Qualität, Intensität und Dauer des Stressors [16]. Die neuroendokrine Stressantwort wiederum ist abhängig von Tageszeit, Alter des Individuums, reproduktivem Status, genetischem Hintergrund und bereits erfahrenem Stress im Leben [85]. Ziel der Stressreaktion ist es, die körperliche Homöostase wiederherzustellen, was mit adaptionsbedingten physiologischen und behavioralen Veränderungen einhergeht, die als Allostase bezeichnet werden [16, 114]. Weichen die Konzentrationen der Mediatoren der Stressantwort – v.a. von GC und Adrenalin – jedoch über einen längeren Zeitraum von ihren Normwerten ab, beispielsweise bei wiederholter oder chronischer Stressbelastung, kommt es zu pathologischen Veränderungen im Körper und Gehirn – bezeichnet als „allostatic load“. Die Auswirkungen des Stresses hängen damit stark von der Dauer ab [49, 114].

1.2.1 Stressreaktionen auf akuten Stress

Unter dem Einfluss von akutem Stress werden die oben beschriebenen Stresssysteme aktiviert. Über ausschließlich neuronale Signalwege kommt es bereits innerhalb weniger Sekunden zum Anstieg der NA- und Adrenalin-Konzentrationen, die durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems aus dem Nebennierenmark freigesetzt werden [55, 88]. Etwas zeitlich verzögert werden durch Stimulation der HPA-Achse GC sezerniert [85]. Die durch die Stresssysteme vermittelte Reaktion auf akuten Stress geht mit verschiedenen physiologischen Reaktionen und Verhaltensveränderungen einher. So werden beispielsweise durch Gluconeogenese, Glykogenolyse und Lipolyse Energie für Herz, Gehirn und Muskulatur bereitgestellt, Herzfrequenz und Blutdruck steigen [17]. Jedoch können durch akuten emotionalen oder physischen Stress auch Erkrankungen verursacht werden, wie beispielweise die Tako-Tsubo-Kardiomyopathie [149].

Neben den physiologischen Reaktionen auf akuten Stress treten unmittelbar auch Verhaltensveränderungen wie Angst, Aggression und „Arousal“ auf [85]. Verschiedene Strukturen des zentralen Nervensystems wie Kortex, limbisches System und Hirnstamm sind daran beteiligt [11, 85].

1.2.2 Auswirkungen von chronischem Stress

Eine chronische Aktivierung der beiden Stresssysteme aufgrund von wiederholter oder anhaltender Stressexposition erhöht das Risiko für zahlreiche somatische und psychische Erkrankungen. Dazu zählen kardiovaskuläre Erkrankungen, Fibromyalgie, Asthma, atopische Dermatitis, entzündliche Darmerkrankungen, Osteoporose, Angststörungen, Depressionen und PTSD [22, 85, 173]. Dabei hängt die Entwicklung und die Schwere der durch Stress verursachten Erkrankungen von der Genetik, Vulnerabilität und Resilienz des Organismus, Stressexposition während kritischen Perioden der Entwicklung sowie Stärke und Dauer des Stresses ab [16].

Die zugrundeliegenden Mechanismen, wie es zur Entstehung dieser Erkrankungen unter chronischem Stress kommt, sind noch nicht vollständig geklärt. Zahlreiche Studien untersuchten bereits die durch Stress hervorgerufenen GC-assozierte Veränderungen der HPA-Achse und deren Zusammenhang mit der Entstehung bestimmter Erkrankungen. Interessanterweise weisen mehr und mehr Studien daraufhin, dass ein verändertes GC-Signaling, welches das Zusammenspiel aus GC Freisetzung und dessen Wirkung an den Zielorganen beschreibt [113], etwas mit der Entstehung dieser Erkrankungen zu tun haben könnte. So werden einige Krankheitsbilder mit erhöhten GC-Signaling und Hyperkortisolismus in Verbindung gebracht, wie beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen [9]. Zudem stehen jedoch auch viele Erkrankungen mit einem verminderten GC-Signaling in Zusammenhang [113]. Das insuffiziente GC-Signaling ist entweder auf eine verminderte Verfügbarkeit von GC (Hypokortisolismus) – bedingt durch eine verminderte Synthese oder Defekte in der Signaltransduktion – oder eine erhöhte GC Resistenz, das heißt vermindertes Ansprechen der Gewebe auf GC, oder die Kombination aus beiden zurückzuführen [113]. Zu Erkrankungen, die durch ein vermindertes GC-Signaling charakterisiert sind, zählen PTSD [173], Fibromyalgie [21], chronische Kopfschmerzen [34], das chronische Fatigue Syndrom [29] und Depressionen [6]. Erniedrigte Plasma Kortisolkonzentrationen wurden auch bei Patienten gemessen, die an entzündlichen Erkrankungen leiden, wie rheumatoide Arthritis [53, 146] und Asthma [81]. Ebenso konnten Raison und Miller zeigen, dass Stresserfahrungen in der Kindheit (Verlust der Eltern, Misshandlung) ebenfalls mit niedrigen Kortisolwerten einhergehen [57, 58]. Bisher ist jedoch noch nicht bekannt, ob es sich bei dem reduzierten GC-Signaling um einen kompensatorischen Mechanismus handelt, der verhindern soll, dass der Körper längerfristig erhöhten GC-Konzentrationen ausgesetzt ist.

Um den Einfluss von veränderten GC-Signaling auf stressassoziierte Erkrankungen aufklären zu können, sind weitere Studien notwendig, die sich u. a. mit den Mechanismen des GC-Signaling beschäftigen.

1.3 Die HPA-Achse

Regelkreis der HPA-Achse

GC beeinflussen zahlreiche physiologische Vorgänge wie Metabolismus, Wachstum, Reproduktion, Kognition, Verhalten, Immun- und Herzkreislaufsystem. Ihre Freisetzung wird über die HPA-Achse reguliert [98]. Die Aktivierung der HPA-Achse beginnt mit der Freisetzung von „corticotropin releasing hormone“ (CRH) aus Neuronen des Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus. Der PVN selbst erhält je nach Art des Stressors (z.B. Sport, Prüfungssituation, Schmerz, Zeitdruck, zwischenmenschliche Konflikte) Signale von höher geschalteten Hirnstrukturen wie Hippocampus oder Amygdala [10, 106]. Das in der medianen Eminenz freigesetzte CRH gelangt über das hypophysäre portale Gefäßsystem in die Adenohypophyse und bindet dort an den „corticotropin releasing hormone receptor 1“ (CRHR1). Dies führt zur Synthese von Proopiomelanocortin (POMC), das u.a. in beta-Lipoprotein und Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) gespalten wird [106]. Die Wirkung von CRH wird durch den synergistischen Effekt von Arginin-Vasopressin (AVP) verstärkt [90]. AVP wird ebenfalls im PVN produziert und bindet nach Freisetzung aus der medianen Eminenz in der anterioren Hypophyse an den Arginin-Vasopressin 1 beta (AVP1b) Rezeptor [60, 106]. Unter basalen Bedingungen spielt AVP jedoch nur eine untergeordnete Rolle bei der ACTH Sekretion [60, 137]. Das in die Blutbahn freigesetzte ACTH bindet an den Melanocortin-2-Rezeptor (MC2-Rezeptor) in der NNR. Dies führt zur Produktion und Freisetzung von GC (Kortisol bei Menschen oder Kortikosteron (CORT) bei Nagern) aus der Zona fasciculata und glomerulosa in die Blutbahn [106].

Wirkung der GC

Die Produktion von GC erfolgt nicht nur während Stress, sie werden kontinuierlich unter basalen Bedingungen in circadianer Rhythmik freigesetzt [10, 101, 106]. Unter physiologischen Bedingungen ist die Konzentration beim Menschen am Morgen am höchsten, bei den nachtaktiven Nagern am Abend [10, 106].

GC zählen zu den Steroidhormonen wie auch Mineralokortikoide und Sexualhormone. Steroide werden aus dem Vorläufer Cholesterin, welches in Lipidvesikeln innerhalb der NNR gespeichert wird, in mehreren enzymatischen Reaktionen gebildet. Das hormonell aktive GC bei Menschen ist Kortisol, bei den Nagern CORT [10, 43].

Die lipophilen GC werden im Blut an Proteine – Albumin oder Corticosteron-bindende Globulin (CBG) – gebunden transportiert. Nur 5 % der GC liegen im Blut ungebunden vor und sind damit biologisch aktiv [10, 106].

Die biologische Verfügbarkeit der GC wird durch zwei Isoformen der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 β -HSD) reguliert. Die u.a. im Gehirn exprimierte 11 β -HSD1 katalysiert die Reaktion von Kortison in die wirksamere Form Kortisol bzw. CORT. 11 β -HSD2 wandelt Kortisol bzw. CORT in die inaktive 11-keto Form (Kortison) um. Dieses Enzym findet man v.a. in Geweben, die hauptsächlich die nicht selektiven Mineralokortikoidrezeptoren (MR) exprimieren (z.B. Niere, Pankreas). Auf diese Weise wird die Spezifität der MR für Aldosteron erzwungen [33, 46, 67].

GC beeinflussen zahlreiche Vorgänge im Körper. Neben der Bereitstellung von Energie durch die Stimulation der Glukoneogenese und durch die katabole Wirkung auf Fettgewebs- und Eiweißstoffwechsel haben sie zudem eine schwache mineralokortikoide Wirkung. Weiterhin wirken sie antiinflammatorisch und immunsuppressiv, weshalb sie u.a. bei der Therapie von Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden. Des Weiteren verstärken sie den Effekt der Katecholamine, indem sie über Enzyminduktion deren Synthese fördern und die Sensitivität der Adrenorezeptoren gegenüber den Katecholamine erhöhen [128].

Beendigung der Stressantwort über negatives Feedback

Die sezernierten GC steuern nun ihre weitere Bildung durch negative Feedbackschleifen. Über dieses negative Feedback können GC die Stressantwort limitieren und den Körper vor einer Hyperaktivität der HPA-Achse, die mit somatischen und physischen Erkrankungen einhergeht, schützen [41, 129]. Prinzipiell können GC an zwei Rezeptoren (MR, Glukokortikoid Rezeptor (GR)) binden, die je nach Organ im Körper unterschiedlich verteilt sind [27, 126]. MR werden zum einen in Mineralokortikoid-sensitiven Organen exprimiert

(Niere, Pankreas) [10], zum anderen findet man sie in limbischen Gehirnstrukturen (Hippocampus, präfrontaler Kortex) [100, 126]. An diesen bereits bei geringen Hormonkonzentrationen besetzten Rezeptoren können sowohl Mineralokortikoide als auch GC binden. An die im Gegensatz zum MR ubiquitär im Körper vorkommenden GR binden nur GC oder deren Derivate (wie Dexamethason). Aufgrund der geringen Affinität zu ihren Liganden sind die GR erst bei hohen Konzentrationen besetzt. Ihren Beitrag zur Feedback-Hemmung leisten sie somit beim circadianen Peak von GC und unter Stresseinfluss [27, 126, 129].

Die Feedbackhemmung wird durch die Bindung der GC in der Hypophyse und im Hypothalamus vorwiegend an GR, im Hippocampus an MR eingeleitet, wobei die Inhibition durch den Hippocampus indirekt über γ -Aminobuttersäure (GABA) erfolgt, das an den γ -Aminobuttersäure A Rezeptor (GABA-A-Rezeptor) des PVNs bindet (siehe Abbildung 1) [72, 160, 161].

Bei fehlendem Liganden bildet der sich im Zytoplasma befindende GR einen Komplex mit verschiedenen Chaperonen / Hitzeschockproteinen (hsp90, hsp70) und Immunophilinen wie FK binding protein 51 (FKBP51) [10, 111, 170]. Durch Bindung von GC an den GR kommt es zu einer Konformationsänderung, FKBP51 wird durch FKBP52 ausgetauscht [10, 25, 127]. Der mit GC beladene GR transloziert nun in den Zellkern und bindet an bestimmte Promoterregionen der Desoxyribonucleinsäure (DNA), sog. „glucocorticoid response elements“ (GRE), was mit der Aktivierung von Genen einhergeht [127, 133]. Dabei erfolgt die DNA-Bindung entweder als Monomer oder als Dimer, welches entweder aus zwei GR bzw. MR (Homodimer) oder aus einem GR und MR (Heterodimer) besteht und ist u.a. abhängig von den GC Leveln [99, 110, 150]. Bestimmte Gene können jedoch ebenso durch GC gehemmt werden. Dies erfolgt entweder durch Bindung von GR an negative GRE (nGRE) oder durch die Interaktion mit bereits an die DNA gebundenen Transkriptionsfaktoren (NF-kappa-B (NF- κ B), Alkalische Phosphatase 1 (AP-1)) [10, 103, 133].

Neben den im Zytoplasma vorkommenden Rezeptoren werden auch Membran assoziierte G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit den schnellen, genom-unabhängigen Effekten der GC u.a. auf Ebene des Hippocampus, PVNs und der Hypophyse in Verbindung gebracht [12, 148]. Da die nicht-genomischen Effekte in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, wird im Verlauf der Arbeit darauf nicht mehr eingegangen.

1.4 „Chronic subordinate colony housing“ – Ein Mausmodell zur Untersuchung der durch chronischen Stress verursachten Veränderungen der HPA-Achse

Bisher sind die Mechanismen, die für die Veränderungen der HPA-Achsen-Funktionalität unter chronischem Stress verantwortlich sind, noch nicht vollständig verstanden. Um neue Erkenntnisse darüber zu erlangen, benötigt man Tiermodelle, die die Situation im Menschen möglichst genau widerspiegeln. Ein solches Tiermodell ist das von Reber 2007 etablierte CSC Paradigma. In ihm werden über einen Zeitraum von 19 Tagen chronische, psychologische und soziale Aspekte von Stress, welche das Risiko für somatische und affektive Erkrankungen erhöhen, miteinander kombiniert [85, 117]. Hierzu werden vier Mäuse zusammen mit einer größeren und älteren dominanten Maus gehalten, welche erstere über den gesamten Zeitraum psychosozial stresst. Als Kontrollen hierzu dienen einzeln gehaltene Mäuse (SHC). Eine genaue Beschreibung erfolgt im Methodenteil (siehe 2.2.3.). In vielen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass das CSC Modell mit Verhaltensveränderungen einhergeht. CSC Mäuse zeigen verstärktes Angstverhalten in der Elevated Plus Maze (EPM) [117, 120] und dem Open Field (OF) [144, 159]. Obwohl eine hohe Komorbidität zwischen Angststörung und Depression [61, 74, 93] besteht, verursacht das CSC kein depressions-ähnliches Verhalten [144].

Außerdem führt chronisch psychosozialer Stress bei CSC Tieren *in vitro* zu einer reduzierten GC-Sensitivität (insuffizientes GC-Signaling) sowohl in Milzzellen [117] als auch in anti-CD3-stimulierten T-Helferzellen aus peripheren LK [134]. Dieses reduzierte GC-Signaling könnte, wie bereits in 1.2.2 beschrieben, an der Entwicklung von somatischen und affektiven Störungen, die mit Entzündung einhergehen, beteiligt sein [113, 130].

Zudem treten bei CSC Mäusen morphologische und funktionelle Veränderungen der HPA-Achse auf. Sowohl in der Hypophyse [44, 144] als auch in den Nebennieren [42, 43, 45, 117] von CSC Tieren kommt es zu einer durch Hyperplasie vermittelten Zunahme des absoluten und relativen Gewichts.

Die morgendlichen CORT Spiegel in CSC verglichen mit SHC Tieren sind nicht merklich erhöht, obwohl in gestressten Mäusen erhöhte morgendliche ACTH Konzentrationen im Plasma gemessen werden konnten [42, 44, 45, 117]. Dies spricht bereits für eine potenzielle Reduktion der ACTH-Sensitivität in CSC Tieren. Diese Annahme wird zudem dadurch gestützt, dass CSC im Gegensatz zu SHC Tieren zum Zeitpunkt der Dunkelphase eine reduzierte *in vitro* ACTH-Sensitivität der Nebennierenzellen [86, 87, 156] und verringerte abendliche Plasma CORT Spiegel aufweisen [86, 117].

Auch auf molekularer Ebene konnten Veränderungen durch chronischen Stress nachgewiesen werden. Die AVP1b Rezeptor und POMC Protein Expression in der Hypophyse blieb unverändert, wohingegen die CRHR1 Protein Konzentration reduziert war [44]. In der Nebennierenrinde blieb die Anzahl an Lipidtröpfchen wie auch die Proteinexpression zahlreicher Enzyme (Hormon-sensitive-Lipase (HSL), 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase)) und Rezeptoren (low-density lipoprotein receptor (LDL-R)), die an der Bereitstellung von freiem Cholesterin, dem Vorläufer der Steroide, beteiligt sind, unverändert, mit der Ausnahme von „scavenger receptor class B type 1“ (SR-BI), dessen Expression nach 19-tägigem CSC sogar erhöht war [43]. Zudem wurden vergleichbare Level für MC2R Protein und „steroidgenic acute regulatory protein“ (StAR-Protein) messenger Ribonukleinsäure (mRNA) bzw. erhöhte mRNA Level für die 11- β -Hydroxylase gefunden [156]. Diese Daten lassen vermuten, dass die Nebennieren gestresster Mäuse im Vergleich zu SHC Tieren mehr CORT produzieren und sezernieren können. So wurden in Einklang mit dieser Hypothese erhöhte CORT Level im Plasma und in den Nebennieren in CSC Tieren 5 min nach akutem heterotypen Stress gemessen [156].

Die beschriebenen Veränderungen der Nebennierenrinde scheinen zwar vor chronisch erhöhten CORT-Spiegeln zu schützen, es gibt jedoch auch Hinweise, dass sie bei der Entstehung von ängstlichem Verhalten [45, 143, 144, 159] und spontaner Kolitis [117, 118, 121] eine Rolle spielen.

1.5 GrDim Mäuse – Dimerisierungsdefizit des GRs

Ein Ansatz, um den Beitrag von GR an stress-assoziierten Veränderungen der HPA-Achsen-Funktionalität besser zu verstehen, ist die Fähigkeit der Rezeptoren zur Dimerisierung und somit deren Dimerisierungseffekte genetisch im Tiermodell zu inhibieren. Im Mausmodell kann dies mit sog. glukokortikoidrezeptor-dimerisierungsdefiziten (GRDim) Mäusen durchgeführt werden. Durch das Einbauen der Punktmutation A458T in das GR Gen wird die Dimerisierung des GRs und damit die Bindung an das GRE der DNA verhindert [122]. Aufgrund der blockierten Genaktivierung erfolgt die Wirkung der GC über alternative, dimerisierungsunabhängige Wege. Dazu zählt das „Tethering“, bei dem der GR mit bereits an DNA gebundenen Proteinen interagiert. Über diesen Signalweg unterdrückt der GR u.a. die Transkription proinflammatorischer Faktoren wie NF- κ B and AP-1 [26]. Bereits in den 90er Jahren wurden von Reichardt et. al. (1999) und Cole et. al. (1995) Versuche mit GR veränderten Mäusen durchgeführt. Sie fanden heraus, dass für die Lebensfähigkeit der

Mäuse v.a. dimerisierungsunabhängige GR-Signalwege verantwortlich sind. Denn im Gegensatz zu GrDim Mäusen versterben GR-Knockout Mäuse ($Gr^{-/-}$) bereits kurz nach der Geburt und weisen u.a. Atelektasen der Lungen, unpassende Expression von Enzymen der Glukoneogenese in der Leber, Derepression der HPA-Achse und Hyperplasie der NNR auf [18, 122]. Zahlreiche Vorgänge werden über die Bindung des GR-Dimers an GREs reguliert: GC abhängige Apoptose der Thymozyten und T-Lymphozyten [124], Stresserythropoese, aufgehobene Effekte der GC bei rheumatoider Arthritis [7], allergische Kontaktdermatitis [155]. Zudem sind die CORT Serum Level [104, 122], circadiane CORT Konzentrationen [70] und CORT Sekretion nach 20 min Immobilisation (restraint stress paradigm) [104] erhöht, was vermuten lässt, dass das generelle negative Feedback der Tiere reduziert ist. Durch zahlreiche Studien ist zudem bekannt, dass auch einige Vorgänge bei einem Dimerisierungsdefizit des GRs unverändert ablaufen und somit die Wirkung der GC über andere Signalwege erfolgt. Dazu zählen die Repression proinflammatorischer Zytokine in Thymozyten und Makrophagen [123, 124] und durch GC Gabe verursachte Osteoporose [115].

1.6 Fragestellung

Wie bereits beschrieben sind viele Erkrankungen, wie beispielsweise PTSD [173] mit der Entstehung von Hypokortisolismus assoziiert. Die Mechanismen hinter der Entstehung von Hypokortisolismus und inwieweit GR-Dimerisierung daran beteiligt sind, ist jedoch noch nicht vollständig untersucht. Ein gutes Modell, um dies zu prüfen, ist das CSC, da es u.a. zu einem reduzierten GC-Signaling und dark phase Hypokortizismus führt [38, 85, 117, 156]. Zudem bietet sich durch die Verwendung von GRDim Mäusen die Möglichkeit zu prüfen, ob durch GR Dimerisierung vermittelte Effekte an der Entwicklung des stressbedingten Hypokortizismus beteiligt sind.

Das Hauptziel dieser Arbeit war deshalb, i) zu untersuchen, wie sich der Wegfall der GR Dimerisierung auf globaler Ebene auf die stressassoziierten Veränderungen der HPA Achse, mit besonderem Fokus auf die Hypophyse und Nebenniere, auswirkt. Zudem wurde analysiert, ii) inwiefern sich typische stress-assoziierte Effekte des CSC Modells auf physiologischer und behavioraler Ebene durch den globalen Wegfall der GR Dimerisierung verändern.

Um die oben beschriebenen Ziele zu erreichen wurden GRDim und respektive WT Mäuse entweder dem CSC ausgesetzt oder über den Zeitraum des Experiments einzeln gehalten (SHC). Zur Untersuchung des Verhaltens wurden am Morgen an Tag 15 das (Open Field / Novel Object (OF/NO) und Tag 19 der Forced Swim Test (FST)) durchgeführt. An Tag 20 wurden die Tiere getötet, die benötigten Organe (Thymus, Hypophyse, Nebenniere) entnommen und weitere Untersuchungen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tab. 1: Verwendete Chemikalien

BSA = bovines Serumalbumin, dPBS = Dulbecco's phosphate buffer solution, DNEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, IGEPAL = Octylphenoxypolyethoxyethanol, KCl = Kaliumchlorid, NaCl = Natriumchlorid, SDS = Sodiumdodecylsulfat, TEMED = N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin, Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Name	Hersteller	Firmensitz
0,02 % EDTA Solution	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
30 % Acrylamid / Bisacrylamidlösung	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
4 x Laemmli Sample Puffer	Bio Rad Laboratories	München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Adrenocorticotropic Hormone Fragment 1-24 human	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
BioScience-Grade, Nuklease-frei, autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
BSA	BioFroxx	Einhausen, Deutschland
Complete Mini Protease Inhibitor (10x)	Roche Diagnostics	Penzberg, Deutschland
dPBS	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
DMEM/F-12, no phenol red	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
EosinY	Waldeck GmbH & Co.	Münster, Deutschland
Ethanol 99,8 % unvergällt	Honeywell	Morris Plains, USA
Ethanol 99,8 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Glycin	NeoFroxx	Einhausen, Deutschland
HEPES	Merck	Darmstadt, Deutschland
IGEPAL	Alfa Aesar	Haverhill, USA
Isopropanol / 2-Propanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

Name	Hersteller	Firmensitz
Kaliumdihydrogenphosphat	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
KCl	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Mayers Hämalaun	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Methylbutan	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Oil Red Pulver	Waldeck GmbH & Co.	Münster, Deutschland
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Roti®-Histol	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histokitt	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Mount Aqua	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
SDS	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Skim Milk Powder	PanReac AppliChem	Darmstadt, Deutschland
TEMED	ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T. TM Compound	Sakura Finet Europe	Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tris	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	VWR	Radnor, USA

2.1.2 Lösungen und Puffer

Tab. 2: Verwendete Lösungen und Puffer

ddH₂O = doppelt destilliertes Wasser, *EDTA* = Ethylendiamintetraessigsäure, *HEPES* = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, *IGEPAL* = Octylphenoxypolyethoxyethanol, *PBS* = Phosphate buffered saline, *SDS* = Sodiumdodecylsulfat, *Tris* = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, *TBS* = Tris buffered saline, *TBS-T* = Tris-buffered saline – Tween

Name	Zusammensetzung
10 % Ammoniumpersulfat	10 g Ammoniumpersulfat 1 ml ddH ₂ O
Complete Mini Protease Inhibitor Solution	1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Lösen in 1 ml ddH ₂ O
EDTA Lysepuffer	1 ml 0,02 % EDTA 0,01751 g Natriumchlorid 50 µl HEPES 5 µl IGEPAL 100 µl Complete Mini Protease Inhibitor Solution
Elektrolytpuffer, 10x	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS Pellets Ad 1 ddH ₂ O
Elektrolytpuffer, 1x	100 ml Elektrolytpuffer, 10x 900 ml ddH ₂ O
Loading Dye	90 µl 4x Laemmli Sample Puffer 10 µl β-Mercaptoethanol
PBS, 10x	8 g Natriumchlorid 1,16 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 g Kaliumchlorid 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat Ad 1 l ddH ₂ O
PBS 1x	100 ml 10 x PBS 900 ml ddH ₂ O
SDS – Solution 1%	1 g SDS Pellets Lösen in 100 ml dH ₂ O

Name	Zusammensetzung
4x Sammelgelpuffer, pH 6,8	50 ml 1 M Tris-Cl pH 6,8 4 ml 10 % SDS 46 ml ddH ₂ O
TBS, 10x, pH 7,4	61 g Tris 87,66 g Natriumchlorid Ad 1 l ddH ₂ O
TBS, 1x	100 ml 10x TBS 900 ml ddH ₂ O
TBS-T, 1x	100 ml 10x TBS 1 ml Tween 900 ml ddH ₂ O
Transferpuffer, 10x	30,3 g Tris (25 mM) 144 g Glycin Ad 1 l ddH ₂ O
Transferpuffer, 1x	100 ml 10x Transferpuffer 700 ml ddH ₂ O 200 ml Methanol
4x Trenngelpuffer, pH 8,8	75 ml 2 M Tris pH 8,8 4 ml 10 % SDS 21 ml ddH ₂ O

2.1.3 Kits und Enzyme

Tab. 3: Verwendete Kits und Enzyme

ACTH = Adrenocorticotropin, BCA= Bicinchoninsäure, cDNA = Copy Desoxyribonucleinsäure, ECL = enhanced luminol-based chemiluminescent, ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, RNA = Ribonucleinsäure

Name	Hersteller	Firmensitz
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio Rad Laboratories	München, Deutschland
Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA	IBL International GmbH	Hamburg, Deutschland
ACTH ELISA	IBL International GmbH	Hamburg, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Paris™ Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Re Blot Plus Solution (strong)	Merck	Darmstadt, Deutschland
RNaseOUT™	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
SYBR® Green	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.1.4 Antikörper

Tab. 4: Verwendete Antikörper

CRHR1 = Corticotropin-releasing Hormon Rezeptor 1, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HRP = horseradish peroxidase, Ig G= Immunglobulin G

Primärer Antikörper	Hersteller	Firmensitz
CRHR1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
GAPDH	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sekundärer Antikörper	Hersteller	Firmensitz
Anti-mouse Ig G, HRP-linked Antibody	Cell signaling Technology	Danvers, USA
Anti-rabbit Ig G, HRP-linked Antibody	Cell signaling Technology	Danvers, USA

2.1.5 Primer

Tab. 5: Verwendete Primer

Angegeben sind die Primer (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) in der Sequenz 5'-3'.

