

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Charakterisierung des Proteoms der Retina der Maus in psychosozialen
Stressmodellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Franziska Anna Georgette Neubauer
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 30. Juni 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis.....	V
Bildverzeichnis	VI
1. Einleitung/ Ziel der Dissertation.....	1
2. Literaturdiskussion	2
2.1 Glaukom	2
2.1.1 Ätiologie und Klassifikation.....	2
2.1.2 Okulare Erkrankungen und Stress	4
2.2 Stress	5
2.2.1 Ätiologie und Pathogenese	7
2.3 Stressexperimente mit Mäusen.....	8
2.3.1 Early Life Stress (ELS)	10
2.3.2 Chronischer sozialer Stress (CSD)	11
2.3.3 (2R, 6R)-Hydroxynorketamin (HNK)-Gabe.....	12
2.4 Retina	14
2.5 Proteomik	17
2.5.1 Massenspektrometrische Proteomik	17
2.5.2 Proteomische Analysen der Retina	19
3. Material und Methoden.....	22
3.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Software	22
3.1.1 Geräte	22
3.1.2 Verbrauchsmaterial	22
3.1.3 Chemikalien.....	23
3.1.4 Software	24
3.2 Versuchstiere	25
3.2.1 Early Life Stress (ELS)	25
3.2.2 Chronischer sozialer Stress (CSD)	26
3.2.3 (2R, 6R)-Hydroxynorketamin (HNK)-Gabe.....	27
3.3 Vorgehensweise der proteomischen Experimente.....	27

3.3.1	Vorbereitung der Proben	27
3.3.2	In-Lösung Verdauung	29
3.3.3	Probenaufreinigung mittels <i>SOLAμ SPE well plates</i>	30
3.3.4	Flüssigkeitschromatographie (LC) – Electrospray-Ionisation (ESI) – MS/MS-Analyse.....	31
3.3.5	„Discovery Proteomik“- Strategie	32
3.3.6	Bioinformatik und Funktions- und Signalweganalyse.....	32
4.	Ergebnisse	34
4.1	ELS-Versuchsreihe	34
4.2	CSD-Versuchsreihe.....	39
4.3	HNK-Versuchsreihe.....	44
4.4	Vergleichende Signalweg-Analyse aller Versuchsreihen.....	49
4.4.1	Signalweg-Analyse der „Canonical Pathways“.....	49
4.4.2	Signalweg-Analyse der „Diseases and Biological Functions“	53
4.4.3	Signalweg-Analyse der „Upstream Regulators“	57
5.	Diskussion.....	61
5.1	Identifikation potenzieller Biomarker	62
5.1.1	Proteine der „Canonical Pathways“	62
5.1.2	Proteine der „Diseases and Biological Functions“	65
5.1.3	Proteine der „Upstream Regulators“	66
5.1.4	Weitere Schlüsselproteine der Versuchsreihen	68
5.2	Limitationen der Studie.....	69
5.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	70
6.	Zusammenfassung.....	72
	Literaturverzeichnis	74
	Anhang	83
	Danksagung	95
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
ACTH	adrenocortikotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
ALDOC	<i>Aldolase C</i>
AMPA	AMPA-Rezeptor
APP	Amyloid-Precursor-Protein
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
AVP	Arginin-Vasopressin
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CID	<i>Collision-induced Dissociation</i>
cm	Zentimeter
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CSD	chronischer sozialer Stress
CTRL	Kontrollgruppe
Da	Dalton

DTT	Dithiothreitol
ELS	Early Life Stress
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ESI	Elektrospray-Ionisation
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
FA	Ameisensäure
FDR	<i>false discovery rate</i>
FTMS	<i>Orbitrap-Fourier transform mass spectrometry</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung
GOBP	<i>gene ontology biological process</i>
GOCC	<i>gene ontology cellular components</i>
GOMF, GOMT	<i>gene ontology molecular functions</i>
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
HMOX1	Hämoxygenase-1
HNK	(2R, 6R)-Hydroxynorketamin
hnRNP	heterogene nukleäre Ribonukleoproteine
H ₂ O	Wasser
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
iBAQ	<i>intensity-based absolute quantification</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
LC	<i>liquid chromatography</i>
LFQ	<i>label-free quantification</i>
LTQ	<i>linear trap quadrupole</i>
M	Molar
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MDD	<i>Major Depressive Disorder</i>
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
<i>m/z</i>	Masse zu Ladung-Verhältnis
mg	Milligramm
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid

NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR2E3	<i>Photorezeptor-specific nuclear receptor</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PITPs	Phosphatidylinositol-Transferproteine
PSAP	<i>Prosaposin</i>
PSEN1	Präsenilin-1
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
Rcvrn	<i>Recoverin</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SARI	Serotonin-Antagonist-und- Wiederaufnahme-Inhibitoren
SSNRI	selektive Serotonin