AVP1b = Arginin-Vasopressin-Rezeptor 1b, *CRHR1* = Corticotropin-releasing Hormon Rezeptor 1, *POMC* = Proopiomelanocortin, *RPL* = ribosomales Protein L

Produkt	Primerpaar	Sequenz
AVP1b	AVP1b Forward	5'-GCTCACAGCTTGCTATGGCCTCAT
	AVP1b Reverse	5'-CCAGCCTGTGTCTTGACTTTTCAG
CRHR1	CRHR1 Forward	5'-GTGACAGCCGCCTACAACACTACTT
	CRHR1 Reverse	5'-GTAGCAGCCCTCACCGAACA
POMC	POMC Forward	5'-CGGTGAAGGTGTACCCCAACGT
	POMC Reverse	5'-GGACCTGCTCCAAGCCTAATGGCC
RPL	RPL Forward	5'-CCTGCTGCTCTCAAGGT
	RPL Reverse	5'-TGGCTGTCACTGCCTGGTACTT

2.1.6 Gebrauchsgegenstände

Tab. 6: Verwendete Gebrauchsgegenstände

PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion

Name	Hersteller	Firmensitz
96 Well Platte	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Amersham™ Protran™ Premium 0,45 µm NC	GE Healthcare Life science	Freiburg, Deutschland
Combitips advanced®	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Corning® Costar® Stripette®	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Deckgläser	VWR	Radnor, USA
Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falcon 15 ml, 50 ml	Corning Life Sciences	Tewksbury, MA, USA
Militex ® Biopsy Punch	Integra	Saint Priest, Frankreich
PCR Reaktionsgefäß	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze mit / ohne Filter	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Rotilabo®-Faltenfilter, Typ 601P	ROTH	Karlsruhe, Deutschland

Name	Hersteller	Firmensitz
Superfrost Ultra Plus ®	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Tissue-Tek® Cyromold	WECKERT	Kitzingen, Deutschland

2.1.7 Geräte

Tab. 7: Verwendete Geräte

Name	Hersteller	Firmensitz
Analysewaage MSE225P	Sartorius Weighing Technology GmbH	Göttingen, Deutschland
Analysewaage CPA 10001	Sartorius Weighing Technology GmbH	Göttingen, Deutschland
ChemiDoc™ MP System	Bio Rad Laboratories	München, Deutschland
Easy Pet 3	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH	Ortenberg, Deutschland
HERAEUS® BB 15	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Herafreeze HFU B Series	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
IKA MTS 2/4	IKA	Staufen, Deutschland
Leica CM1950 Cryostat	Leica Biosystems	Wetzlar, Deutschland
Leica DMI6000B	Leica Biosystems	Wetzlar, Deutschland
Leica S6E	Leica Biosystems	Wetzlar, Deutschland
MICRO STAR 17®	VWR	Darmstadt, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio Rad Laboratories	München, Deutschland
Ministar Silverline	VWR	Radnor, USA
Multipipette® Stream	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PEQStar	VWR	Radnor, USA
PowerPAC™ HC	Bio Rad Laboratories	München, Deutschland
Research Plus Pipettes	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio Rad Laboratories	München, Deutschland
ViiA™ 7	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
VORTEX Genie 2	Scientific Industries	Boemia, NY, USA

2.1.8 Programme

Tab. 8: Software

Name	Version	Hersteller	Firmensitz
BMG OPTIMA Windows™	2.20R2	BMG Labtech	Ortenberg, Deutschland
EthoVision XT V 11	11.5.1022	Noldus Information Technology	Wageningen, Niederlande
GraphPad Prism	9.0	Graphpad Software, Inc.	San Diego, Kalifornien
Image Lab™	5.0	Bio Rad Laboratories	München, Deutschland
Leica Application Suite X	1.0	Leica Biosystems	Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel ®	1809 for Office 365 MSO	Microsoft Corporation	Washington, USA
Microsoft Powerpoint®	1809 for Office 365 MSO	Microsoft Corporation	Washington, USA
Microsoft Word®	1809 for Office 365 MSO	Microsoft Corporation	Washington, USA
ReImage	V0.1	Dr. Michael Noll-Hussong	

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) Mäuse im Alter von fünf Wochen [122]. Heterozygote GR^{dim/WT} Mäuse wurden untereinander gekreuzt. Die auf diese Weise gezüchteten GR^{WT/WT} und GR^{Dim/Dim} Tiere wurden durch PCR Analysen genomischer DNA aus der Schwanzspitze genotypisiert und den Versuchsgruppen zugeteilt. Die Hälfte der Versuchstiere waren GR^{WT/WT} Mäuse, die andere Hälfte wies homozygot ein Dimerisierungsdefizit des GRs auf (GR^{Dim/Dim} Mäuse).

Als dominante Residents dienten männliche CD1 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 30-35 g.

Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen (Licht- / Dunkelzyklus: bis Woche 5 nach Geburt 14/10 Stunden, ab Woche 5 nach Geburt 12/12 Stunden, Beginn der Lichtphase 6:00 Uhr, Temperatur 20 +/- 2 °C, Luftfeuchtigkeit 60 %) mit ad libidum Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

Für die Durchführung der Versuche lag eine Tierversuchsgenehmigung mit der Versuchsnummer 1267 vor.

2.2.2 Experimentelles Design

Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse zunächst für vier Wochen in Einzelkäfigen (16 x 22 x 14 cm) gehalten, um sie an den Tag / Nacht Zyklus von 14/10 auf 12/12 Stunden zu adaptieren. An Tag -6 erhielten die Tiere ihre Ohrmarke. An Tag 1 wurden die Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe zugeteilt. (SHC Wildtyp (WT) = 13, CSC WT = 11, SHC GrDim = 11, CSC GrDim = 13). Die CSC Mäuse wurden in den darauffolgenden 19 Tagen im Rahmen des CSC Paradigmas chronisch gestresst (siehe 2.2.3). Währenddessen wurden die SHC Tiere einzeln gehalten. An den Tagen 15 und 19 wurden zwei etablierte Verhaltenstests durchgeführt. Zum einen der OF/NO Test, mit dem die Aktivität und das ängstliche Verhalten der Mäuse gemessen werden, zum anderen der FST, mit dem die Tiere auf depressives Verhalten getestet werden.

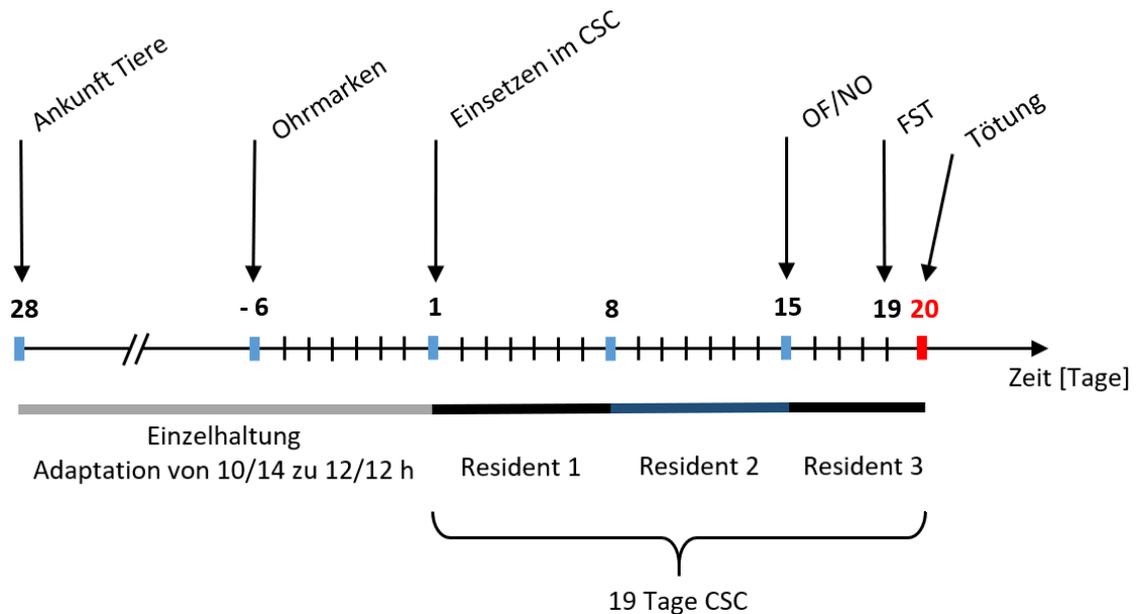


Abb. 2.: Schematischer Ablauf des CSC-Paradigmas

Nach der Ankunft der Mäuse wurden diese für 4 Wochen einzeln gehalten, um sie an den Tag/Nacht Zyklus von 12/12 h umzustellen. An Tag -6 erhielten die Tiere ihre Ohrmarken bevor sie an Tag 1 entweder einzeln gehalten (SHC) oder ins CSC gesetzt wurden. Um chronischen Stress in den CSC Tieren zu erzeugen, wurden vier CSC Mäuse zusammen mit einer größeren dominanten Maus für 19 Tage in einem Käfig gehalten. An Tag 8 und 15 wurden die CSC Mäuse zu einem anderen Residenten gesetzt, um eine Gewöhnung zu vermeiden. An Tag 15 (OF/NO) und an Tag 19 (FST) wurden etablierte Verhaltenstests durchgeführt, bevor die Mäuse an Tag 20 getötet wurden.

CSC = Chronisch subordinierte Koloniehaltung, FST = Forced Swim Test, OF/NO = Open Field / Novel Object

An Tag 20 wurden die Mäuse zwischen 6.00 und 9.00 Uhr nochmals gewogen und im Anschluss mittels Kohlendioxid (CO₂) Narkose und Dekapitierung getötet. Daraufhin wurde das Blut und verschiedene Organe gesammelt. Aus dem Blut wurde Plasma zur Messung der CORT- und ACTH Konzentrationen gewonnen.

Die Hypophysen wurden isoliert, um die Genexpression von CRHR1, AVP1b und POMC, ebenso wie die relativen Proteinlevel von CRHR1 zu bestimmen. Die linken Nebennieren wurden für die *in vitro* Stimulation mit ACTH (100 nM) entnommen. Die rechten Nebennieren wurden heraus präpariert, um Ölrot- und Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbungen anzufertigen.

Außerdem wurden die Gehirne nach der Entnahme zunächst in Methylbutan gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Modell der chronisch subordinierten Koloniehaltung – CSC

Um die Versuchstiere chronisch psychosozialen Stress auszusetzen, wurde das von Reber et. al. im Jahr 2007 etablierte Modell der 19-tägigen chronisch subordinierten Koloniehaltung verwendet [117]. Hierzu wurden vier Mäuse (2 WT, 2 GrDim) zusammen mit einer dominanten CD1 Maus in einem Beobachtungskäfig (Plexiglas, 38 x 22 x 35 cm) gehalten. Die potentiellen CD1 Mäuse wurden vor ihrem Einsatz zusammengesetzt und auf aggressives Verhalten getestet. Um schwerwiegende Verletzungen der Versuchstiere zu vermeiden, wurden die CD1 Mäuse, die andere Mäuse verletzt, nicht für die Experimente eingesetzt. Die Residents wurden für mehrere Versuche verwendet und zwischen ihren Einsätzen in Einzelkäfigen gehalten.



Abb. 3: CSC-Paradigma

Versuchsmäuse zeigen die „submissive upright“ Haltung gegenüber dem Residenten

CSC = Chronisch subordinierte Koloniehaltung

Zur Schaffung eines territorialen Vorteils wurde der Resident zwei Tage vor Beginn des CSCs in den Beobachtungskäfig platziert. Im Anschluss wurden an Tag 1 jeweils zwei WT und zwei GrDim Mäuse in den Käfig gesetzt. Um eine Gewöhnung der Versuchstiere an den Residenten während der 19-tägigen Stressexposition zu verhindern, wurden die CSC Mäuse am Tag 8 und 15 nach dem Wiegen in den Käfig eines neuen Residents platziert. Außerdem wurden jeweils die ersten 60 min nach dem Zusammensetzen der CSC Mäuse mit dem Residenten aufgezeichnet, um das Copingverhalten der Versuchstiere zu untersuchen. Während der Versuchsdauer wurden die Kontrolltiere (SHC) in Standardeinzelkäfigen gehalten und abgesehen von den wöchentlichen Käfigwechseln und Wiegen (Tag 1, 5, 8, 12, 15, 19 und 20 unmittelbar vor der Tötung) nicht gestört.

2.2.4 Verhaltenstests

Um herauszufinden, ob CSC ängstliches und / oder depressives Verhalten induziert und welchen Einfluss ein Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit auf das Verhalten hat, wurden an Tag 15 und 19 zwischen 7:00 und 11:00 Uhr zwei Verhaltenstests durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Noldus EthoVision TMXT 11.5.

2.2.4.1 OF/NO

An Tag 15 wurde der OF/NO Test durchgeführt. Es wurden 2 Arenen (jeweils L x B x H: 45 cm x 27 cm x 27 cm) parallel verwendet, um zwei Mäuse gleichzeitig zu testen. Im ersten Schritt wurde die Maus in die innere Zone der Arena (Abb. 4) gesetzt (OF). Im zweiten Schritt wurde ein neues Objekt (Durchmesser: 3 cm) in das Zentrum des Open Fields platziert, das die Maus erkunden konnte (NO). Beide Versuchsabschnitte erstreckten sich jeweils über fünf Minuten und wurden mit der Software Noldus aufgezeichnet.

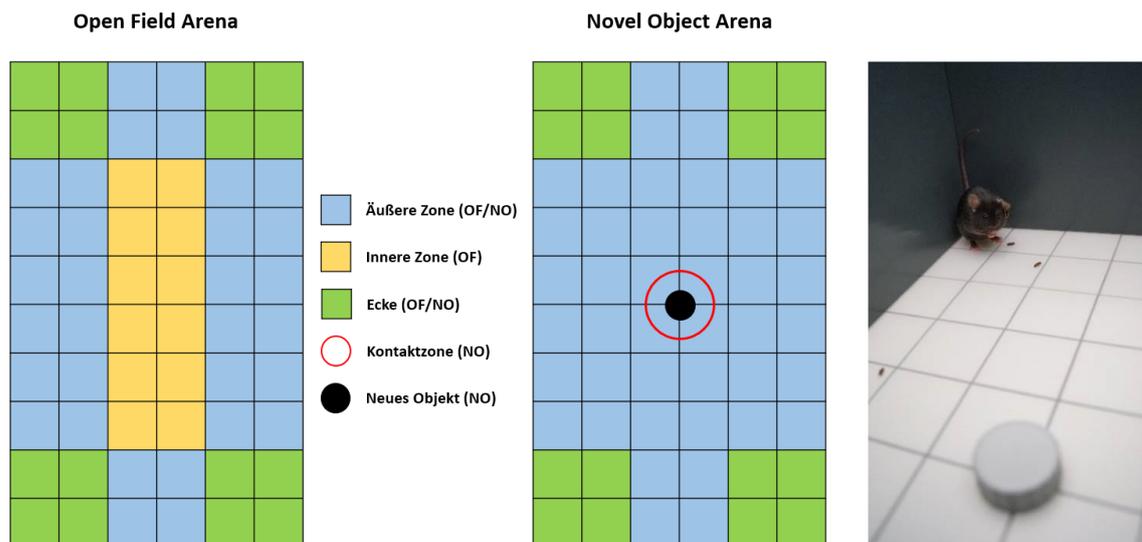


Abb. 4: Arena Einstellungen des OF / NO

Auf der linken Seite sind die Einstellungen der Open Field Arena (OF) dargestellt, in der Mitte die der Novel Object Arena (NO). Beide Arenen bestehen aus den Ecken und der äußeren Zone. Im OF wird außerdem die innere Zone abgegrenzt. Im NO befindet sich in der Mitte ein Gegenstand, der von der Kontaktzone umgeben ist. Auf dem rechten Bild ist eine Maus während des NO abgebildet, die sich in einer der Ecken aufhält.

OF = Open Field, NO = Novel Object

Analysiert wurden die zurückgelegte Strecke, die in den Ecken verbrachte Zeit und wie häufig die Mäuse die innere bzw. die Kontaktzone betraten. Hierfür wurde ebenfalls die Software Noldus verwendet.

2.2.4.2 FST

An Tag 19 wurde der FST durchgeführt, um den Einfluss von chronisch psychosozialen Stress und des Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizits auf depressives Verhalten zu untersuchen (Abb. 5). Pro Versuch wurden zwei Mäuse parallel getestet. Nach jedem Durchlauf wurde das Wasser gewechselt.

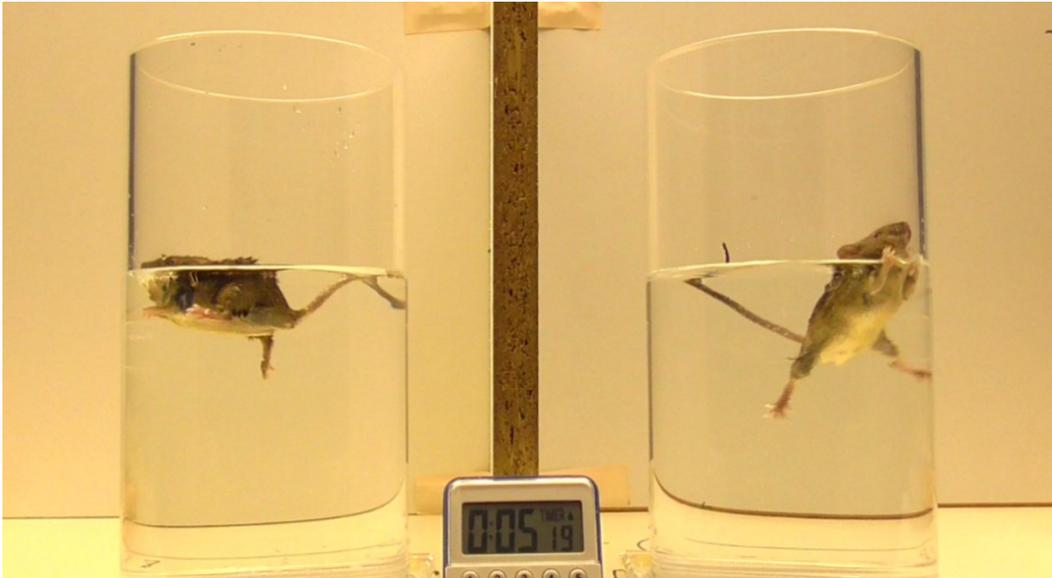


Abb. 5: FST Versuchsaufbau

Für den FST wurden jeweils eine Maus in einen bis zu einer Höhe von 13 cm mit $21 \pm 0,5$ °C kaltem Wasser gefüllten Plastikzylinder gesetzt. Pro Versuch wurden zwei Tiere gleichzeitig getestet, wobei eine Trennwand Sichtschutz gewährte. Jede Maus wurde 6 min getestet und auf Video aufgezeichnet. Für die Bestimmung der Immobilität wurden jedoch nur die letzten 240 s verwendet.

FST = Forced Swim Test

Dafür wurden die Mäuse nacheinander in einen durchsichtigen Plastikzylinder (Höhe: 40 cm, Durchmesser: 12 cm), der bis zu einer Höhe von 13 cm mit $21 \pm 0,5$ °C kaltem Wasser gefüllt war, gesetzt. Jedes Tier wurde 6 min getestet und auf Video aufgezeichnet. In den letzten 4 min wurde die Dauer der Immobilität der Mäuse ermittelt. Eine Maus gilt als immobil, wenn sie sich nicht bewegt bzw. nur Bewegungen durchführt, die nötig sind, um den Kopf über Wasser zu halten ($v < 2,5$ cm/s). Ab einer Geschwindigkeit von 2,5 cm/s gilt die Maus folglich als mobil und die Bewegungen werden aufgezeichnet. Für die Auswertung wurde ebenfalls die Software Noldus verwendet.

2.2.5 Sammeln des Blutes

Um den Effekt des CSCs auf die ACTH und CORT Konzentration im Plasma zu untersuchen, wurden die Tiere an Tag 20 mit CO₂ narkotisiert, gewogen und dekapitiert. Zur Verhinderung eines stressbedingten Anstiegs der Hormonlevel erfolgte die Tötung aller Tiere eines CSC Käfigs gleichzeitig; zudem betrug die Zeit zwischen der Herausnahme aus dem Käfig und der Tötung weniger als drei Minuten.

Das gewonnene Blut wurde in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Tubes gesammelt und auf Eis gelagert. Das nach der Zentrifugation des Blutes (4 °C, 5000 g, 10 min) gewonnene Plasma wurde aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.6 Entnahme der Organe

Zur Bestimmung des Einflusses von chronischem Stress auf das Gewicht von Thymus, Nebenniere und Hypophyse wurden diese Organe nach der Tötung entnommen. Die Hypophysen wurden direkt gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Thymus wurde in Dulbecco's phosphate buffer solution (dPBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und die Nebennieren in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), das 0,1 % bovines Serumalbumin (BSA; BioFroxx, Einhausen, Deutschland) enthält, auf Eis gelagert bis das Fett von den Organen entfernt wurde. Im Anschluss wurden die Organe gewogen. Die linken Nebennieren wurden anschließend stimuliert (siehe 2.2.8). Die restlichen Organe wurden bei -80 °C eingefroren. Zudem wurden die Gehirne herauspräpariert, in Methylbutan gefroren und bis zur weiteren Verwendung ebenfalls bei -80 °C gelagert.

2.2.7 ELISA für CORT- und ACTH Konzentration im Plasma

Für die Bestimmung der Plasma CORT Konzentration wurden 10 µl Plasma 1:10 mit dPBS verdünnt. 20 µl dieser Lösung wurden nun für den CORT Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA; IBL international, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Die Plasma ACTH Konzentration wurde ebenfalls gemäß Herstellerangaben mit dem ACTH ELISA (IBL international, Hamburg, Deutschland) ermittelt.

2.2.8 Stimulation der Nebennieren

Die linke Nebenniere wurde vom Fett befreit und halbiert. Beide Hälften wurden gewogen, jeweils in ein mit 200 µl DMEM-F12 (0,1 %) BSA gefülltes Well einer 96er-Wellplatte gegeben und im Inkubator bei 37 °C (95 % O₂, 5 % CO₂) präinkubiert. Nach 4 h wurde das Medium vorsichtig abgenommen und durch 100 µl frisches ersetzt. Dazu wurden entweder 25 µl ACTH mit einer Endkonzentration 100 nM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) oder Natriumchlorid (NaCl; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (basal) hinzugegeben. Die Stimulation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C im Inkubator (95 % O₂, 5 % CO₂). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bis zur Analyse mit dem CORT ELISA (IBL International GmbH, Hamburg, Deutschland) bei -20 °C gelagert.

Die gemessenen CORT Konzentrationen unter basalen Bedingungen bzw. nach Stimulation mit ACTH wurden relativ zum Gewicht der Nebennieren-Hälfte in ng/ml/mg Gewebe angegeben.

2.2.9 RNA- und Proteinisolation

2.2.9.1 RNA und Proteinisolation aus der Hypophyse mithilfe des PARISKits®

Die Isolierung von RNA und Protein aus der Hypophyse erfolgte mit dem PARISKit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Hypophysen wurden zunächst in 100 µl Cell Disruption Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) homogenisiert.

50 µl dieser Lösung wurden mit 50 µl 2X Lysis/Binding Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 50 µl absolutem unvergälten Ethanol vermischt. Die Proben wurden über einen Filter gegeben und bei 12000 g für 45 sec zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 700 µl der Waschlösung I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) über den Filter gegeben, im Anschluss daran 2 x 500 µl der Waschlösung 2/3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Dazwischen wurde jeweils für 45 sec bei 12000 g zentrifugiert. Die Filter wurden in ein neues Collection Tube gesteckt, 40 µl der auf 95 °C erhitzten Elution Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf die Filter gegeben und zentrifugiert (12000 g, 30 sec). Daraufhin wurden weitere 10 µl Elution Solution auf den Filter pipettiert und erneut zentrifugiert (12000 g, 30 sec). Bei den nun auf Eis gekühlten Proben wurde im Anschluss die RNA Konzentration mit dem NanoDrop 2000 bei 260/280 nm gemessen bevor die Proben bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80 °C gelagert wurden.

Für die Proteinisolierung wurden die verbliebenden 50 µl nach der Homogenisierung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 10 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

2.2.9.2 Proteinisolierung aus der Nebenniere

Die bereits für die Ölotfärbung verwendeten (2.2.14.1) und bei -80 °C eingefrorenen Nebennieren wurden zunächst mit 1 x PBS aus dem Tissue Tek herausgelöst und im Anschluss gewogen. 90 µl des zuvor hergestellten Lysepuffers (Tabelle 9) wurde zu den Nebennieren gegeben.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Proteinlysepuffers

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure; HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure,

Igepal = Octylphenoxyethoxyethanol

5ml	Substanz	Endkonzentration
5 µl	0,5 M EDTA	~ 0,5 mM
1,25 ml	1 M Natriumchlorid	~ 250 mM
250 µl	HEPES	~ 50 mM
25 µl	Igepal	~ 0,5 %
500 µl	Complete Mini Protease Inhibitor (10x)	~ 10 %
2970 ml	Aqua Bidest	

Diese wurden mit einem Stösel homogenisiert, 1 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert und daraufhin bei 13000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde abgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.10 cDNA Synthese

Bevor bestimmte Genomabschnitte vervielfältigt werden können, muss die instabile RNA zunächst in copy Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden, welche ausschließlich aus Exons besteht.

Für die cDNA Synthese wurde das High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. 10 µl der RNA Proben wurden zu 10 µl des zuvor hergestellten Mastermixes hinzugegeben (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammensetzung des cDNA Mastermixes pro Probe und cDNA Synthese Programm

cDNA = Copy Desoxyribonucleinsäure, ddH₂O = zweifach destilliertes Wasser, dNTP = Nukleosidtriphosphat, RNA = Ribonucleinsäure, RNase = Ribonuklease

cDNA Mastermix	1x	cDNA Synthese Programm	
10 RT Puffer	2,0 µl	25 °C	10 min
25 x 100 mM dNTP's	0,8 µl	37 °C	120 min
10 x Reverse Transkriptase zufällige Primer	2,0 µl	85 °C	5 min
Multiscribe reverse Transkriptase	0,6 µl		
RNAse Inhibitor	0,3 µl		
ddH ₂ O	4,3 µl		
Gesamtvolumen	10 µl		
+ 10 µl RNA Probe			

Durch den Thermocycler PEQStar wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Im ersten Schritt des cDNA Synthese Programmes lagerten sich bei 25 °C die Primer an die passende Sequenz des RNA Stranges an. Im nächsten Schritt synthetisierte die reverse Transkriptase die cDNA bei 37 °C. Durch weitere Erwärmung auf 85 °C kam es zur Denaturierung der Polymerase, was die Transkription beendete. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.11 qPCR

QPCR ist eine Methode, bei der neben der Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen zusätzlich die Quantifizierung der vervielfältigten DNA möglich ist. Während der Amplifikation bindet der in der Primerlösung enthaltene Fluoreszenzfarbstoff (SYBR® Green) an die doppelsträngige DNA. Durch die Bindung kommt es zu einer Fluoreszenzzunahme, die proportional zur Menge des PCR Produktes ist. Für die Auswertung wird der Ct-Wert herangezogen. Er beschreibt die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, bis das detektierte Fluoreszenzsignal exponentiell über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Er ist indirekt proportional zur DNA-Menge vor der PCR. Zunächst mussten die cDNA Proben 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt werden. Im Anschluss wurden 7,5 µl der zuvor hergestellten Primerlösungen (Tabelle 11) in die 384 Well Platte pipettiert, dazu kamen 2,5 µl der verdünnten cDNA. Jede Probe wird dreimal pipettiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Primerlösung pro Probe und qPCR Programm

cDNA = Copy Desoxyribonucleinsäure, ddH₂O = zweifach destilliertes Wasser, qPCR = quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Primerlösung	1x	qPCR Programm		Zyklusanzahl
SYBR® Green	5,0 µl	50 °C	2 min	1 x
Vorwärts Primer	0,4 µl	95 °C	10 min	
Rückwärts Primer	0,4 µl	95 °C	15 sec	40 x
ddH ₂ O	1,7 µl	60 °C	30 sec	
Gesamtvolumen + 2,5 µl cDNA Probe (1:10)	7,5 µl	72 °C	30 sec	
		95 °C	15 sec	1 x
		60 °C	1 min	
		95 °C	15 sec	

Untersucht wurde die Expression von CRHR1, AVP1b und POMC. Damit die DNA Mengen miteinander verglichen werden können, wurde zusätzlich das „Housekeepergen“ RPL bestimmt, das in allen eukaryonten Zellen vorkommt. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die qPCR erfolgte nach dem Programm des ViiATM 7. Nach der initialen Phase (50 °C für 2 min, 95 °C für 10 min) erfolgte die Amplifikation in 40 Zyklen. Zunächst denaturierten bei 95 °C die DNA-Doppelstränge, im nächsten Schritt erfolgte bei 60 °C das Annealing der Primer. Die Synthese der neuen DNA-Doppelstränge fand bei 72 °C statt. Im Anschluss wurde der Schmelzpunkt bestimmt (95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min, 95 °C for 15 s). Die Amplifikationsprodukte wurden mithilfe der Schmelzkurve überprüft. Die relative mRNA Expression wurde mittels der Delta-delta-CT-Methode ($\Delta\Delta CT$) ermittelt.

2.2.12 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung im Gewebehomogenisat wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Als Grundlage dient die Biuret-Reaktion. Im alkalischen Milieu reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^{1+} . Dies wird als violetter Farbumschlag sichtbar.

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. BSA-Verdünnungen und Proben (Nebenniere 1:5, Hypophyse 1:2 mit ddH₂O verdünnt) wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert, darauf wurde das „Working“ Reagenz gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank (95 % O₂, 5 % CO₂) erfolgte die Messung mit dem FLUOstar OPTIMA bei einer Längenwelle von 562 nm.

2.2.13 Westernblot

Entsprechend der zuvor ermittelten Proteinkonzentration wurde die Probenmenge berechnet, die für 20 µg Protein benötigt wird. Die Proben wurden mit Loading Dye (Bio Rad Laboratories, München, Deutschland) versetzt, 5 min bei 96 °C gekocht und anschließend auf ein Sodiumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamidgel (10 %) aufgetragen. Zur Auftrennung der Proben nach Molekulargewicht erfolgte die Elektrophorese bei 60 V für 20 min und 120 V für 1 h 30 min. Als Marker der Laufweite diente der Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare Life science, Freiburg, Deutschland) bei 15 V für 1 h unter Verwendung des Transferpuffers transferiert (Semidry Blot). Die Nitrozellulosemembranen wurden für 1 h bei Raumtemperatur (RT) in 5 % Milchpulver (MP; PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gelöst und in „Tris-buffered saline-Tween“ (TBS-T) geblockt. Dies verhindert die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran.

Es folgte die Inkubation der Membranen mit dem primären CRHR1 Antikörper (1:300 in 5 % MP; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) über Nacht bei 4 °C. Nach 3 x 10-minütigem Waschen mit TBS-T wurden die Membranen mit dem sekundären Antikörper HRP linked anti-rabbit IgG (1:2000 in TBS-T; Cell signaling Technology, Danvers, USA) für 45 min bei RT inkubiert. Die Membranen wurden erneut 3 x 10 min mit TBS-T und 1 x 5 min mit „Tris-buffered saline“ (TBS) gewaschen.

Nach der Detektion mit Clarity™ Western ECL (Bio Rad Laboratories, München, Deutschland) wurden die Westernblots mit dem ChemiDoc™ XRS+ System und mittels ImagineLab™ analysiert.

Im Anschluss daran wurden die Membranen mit 1/10 verdünnter Re Blot Plus Strong Solution (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 5 min gestrippt, 2 x für 5 min mit 5 % MP in TBS-T geblockt und mit primären anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Antikörper (1:5000 in 5% MP; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem 3 x 10-minütigem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper HRP linked anti-mouse IgG (1:3000 in TBS-T; Cell signaling Technology, Danvers, USA) für 1 h bei RT. Nach dem erneuten Waschen erfolgten die Visualisierung und Analyse wie bereits oben beschrieben. Die Banden befanden sich für CRHR1 bei ~47 kDa und GAPDH bei ~35 kDa.

Die CRHR1 Proteinexpression in der Hypophyse wurde zu den SHC WT normalisiert, daran wurden die anderen Proben angeglichen.

2.2.14 Färbungen

2.2.14.1 Öl-Rot Färbung der rechten Nebennieren

Die Nebennierenschnitte wurden mit Öl-Rot-O angefärbt, um die Menge an Lipidtropfen in der Nebenniere, die Cholesterol enthalten, zu quantifizieren.

Für jedes Tier wurden drei 5 µm Kyroschnitte der rechten Nebenniere mit dem Kryostaten angefertigt, die sowohl Kortex als auch Medulla enthielten (Abb. 6). Dafür wurden die Nebennieren zunächst in Tissue-Tec® eingebettet. Die auf die Objektträger gezogenen Schnitte wurden bei RT für 10 min getrocknet und anschließend bei -20 °C gelagert.

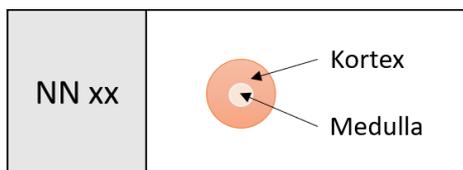


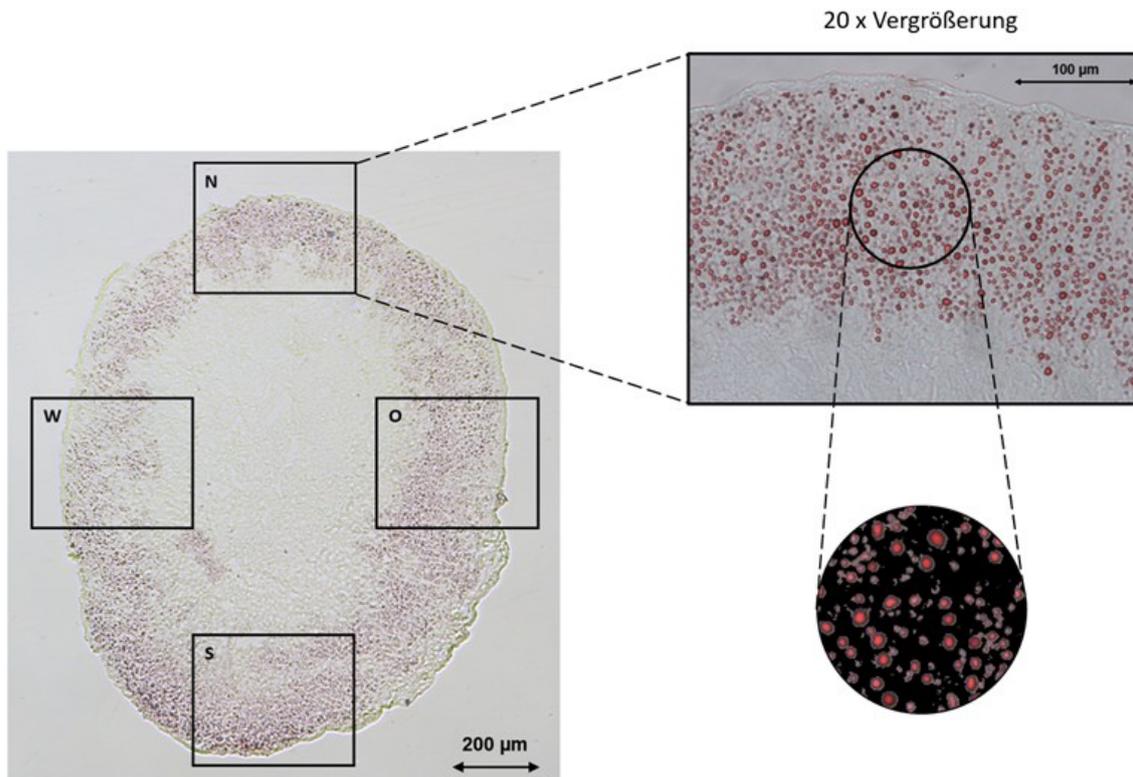
Abb. 6: Objektträger mit Nebennierenquerschnitt

NN = Nebenniere

Für die Anfärbung der Schnitte wurden diese zunächst für 72 h in Formalin (Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland) bei RT fixiert. 24 h vor der Ölrotfärbung wurde die Stocksolution bestehend aus 0,5 % Öl-Rot-O (WALDECK GmbH & Co., Münster, Deutschland) gelöst in absolutem Isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hergestellt, welche mit ddH₂O zu einer 60 % Lösung runterverdünnt wurde. Die fixierten Schnitte wurden kurz in Aqua bidest gewaschen, für 5 min in 60 % Isopropanol gegeben und für 15 min mit frisch gefilterter Oil-Red-O-Lösung angefärbt.

Im Anschluss wurden die Schnitte erneut für 5 min in 60 % Isopropanol gewaschen und in ddH₂O eingetaucht. Um die Schnitte einzudecken, wurden die Objektträger gut getrocknet. Roti® Mount Aqua (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) wurde auf den Objektträger gegeben und das Deckglas vorsichtig über den Schnitten platziert.

Für weitere Analysen wurden pro Nebenniere zwei Schnitte verwendet. Für die Quantifizierung der Anzahl der Lipidtropfen im Kortex wurde jeder Schnitt in vier Viertel bestehend aus Kortex und Medulla geteilt. Von jedem Bereich (N, O, S, W) wurde ein Foto in 20facher Vergrößerung mit dem Mikroskop Leica DMI6000B erstellt (Abb. 7).



Abd. 7: Öl-Rot-O Färbung und Analyse

Pro Nebennierenschnitt wurden vier mikroskopische Bilder (N, O, S, W) mit 20facher Vergrößerung aufgenommen. Für jedes Bild wurde ein repräsentativer Ausschnitt innerhalb der Zona fasciculata und reticularis der Nebennierenrinde ausgewählt und mit der Software ReImage der prozentuale Anteil der Öl-Rot-O positiven Fläche ermittelt.

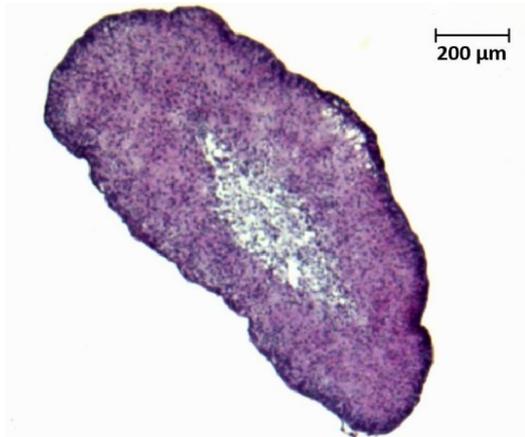
In jedem Schnittbild wurde eine identische Fläche innerhalb der der Zona fasciculata und reticularis mit der von Dr. Michael Noll-Hussong entwickelten Software ReImage analysiert, um den prozentualen Anteil der Öl-Rot-O positiven Fläche (Pixel) zu bestimmen (Abb. 7). Die Zona glomerulosa des Kortex und die Medulla wurden in die Analyse nicht miteinbezogen, da in diesen Bereichen der Nebennieren kaum Glukokortikoide produziert werden.

2.2.14.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der rechten Nebennieren

Von den bereits in Tissue-Tek fixierten Nebennieren wurden 5 µm dicke Schnitte mit dem Kryostaten angefertigt und an der Luft getrocknet. Die Schnitte wurden zunächst bei -20 °C in eiskalter Methanol-/Aceton-Lösung 1:1 für 10 min fixiert und im Anschluss in Aqua bidest ausgewaschen. Danach wurden die Schnitte für 4 min in die gefilterte Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben, wodurch die Zellkerne angefärbt wurden. Durch anschließendes 10-minütiges Spülen mit Leitungswasser wurde der pH-Wert angehoben; der Farbton schlug in blauviolett um. Es folgte die 1-minütige Zytoplasmafärbung mit Eosin (WALDECK, Münster, Deutschland), Überreste wurden mit

Aqua bidest abgespült. Durch die aufsteigende Ethanolreihe (2 x 70 % 1 min, 2 x 90 % 1 min, 2 x 100 % 2 min) wurden die Schnitte entwässert. Nach 2 x 1-minütiger Klärung in Roti®-Histol (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Schnitte mit Roti®-Histokit (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

Von den Schnitten wurden in 10x Vergrößerung Fotos mit dem Mikroskop Leica DMI6000B aufgenommen.



Abd. 8: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Nebennierenschnittes

Dargestellt ist ein Schnitt durch die rechte Nebenniere. Der Kortex umgibt das heller angefärbte Nebennierenmark.

2.2.15 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten und die Erstellung der Graphen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (Version 9.0, GraphPad Software). Sämtliche Datensätze wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors auf Normalverteilung getestet. Bei Normalverteilung wurden Ausreißer mit dem Grubb's-Test [51] ermittelt und von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Auswertung von normalverteilten Daten erfolgte mit parametrischen Tests. Bei mindestens zwei unabhängigen Gruppen, die sich in mehr als einem Faktor unterschieden, wurden die Daten mittels einer two way analysis of variance (Two-way ANOVA) analysiert. Bei einem signifikanten Haupteffekt wurden im Anschluss Bonferroni post hoc Tests durchgeführt. Für abhängige Variablen, die sich in mehr als einem Faktor unterschieden, wurde der Linear Mixed Models Test herangezogen. Nicht normalverteilte Daten wurden mit nicht parametrischen Tests analysiert, ohne zuvor auf Ausreißer zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde der Mann-Whitney-U-Test (ein Faktor, zwei unabhängige Stichproben) verwendet. Die normalverteilten Datensätze wurden als Balkendiagramme (Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) dargestellt, nicht normalverteilte Daten als Box Blots, wobei die durchgezogene Linie dem Median, die untere Box der 25. Perzentile und die obere der 75. Perzentile entsprechen. Ebenso wurden das Minimum (unterer Fehlerbalken) und das Maximum (oberer Fehlerbalken) angegeben.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dargestellt. Der CSC-Effekt beschreibt den signifikanten Unterschied zwischen SHC und CSC Mäusen. Beim Vorliegen eines GRDim-Effekts besteht ein signifikanter Unterschied zwischen GrDim und WT Mäusen.

3.3 Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf das Verhalten während des CSCs

3.3.1 OF/NO

An Tag 15 wurde der OF/NO Test zur Bestimmung der Ängstlichkeit der Tiere durchgeführt.

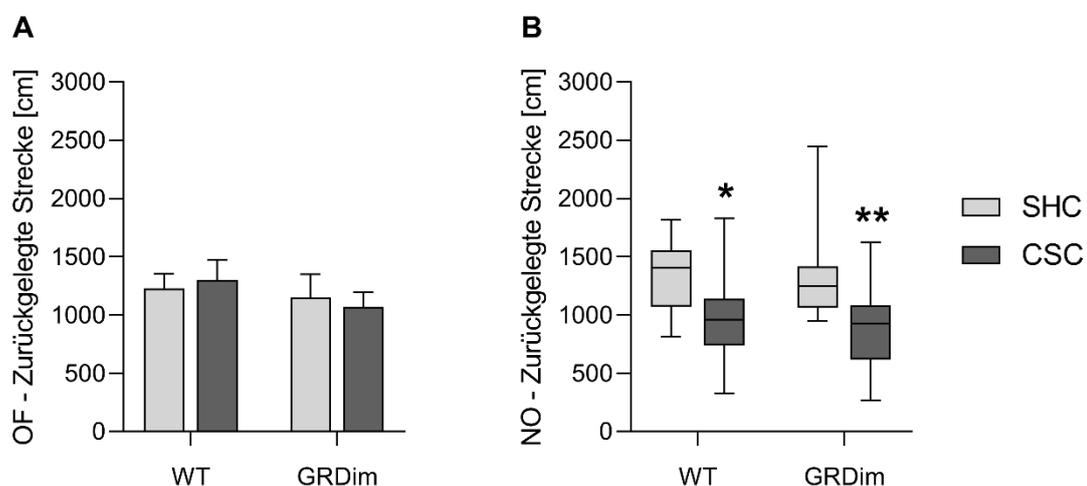


Abb. 9: Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die Lokomotion im OF/NO Test

An Tag 15 des CSCs wurde der OF/NO Test durchgeführt. In den Graphiken ist jeweils die zurückgelegte Strecke im OF (A) und im NO (B) dargestellt. Sie ist ein Maß für die Lokomotion der Tiere. Parametrische Daten sind als Mittelwert und SEM dargestellt. Nicht parametrische Daten sind als Box-Plots dargestellt. Durchgezogene Linien stehen für den Median. Die untere Box repräsentiert die 25., die obere die 75. Perzentile. Ebenso ist das Minimum (unterer Fehlerbalken) und das Maximum (oberer Fehlerbalken) dargestellt. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ vs. SHC Gruppe

SHC WT (n = 12), CSC WT (n = 11), SHC GRDim (n = 10), CSC GRDim (n = 13)

OF = Open Field, NO = Novel Object, WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoidrezeptor-dimerisierungsdefizit, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SEM = Standardfehler

Die statistische Analyse (Two-way ANOVA, Mann-Whitney-U) der Lokomotion im OF ergab weder einen signifikanten Unterschied zwischen SHC und CSC Mäusen (Faktor CSC: $F_{(1,42)} = 0,0002746$, $P = 0,987$; Abb. 9 A) noch zwischen WT und GRDim Tieren (Faktor GrDim: $F_{(1,42)} = 1,020$; $P = 0,318$; Abb. 9 A). Im NO legten sowohl die gestressten WT Mäuse ($P = 0,016$) als auch GRDim Tiere ($P = 0,006$) jeweils eine geringere Strecke zurück als die Kontrolltiere (Abb. 9 B). Zwischen WT und GRDim Mäusen konnte jedoch weder in

SHC ($P = 0,674$) noch in CSC Tieren ($P = 0,910$) ein Unterschied in der zurückgelegten Strecke nachgewiesen werden (Abb. 9 B).

Die statistische Analyse der Häufigkeit des Betretens der inneren Zone im OF ergab einen signifikanten Haupteffekt des Faktors CSC ($F_{(1,42)} = 8,991$, $P = 0,005$; Abb. 10A). In posthoc Analysen konnte gezeigt werden, dass chronischer psychosozialer Stress in GrDim Mäusen ($P = 0,019$), jedoch nicht in WT Tieren ($P = 0,277$) im Vergleich zu SHC Tieren mit einem selteneren Betreten der inneren Zone im OF einhergeht (Abb. 10 A). Für den Faktor GRDim lag kein signifikanter Haupteffekt vor ($F_{(1,42)} = 0,0674$, $P = 0,796$; Abb. 10 A).

Die Kontaktzone im NO wurde von gestressten GRDim im Vergleich zu SHC GrDim Mäusen signifikant seltener betreten ($P = 0,004$), nur ein Trend ergab sich in WT Tieren ($P = 0,075$). Sowohl in SHC ($P = 0,163$) als auch CSC Mäusen ($P = 0,305$) konnte kein GRDim Effekt nachgewiesen werden (Abb. 10 B).

Die CSC GRDim Tiere hielten sich im OF signifikant länger in den Ecken im Vergleich zu SHC GrDim Mäusen auf ($P = 0,002$; Abb. 10 C), in WT konnte nur ein Trend nachgewiesen werden ($P = 0,059$; Abb. 10 C). Im Gegensatz dazu verbrachten im NO Test sowohl gestresste WT ($P < 0,001$) als auch GRDim Mäuse ($P = 0,021$) eine signifikant längere Zeit in den Ecken verglichen mit den jeweiligen SHC Kontrolltieren (Abb. 10 D). Sowohl im OF als auch im NO lag kein signifikanter Unterschied in der in den Ecken verbrachten Zeit zwischen WT und GrDim Tieren weder in SHC (OF: $P = 0,123$, Abb. 10 C; NO: $P = 0,507$, Abb. 10 D) noch in CSC Mäusen (OF: $P = 0,820$, Abb. 10 C; NO: $0,459$, Abb. 10 D) vor.

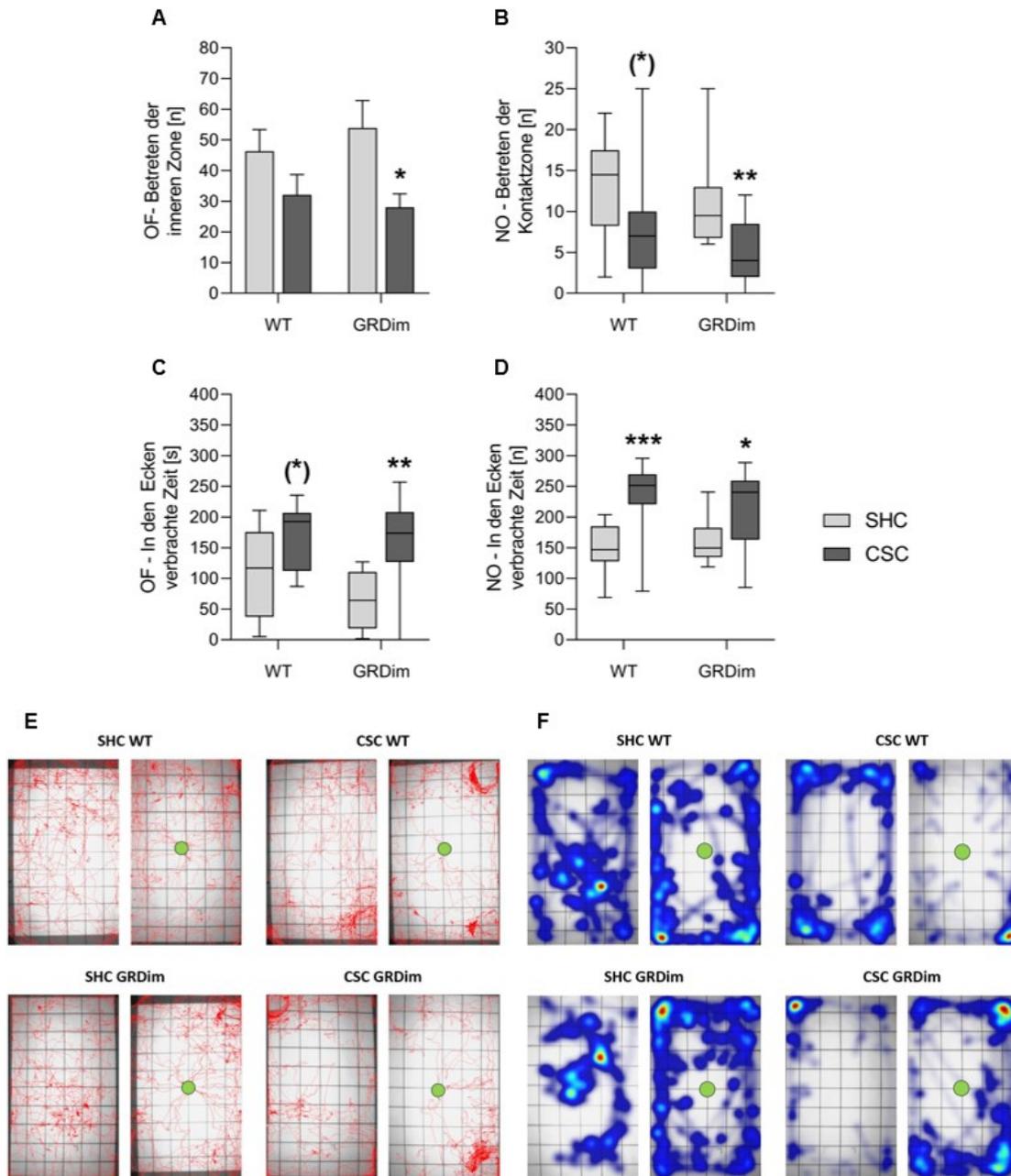


Abb. 10: Effekte des GR Dimerisierungsdefizits auf das ängstliche Verhalten im OF/NO Test

An Tag 15 des CSCs wurde der OF/NO Test durchgeführt. Die ersten beiden Graphen zeigen die Häufigkeit des Betretens der inneren Zone im OF (A) bzw. der Kontaktzone im NO (B). In C) und D) ist die in den Ecken verbrachte Zeit im OF (C) und NO (D) abgebildet. Zur Darstellung der Bewegung wurden die Tracks der Tiere aufgezeichnet (E). Die Zeit, die die Tiere in bestimmten Bereichen verbracht haben, ist in F) zusätzlich als „Heatmap“ dargestellt. Je stärker sich die blauen Bereiche rot verfärben, desto länger hielt sich die Maus in diesem Bereich auf. In E) und F) ist auf der linken Seite jeweils die Arena des OFs gezeigt, auf der rechten die Arena des NOs. Die grünen Kreise stehen für das Novel Object.

Parametrische Daten sind als Mittelwert und SEM dargestellt. Nicht parametrische Daten sind als Box-Plots dargestellt. Durchgezogene Linien stehen für den Median. Die untere Box repräsentiert die 25., die obere die 75. Perzentile. Ebenso ist das Minimum (unterer Fehlerbalken) und das Maximum (oberer Fehlerbalken) dargestellt. (* $P < 0,08$, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$ vs. SHC Gruppe

SHC WT (n = 12), CSC WT (n = 10), SHC GRDim (n = 11), CSC GRDim (n = 13)

OF = Open Field, NO = Novel Object, WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SEM = Standardfehler

3.3.2 FST

An Tag 19 wurde der FST zur Bestimmung des depressiven Verhaltens durchgeführt.

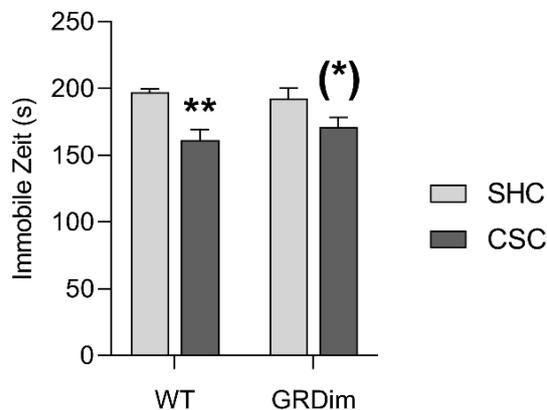


Abb. 11: Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf depressives Verhalten

An Tag 19 des CSCs wurde der FST durchgeführt. Der Versuch erstreckte sich über sechs Minuten, wobei nur die letzten 240 s für die Analysen verwendet wurden. In der Graphik ist die Zeit, in der sich die Tiere nicht bewegt haben, abgebildet. Daten zeigen den Mittelwert und SEM.

(*P) < 0,08, **P ≤ 0,01 vs. SHC Gruppe

SHC WT (n = 11), CSC WT (n = 11), SHC GRDim (n = 9), CSC GRDim (n = 13)

WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, FST = Forced Swim Test, SEM = Standardfehler

Die statistische Analyse (Two-way ANOVA) ergab einen signifikanten CSC-Haupteffekt ($F_{(1,40)} = 18,25$, $P < 0,001$; Abb. 11). In posthoc Analysen konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu GRDim Mäusen ($P = 0,06$; Abb. 11) gestresste WT eine signifikant geringere Zeit immobil waren als SHC WT Mäuse ($P < 0,001$; Abb. 11). Ein signifikanter GrDim-Haupteffekt lag nicht vor ($F_{(1,40)} = 0,152$, $P = 0,699$; Abb. 11).

3.4 Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf Thymus-, Hypophysen- und Nebennierengewicht

Nach der Tötung wurde das absolute Gewicht des Thymus, der Hypophyse und beider Nebennieren bestimmt.

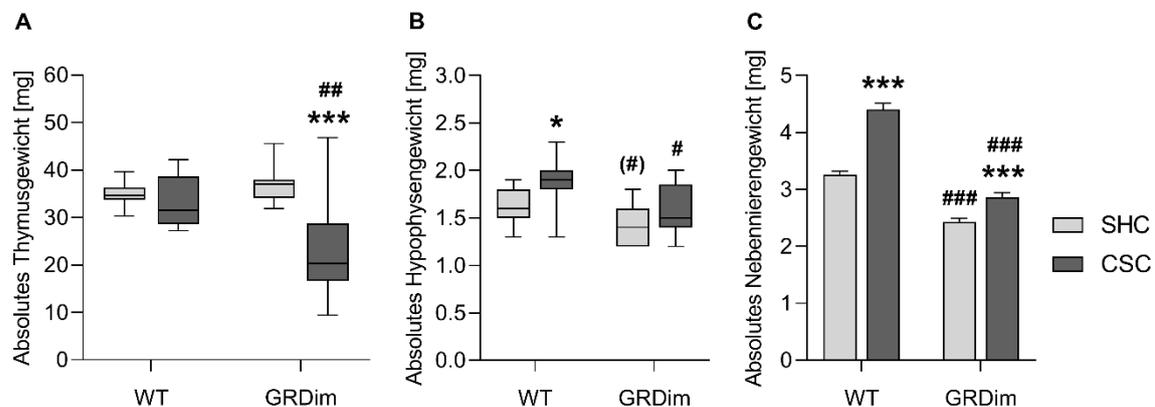


Abb. 12: Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf das absolute Gewicht des Thymus, der Hypophyse und beider Nebennieren

Im Anschluss an die Tötung der Tiere an Tag 20 wurden die Organe entnommen und gewogen. Die Graphen zeigen das absolute Thymusgewicht (A), Hypophysengewicht (B) und Gewicht beider Nebennieren (C). Parametrische Daten zeigen den Mittelwert und SEM. Nicht parametrische Daten sind als Box-Plots dargestellt. Durchgezogene Linien stehen für den Median. Die untere Box repräsentiert die 25., die obere die 75. Perzentile. Ebenso ist das Minimum (unterer Fehlerbalken) und das Maximum (oberer Fehlerbalken) dargestellt.

* $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$ vs. SHC Gruppe, (#) $P < 0,08$, # $P \leq 0,05$, ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ vs. WT

Thymus, Hypophyse: SHC WT (n = 13), CSC WT (n = 11), SHC GRDim (n = 11), CSC GRDim (n = 13)

Nebennieren: SHC WT (n = 13), CSC WT (n = 11), SHC GRDim (n = 11), CSC GRDim (n = 12)

WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, SEM = Standardfehler

Die statistische Analyse (Mann-Whitney-U) des absoluten Thymusgewichts ergab einen signifikanten CSC-Effekt in den GrDim Mäusen ($P < 0,001$; Abb. 12 A), jedoch nicht in WT Tieren ($P = 0,392$; Abb. 12 A). Im Gegensatz zu SHC Mäusen ($P = 0,186$; Abb. 12 A) wiesen gestresste GRDim verglichen mit CSC WT Tieren leichtere Thymi auf ($P = 0,004$; Abb. 12 A).

In der statistischen Analyse (Mann-Whitney-U) des absoluten Hypophysengewichts konnte gezeigt werden, dass gestresste WT Mäuse im Vergleich zu SHC WT leichtere Hypophysen aufweisen ($P = 0,018$; Abb. 12 B). In GrDim Mäusen konnte kein CSC-Effekt nachgewiesen werden ($P = 0,363$; Abb. 12 B). Des Weiteren ging das GR Dimerisierungsdefizit in gestressten GRDim Mäusen mit leichteren Hypophysen einher ($P = 0,017$; Abb. 12 B), nur ein Trend zeigte sich in SHC GrDim Tieren ($P = 0,059$; Abb. 12 B).

Die statistische Analyse (Two-way ANOVA) des absoluten Nebennierengewichts ergab einen signifikanten CSC-Haupteffekt ($F_{(1,43)} = 93,96$, $P < 0,001$; Abb. 12 C). In Post-hoc

Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl gestresste WT ($P < 0,001$; Abb. 12 C) als auch GRDim Mäuse ($P < 0,001$; Abb. 12 C) verglichen mit den jeweiligen SHC Kontrollmäusen signifikant schwerere Nebennieren aufweisen. Des Weiteren lag ein signifikanter GRDim-Haupteffekt vor ($F_{(1,43)} = 212,1$, $P < 0,001$; Abb. 12 C). Das GR Dimerisierungsdefizit ging sowohl in SHC GRDim ($P < 0,001$; Abb. 12 C) als auch CSC GRDim Mäusen ($P < 0,001$; Abb. 12 C) verglichen mit den jeweiligen WT Tieren mit signifikant leichteren Nebennieren einher.

3.5 Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die Plasma CORT- und ACTH-Konzentration

Aus dem nach der Tötung in EDTA-Röhrchen gesammelten Blut wurden die basalen CORT- und ACTH Konzentrationen im Plasma ermittelt.

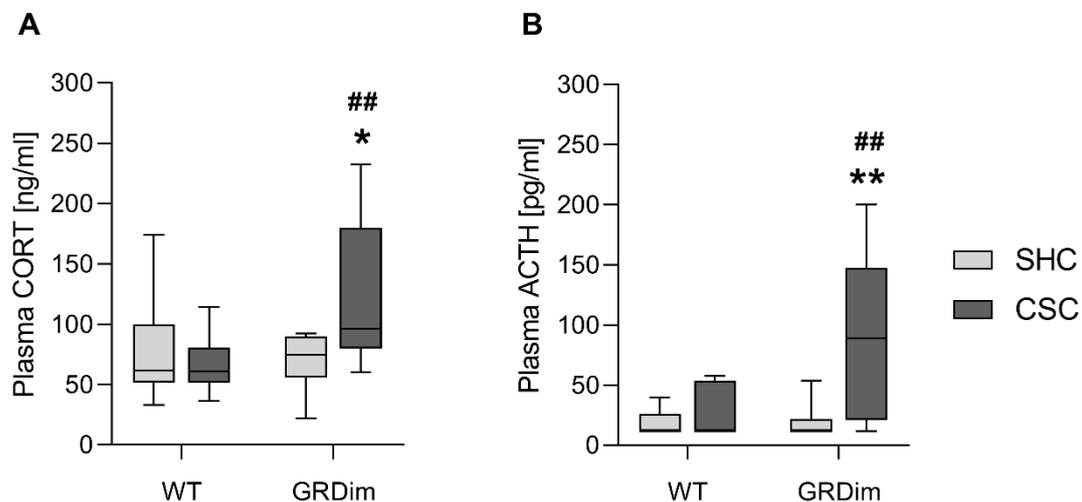


Abb. 13: Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die Plasma CORT- und ACTH-Konzentration

Im Anschluss an die Tötung wurden aus dem gewonnenen Plasma die CORT- und ACTH Konzentrationen bestimmt. A) zeigt die gemessenen Plasma CORT Level, B) die Plasma ACTH Konzentrationen.

Nicht parametrische Daten sind als Box-Plots dargestellt. Durchgezogene Linien stehen für den Median. Die untere Box repräsentiert die 25., die obere die 75. Perzentile. Ebenso ist das Minimum (unterer Fehlerbalken) und das Maximum (oberer Fehlerbalken) dargestellt. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ vs. SHC Gruppe, ## $P \leq 0,01$ vs. WT

SHC WT (n = 13), CSC WT (n = 11), SHC GRDim (n = 11), CSC GRDim (n = 13)

WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, ACTH = Adrenokortikotropin, CORT = Kortikosteron, SEM = Standardfehler

In der statistischen Analyse (Mann-Whitney-U) konnte gezeigt werden, dass gestresste GRDim Mäusen verglichen mit SHC GrDim Tieren signifikant höhere CORT ($P = 0,013$; Abb. 13 A) und ACTH Plasma Level ($P = 0,002$; Abb. 13 B) aufwiesen. In WT Mäusen ergab sich weder für das Plasma CORT Level ($P = 0,733$; Abb. 13 A) noch für die Plasma ACTH Konzentration ($P = 0,533$; Abb. 13 B) ein CSC-Effekt.

Ein signifikanter GRDim-Effekt lag in CSC Mäusen für die Plasma CORT ($P = 0,002$; Abb. 13 A) und ACTH Level ($P = 0,009$; Abb. 13 B) vor. Weder die Plasma CORT ($P = 0,832$; Abb. 13 A) noch die ACTH Konzentration ($P = 0,930$; Abb. 13 B) unterschied sich zwischen SHC WT und SHC GRDim Mäusen.

3.6 Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die *in vitro* CORT Sekretion nach ACTH Stimulation

In den linken Nebennieren wurde die *in vitro* ACTH Sensitivität anhand der CORT Produktion nach einstündiger Stimulation mit ACTH bestimmt. Die gemessene CORT Konzentration wurde auf das Gewicht der für die Stimulation verwendeten Nebennieren normiert.

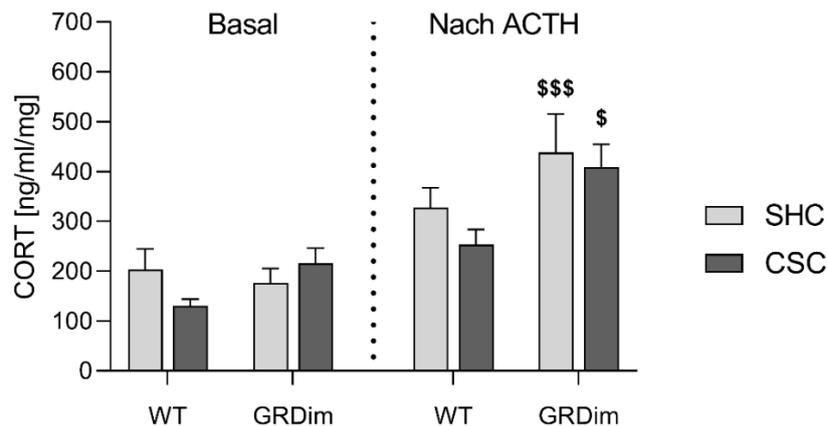


Abb. 14: Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die *in vitro* CORT Sekretion nach ACTH Stimulation

Nach der Tötung wurden die linken und rechten Nebennieren entnommen, vom Fett befreit und separat gewogen. Die rechten Nebennieren wurden eingefroren, die linken halbiert. Die Hälften wurden erneut gewogen und entweder mit NaCl (basal) oder mit 100 nM ACTH für 1 h *in vitro* inkubiert. Im Anschluss wurde aus dem Überstand die CORT Konzentration bestimmt.

Daten zeigen den Mittelwert und SEM. \$P ≤ 0,05, \$\$\$P ≤ 0,001 vs. basal

SHC WT (n = 11), CSC WT (n = 10), SHC GRDim (n = 10), CSC GRDim (n = 11)

WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, ACTH = Adrenokortikotropin, CORT = Kortikosteron, SEM = Standardfehler

Die statistische Analyse (Linear Mixed Models) ergab einen signifikanten Haupteffekt „Stimulation“ ($F_{(1,37)} = 38,56$, $P < 0,001$). In post hoc Analysen konnte gezeigt werden, dass die einstündige *in vitro* Stimulation mit ACTH in SHC GRDim ($P < 0,001$) und CSC GRDim Mäusen ($P = 0,014$) zu einer signifikanten Zunahme der CORT Konzentration im Vergleich zu den basalen CORT Leveln führt, jedoch nicht in SHC WT ($P = 0,356$) und CSC WT Tieren ($P = 0,505$). Zudem lag ein signifikanter GRDim-Haupteffekt ($F_{(1,39)} = 6,922$, $P = 0,012$) vor. In post hoc Analysen konnte jedoch weder unter basalen Bedingungen zwischen SHC ($P_{(\text{SHC WT basal vs. SHC GRDim basal})} > 0,999$) bzw. CSC Tieren ($P_{(\text{CSC WT basal vs. CSC GRDim basal})} > 0,999$) noch nach der *in vitro* Stimulation mit ACTH zwischen SHC ($P_{(\text{SHC WT ACTH vs. SHC GRDim ACTH})} = 0,784$) bzw. CSC Tieren ($P_{(\text{CSC WT ACTH vs. CSC GRDim ACTH})} = 0,123$) ein signifikanter Unterschied in der CORT Konzentration nachgewiesen werden.

Ein signifikanter CSC-Haupteffekt lag nicht vor ($F_{(1,39)} = 1,239$, $P = 0,272$) (Abb. 14).

3.7 Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die relative CRHR1, AVP1b und POMC mRNA Expression in der Hypophyse

Für die Messung der mRNA Expression von CRHR1, AVP1b und POMC in der Hypophyse wurde die RNA aus der Hypophyse isoliert und mittels qPCR vervielfältigt. Die mRNA Expression wurde ins Verhältnis zur ebenfalls bestimmten RPL mRNA Expression gesetzt.

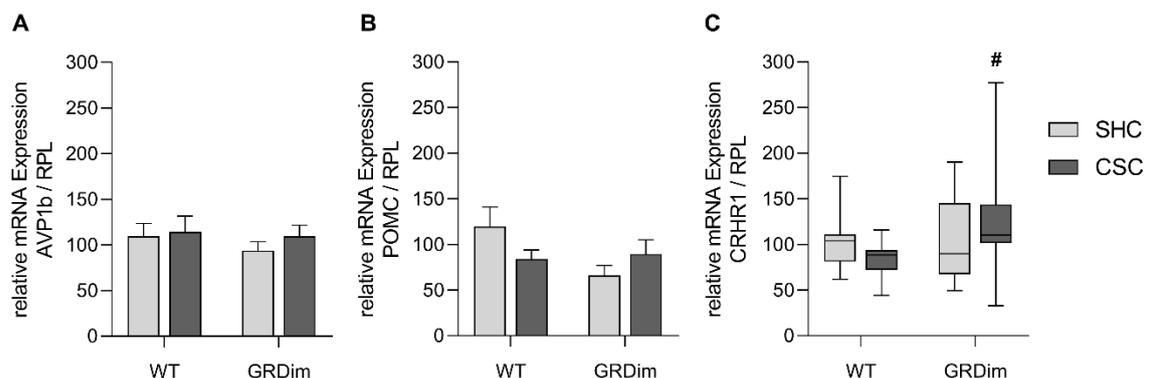


Abb. 15: Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die relative CRHR1, AVP1b und POMC mRNA Expression in der Hypophyse

Nach der Tötung wurden die Hypophysen entnommen und gewogen. Für die Bestimmung der relativen AVP1b (A), POMC (B) und CRHR1 (C) mRNA Expression in der Hypophyse wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR vervielfältigt. Alle Proben wurden an die mRNA Expression des „Housekeepergens“ RPL angepasst. Die relative mRNA Expression wurde mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode berechnet. Parametrische Daten sind als Mittelwert und SEM dargestellt. Nicht parametrische Daten sind als Box-Plots dargestellt. Durchgezogene Linien stehen für den Median. Die untere Box repräsentiert die 25., die obere die 75. Perzentile. Ebenso ist das Minimum (unterer Fehlerbalken) und das Maximum (oberer Fehlerbalken) dargestellt. # $P \leq 0,05$

AVP1b: SHC WT (n = 12), CSC WT (n = 11), SHC GRDim (n = 10), CSC GRDim (n = 12)

POMC: SHC WT (n = 12), CSC WT (n = 11), SHC GRDim (n = 11), CSC GRDim (n = 12)

CRHR1: SHC WT (n = 12), CSC WT (n = 11), SHC GRDim (n = 11), CSC GRDim (n = 13)

WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, AVP1b = Arginin-Vasopressin Rezeptor 1b, POMC = Proopiomelanocortin, CRHR1 = Corticotropin-releasing-Hormon Rezeptor 1, RPL = ribosomales Protein L, SEM = Standardfehler, cDNA = copy Desoxyribonucleinsäure, mRNA = messenger Ribonucleinsäure, qPCR = quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Die statistische Analyse mittels Two-way ANOVA ergab keinen signifikanten CSC-Haupteffekt für die AVP1b ($F_{(1,41)} = 0,5593$, $P = 0,459$; Abb. 15 A), und POMC mRNA Expression in der Hypophyse ($F_{(1,42)} = 0,1497$, $P = 0,701$; Abb. 15 B). Auch lag kein signifikanter GRDim-Haupteffekt für AVP1b ($F_{(1,41)} = 0,5756$, $P = 0,452$; Abb. 15 A), und POMC ($F_{(1,42)} = 2,419$, $P = 0,127$; Abb. 15 B) vor. Im Mann-Whitney-U-Test konnte ein signifikanter Unterschied in der CRHR1 mRNA Expression zwischen CSC WT und GRDim Mäusen ($P = 0,011$; Abb. 15 C), nicht jedoch zwischen SHC WT und SHC GRDim Tieren ($P = 0,536$; Abb. 15 C) nachgewiesen werden. Ein CSC-Effekt lag weder in WT ($P = 0,174$; Abb. 15 C) noch in GRDim Mäusen vor ($P = 0,186$; Abb. 15C).

3.8 Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die relative CRHR1 Protein Expression in der Hypophyse

Für die Bestimmung der relativen CRHR1 Protein Expression in der Hypophyse wurden die Proteine isoliert und Westernblots durchgeführt. Die erhaltenen Banden wurden an die Ladekontrolle GAPDH angepasst.

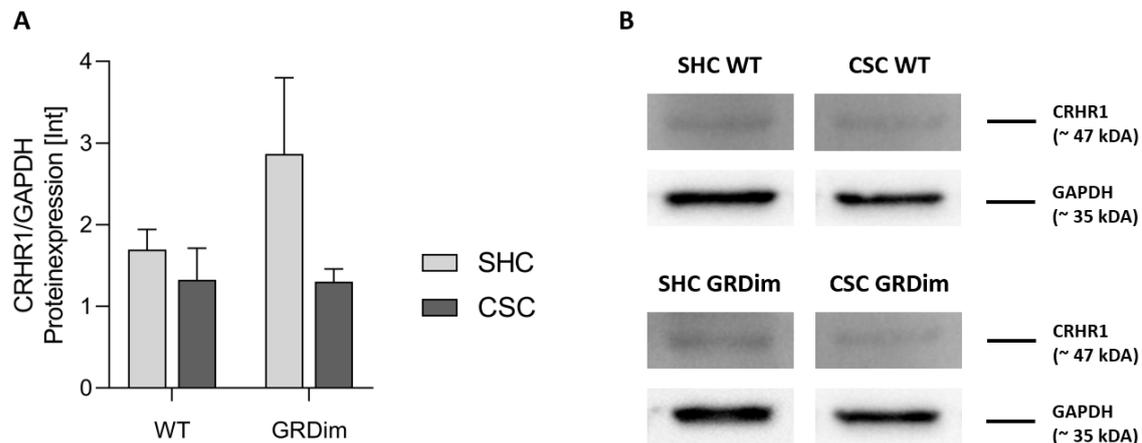


Abb. 16: Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf die relative CRHR1 Protein Expression in der Hypophyse

Nach der Tötung wurden die Hypophysen entnommen und gewogen. Für die Bestimmung der relativen CRHR1 Proteinexpression [grey density] in der Hypophyse wurden die Proteine extrahiert. Alle Proben wurden zur Ladekontrolle GAPDH normalisiert (A). Daten zeigen den Mittelwert und SEM. Repräsentative Banden für CRHR1 (~ 47 kDa) und die Ladekontrolle GAPDH (~ 35 kDa) für jede Gruppe sind in B) dargestellt.

SHC WT (n = 7), CSC WT (n = 8), SHC GRDim (n = 8), CSC GRDim (n = 8)

WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, CRHR1 = Corticotropin-releasing-Hormon Rezeptor 1, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, SEM = Standardfehler

Nach statistischer Auswertung (Two-way ANOVA) zeigte sich weder ein CSC- ($F_{(1,27)} = 3,192$; $P = 0,085$) noch ein GrDim-Haupteffekt ($F_{(1,27)} = 1,123$; $P = 0,299$) für die relative CRHR1 Protein Expression (Abb. 16 A).

3.9 Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf absolute und relative Menge der Lipidvesikel in der Nebennierenrinde

Zur Bestimmung der Menge an Lipidvesikeln in der Nebennierenrinde wurden die hergestellten Kyroschnitte mit Öl-Rot-O angefärbt und mit der Software ReImage ausgewertet.

Die statistische Analyse (Two-way ANOVA) ergab einen signifikanten CSC-Haupteffekt sowohl für die absolute ($F_{(1,43)} = 4,158$, $P = 0,048$; Abb. 18 A) als auch für die an das Nebennierengewicht angepasste ($F_{(1,40)} = 38,69$, $P < 0,001$; Abb. 18 B) mit Öl-Rot-O angefärbte Fläche. Posthoc Analysen zeigten, dass die Nebennieren gestresster WT sowohl absolut ($P = 0,004$; Abb. 18 A), als auch bezogen auf das Nebennierengewicht ($P < 0,001$; Abb. 18 B) signifikant mehr Lipidvesikel aufwiesen als der SHC WT Mäuse. Im Gegensatz dazu lag kein Unterschied in der mit Öl-Rot-O angefärbten Fläche zwischen CSC GRDim und SHC GRDim Mäusen vor (absolut: $P > 0,999$, Abb. 18 A; relativ: $P = 0,977$, Abb. 18 B).

Ein signifikanter GRDim-Haupteffekt wurde sowohl für die absolute ($F_{(1,43)} = 54,34,0$ $P < 0,001$; Abb. 18 A) als auch für die an das Nebennierengewicht angeglichenen mit Öl-Rot-O angefärbte Fläche ($F_{(1,40)} = 139,6$, $P < 0,001$; Abb. 18 B) nachgewiesen. Posthoc Analysen ergaben, dass eine signifikant kleinere Nebennierenfläche sowohl in gestressten GRDim (absolut: $P < 0,001$, Abb. 18 A; relativ: $P < 0,001$, Abb. 18 B) als auch in SHC GrDim Mäusen (absolut: $P = 0,003$, Abb. 18 A; relativ: $P < 0,001$, Abb. 18 B) angefärbt wurde im Vergleich zu den jeweiligen WT Mäusen.

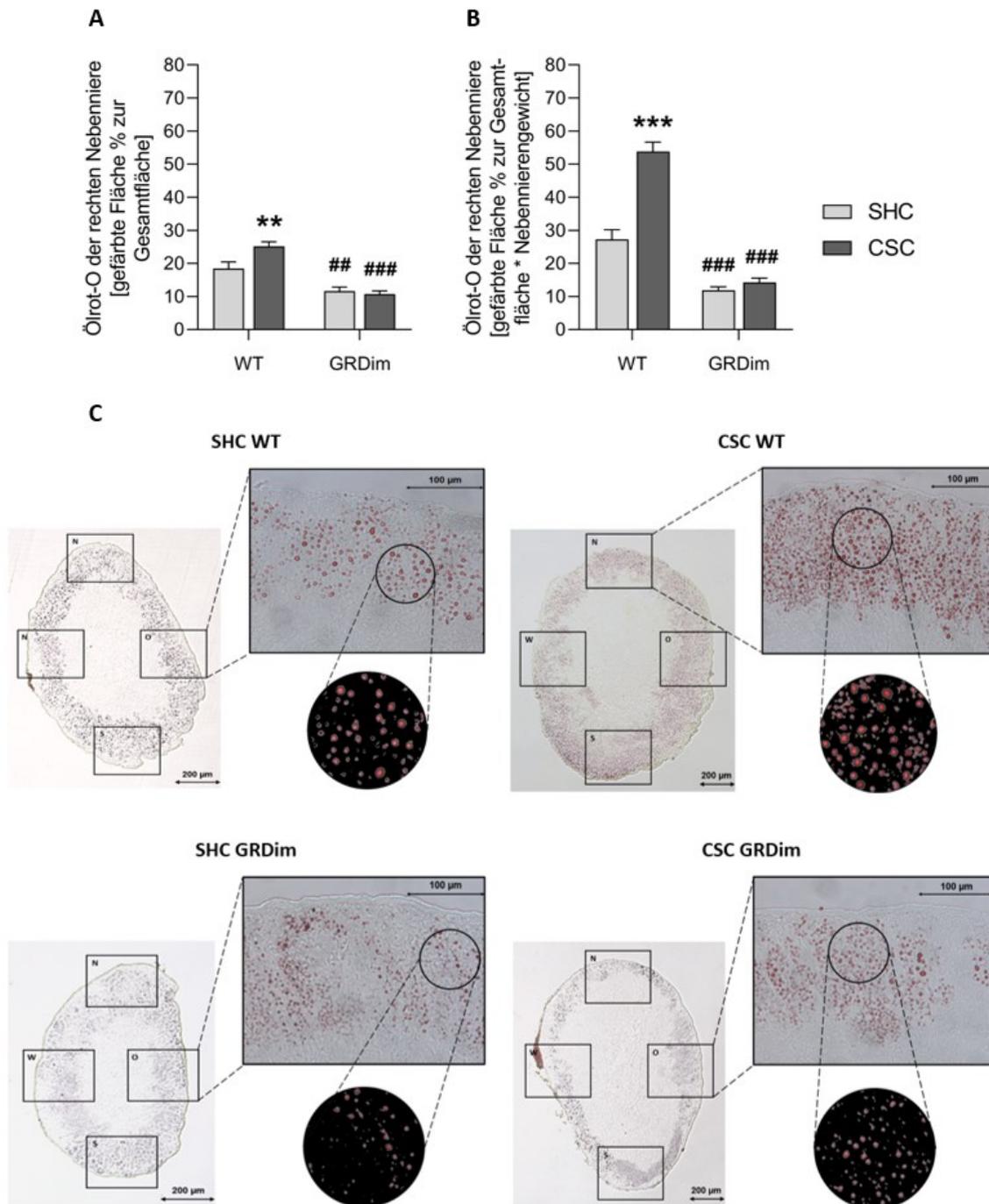


Abb. 17: Effekt des GR Dimerisierungsdefizits auf den Lipidgehalt im Nebennierenkortex

Nach der Tötung wurden die Nebennieren entnommen, vom Fett befreit und separat gewogen. Zur Bestimmung der Menge an Lipidvesikeln in der Nebennierenrinde wurden die rechten Nebennieren geschnitten und mit Öl-Rot-O angefärbt. Die Fläche der Lipidtropfen [Pixel] pro ausgewertete Gesamtfläche [Pixel] wurde bestimmt. In A) ist die mit Öl-Rot-O gefärbte Fläche dargestellt, in B) sind die Daten an das Nebennierengewicht angeglichen. In C) sind repräsentative Nebennierenschnitte aller vier Gruppen dargestellt. Pro Schnitt wurden vier 20x Vergrößerungen (N, O, S, W) erstellt und aus einem repräsentativen Bereich (300x300 Pixel) die mit Öl-Rot-O angefärbte Fläche bestimmt (Balken 100 µm). Daten zeigen den Mittelwert und SEM.

** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. SHC Gruppe, ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ vs. WT

SHC WT (n = 13), CSC WT (n = 11), SHC GRDim (n = 11), CSC GRDim (n = 12)

WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoidrezeptordimerisierungsdefizit, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, SEM = Standardfehler

3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 12: Ergebnisübersicht

WT = Wildtyp, GRDim = Glukokortikoiddimerisierungsdefizit, SHC = einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung OF = Open Field, NO = Novel Object, FST = Forced Swim Test, CORT = Kortikosteron, ACTH = Adrenokortikotropin, CRHR1 = Corticotropin-releasing-Hormon Rezeptor 1, AVP1b = Arginin-Vasopressin Rezeptor 1b, POMC = Proopiomelanocortin, mRNA = messenger Ribonukleinsäure, ⇔ = kein signifikanter Unterschied, ↑ = signifikante Zunahme, ↓ = signifikante Abnahme, (↓/↑) = Trend

	Stress-Effekt		GrDim-Effekt	
	CSC WT vs. SHC WT	CSC GrDim vs. SHC GrDim	SHC GrDim vs. SHC WT	CSC GrDim vs. CSC WT
OF - Zurückgelegte Strecke	⇔	⇔	⇔	⇔
NO - Zurückgelegte Strecke	↓	↓	⇔	⇔
OF - Betreten innere Zone	⇔	↓	⇔	⇔
NO - Betreten Kontaktzone	(↓)	↓	⇔	⇔
OF - Zeit in den Ecken	(↑)	↑	⇔	⇔
NO - Zeit in den Ecken	↑	↑	⇔	⇔
Immobile Zeit FST	↓	(↓)	⇔	⇔
Absolutes Thymusgewicht	⇔	↓	⇔	↓
Absolutes Hypophysengewicht	↑	⇔	(↓)	↓
Absolutes Nebennierengewicht	↑	↑	↓	↓
Plasma CORT Konzentration	⇔	↑	⇔	↑
Plasma ACTH Konzentration	⇔	↑	⇔	↑
<i>in vitro</i> CORT Sekretion nach Stimulation mit ACTH	Basal: ⇔ ACTH: ⇔	Basal: ⇔ ACTH: ⇔	Basal: ⇔ ACTH: ⇔	Basal: ⇔ ACTH: ⇔
	basal vs. ACTH: ⇔		basal vs. ACTH: ↑	
CRHR1 mRNA Expression	⇔	⇔	⇔	↑
AVP1b mRNA Expression	⇔	⇔	⇔	⇔
POMC mRNA Expression	⇔	⇔	⇔	⇔
CRHR1 Protein Expression	⇔	⇔	⇔	⇔
Menge an Lipidtropfen in der Nebennierenrinde	↑	⇔	↓	↓

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es mithilfe des CSC Modells die Auswirkung des globalen Wegfalls der GR Dimerisierungsfähigkeit auf die chronisch stressassoziierten Veränderungen der HPA-Achse, mit besonderem Fokus auf die Hypophyse und Nebennieren, zu untersuchen. Dafür, wurden Mäuse der Linie GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) mit bzw. ohne GR Dimerisierungsfähigkeit entweder dem CSC Modell für chronisch psychosozialen Stress oder der Einzeltierhaltung als Kontrollbedingung (SHC) ausgesetzt. Am Ende des Experiments wurden folgende Parameter genauer analysiert: Nebennieren- und Hypophysengewicht, Plasma CORT- und ACTH Konzentration, *in vitro* ACTH-Sensitivität der Nebennieren, mRNA Expression in der Hypophyse (CRHR1, AVP1b, POMC), Proteinexpression in der Hypophyse (CRHR1) und die Menge an kortikalen Lipidvesikeln in der Nebennierenrinde. Weiterhin wurde untersucht, ob sich das Fehlen der GR Dimerisierung auf typische physiologische und affektive chronisch stressassoziierte Effekte auswirkt. Hierzu zählten das Thymusgewicht und das generelle angst- und depressionsähnliche Verhalten.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass das CSC Modell auch in dieser Mauslinie GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) typische Veränderungen, die unter chronischem psychosozialen Stress auftreten, hervorruft. Hierzu zählen beispielweise ein verstärktes Angstverhalten sowie erhöhtes Nebennieren- und Hypophysengewicht. Zudem wurde erstmals gezeigt, dass das Fehlen der GR Dimerisierungsfähigkeit mit generellen morphologischen und funktionellen Veränderungen auf Hypophysen- und Nebennieren-Ebene verbunden ist, was folglich auch die Reaktivität dieser Organe auf chronischen psychosozialen Stress beeinflusst. Dies spiegelte sich in einem geringeren Hypophysengewicht der gestressten GRDim Mäuse verglichen mit CSC WT Tieren wider. Zudem ging dies mit einer erhöhten CRHR1 mRNA Expression in der Hypophyse und erhöhten ACTH Konzentrationen einher. Des Weiteren führte das GR Dimerisierungsdefizit nach chronisch psychosozialen Stress zu leichteren Nebennieren verglichen mit WT. Außerdem wurden in gestressten GRDim Mäusen im Vergleich zu CSC WT Tieren erhöhte CORT Konzentrationen gemessen. Im Einklang hiermit zeigten Mäuse mit GR Dimerisierungsdefizit in der Analyse der Ölrot-O-Färbung der Nebennieren eine signifikante Abnahme der Lipidvesikel verglichen mit WT. Die *in vitro* Stimulation der Nebennieren mit ACTH führte in den GRDim Tieren zu einer Zunahme der CORT Produktion.

Auf physiologischer Ebene wiesen CSC vs. SHC GRDim Mäuse ein geringeres Thymusgewicht auf.

Das CSC-induzierte Angstverhalten im OF/NO wurde durch das Dimerisierungsdefizit nicht beeinflusst. Trotz erhöhter CORT Level führte das CSC in GRDim Mäusen im FST nicht zu depressionsähnlichem Verhalten.

4.1 Effekte des GR Dimerisierungsdefizits auf Ebene der Hypophyse und Nebenniere

Wie bereits beschrieben, sind viele Erkrankungen, z.B. PTSD [173] mit der Entstehung von Hypokortisolismus assoziiert. Bisher ist jedoch noch nicht geklärt, wie es zu dem Hypokortisolismus kommt. Für die Untersuchung dieser Fragestellung ist das CSC Modell gut geeignet, da es u.a. zu einem reduzierten GC-Signaling und dark phase Hypokortizismus führt [38, 85, 117, 156]. Durch die Verwendung von GRDim Mäusen kann zudem geprüft werden, ob durch GR Dimerisierung vermittelte Effekte an der Entwicklung des stressbedingten Hypokortizismus beteiligt sind.

Das erste „Hauptaim“ dieser Arbeit war es deshalb zu untersuchen, wie sich der Wegfall der GR Dimerisierung auf die stressassoziierten Veränderungen der HPA Achse, mit besonderem Fokus auf Hypophyse und Nebennieren, auswirkt. Hierzu wurden verschiedene physiologische und molekulare Parameter dieser Organe analysiert.

4.1.1 Effekte des GR Dimerisierungsdefizits auf Ebene der Hypophyse

Die Hypophyse ist das intermediäre Organ in der HPA-Achse. Aus dem PVN freigesetztes CRH und AVP führen auf Hypophysenebene zur Freisetzung von ACTH, welches in der NNR die Freisetzung von CORT triggert [106]. In Anbetracht der Tatsache, dass chronisch psychosozialer Stress schwerwiegende Effekte auf die HPA-Achsen Aktivität haben kann (siehe Einleitung), ist es nicht verwunderlich, dass hierbei auch die Hypophysenphysiologie und -funktionalität stark beeinträchtigt werden können. Auf Hypophysenebene spielt der GR eine wichtige Rolle in der Regulation der Stressantwort durch negatives Feedback [72]. Die Hemmung erfolgt zum einen durch Bindung des GR an nGRE innerhalb des POMC-Promotors [30, 31], darüber hinaus kann GR die Nur77-induzierte POMC-Transkription durch einen Protein-Protein-Interaktionsmechanismus unterdrücken [96, 109].

Aus früheren Studien des CSC Modells mit C57BL6/N Mäusen ist bereits bekannt, dass chronisch psychosozialer Stress zu einer Erhöhung des Hypophysengewichts führt [44, 144]. Letzteres konnte auch in WT Tieren in der aktuellen Studie bestätigt werden. Im Detail

waren dabei Hypophysen chronisch gestresster WT signifikant schwerer im Vergleich zu den Kontrolltieren. Da in früheren Studien des CSC Modells in WT C57BL6/N Tieren gezeigt werden konnte, dass diese Zunahme auf eine Hyperplasie der corticotrophen Zellen zurückzuführen ist [44], ist es wahrscheinlich, dass dies auch in den WT Tieren der in dieser Arbeit verwendeten Mauslinie der Fall ist. Um dies jedoch zu bestätigen, muss in zukünftigen Studien die Zellzahl der Hypophysen und der Anteil an corticotrophen Zellen über beispielweise immunohistochemische Methoden bestimmt werden. Interessanterweise zeigten gestresste GRDim Mäuse diesen Effekt nicht, die Hypophysen gestresster GRDim Tiere waren sogar leichter verglichen mit den jeweiligen WT Mäusen. Möglicherweise ist die Erniedrigung des Hypophysengewichts in GRDim CSC Mäusen auf einen kompensatorischen Mechanismus zurückzuführen mit dem Ziel erhöhte ACTH Konzentrationen zu verhindern.

Im nächsten Schritt wurde das aus der Hypophyse freigesetzte ACTH bestimmt. In diesem Zusammenhang zeigten Ergebnisse aus dem CSC bereits, dass chronisch psychosozialer Stress über 19 Tage in C57BL6/N Mäusen zu erhöhten ACTH Konzentrationen im Plasma führt [42, 44]. In dieser Arbeit konnte dieser Effekt jedoch nicht in WT Mäusen nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine verminderte Sensitivität der Hypophysen gegenüber dem stimulatorischen Input aus dem PVN zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu den WT Tieren zeigten gestresste GRDim Mäuse jedoch signifikant erhöhte ACTH Level verglichen mit CSC WT und SHC GRDim Tieren. Da in GRDim Mäusen chronischer psychosozialer Stress mit einer Abnahme des Hypophysengewichts einherging, kann folglich ein erhöhtes Hypophysengewicht nicht für eine erhöhte ACTH Ausschüttung in gestressten GRDim Mäusen verantwortlich sein.

Die ACTH Produktion und Sekretion aus den corticotrophen Zellen der Hypophysen wird durch CRH und AVP initiiert, die an entsprechende Rezeptoren (CRHR1 bzw. AVP1b) im anterioren Lappen der Hypophyse binden [60, 106]. Um deshalb im nächsten Schritt herauszufinden, wie diese erhöhten ACTH Werte in gestressten GRDim Mäusen vermittelt werden, wurden die relativen mRNA Expressionen dieser Rezeptoren und die CRHR1 Protein Expression bestimmt. Für die Bestimmung der CRHR1 Proteinexpression wurden pro Gruppe maximal acht Tiere untereinander verglichen, da im Verlauf Mäuse nachgezüchtet werden mussten und erst nach Beendigung dieser Arbeit erneute Western Blot Analysen durchgeführt werden konnten. In früheren Studien des CSCs führte chronischer Stress in C57BL6/N Mäusen zu einer Zunahme der AVP1b Proteinexpression bei unveränderter CRHR1 Expression [44]. Verglichen mit ungestressten WT Mäusen ergaben

sich nun jedoch keine Unterschiede in der CRHR1 mRNA und Proteinexpression und der AVP1b mRNA in CSC WT Tieren. Da aus früheren Studien bekannt ist, dass die AVP1b mRNA Expression oftmals nur begrenzt mit der Proteinexpression korreliert [28, 112, 163], kann jedoch aus der mRNA nicht zwingend auf die Proteinexpression geschlossen werden, weshalb diese für AVP1b noch in weiteren Studien bestimmt werden sollte. Auch zwischen SHC und CSC GRDim Mäusen waren CRHR1 mRNA und Proteinexpression und AVP1b mRNA vergleichbar, bei jedoch erhöhten ACTH Konzentrationen im Plasma. Dies spricht dafür, dass eine verstärkte Sensitivität der Hypophyse für CRH und AVP nicht für die erhöhten Konzentrationen an ACTH verantwortlich sein können.

Unter stressfreien SHC Bedingungen gab es sowohl in der CRHR1 und AVP1b mRNA Expression als auch der CRHR1 Proteinlevel keine Unterschiede zwischen WT und GRDim Mäusen. Weiterhin war die CRHR1 mRNA Expression gestresster GRDim Tiere trotz unveränderter Protein Expression im Vergleich zu WT erhöht. Wie bereits erwähnt, ist aus zahlreichen Studien bekannt, dass die mRNA Expression beispielsweise für AVP1b nur begrenzt mit der Proteinexpression korreliert [28, 112, 163]. Dies deutet darauf hin, dass der Proteingehalt nicht primär von der Höhe der mRNA abhängt, sondern von der Effizienz der mRNA-Translation in Proteine und von posttranslationalen Ereignissen. Daher liegt es nahe, dass in Bezug auf CRHR1 nur bei den gestressten GRDim Tieren posttranskriptionale Prozesse weniger effektiv ablaufen.

Die Bindung von CRH und AVP an ihre entsprechenden Rezeptoren in der Hypophyse induziert die POMC mRNA Synthese [106], woraus durch Schneideenzyme (Prohormon-convertase 1) ACTH freigesetzt wird [174]. Neben einer verstärkten CRHR1 bzw. AVP1b Expression kann die ACTH Freisetzung deshalb durch einen Anstieg der POMC mRNA Expression vermittelt sein. In dieser Arbeit war die POMC mRNA Expression zwischen SHC und CSC WT vergleichbar. Da Füchsl et. al. in C57BL6/N Tieren bereits zeigen konnten, dass CSC die POMC Protein Expression nicht beeinflusst [44], stehen die Ergebnisse der aktuellen Arbeit in Einklang mit bereits veröffentlichten Daten des CSC Modells. Ebenso unterschied sich die POMC mRNA Expression der CSC GRDim Mäuse nicht von den GRDim Kontrolltieren. Da jedoch in CSC GRDim Mäusen erhöhte ACTH Level gemessen wurden, könnte dies auf einen erhöhten Umsatz von POMC zurückzuführen sein. In zukünftigen Studien könnte daher der POMC Umsatz quantifiziert werden.

Im Gegensatz zur Hypophyse sind die Mechanismen des genomischen negativen Feedbacks durch GC auf Ebene des PVNs bisher noch nicht vollständig verstanden. Malkoski und Dorin zeigten, dass die direkte Bindung von GR an das nGRE im CRH Promoter die CRH

Expression reduziert [95]. Die Ergebnisse anderer Studien deuten darauf hin, dass durch Protein-Protein-Interaktion zwischen GR und zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) „response element-binding protein“ (CREB) die Bindung von CREB an „cAMP response element“ (CRE) und damit die CRH Transkription unterdrückt wird. Auf jeden Fall ist an dem Feedback der GR beteiligt [52, 171], denn ein komplettes Fehlen des GRs geht mit einer deutlich erhöhten CRH Expression einher [79]. Da Stress trotz Dimerisierungsdefizit verglichen mit Kontrolltieren zu keinen Veränderungen in der AVP1b mRNA Expression und der CRHR1 Proteinexpression führt, wäre eine Konzentrationsbestimmung von AVP und CRH im Hypothalamus sehr interessant. Es wäre möglich, dass die erhöhten ACTH Level auf eine gesteigerte Freisetzung von CRH und AVP aus dem PVN aufgrund eines gestörten Feedbacks zurückzuführen sind.

4.1.2 Effekte auf physiologische Parameter der Nebennieren

Die Nebenniere ist ein endokrines Organ, in welchem zahlreiche Hormone gebildet werden. In der NNR werden Steroide, Androgene und Aldosteron synthetisiert, aus dem Nebennierenmark werden Epinephrine freigesetzt [128]. Auf diese Weise ist die Nebenniere an der Regulation vieler physiologischer Prozesse beteiligt, u.a. der Stressantwort [128]. Vor kurzem konnte zudem gezeigt werden, dass GC durch Interaktion mit dem GR über einen sog. „Ultra-Short-Feedback-Mechanismus“ die ACTH Sensitivität auf Ebene der Nebennieren und damit ihre eigene Produktion direkt beeinflussen können [165]. Aufgrund der zentralen Rolle der Nebennieren in der Stressregulation, wurde in dieser Arbeit auch die Auswirkung des GR Dimersierungsdefizits auf die physiologischen Parameter der Nebenniere untersucht.

Es ist aus zahlreichen Studien bekannt, dass chronischer Stress mit einer Zunahme des Nebennierengewichts einhergeht [8, 119, 135]. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass dies auch bereits in mehreren Studien des CSC Modells (C57BL/6N Mäuse) nachgewiesen werden konnte [43, 84, 117, 156]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem kürzlich zeigen, dass eine Erhöhung des Nebennierengewichts neben einer Atrophie des Thymus einer der Prädiktoren dafür ist, ob ein Tier chronisch gestresst ist oder nicht [84].

Auch in dieser Arbeit führte chronisch psychosozialer Stress in WT Tieren zu schwereren Nebennieren. Somit ist dieser Effekt nicht nur in C57BL/6N Tieren nachgewiesen, sondern auch auf andere Mauslinien, wie beispielsweise GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO), übertragbar. Der Wegfall der GR Dimerisierung ging sowohl in SHC als auch CSC GRDim Tieren mit leichteren Nebennieren einher verglichen mit WT Mäusen. Hierbei handelt es sich

möglicherweise um eine kompensatorische Reaktion, um bei fehlender GR Dimerisierung erhöhte CORT Konzentrationen zu verhindern. Noch ist jedoch nicht bekannt, ob von der Gewichtsabnahme Nebennierenrinde und Nebennierenmark in gleichem Maße betroffen sind. Dies könnte in weiteren Studien beispielsweise durch Anfärben von Nebennierenschnitten und Berechnung der jeweiligen Flächen untersucht werden.

Interessanterweise konnte nicht nur in WT Mäusen nach chronisch psychosozialen Stress eine Gewichtszunahme der Nebennieren beobachtet werden. Trotz des GR Dimerisierungsdefizites führte chronische psychosoziale Stressexposition zu einer signifikanten Zunahme des Nebennierengewichts in CSC GRDim Mäusen verglichen mit SHC GRDim Tieren. Die Vergrößerung der Nebennierenmasse wird dabei vermutlich wie bei C57BL/6N Tieren durch Zellhyperplasie vermittelt [43, 117, 156], wobei dies zur Bestätigung der Hypothese in weiteren Studien genauer untersucht werden sollte.

Die Nebennieren sind bekanntlich das Endorgan der HPA-Achse. Durch Bindung von ACTH an den M2CR an der Zelloberfläche der Nebennierenrindenzellen v.a. der Zona fasciculata wird die Synthese und Freisetzung von CORT induziert [50]. Um die Funktionalität der Nebennieren zu überprüfen, wurde deshalb im nächsten Schritt die CORT Konzentration im Plasma bestimmt. In dieser Arbeit konnte kein Unterschied in den CORT Leveln zwischen SHC und CSC WT Mäusen gefunden werden. Dieser Effekt ist bereits aus veröffentlichten Studien des CSC Modells mit C57BL/6N Mäusen bekannt [39, 42, 43, 117, 156]. Die vergleichbaren CORT Werte trotz schwererer Nebennieren und gleicher ACTH Level lassen vermuten, dass es auf Ebene der Nebennieren unter chronischem Stress zu einer verminderten Sensitivität gegenüber ACTH kommt. Diese These wird auch von Fuchs et al. unterstützt [44, 45]; hier erhalten die Nebennieren jedoch einen erhöhten stimulatorischen Input aufgrund der erhöhten ACTH Level. Der Mechanismus, der zu einer verminderten Sensitivität gegenüber ACTH führt, ist auf Ebene der Nebennieren noch nicht vollständig verstanden. Uschold-Schmidt et al. zeigten jedoch bereits, dass in C57BL/6N Mäusen unter chronisch psychosozialen Stress die Proteinexpression von MC2R in der Nebenniere unverändert ist und damit vermutlich nicht für die verminderte Sensitivität gegenüber ACTH verantwortlich ist [156]. Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse auch auf die in dieser Arbeit verwendete Mauslinie zutreffen, müsste in zukünftigen Studien die Proteinexpression von M2CR beispielsweise mittels Western Blots untersucht werden. Interessanterweise wiesen CSC GRDim Mäuse im Vergleich zu SHC GRDim Mäusen und CSC WT erhöhte CORT Konzentrationen auf. Die mögliche Beeinträchtigung im Feedback kann unter basalen Bedingungen vermutlich durch die Abnahme des Nebennierengewichts

kompensiert werden. Unter chronischem Stress kann in CSC GRDim Tieren der durch eine erhöhte Ausschüttung von ACTH vermittelte Anstieg der Plasma CORT Konzentration offensichtlich nicht mehr durch die Gewichtsreduktion des Organes verhindert werden.

4.1.3 Nebennierenstimulation

Die bereits diskutierten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Plasma CORT Level in den GRDim Tieren über Veränderungen in der ACTH Konzentration mediiert werden. Dennoch sollte zusätzlich untersucht werden, ob der Wegfall der GR Dimerisierungsfähigkeit die ACTH Sensitivität der Nebennieren beeinflusst. Um dies zu testen, wurde die *in vitro* Sensitivität der linken Nebenniere gegenüber einer pharmakologischen Dosis (100 nM) an ACTH ermittelt. Diese Methode wurde bereits in verschiedenen Studien des CSCs mit C57BL/6N Mäusen angewandt. Dabei wurde gezeigt, dass die Nebennieren gestresster C57BL/6N Tiere nach 19 Tagen CSC im Vergleich zu SHC Tieren auf den Stimulus ACTH *in vitro* signifikant weniger CORT produzieren [86, 87, 156]. Die genauen Mechanismen sind nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass dies dem Schutz der CSC Tiere vor erhöhten CORT Leveln bei schweren Nebennieren dient [156]. Trotzdem reagieren die Nebennieren der CSC Mäuse nach 19 Tagen CSC adäquat auf einen akuten heterotypen Stressor, was sich in erhöhten Plasma CORT Leveln 5 Minuten nach dem Verhaltenstest Elevated Platform (EPF) zeigt [156].

In der vorliegenden Studie wurde durch 1 h *in vitro* Stimulation mit ACTH (100 nM) die CORT Konzentration weder der SHC WT noch der CSC WT Mäuse beeinflusst. Als mögliche Ursache kann eine zu geringe verwendete Menge an ACTH nahezu ausgeschlossen werden, da Uschold-Schmidt et al. bereits zeigen konnten, dass durch *in vitro* Stimulation mit einer pharmakologischen Dosis von ACTH (100 nM), welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde, die Nebennieren der SHC wie auch der CSC Mäuse signifikant mehr CORT produzieren [156]. Ein Unterschied zu den bisher publizierten Studien ist jedoch, dass die Nebennieren der Tiere in der vorliegenden Arbeit 1 h, anstatt wie bisher veröffentlicht, 6 h [87, 156] mit ACTH inkubiert wurden. In nicht publizierten Daten konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass auch die einstündige *in vitro* Inkubation mit ACTH (100 nM) vergleichbare Ergebnisse liefert.

Die Versuche in dieser Studie wurden jedoch mit einer anderen Mauslinie GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) durchgeführt. Die fehlende Zunahme der CORT Produktion der Nebennieren der WT Mäuse nach 1 h *in vitro* Stimulation mit ACTH (100 nM) könnte auf eine verzögerte Reaktion auf ACTH im Vergleich zu C57BL/6N Mäusen beispielsweise

aufgrund einer reduzierten Expression von MC2R zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu WT Mäusen produzierten die Nebennieren der GRDim Tiere nach der 1 h *in vitro* Stimulation mit ACTH mehr CORT. Möglicherweise weisen diese Tiere aufgrund der Beeinträchtigung des negativen Feedbacks bei fehlender GR Dimerisierung eine erhöhte Expression an MC2R auf und reagieren damit empfindlicher auf ACTH. Es konnte nämlich bereits früher gezeigt werden, dass der GR die MC2R Expression beeinflusst [54, 165]. Dies erfolgt über die Komplexbildung von GR mit „steroidogenic factor 1“ (SF-1), welcher nun die Genexpression von „dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene 1“ (DAX-1) induziert. DAX-1 wiederum hemmt die Expression des MC2Rs [54]. Zur Überprüfung dieser These sollte in weiteren Studien die MC2R, DAX-1 und SF-1 Expression in den Nebennieren bestimmt werden.

4.1.4 Lipidvesikel in der Nebennierenrinde

Wie bereits beschrieben, unterschied sich die CORT-Produktion der SHC GRDim und SHC WT Mäuse trotz leichter Nebennieren in den GRDim Tieren bei vergleichbaren ACTH Leveln nicht. Aus diesem Grund wurden in SHC und CSC Tieren die Effekte des globalen GR Dimerisierungsdefizits auf die Fähigkeit der Nebennieren CORT zu produzieren näher untersucht. Es gibt verschiedene Quellen für freies Cholesterin, dem Vorläufer der Steroide: zum einen wird Cholesterin mittels 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) aus freien Fettsäuren synthetisiert [131], zum anderen werden Cholesterylester (CE) in low-density lipoproteins (LDL) endozytotisch über die Bindung an den LDL Rezeptor aufgenommen und in Endosomen daraus freies Cholesterin gebildet [76]. Alternativ werden aus Lipoproteinen (LDL bzw. High-density lipoprotein) nach der Bindung an den SR-B1 CE direkt freigesetzt und in Lipidtropfen gespeichert [116, 169]. Durch die HSL wird aus CE freies Cholesterin gewonnen [77, 80].

In bisherigen Studien des CSC Modells mit C57BL/6N Mäusen veränderte sich die Anzahl der Lipidtropfen in der Nebennierenrinde nach 19-tägigem CSC nicht [43]. Zudem unterschied sich die Proteinexpression zahlreicher Enzyme (HSL, HMG-CoA-Reduktase) und Rezeptoren (LDL-R), die an der Bereitstellung von freiem Cholesterin, dem Vorläufer der Steroide, beteiligt sind, nicht, mit der Ausnahme von SR-B1, dessen Expression sogar erhöht war [43]. Außerdem waren die Level für MC2R und steroidogenic acute regulatory protein (StAR) mRNA, dem Schrittmacherenzym der Steroidgenese, vergleichbar [156]. In dieser Arbeit wurde in erste Linie die Menge an Lipidvesikeln, in denen CE gespeichert werden, bestimmt. Hierbei enthielt die Nebennierenrinde der CSC WT Mäuse signifikant

mehr Lipidvesikel als die der SHC WT Tiere. Wie bereits beschrieben, ging Stress zudem mit schwereren Nebennieren einher. Die erhöhte Anzahl an Lipidvesikeln wie auch die Gewichtszunahme der Nebennieren könnte dazu dienen, auf Stress besser vorbereitet zu sein, denn im Rahmen einer akuten Stressreaktionen werden GC u.a. aus in Lipidvesikeln gespeicherten CE in der Nebenniere gebildet [23]. Da die Mäuse am Morgen getötet und die Nebennieren, in welchen die Anzahl der Lipidvesikel bestimmt wurde, anschließend eingefroren wurden, spiegeln die Nebennieren die Situation am Morgen wider. Eine Erklärung für die beschriebenen Effekte wäre deshalb, dass die CE noch nicht für die gesteigerte CORT Produktion am Abend im Rahmen der circadianen Rhythmik verbraucht wurden. Zudem sind die Residents nachts aktiver, weshalb die Mäuse überwiegend am Abend bzw. in der Nacht gestresst wurden. Warum sich jedoch diese Ergebnisse von bisherigen aus dem CSC mit C57BL/6N Mäusen unterscheiden, ist unklar. Um dies zu überprüfen, könnten beispielsweise Schlüsselenzyme und Rezeptoren der Cholesterinbereitstellung wie HSL, LDL-R, SR-B1, HMG-CoA-Reduktase, MC2R und StAR mRNA in weiteren Studien untersucht werden. Unterschiede in der Expression könnten für die differenten Ergebnisse zwischen C57BL/6N Mäusen und GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) verantwortlich sein.

Im Vergleich mit WT enthielt die Nebennierenrinde der SHC und CSC GRDim Mäuse interessanterweise auch unter Berücksichtigung des Nebennierengewichts signifikant weniger Lipidvesikel. Ähnlich wie bei dem Effekt des reduzierten Nebennierengewichts in GRDim Mäusen handelt es sich dabei vermutlich ebenfalls um einen Anpassungsmechanismus, um bei fehlender GR Dimerisierung erhöhte CORT Level zu verhindern. In Bezug auf die reduzierte Anzahl an Lipidtropfen bzw. CE wäre daher zunächst interessant, inwieweit die Expression von v.a. LDL-R, SR-B1 und HSL durch GRDim reguliert wird.

Im Gegensatz zu WT Mäusen unterschied sich die Anzahl der Lipidvesikel zwischen CSC und SHC GRDim Tieren nicht. Dies kann Folge eines vermehrten Verbrauches der CE für die Bildung von CORT in den CSC GRDim Mäusen sein, welcher an den erhöhten Plasma CORT Leveln in gestressten GrDim Tieren im Vergleich zu SHC GRDim sichtbar ist.

Neben dem bereits beschriebenen Feedback auf Ebene der Hypophyse wird zudem seit kurzem vermutet, dass auch auf Ebene der Nebennieren GC ihre eigene Produktion über einen sog. „Ultra-Short-Feedback-Mechanismus“ verringern. Letzterer könnte auch in die Entstehung von Hypokortizismus involviert sein [165]. GR befinden sich im Zytoplasma der Nebennierenrindenzellen u.a. in einen Komplex mit SF-1. Durch Bindung der GC an diesen

Komplex transloziert dieser in den Zellkern und fördert die Genexpression von DAX-1. DAX-1 hemmt wiederum die MC2R und StAR Expression und damit die CORT-Produktion [54]. Unter dem Einfluss von ACTH kommt es zu einer Dissoziation des SF-1 vom Komplex. SF-1 transloziert nun in den Zellkern und fördert dort die Transkription von StAR und MC2R [54]. Dies unterstützt die Hypothese eines GR vermittelten intraadrenalen Negativ-Feedback-Mechanismus und die Rolle von ACTH und CORT bei der Regulation der Steroidgenese in der Nebenniere [165]. Diese Reduktion von StAR und MC2R könnte somit die Sensitivität der Nebennieren auf ACTH verringern und zum Hypokortizismus führen. Um zu testen, ob durch die fehlende Dimerisierung des GRs dieser Feedbackmechanismus beeinträchtigt wird, wäre eine Bestimmung von DAX-1, StAR und SF-1 in zukünftigen Experimenten sinnvoll.

4.2 Effekte des GR Dimerisierungsdefizits auf das Verhalten (OF/NO, FST)

Chronischer Stress ist ein Risikofaktor für psychische Erkrankungen, wie Angst [71] und Depressionen [66, 71, 145]. Viele Studien konnten die Reaktivität der HPA-Achse und das GC-Signaling mit der Entstehung dieser Erkrankungen in Verbindung bringen. Eine gute Möglichkeit, um die Mechanismen hinter der Entstehung stress-induzierter psychischer Erkrankungen zu untersuchen, ist das CSC Modell. In diesem werden chronische, psychologische und soziale Aspekte des Stresses miteinander vereint. Somit wird eine große Bandbreite gesundheitsgefährdender Stressoren abgedeckt. Zudem kommt es zu einer Beeinträchtigung des GC-Signaling [85]. Das 19-tägige CSC induziert in C57BL/6N Mäusen ängstliches Verhalten, was in unterschiedlichen Verhaltenstests zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt werden konnte: OF/NO an Tag 14 [39] und 19 [87, 159], EPM an Tag 19 [117]. Auch 4 und 8 Tage nach dem CSC verbrachten gestresste Mäuse weniger Zeit auf den offenen Armen des EPMS [144]. Neben ängstlichem Verhalten kommt es im Rahmen des CSC zu abendlichem Hypokortizismus [86, 117]. Hyperkortizismus wird jedoch dagegen mit depressiven Verhalten assoziiert [66]. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass der Wegfall der Dimerisierung des GRs, falls die Dimerisierung für die Entstehung dieser Erkrankungen eine Rolle spielt, dazu führt, dass CSC GRDim Tiere eher depressionsähnliches Verhalten und keine Angst zeigen.

Um den Einfluss des GR Dimerisierungsdefizit auf das ängstliche- und depressive Verhalten der Mäuse zu untersuchen, wurden deshalb an Tag 15 der OF/NO und an Tag 19 der FST durchgeführt. In den meisten bisher durchgeführten Experimenten des CSCs erfolgten die

Verhaltenstest an Tag 19 [87, 117, 159]. An Tag 19 verbrachten beispielsweise gestresste C57BL/6N Mäuse signifikant weniger Zeit auf dem offenem Arm im EPM im Vergleich zu den Kontrolltieren [108]. Foertsch et al. konnte zeigen, dass bereits an Tag 14 des CSCs ängstliches Verhalten (OF/NO) auftritt, sichtbar an einer signifikant länger verbrachten Zeit in den Ecken im OF und NO und einer geringeren zurückgelegten Strecke im NO in C57BL/6N Mäusen [39]. Auch in diesem Experiment induzierte das CSC Modell chronischen psychosozialen Stress, welcher mit ängstlicherem Verhalten einherging. Letzteres war erkennbar an der signifikant länger in den Ecken verbrachten Zeit der gestressten WT Mäuse gegenüber den SHC WT im OF und NO. Zudem legten die gestressten Mäuse im NO eine geringe Strecke als SHC Tiere zurück. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die in diesen Experimenten verwendete Mausrasse GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) ängstliches Verhalten im Rahmen des CSCs entwickelt.

Eine generell reduzierte Lokomotion kann ausgeschlossen werden, da sich die zurückgelegte Strecke, welche ein Marker für die Lokomotion ist [138], im OF zwischen den CSC und SHC Tieren nicht unterschied.

Auch die gestressten GRDim Mäuse verbrachten signifikant mehr Zeit in den Ecken im OF und NO. Zudem legten die gestressten GRDim Mäuse im NO eine geringe Strecke als SHC Tiere zurück. Die zurückgelegte Strecke im OF unterschied sich zwischen den GRDim CSC und SHC Tieren nicht. Im OF führte Stress in GRDim Mäusen zu einem selteneren Betreten der inneren Zone bzw. der Kontaktzone im NO. Die Ergebnisse zeigen, dass auch bei Mäusen mit GR Dimerisierungsdefizit chronischer Stress mit einer Zunahme des ängstlichen Verhaltens einhergeht. Nach 15 Tagen chronischen Stresses unterschieden sich GrDim Mäuse und WT bis auf die Häufigkeit des Betretens der inneren Zone im OF bzw. der Kontaktzone im NO nicht in ihrem ängstlichen Verhalten. Interessanterweise ging ein kompletter Knockout des GRs im ZNS (GRNesCre), bei dem in betroffenen Mäusen bereits unter basalen Bedingungen (Tiere wurden für 7 Tage einzeln gehalten) erhöhte CORT Level gemessen wurden, mit reduziertem Angstverhalten einher. So verbrachten GRNesCre Mäuse signifikant mehr Zeit in den offenen Bereichen des „elevated zero maze“ [152]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass GC und damit der GR an der Entwicklung von ängstlichen Verhalten beteiligt sind. Weiterhin liegt es nahe, dass die Wirkung der GC nicht über die Dimerisierung des GR erfolgt, denn, wie bereits oben beschrieben, zeigten sowohl gestresste WT als auch GRDim Mäuse im Vergleich zu SHC Tieren ängstlicheres Verhalten. Auch unter stressfreien Bedingungen ergaben sich keine Unterschiede zwischen GRDim und WT Mäusen im OF/NO. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Studien. Oitzl et.

al fand beispielsweise ebenfalls keinen Unterschied zwischen nicht gestressten GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) Mäusen und Kontrolltieren in der Lokomotion sowie im ängstlichen Verhalten im OF bzw. Light/Dark Preference (L:D) Test [104].

Aufgrund der Annahme, dass CSC zu depressions-ähnlichem Verhalten führt, wenn das Feedback der HPA-Achse durch das Fehlen der GR Dimerisierung beeinträchtigt ist, wurde an Tag 19 der FST durchgeführt. Aus anderen Studien ist bekannt, dass Hyperkortizismus mit Depression einhergeht. Iniguez zeigte beispielweise, dass „Social Defeat Stress“ über 10 Tage in Mäusen (C57BL/6N) zu einem zu höheren Plasma CORT Leveln, zum anderen zu depressions-ähnlichem Verhalten (gemessen im FST) führt [66]. Weiterhin ist bekannt, dass eine Injektion von CORT über einen Zeitraum von 21 Tagen ebenfalls depressions-ähnlichem Verhalten hervorruft [89, 92].

Aus Versuchen des CSC Modells (C57BL/6N) ist bereits bekannt, dass es kein depressions-ähnliches Verhalten induziert [144]. Analog dazu zeigten die gestressten WT der vorliegenden Studie kein depressions-ähnliches Verhalten. Letztere verhielten sich hyperaktiv. Dies ist ein gutes Beispiel dafür, dass das CSC Modell sowohl in C57BL/6N als auch in GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) Mäusen nicht zu depressions-ähnlichem Verhalten führt. In gestressten GRDim Mäusen konnte verglichen mit SHC GRDim Tieren nur im Trend eine geringere immobile Zeit nachgewiesen werden. Aufgrund des geringen Abstandes zur Signifikanz sollten Tiere nachgezüchtet und ebenfalls auf depressions-ähnliches Verhalten untersucht werden. Ebenso bestand kein Unterschied in der immobilen Zeit zwischen GRDim und WT Mäusen. Damit kann die Hypothese, dass die fehlende Dimerisierung des GR depressions-ähnliches Verhalten induziert, nicht belegt werden. Die Entstehung von depressions-ähnlichem Verhalten durch GC wird höchstwahrscheinlich über den GR vermittelt, denn ein kompletter Knockout des GRs im ZNS (GRNesCre) verursacht in Mäusen trotz erhöhter Plasma CORT Konzentrationen kein depressions-ähnliches Verhalten [152]. Auch in dieser Arbeit führte chronischer Stress trotz erhöhter CORT Level bei vorhandenem GR allerdings mit fehlender Dimerisierungsfähigkeit nicht zu depressions-ähnlichem Verhalten. Deshalb könnte vermutet werden, dass die Wirkung erhöhter GC Level auf die Entstehung von depressions-ähnlichem Verhalten über die Dimerisierung des GR vermittelt wird. Um dies zu untersuchen, könnte in zukünftigen Studien WT und GRDim Mäusen beispielsweise über einen bestimmten Zeitraum CORT injiziert und im Anschluss der FST durchgeführt werden. Eine signifikant längere immobile Zeit in den WT Tieren im Vergleich zu den GRDim Mäusen würde die Vermutung bekräftigen.

Eine mögliche Erklärung für das hyperaktive Verhalten der gestressten Tiere könnte eine vermehrte Freisetzung von NA unter chronischem Stress sein. In diesem Zusammenhang konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass der NA-Wiederaufnahme-Hemmer Reboxetin im FST mit einer gesteigerten Mobilität einherging [2, 105]. In dieser Arbeit wurde NA jedoch nicht bestimmt, weshalb dies in zukünftigen Studien noch erfolgen sollte.

4.3 Effekte des GR Dimerisierungsdefizits auf den Thymus

Es ist bekannt, dass akuter und chronischer Stress häufig mit Thymusinvolution verbunden ist [38, 47, 84, 117, 135, 141]. Dies wird v.a. durch GC vermittelte Apoptose von Thymozyten hervorgerufen [20, 62, 147]. In Ratten konnte beispielweise gezeigt werden, dass eine 24-stündige Konfrontation mit einem dominanten männlichen Artgenossen in gestressten Ratten eine ausgeprägte Atrophie des Thymus zur Folge hat [36]. Zudem zeigten Ratten mit erhöhten CORT Leveln im Plasma eine gesteigerte Apoptose (v.a. unreife CD4+/CD8+ Zellen) und einen Rückgang der zellulären Proliferation [36]. In Anbetracht der Tatsache, dass der Thymus eine hohe GR Expression aufweist und unreife CD4+/CD8+ Zellen stark auf GC ansprechen [3, 91], könnten erhöhte GC Level unter Stress die Apoptose induzieren und die Zellproliferation hemmen [136, 147]. Im Einklang damit konnten sowohl eine Adrenalectomie [117] als auch der GR Antagonist RU486 [147] einen Anstieg der Thymozytenapoptose und einen Rückgang der Zellproliferation unter dem Einfluss von sozialem Stress hemmen. Auch in Studien des CSC Modells zeigte sich unter chronisch psychosozialen Stress in C57BL/6N Mäusen eine signifikante Reduktion des Thymusgewichts verglichen mit SHC Mäusen [38, 39, 84, 87, 117]. Neben der Zunahme des Nebennierengewichts handelt es sich zudem dabei um einen Hauptmarker, inwieweit ein Tier gestresst ist [84]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der aktuellen Arbeit untersucht, ob sich ein globales GR Dimerisierungsdefizit in Mäusen auf die Größe der Thymi gestresster Mäuse auswirkt.

Im Gegensatz zu bereits publizierten Daten konnte in WT Mäusen nach chronischer Stressexposition keine Abnahme des Thymusgewichts nachgewiesen werden. In früheren Studien wurden bis 48 h nach Beginn des CSCs in gestressten C57BL/6N Mäusen erhöhte CORT Konzentrationen gemessen [117, 157]. Reber et al. diskutierte hierbei, dass diese initial erhöhten CORT Level in CSC Tieren, welche bereits 24 h nach Beginn des CSC beobachtet wurden, die Thymusinvolution initiieren [117]. In dieser Arbeit wurden die Versuche jedoch mit einer anderen Mauslinie durchgeführt. Um nun Erkenntnisse darüber zu gewinnen, weshalb in dieser Mauslinie keine Thymusinvolution beobachtet werden

konnte, müssten in zukünftigen Studien ebenfalls die initialen CORT Level zu Beginn des CSC Modells bestimmt werden.

Bei GRDim Tieren führte chronischer Stress zu einer signifikanten Abnahme des Thymusgewichts. Zudem lag ein signifikanter Unterschied im Thymusgewicht zwischen den gestressten GRDim und CSC Tieren vor. Da CORT wie oben beschrieben eine Thymusatrophie verursacht und CSC GRDim Mäuse bei signifikant erhöhten CORT Konzentrationen leichtere Thymi hatten, kann die Thymusatrophie in diesen Tieren nicht über GR Dimerisierung vermittelt sein. Es liegt deshalb nahe, dass die Apoptose der Thymozyten über andere Signalwege erfolgt. Der Thymus besitzt eine hohe Expression von β -Adrenorezeptoren [73]. So kann das durch chronischen Stress aktivierte sympathische Nervensystem über die Freisetzung von Katecholaminen wie NA ebenfalls zur Apoptose der Thymozyten führen [1, 32, 35, 36, 73]. Um dies zu überprüfen, müsste in weiteren Versuchen ebenfalls die Konzentration der Epinephrine bestimmt werden.

4.4 Optimierung der Vergleichbarkeit der Daten von GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) Mäusen mit C57BL/6N Tieren

Die bisher veröffentlichten Daten des CSC Modells stammen hauptsächlich aus Versuchen mit C57BL/6N Mäusen. Die Mäuse dieser Studie gehören jedoch einem anderen Mausstamm GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) an. Wie bereits in mehreren Studien, welche verschiedene Mausstämme miteinander verglichen haben, gezeigt wurde [132, 154, 158], unterschieden sich auch in dieser Arbeit manche Ergebnisse der GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) Mäuse von bereits veröffentlichten Daten im CSC mit C57BL/6N Tieren.

Zum einen führt das 19-tägige CSC in C57BL/6N Mäusen zu einer Reduktion des Thymusgewichts [38, 39, 84, 87, 117]. Zum anderen geht chronisch psychosozialer Stress im CSC (C57BL/6N) mit erhöhten ACTH Leveln einher, wohingegen in den morgendlichen CORT Leveln keine Unterschiede zwischen CSC und SHC Tieren vorliegen [42, 44, 45, 117]. Des Weiteren reagieren SHC und CSC Mäuse nach der *in vitro* Stimulation mit ACTH (100 nM) mit einem signifikanten Anstieg der CORT Produktion verglichen mit unstimulierten Nebennieren. Zudem bildeten Nebennieren gestresster C57BL/6N Tiere nach 19 Tagen CSC im Vergleich zu SHC Tieren auf den Stimulus ACTH *in vitro* signifikant weniger CORT [117, 156]. Fuchsl et al. maßen in den schwereren Hypophysen eine reduzierte Proteinexpression von CRHR1 [44]. Die Anzahl der Lipidvesikel unterschied sich zwischen SHC und CSC Mäusen (C57BL/6N) nicht [43].

Trotz vieler Gemeinsamkeiten, wie die Zunahme des Nebennieren- [38, 39, 42, 107, 117, 144, 156] und Hypophysengewichts [44, 144], unveränderter CORT Level nach chronischem psychosozialen Stress [39, 42, 43, 117, 156], keine Unterschiede in der Lokomotion im OF bzw. Abnahme im NO bei den CSC Mäusen und ängstlicherem Verhalten [39, 87, 144], wird aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse deutlich, dass GRDim(Sv129Ev/B6) (GVO) Tiere teilweise andere Veränderungen unter chronisch psychosozialem Stress aufweisen als C57BL/6N Mäuse. Für eine bessere Vergleichbarkeit mit bisherigen Daten des CSC Modells sollten in zukünftigen Experimenten ein anderer Mausstamm zur Generierung eines GR Dimerisierungsdefizits verwendet werden.

4.5 Fazit und Ausblick

Schon seit einigen Jahren werden Untersuchungen mit Mäusen, die ein GR Dimerisierungsdefizit aufweisen, durchgeführt. Diese Studien lieferten u.a. Erkenntnisse darüber, inwieweit die GR Dimerisierung durch GC bedingte metabolische Veränderungen beeinflusst [19, 125] und welche Rolle die GR Dimerisierung bei der antientzündlichen Wirkung von GC spielt [5, 75, 167]. Bisher gibt es jedoch kaum Daten darüber, welche Veränderungen der Wegfall der GR Dimerisierung in der HPA-Achse unter chronisch psychosozialem Stress hervorruft. Deshalb wurden in dieser Arbeit GRDim Mäuse dem 19-tägigen CSC Paradigma ausgesetzt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zum ersten Mal, dass der Wegfall der GR Dimerisierung im Rahmen des CSCs Auswirkungen auf stressassoziierte Veränderungen der HPA-Achse, v.a. auf Ebene der Nebenniere, aber auch der Hypophyse hat. Um jedoch die genauen Mechanismen dahinter zu verstehen, sind, wie bereits in den einzelnen Kapiteln erwähnt, weitere Analysen notwendig. Ein Schwerpunkt sollte v.a. auf den PVN des Hypothalamus, dem dritten wichtigen Bestandteil der HPA-Achse, gelegt werden.

Auf behavioraler Ebene weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Dimerisierung des GRs keinen Einfluss auf die Entstehung von ängstlichem Verhalten unter chronisch psychosozialen Stress hat.

Generell besteht eine hohe Relevanz von Studien, welche durch chronisch psychosozialen Stress induziertes reduziertes GC-Signaling und dessen Einfluss bei der Entstehung verschiedener Krankheiten untersuchen. Zu letzteren zählen auch Krankheitsbilder, welche durch eine eingeschränkte Funktion des GRs verursacht werden, wie beispielsweise das Crousos-Syndrom, eine familiär oder sporadisch auftretende generalisierte Glukokortikoid-Resistenz mit variabler Ausprägung, hervorgerufen durch verschiedene Mutationen im für

den GR kodierenden NR3C1-Gen [15, 64, 69]. Mögliche Symptome sind Angststörungen, chronische Fatigue, Hypertension, Hirsutismus [13-15, 69].

Andere Mutationen im NR3C1-Gen resultieren in einer Zunahme der Sensitivität gegenüber GC. So wurden beispielsweise in homozygoten Trägern des GR BclI Polymorphismus verglichen mit heterozygoten Trägern oder Nichtträgern erhöhte Nüchterninsulinpiegel gemessen und pathologische HOMA-Indices ermittelt [48, 166], ebenfalls waren das Körpergewicht und der Gesamtkörperfettgehalt signifikant höher [48, 151].

Eine weitere sehr seltene Erkrankung, die durch eine erhöhte Sensitivität der Gewebe gegenüber GC hervorgerufen wird, ist das Glukokortikoid-Hypersensitivitätssyndrom. Betroffene entwickeln trotz normwertiger Plasma ACTH- und CORT Level Symptome des Cushing Syndroms, wie Vollmondgesicht, stammbetonte Fettsucht, Hypertonie [24, 164]. Die genauen Mechanismen sind bisher noch weitestgehend unklar [65, 102]. Andere Erkrankungen wie Depressionen [6] oder PTSD [172] sind durch ein insuffizientes GC-Signaling gekennzeichnet. Das im Rahmen von Depressionen auftretende reduzierte Ansprechen auf GC wird beispielsweise mit einer verminderten Sensitivität der GC Rezeptoren in Verbindung gebracht [63, 94].

Diese Arbeit hat einen Teil zur Erforschung der Mechanismen dieser Erkrankungen beigetragen. Zukünftige Studien können daran anknüpfen, um mögliche Behandlungsansätze zu finden.

5 Zusammenfassung

Chronischer psychosozialer Stress gilt als Risikofaktor für zahlreiche somatische und affektive Erkrankungen. Einige sind mit der Entstehung von Hypokortizismus assoziiert. Die Mechanismen hinter der Entstehung von stressinduziertem Hypokortizismus sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Zudem ist noch nicht bekannt, inwiefern Glukokortikoidrezeptor (GR)-Dimerisierung an diesen Mechanismen beteiligt ist.

Zur genauen Untersuchung eignen sich Tiermodelle, vor allem das Modell der chronisch subordinierten Koloniehaltung (CSC), welches zu einem reduzierten Glukokortikoid (GC)-Signaling und „dark phase“ Hypokortizismus führt. Zudem kann durch Verwendung von GR Dimerisierungsdefiziten (GRDim) Mäusen geprüft werden, ob durch GR-Dimerisierung vermittelte Effekte an der Entwicklung des stressbedingten Hypokortizismus beteiligt sind. Das Hauptaim dieser Arbeit war deshalb zu untersuchen, wie sich der Wegfall der GR Dimerisierung auf globaler Ebene auf die stressassoziierten Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse), mit besonderem Fokus auf die Hypophyse und Nebenniere, auswirkt. Zudem wurde analysiert, inwiefern sich typische stress-assoziierte Effekte des CSC Modells auf physiologischer und behavioraler Ebene durch den globalen Wegfall der GR Dimerisierung verändern.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass das CSC Modell auch in dieser Mauslinie (GrDim(129SvEv)(B6)GVO) typische unter chronisch psychosozialen Stress auftretende Veränderungen, wie erhöhtes Nebennieren- und Hypophysengewicht und erhöhtes Angstverhalten hervorruft. Zudem ergaben die Untersuchungen, dass das Fehlen der GR-Dimerisierungsfähigkeit mit morphologischen und funktionellen Veränderungen auf Hypophysen- und Nebennieren-Ebene verbunden ist. Zum einen war das Hypophysengewicht in CSC GRDim Mäusen im Vergleich zu CSC WT und Nebennierengewicht in GRDim Mäusen verglichen mit WT geringer. Dies ist vermutlich auf kompensatorische Anpassungsmechanismen zurückzuführen, um erhöhte Plasma Adrenocorticotropin (ACTH)- beziehungsweise Kortikosteron (CORT)-Level bei GR Dimerisierungs-defizit zu vermeiden. Dennoch wurden in CSC GRDim Mäusen erhöhte ACTH-Level gemessen, was für eine Beeinträchtigung im negativen Feedback spricht. Bei unveränderter Arginin-Vasopressin-Rezeptor 1b (AVP1b) und Proopiomelanocortin (POMC) mRNA Expression und Corticotropin-releasing Hormon Rezeptor 1 (CRHR1) Proteinexpression in dieser Arbeit sind weitere Untersuchungen, insbesondere des PVNs und Arginin-Vasopressin (AVP) und Corticotropin-releasing Hormon (CRH), notwendig, um die genauen Mechanismen zu verstehen. Trotz leichterer Nebennieren waren die Plasma

CORT Level in CSC GRDim im Vergleich zu einzeln gehaltenen (SHC) GrDim Mäusen signifikant höher. Die fehlende GR Dimerisierung beeinflusst möglicherweise die im Rahmen des CSCs verminderte Sensitivität der Nebennieren gegenüber ACTH. Weitere Erkenntnisse darüber könnten zukünftige Studien liefern, in welchen Mediatoren des intra-adrenalen Feedbacks wie „steroidgenic acute regulatory protein“ (StAR), Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R), „dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene 1“ (DAX-1) bestimmt werden, um den Einfluss der GR Dimerisierung auf die Entstehung des Hypokortizismus auf Ebene der Nebennieren zu ermitteln. Des Weiteren führte die Stimulation der Nebennieren *in vitro* mit ACTH (100 nM) nur in den GRDim Mäusen zu einer Zunahme der CORT Level. Dies könnte durch eine erhöhte MC2R Expression mediiert sein, weshalb in zukünftigen Studien die Rezeptorexpression ermittelt werden sollte. Die Bestimmung der Lipidvesikel, welche die Vorstufe der Steroide (Cholesterinester [CE]) enthalten, in der Nebennierenrinde zeigte, dass GRDim Tiere verglichen mit WT Mäusen signifikant weniger Lipidvesikel aufweisen. Auch hier handelt es sich vermutlich um Anpassungsmechanismen, um erhöhte CORT Level zu vermeiden. Inwieweit die GR Dimerisierung dabei eine Rolle spielt, könnte in zukünftigen Studien durch die Bestimmung von Hormonen und Rezeptoren, welche die Verfügbarkeit der CE und die GC Synthese beeinflussen, ermittelt werden. Die Reduktion des Thymusgewicht im Rahmen des CSC in gestressten GRDim Mäusen im Vergleich zu nicht gestressten GRDim Tieren wird vermutlich nicht über GR Dimerisierung vermittelt. Auch das CSC-induzierte Angstverhalten im OF/NO wird durch das GR Dimerisierungsdefizit nicht beeinflusst. Die fehlende Reduktion der Immobilität der CSC GrDim Tiere trotz erhöhter CORT-Level könnte darauf hindeuten, dass die GR Dimerisierung in der Entstehung depressions-ähnlichen Verhaltens eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass aufgrund des GR Defizites eine Einschränkung im negativen Feedback vorliegt. Dies führte zu verschiedenen organspezifischen Anpassungen. Um weitere Erkenntnisse über die genauen Mechanismen zu erlangen, sind jedoch zukünftige Studien notwendig.

6 Literaturverzeichnis

1. Anderson K L, Anderson G, Michell R H, Jenkinson E J, Owen J J: Intracellular signaling pathways involved in the induction of apoptosis in immature thymic T lymphocytes. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 156: 4083-4091 (1996)
2. Arunrut T, Alejandre H, Chen M, Cha J, Russo-Neustadt A: Differential behavioral and neurochemical effects of exercise, reboxetine and citalopram with the forced swim test. *Life Sciences* 84: 584-589 (2009)
3. Ashwell J D, Lu F W M, Vacchio M S: Glucocorticoids in T Cell Development and Function. *Annual Review of Immunology* 18: 309-345 (2000)
4. Baas J: <https://www.tk.de/resource/blob/2026630/.../tk-stressstudie-2016-data.pdf> (12.02.2019)
5. Ballegeer M, Van Looveren K, Timmermans S, Eggermont M, Vandevyver S, They F, Dendoncker K, Souffriau J, Vandewalle J, Van Wyngene L, De Rycke R, Takahashi N, Vandenabeele P, Tuckermann J, Reichardt H M, Impens F, Beyaert R, De Bosscher K, Vandenbroucke R E, Libert C: Glucocorticoid receptor dimers control intestinal STAT1 and TNF-induced inflammation in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 128: 3265-3279 (2018)
6. Bardeleben U, Holsboer F: Cortisol response to a combined dexamethasone-human corticotrophin-releasing hormone challenge in patients with depression. *Journal of Neuroendocrinology* 1: 485-488 (1989)
7. Baschant U, Frappart L, Rauchhaus U, Bruns L, Reichardt H M, Kamradt T, Bräuer R, Tuckermann J P: Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 19317-19322 (2011)
8. Berton O, Aguerre S, Sarrieau A, Mormede P, Chaouloff F: Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 82: 147-159 (1998)

9. Buckley T, Bartrop R, McKinley S, Ward C, Bramwell M, Roche D, Mihailidou A S, Morel-Kopp M C, Spinaze M, Hocking B, Goldston K, Tennant C, Tofler G: Prospective study of early bereavement on psychological and behavioural cardiac risk factors. *Internal Medicine Journal* 39: 370-378 (2009)
10. Cain, Derek W., PhD|Cidlowski, John A., PhD: Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism* 29: 545-556 (2015)
11. Campeau S, Watson S J: Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. *Journal of Neuroendocrinology* 9: 577-588 (1997)
12. Cato A C B, Nestl A, Mink S: Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2002: re9 (2002)
13. Charmandari E, Ichijo T, Jubiz W, Baid S, Zachman K, Chrousos G P, Kino T: A novel point mutation in the amino terminal domain of the human glucocorticoid receptor (hGR) gene enhancing hGR-mediated gene expression. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93: 4963-4968 (2008)
14. Charmandari E, Raji A, Kino T, Ichijo T, Tiulpakov A, Zachman K, Chrousos G P: A novel point mutation in the ligand-binding domain (LBD) of the human glucocorticoid receptor (hGR) causing generalized glucocorticoid resistance: the importance of the C terminus of hGR LBD in conferring transactivational activity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90: 3696-3705 (2005)
15. Chrousos G P, Vingerhoeds A, Brandon D, Eil C, Pugeat M, DeVroede M, Loriaux D L, Lipsett M B: Primary cortisol resistance in man. A glucocorticoid receptor-mediated disease. *The Journal of Clinical Investigation* 69: 1261-1269 (1982)
16. Chrousos G P: Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* 5: 374-381 (2009)
17. Chrousos G P, Gold P W: The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *Journal of the American Medical Association* 267: 1244-1252 (1992)

18. Cole T J, Blendy J A, Monaghan A P, Krieglstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G: Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & Development* 9: 1608-1621 (1995)
19. Conaway H H, Henning P, Lie A, Tuckermann J, Lerner U H: Activation of dimeric glucocorticoid receptors in osteoclast progenitors potentiates RANKL induced mature osteoclast bone resorbing activity. *Bone* 93: 43-54 (2016)
20. Concordet J P, Ferry A: Physiological programmed cell death in thymocytes is induced by physical stress (exercise). *The American Journal of Physiology* 265: 626 (1993)
21. Crofford L J, Pillemer S R, Kalogeras K T, Cash J M, Michelson D, Kling M A, Sternberg E M, Gold P W, Chrousos G P, Wilder R L: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis perturbations in patients with fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism* 37: 1583-1592 (1994)
22. Cryan J F, Holmes A: The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 775-790 (2005)
23. Cummins C L, Volle D H, Zhang Y, McDonald J G, Sion B, Lefrançois-Martinez A, Caira F, Veyssière G, Mangelsdorf D J, Lobaccaro J A: Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *The Journal of clinical investigation* 116: 1902-1912 (2006)
24. Cushing H: The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). *Obesity Research* 2: 486-508 (1994)
25. Davies T H, Ning Y, Sánchez E R: A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 4597-4600 (2002)
26. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G: The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine Reviews* 24: 488-522 (2003)
27. De Kloet E R, Vreugdenhil E, Oitzl M S, Joels M: Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews* 19: 269-301 (1998)

28. de Sousa Abreu R, Penalva L O, Marcotte E M, Vogel C: Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular BioSystems* 5: 1512-1526 (2009)
29. Demitrack M A, Dale J K, Straus S E, Laue L, Listwak S J, Kruesi M J, Chrousos G P, Gold P W: Evidence for impaired activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with chronic fatigue syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73: 1224-1234 (1991)
30. Drouin J, Sun Y L, Nemer M: Glucocorticoid repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Journal of Steroid Biochemistry* 34: 63-69 (1989)
31. Drouin J, Trifiro M A, Plante R K, Nemer M, Eriksson P, Wrangé O: Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Molecular and Cellular Biology* 9: 5305-5314 (1989)
32. Durant S: In vivo effects of catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis. *Cellular Immunology* 102: 136-143 (1986)
33. Edwards C R, Stewart P M, Burt D, Brett L, McIntyre M A, Sutanto W S, de Kloet E R, Monder C: Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *The Lancet* 2: 986-989 (1988)
34. Elwan O, Abdella M, el Bayad A B, Hamdy S: Hormonal changes in headache patients. *Journal of the Neurological Sciences* 106: 75-81 (1991)
35. Engler H, Dawils L, Hoves S, Kurth S, Stevenson J R, Schauenstein K, Stefanski V: Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. *Journal of Neuroimmunology* 156: 153-162 (2004)
36. Engler H, Stefanski V: Social stress and T cell maturation in male rats: transient and persistent alterations in thymic function. *Psychoneuroendocrinology* 28: 951-969 (2003)
37. Ferrie J E, Kivimäki M, Shipley M J, Davey Smith G, Virtanen M: Job insecurity and incident coronary heart disease: the Whitehall II prospective cohort study. *Atherosclerosis* 227: 178-181 (2013)

38. Foertsch S, Fuchsl A M, Faller S D, Holzer H, Langgartner D, Messmann J, Strauss G, Reber S O: Splenic glucocorticoid resistance following psychosocial stress requires physical injury. *Scientific Reports* 7: 15730-2 (2017)
39. Foertsch S, Haffner-Luntzer M, Kroner J, Gross F, Kaiser K, Erber M, Reber S O, Ignatius A: Chronic psychosocial stress disturbs long-bone growth in adolescent mice. *Disease Models & Mechanisms* 10: 1399-1409 (2017)
40. Foley F W, Traugott U, LaRocca N G, Smith C R, Perlman K R, Caruso L S, Scheinberg L C: A prospective study of depression and immune dysregulation in multiple sclerosis. *Archives of Neurology* 49: 238-244 (1992)
41. Frodl T, O'Keane V: How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. *Neurobiology of Disease* 52: 24-37 (2013)
42. Fuchsl A M, Reber S O: Chronic Psychosocial Stress and Negative Feedback Inhibition: Enhanced Hippocampal Glucocorticoid Signaling despite Lower Cytoplasmic GR Expression. *PLOS ONE* 11: e0153164 (2016)
43. Fuchsl A M, Uschold-Schmidt N, Reber S O: Chronic psychosocial stress in male mice causes an up-regulation of scavenger receptor class B type 1 protein in the adrenal glands. *Stress* 16: 461-468 (2013)
44. Fuchsl A M, Langgartner D, Reber S O: Mechanisms underlying the increased plasma ACTH levels in chronic psychosocially stressed male mice. *PLOS ONE* 8: e84161 (2013)
45. Fuchsl A M, Neumann I D, Reber S O: Stress resilience: a low-anxiety genotype protects male mice from the consequences of chronic psychosocial stress. *Endocrinology* 155: 117-126 (2014)
46. Funder J W, Pearce P T, Smith R, Smith A I: Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242: 583-585 (1988)
47. Garren H W, Shaffner C S: How the Period of Exposure to Different Stress Stimuli Affects the Endocrine and Lymphatic Gland Weights of Young Chickens. *Poultry Science* 35: 266-272 (1956)

48. Geelen C C, van Greevenbroek M M, van Rossum E F, Schaper N C, Nijpels G, 't Hart L M, Schalkwijk C G, Ferreira I, van der Kallen, C. J., Sauerwein H P, Dekker J M, Stehouwer C D, Havekes B: BclI glucocorticoid receptor polymorphism is associated with greater body fatness: the Hoorn and CODAM studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98: 595 (2013)
49. Goldstein D S, Kopin I J: Evolution of concepts of stress. *Stress* 10: 109-120 (2007)
50. Gorrigan R J, Guasti L, King P, Clark A J, Chan L F: Localisation of the melanocortin-2-receptor and its accessory proteins in the developing and adult adrenal gland. *Journal of Molecular Endocrinology* 46: 227-232 (2011)
51. Grubbs F E: Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics* 11: 1-21 (1969)
52. Guardiola-Diaz H M, Kolinske J S, Gates L H, Seasholtz A F: Negative glucocorticoid regulation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-stimulated corticotropin-releasing hormone-reporter expression in AtT-20 cells. *Molecular Endocrinology* 10: 317-329 (1996)
53. Gudbjörnsson B, Skogseid B, Oberg K, Wide L, Hällgren R: Intact adrenocorticotrophic hormone secretion but impaired cortisol response in patients with active rheumatoid arthritis. Effect of glucocorticoids. *The Journal of Rheumatology* 23: 596-602 (1996)
54. Gummow B M, Scheys J O, Cancelli V R, Hammer G D: Reciprocal regulation of a glucocorticoid receptor-steroidogenic factor-1 transcription complex on the Dax-1 promoter by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone in the adrenal cortex. *Molecular Endocrinology* 20: 2711-2723 (2006)
55. Handwerker H O, Kress M: Vegetatives Nervensystem. In: Speckmann E, Hescheler J and Köhling R (Hrsg) *Physiologie*, 6. Auflage, Elsevier, München, S. 663-691 (2013)
56. Hapke U, Maske U E, Scheidt-Nave C, Bode L, Schlack R, Busch M A: Chronischer Stress bei Erwachsenen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt* 56: 749-754 (2013)
57. Heim C, Newport D J, Bonsall R, Miller A H, Nemeroff C B: Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse. *The American Journal of Psychiatry* 158: 575-581 (2001)

58. Heim C, Newport D J, Heit S, Graham Y P, Wilcox M, Bonsall R, Miller A H, Nemeroff C B: Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *Journal of the American Medical Association* 284: 592-597 (2000)
59. Herbison C E, Allen K, Robinson M, Newnham J, Pennell C: The impact of life stress on adult depression and anxiety is dependent on gender and timing of exposure. *Development and Psychopathology* 29: 1443-1454 (2017)
60. Herman J P, Tasker J G: Paraventricular Hypothalamic Mechanisms of Chronic Stress Adaptation. *Frontiers in Endocrinology* 7: 137 (2016)
61. Hirschfeld R M A: The Comorbidity of Major Depression and Anxiety Disorders: Recognition and Management in Primary Care. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry* 3: 244-254 (2001)
62. Hoffman-Goetz L, Zajchowski S, Aldred A: Impact of treadmill exercise on early apoptotic cells in mouse thymus and spleen. *Life Sciences* 64: 191-200 (1999)
63. Holsboer F: The dexamethasone suppression test in depressed patients: clinical and biochemical aspects. *Journal of Steroid Biochemistry* 19: 251-257 (1983)
64. Hurley D M, Accili D, Stratakis C A, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, Constantine K, Taylor S I, Chrousos G P: Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *Journal of Clinical Investigation* 87: 680-686 (1991)
65. Iida S, Nakamura Y, Fujii H, Nishimura J, Tsugawa M, Gomi M, Fukata J, Tarui S, Moriwaki K, Kitani T: A patient with hypocortisolism and Cushing's syndrome-like manifestations: cortisol hyperreactive syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 70: 729-737 (1990)
66. Iñiguez S D, Riggs L M, Nieto S J, Dayrit G, Zamora N N, Shawhan K L, Cruz B, Warren B L: Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress* 17: 247-255 (2014)
67. Joëls M: Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in Pharmacological Sciences* 27: 244-250 (2006)

68. Karemaker J M: An introduction into autonomic nervous function. *Physiological Measurement* 38: 89-118 (2017)
69. Karl M, Lamberts S W, Detera-Wadleigh S D, Encio I J, Stratakis C A, Hurley D M, Accili D, Chrousos G P: Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76: 683-689 (1993)
70. Karst H, Karten Y J, Reichardt H M, de Kloet E R, Schütz G, Joëls M: Corticosteroid actions in hippocampus require DNA binding of glucocorticoid receptor homodimers. *Nature Neuroscience* 3: 977-978 (2000)
71. Keeney A J, Hogg S: Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. *Behavioural Pharmacology* 10: 753–764 (1999)
72. Keller-Wood M E, Dallman M F: Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine Reviews* 5: 1-24 (1984)
73. Kendall M D, al-Shawaf A A: Innervation of the rat thymus gland. *Brain, Behavior, and Immunity* 5: 9-28 (1991)
74. Kennedy S H: Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 10: 271-277 (2008)
75. Koenen M, Culemann S, Vettorazzi S, Caratti G, Frappart L, Baum W, Krönke G, Baschant U, Tuckermann J P: Glucocorticoid receptor in stromal cells is essential for glucocorticoid-mediated suppression of inflammation in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 77: 1610-1618 (2018)
76. Kovanen P T, Faust J R, Brown M S, Goldstein J L: Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. I. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured adrenocortical cells. *Endocrinology* 104: 599-609 (1979)
77. Kraemer F B: Adrenal cholesterol utilization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 265-266: 42-45 (2007)

78. Krause N: Life stress as a correlate of depression among older adults. *Psychiatry Research* 18: 227-237 (1986)
79. Kretz O, Reichardt H M, Schütz G, Bock R: Corticotropin-releasing hormone expression is the major target for glucocorticoid feedback-control at the hypothalamic level. *Brain Research* 818: 488-491 (1999)
80. Krieger M: Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annual Review of Biochemistry* 68: 523-558 (1999)
81. Kruger U, Spiecker H: Diagnosis of adrenal cortex insufficiency in steroid-dependent bronchial asthma - the CRH test in comparison with diurnal cortisol profile in serum and cortisol in 24-hour urine. *Pneumologie* 48: 793-798 (1994)
82. Kyrou I, Tsigos C: Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology* 9: 787-793 (2009)
83. Lagraauw H M, Kuiper J, Bot I: Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies. *Brain, Behavior, and Immunity* 50: 18-30 (2015)
84. Langgartner D, Fuchsl A M, Kaiser L M, Meier T, Foertsch S, Buske C, Reber S O, Mulaw M A: Biomarkers for classification and class prediction of stress in a murine model of chronic subordination stress. *PLOS ONE* 13: e0202471 (2018)
85. Langgartner D, Fuchsl A M, Uschold-Schmidt N, Slattery D A, Reber S O: Chronic subordinate colony housing paradigm: a mouse model to characterize the consequences of insufficient glucocorticoid signaling. *Frontiers in Psychiatry* 6: 18 (2015)
86. Langgartner D, Marks J, Nguyen T C, Reber S O: Changes in adrenal functioning induced by chronic psychosocial stress in male mice: A time course study. *Psychoneuroendocrinology* 122: 104880 (2020)
87. Langgartner D, Peterlik D, Foertsch S, Fuchsl A M, Brokmann P, Flor P J, Shen Z, Fox J G, Uschold-Schmidt N, Lowry C A, Reber S O: Individual differences in stress

vulnerability: The role of gut pathobionts in stress-induced colitis. *Brain, Behavior, and Immunity* 64: 23-32 (2017)

88. Laurie Kelly McCorry: Physiology of the Autonomic Nervous System. *American Journal of Pharmaceutical Education* 71: 1 (2007)

89. Lee B, Sur B, Kwon S, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm D: Chronic Administration of Catechin Decreases Depression and Anxiety-Like Behaviors in a Rat Model Using Chronic Corticosterone Injections. *Biomolecules & Therapeutics* 21: 313-322 (2013)

90. Linton E A, Gillies G E, Lowry P J: Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature (London)* 299: 355-357 (1982)

91. Lowy M T: Quantification of type I and II adrenal steroid receptors in neuronal, lymphoid and pituitary tissues. *Brain Research* 503: 191-197 (1989)

92. Ma L, Shen Q, Yang S, Xie X, Xiao Q, Yu C, Cao L, Fu Z: Effect of chronic corticosterone-induced depression on circadian rhythms and age-related phenotypes in mice. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 50: 1236-1246 (2018)

93. Mackenzie C S, Reynolds K, Chou K, Pagura J, Sareen J: Prevalence and correlates of generalized anxiety disorder in a national sample of older adults. *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 19: 305-315 (2011)

94. Maguire T M, Thakore J, Dinan T G, Hopwood S, Breen K C: Plasma sialyltransferase levels in psychiatric disorders as a possible indicator of HPA axis function. *Biological Psychiatry* 41: 1131-1136 (1997)

95. Malkoski S P, Dorin R I: Composite Glucocorticoid Regulation at a Functionally Defined Negative Glucocorticoid Response Element of the Human Corticotropin-Releasing Hormone Gene. *Molecular Endocrinology* 13: 1629-1644 (1999)

96. Martens C, Bilodeau S, Maira M, Gauthier Y, Drouin J: Protein-Protein Interactions and Transcriptional Antagonism between the Subfamily of NGFI-B/Nur77 Orphan Nuclear Receptors and Glucocorticoid Receptor. *Molecular Endocrinology* 19: 885-897 (2005)

97. McEwen B S: Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032: 1-7 (2004)
98. McEwen B S: Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology* 583: 174-185 (2008)
99. Mifsud K R, Reul, Johannes M. H. M.: Acute stress enhances heterodimerization and binding of corticosteroid receptors at glucocorticoid target genes in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 11336-11341 (2016)
100. Moguilewsky M, Raynaud J P: Evidence for a specific mineralocorticoid receptor in rat pituitary and brain. *Journal of steroid biochemistry* 12: 309-314 (1980)
101. Nader N, Chrousos G P, Kino T: Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21: 277-286 (2010)
102. Newfield R S, Kalaitzoglou G, Licholai T, Chilton D, Ashraf J, Thompson E B, New M I: Normocortisolemic Cushing's syndrome initially presenting with increased glucocorticoid receptor numbers. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85: 14-21 (2000)
103. Newton R: Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55: 603-613 (2000)
104. Oitzl M S, Reichardt H M, Joëls M, de Kloet E R: Point mutation in the mouse glucocorticoid receptor preventing DNA binding impairs spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 12790-12795 (2001)
105. Page M E, Brown K, Lucki I: Simultaneous analyses of the neurochemical and behavioral effects of the norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine in a rat model of antidepressant action. *Psychopharmacology* 165: 194-201 (2003)
106. Papadimitriou A, Priftis K N: Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 16: 265-271 (2009)

107. Peterlik D, Stangl C, Bauer A, Bludau A, Keller J, Grabski D, Killian T, Schmidt D, Zajicek F, Jaeschke G, Lindemann L, Reber S O, Flor P J, Uschold-Schmidt N: Blocking metabotropic glutamate receptor subtype 5 relieves maladaptive chronic stress consequences. *Brain, Behavior and Immunity* 59: 79-92 (2017)
108. Peters S, Slattery D A, Uschold-Schmidt N, Reber S O, Neumann I D: Dose-dependent effects of chronic central infusion of oxytocin on anxiety, oxytocin receptor binding and stress-related parameters in mice. *Psychoneuroendocrinology* 42: 225-236 (2014)
109. Philips A, Maira M, Mullick A, Chamberland M, Lesage S, Hugo P, Drouin J: Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Molecular and Cellular Biology* 17: 5952-5959 (1997)
110. Pooley J R, Rivers C A, Kilcooley M T, Paul S N, Cavga A D, Kershaw Y M, Muratcioglu S, Gursoy A, Keskin O, Lightman S L: Beyond the heterodimer model for mineralocorticoid and glucocorticoid receptor interactions in nuclei and at DNA. *PLOS ONE* 15: e0227520 (2020)
111. Pratt W B: The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 21455-21458 (1993)
112. Rabadan-Diehl C, Martínez A, Volpi S, Subburaju S, Aguilera G: Inhibition of vasopressin V1b receptor translation by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region. *Journal of Neuroendocrinology* 19: 309-319 (2007)
113. Raison C L, Miller A H: When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *The American Journal of Psychiatry* 160: 1554-1565 (2003)
114. Ramsay D S, Woods S C: Clarifying the roles of homeostasis and allostasis in physiological regulation. *Psychological Review* 121: 225-247 (2014)
115. Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling A F, Illing A, Stride B, Kirilov M, Mandic V, Takacz A, Schmidt-Ullrich R, Ostermay S, Schinke T, Spanbroek R, Zaiss M M, Angel P E, Lerner U H, David J, Reichardt H M, Amling M, Schütz G, Tuckermann J P: Glucocorticoids

suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metabolism* 11: 517-531 (2010)

116. Reaven E, Tsai L, Azhar S: Intracellular events in the "selective" transport of lipoprotein-derived cholesteryl esters. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 16208-16217 (1996)

117. Reber S O, Birkeneder L, Veenema A H, Obermeier F, Falk W, Straub R H, Neumann I D: Adrenal insufficiency and colonic inflammation after a novel chronic psycho-social stress paradigm in mice: implications and mechanisms. *Endocrinology* 148: 670-682 (2007)

118. Reber S O, Peters S, Slattery D A, Hofmann C, Scholmerich J, Neumann I D, Obermeier F: Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis. *Brain, Behavior and Immunity* 25: 1153-1161 (2011)

119. Reber S O, Obermeier F, Straub R H, Straub H R, Falk W, Neumann I D: Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology* 147: 4968-4976 (2006)

120. Reber S O, Neumann I D: Defensive behavioral strategies and enhanced state anxiety during chronic subordinate colony housing are accompanied by reduced hypothalamic vasopressin, but not oxytocin, expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148: 184-195 (2008)

121. Reber S O, Obermeier F, Straub R H, Veenema A H, Neumann I D: Aggravation of DSS-induced colitis after chronic subordinate colony (CSC) housing is partially mediated by adrenal mechanisms. *Stress* 11: 225-234 (2008)

122. Reichardt H M, Kaestner K H, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schütz G: DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93: 531-541 (1998)

123. Reichardt H M, Tuckermann J P, Bauer A, Schütz G: Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo. *Zeitschrift für Rheumatologie* 59 Suppl 2: II/1-5 (2000)

124. Reichardt H M, Tuckermann J P, Göttlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schütz G: Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *The EMBO Journal* 20: 7168-7173 (2001)
125. Reichardt S D, Föller M, Rexhepaj R, Pathare G, Minnich K, Tuckermann J P, Lang F, Reichardt H M: Glucocorticoids Enhance Intestinal Glucose Uptake Via the Dimerized Glucocorticoid Receptor in Enterocytes. *Endocrinology* 153: 1783-1794 (2012)
126. Reul J M, de Kloet E R: Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511 (1985)
127. Revollo J R, Cidlowski J A: Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1179: 167-178 (2009)
128. Ritter H: Hormone. In: Speckmann E, Hescheler J and Köhling R (Hrsg) *Physiologie*, 6. Auflage, Elsevier, München, S. 691-744 (2013)
129. Rodriguez J M, Monsalves-Alvarez M, Henriquez S, Llanos M N, Troncoso R: Glucocorticoid resistance in chronic diseases. *Steroids* 115: 182-192 (2016)
130. Rook G A W, Lowry C A, Raison C L: Microbial Old Friends, immunoregulation and stress resilience. *Evolution, Medicine, and Public Health* 2013: 46-64 (2013)
131. Rosol T J, Yarrington J T, Latendresse J, Capen C C: Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicologic Pathology* 29: 41-48 (2001)
132. Savignac H M, Finger B C, Pizzo R C, O'Leary O F, Dinan T G, Cryan J F: Increased sensitivity to the effects of chronic social defeat stress in an innately anxious mouse strain. *Neuroscience* 192: 524-536 (2011)
133. Schaaf M J M, Cidlowski J A: Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83: 37-48 (2002)
134. Schmidt D, Reber S O, Botteron C, Barth T, Peterlik D, Uschold N, Männel D N, Lechner A: Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain, Behavior and Immunity* 24: 1097-1104 (2010)

135. Schmidt M V, Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Alam S, Harbich D, Greetfeld M, Uhr M, Holsboer F, Müller M B: Persistent neuroendocrine and behavioral effects of a novel, etiologically relevant mouse paradigm for chronic social stress during adolescence. *Psychoneuroendocrinology* 32: 417-429 (2007)
136. Schwartzman R A, Cidlowski J A: Glucocorticoid-induced Apoptosis of Lymphoid Cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 105: 347-354 (1994)
137. Scott L V, Dinan T G: Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sciences* 62: 1985-1998 (1998)
138. Seibenhener M L, Wooten M C: Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*: e52434 (2015)
139. Selye H: A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 10: 230-231 (1998)
140. Selye H: Confusion and controversy in the stress field. *Journal of Human Stress* 1: 37-44 (1975)
141. Selye H: Thymus and Adrenals in the Response of the Organism to Injuries and Intoxications. *British Journal of Experimental Pathology* 17: 234-248 (1936)
142. Shanafelt T D, Hasan O, Dyrbye L N, Sinsky C, Satele D, Sloan J, West C P: Changes in Burnout and Satisfaction With Work-Life Balance in Physicians and the General US Working Population Between 2011 and 2014. *Mayo Clinic Proceedings* 90: 1600-1613 (2015)
143. Singewald G M, Nguyen N K, Neumann I D, Singewald N, Reber S O: Effect of chronic psychosocial stress-induced by subordinate colony (CSC) housing on brain neuronal activity patterns in mice. *Stress* 12: 58-69 (2009)
144. Slattery D A, Uschold N, Magoni M, Bar J, Popoli M, Neumann I D, Reber S O: Behavioural consequences of two chronic psychosocial stress paradigms: anxiety without depression. *Psychoneuroendocrinology* 37: 702-714 (2012)

145. Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Harbich D, Alam S, Holsboer F, Müller M B, Schmidt M V: Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders. *Hormones and Behavior* 53: 386-394 (2008)
146. Straub R H, Paimela L, Peltomaa R, Schölmerich J, Leirisalo-Repo M: Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46: 654-662 (2002)
147. Tarcic N, Ovadia H, Weiss D W, Weidenfeld J: Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology* 82: 40-46 (1998)
148. Tasker J G, Di S, Malcher-Lopes R: Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147: 5549-5556 (2006)
149. Templin C, Ghadri J R, Diekmann J, Napp L C, Bataiosu D R, Jaguszewski M, Cammann V L, Sarcon A, Geyer V, Neumann C A, Seifert B, Hellermann J, Schwyzer M, Eisenhardt K, Jenewein J, Franke J, Katus H A, Burgdorf C, Schunkert H, Moeller C, Thiele H, Bauersachs J, Tschöpe C, Schultheiss H, Laney C A, Rajan L, Michels G, Pfister R, Ukena C, Böhm M, Erbel R, Cuneo A, Kuck K, Jacobshagen C, Hasenfuss G, Karakas M, Koenig W, Rottbauer W, Said S M, Braun-Dullaeus R C, Cuculi F, Banning A, Fischer T A, Vasankari T, Airaksinen K E J, Fijalkowski M, Rynkiewicz A, Pawlak M, Opolski G, Dworakowski R, MacCarthy P, Kaiser C, Osswald S, Galiuto L, Crea F, Dichtl W, Franz W M, Empen K, Felix S B, Delmas C, Lairez O, Erne P, Bax J J, Ford I, Ruschitzka F, Prasad A, Lüscher T F: Clinical Features and Outcomes of Takotsubo (Stress) Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 373: 929-938 (2015)
150. Trapp T, Rupprecht R, Castrén M, Reul J M H M, Holsboer F: Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: A new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 13: 1457-1462 (1994)
151. Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Després J, Drapeau V, Pérusse L: Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 3141-3145 (2003)

152. Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban P C, Bock R, Klein R, Schütz G: Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature Genetics* 23: 99-103 (1999)
153. Tsigos C, Chrousos G P: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53: 865-871 (2002)
154. Tsuchimine S, Matsuno H, O'Hashi K, Chiba S, Yoshimura A, Kunugi H, Sohya K: Comparison of physiological and behavioral responses to chronic restraint stress between C57BL/6J and BALB/c mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 525: 33-38 (2020)
155. Tuckermann J P, Kleiman A, Moriggl R, Spanbroek R, Neumann A, Illing A, Clausen B E, Stride B, Förster I, Habenicht A J R, Reichardt H M, Tronche F, Schmid W, Schütz G: Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 1381-1390 (2007)
156. Uschold-Schmidt N, Nyuyki K D, Fuchsl A M, Neumann I D, Reber S O: Chronic psychosocial stress results in sensitization of the HPA axis to acute heterotypic stressors despite a reduction of adrenal in vitro ACTH responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* 37: 1676-1687 (2012)
157. Uschold-Schmidt N, Peterlik D, Fuchsl A M, Reber S O: HPA axis changes during the initial phase of psychosocial stressor exposure in male mice. *The Journal of Endocrinology* 218: 193-203 (2013)
158. van Boxelaere M, Clements J, Callaerts P, D'Hooge R, Callaerts-Vegh Z: Unpredictable chronic mild stress differentially impairs social and contextual discrimination learning in two inbred mouse strains. *PLOS ONE* 12: e0188537 (2017)
159. Veenema A H, Reber S O, Selch S, Obermeier F, Neumann I D: Early life stress enhances the vulnerability to chronic psychosocial stress and experimental colitis in adult mice. *Endocrinology* 149: 2727-2736 (2008)
160. Verkuyl J M, Hemby S E, Joëls M: Chronic stress attenuates GABAergic inhibition and alters gene expression of parvocellular neurons in rat hypothalamus. *The European Journal of Neuroscience* 20: 1665-1673 (2004)

161. Verkuyl J M, Karst H, Joëls M: GABAergic transmission in the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus is suppressed by corticosterone and stress. *The European Journal of Neuroscience* 21: 113-121 (2005)
162. Viner R: Putting Stress in Life: Hans Selye and the Making of Stress Theory. *Social Studies of Science* 29: 391-410 (1999)
163. Vogel C, Marcotte E M: Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* 13: 227-232 (2012)
164. Von Werder K: Diagnosis of adrenal cortex diseases. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 123: 393-396 (1998)
165. Walker J J, Spiga F, Gupta R, Zhao Z, Lightman S L, Terry J R: Rapid intra-adrenal feedback regulation of glucocorticoid synthesis. *Journal of the Royal Society, Interface* 12: 20140875 (2015)
166. Weaver J U, Hitman G A, Kopelman P G: An association between a BcII restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *Journal of Molecular Endocrinology* 9: 295-300 (1992)
167. Wepler M, Preuss J M, Merz T, Hartmann C, Wachter U, McCook O, Vogt J, Kress S, Gröger M, Fink M, Scheuerle A, Möller P, Calzia E, Burret U, Radermacher P, Tuckermann J P, Vettorazzi S: Impaired Glucocorticoid Receptor Dimerization Aggravates LPS-Induced Circulatory and Pulmonary Dysfunction. *Frontiers in Immunology* 10: (2020)
168. West C P, Dyrbye L N, Shanafelt T D: Physician burnout: contributors, consequences and solutions. *Journal of Internal Medicine* 283: 516-529 (2018)
169. Williams D L, Connelly M A, Temel R E, Swarnakar S, Phillips M C, de la Llera-Moya M, Rothblat G H: Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Current Opinion in Lipidology* 10: 329-339 (1999)
170. Wochnik G M, Rüegg J, Abel G A, Schmidt U, Holsboer F, Rein T: FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 4609-4616 (2005)

171. Yamamori E, Iwasaki Y, Taguchi T, Nishiyama M, Yoshida M, Asai M, Oiso Y, Itoi K, Kambayashi M, Hashimoto K: Molecular mechanisms for corticotropin-releasing hormone gene repression by glucocorticoid in BE(2)C neuronal cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology* 264: 142-148 (2007)
172. Yehuda R, Southwick S M, Nussbaum G, Wahby V, Giller E L, Mason J W: Low urinary cortisol excretion in patients with posttraumatic stress disorder. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 178: 366-369 (1990)
173. Yehuda R, Teicher M H, Trestman R L, Levengood R A, Siever L J: Cortisol regulation in posttraumatic stress disorder and major depression: a chronobiological analysis. *Biological Psychiatry* 40: 79-88 (1996)
174. Zhou A, Bloomquist B T, Mains R E: The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing. *Journal of Biological Chemistry* 268: 1763-1769 (1993)

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen. Deshalb möchte ich an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, diesen Personen zu danken.

Herrn Prof. Dr. med. Harald Gündel danke ich für die Möglichkeit, die Promotion in der Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie durchführen zu können.

Zudem möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Stefan Reber für die Vergabe des Themas und das mir damit entgegengebrachte Vertrauen danken. Sie hatten immer einen Ratschlag, falls ich mal nicht weiterwusste.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Tuckermann für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Vielen Dank der Arbeitsgruppe Reber für die herzliche Aufnahme und die tatkräftige Unterstützung bei den anfallenden Aufgaben im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat. Dominik Langgartner für die intensive und unermüdliche Hilfsbereitschaft. Danke, dass ich mich bei Rückfragen und Problemen immer an dich wenden konnte und du dir die Zeit genommen hast, Unklarheiten zu klären.

Ebenso möchte ich Dr. rer. nat. Sandra Förtsch danken. Falls ein Versuch mal nicht so gut gelaufen ist, hattest du immer Verbesserungsvorschläge parat.

Außerdem möchte ich mich herzlichst bei Petra Hornischer und Ulrike Binder bedanken, die mich zu Beginn fachkundig im Labor eingearbeitet haben. Bei labortechnischen Schwierigkeiten und Fragen standen sie mir immer zur Seite. Auf die tägliche gemeinsame Zeit und die Gespräche beim Mittagessen habe ich immer gefreut. Die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Spaß bereitet.

Zuletzt möchte ich auch meiner Familie, insbesondere meiner Eltern, für den bedingungslosen Rückhalt danken. Ohne eure Unterstützung wäre das gesamte Studium einschließlich dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für euer offenes Ohr und die hilfreichen Ratschläge.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.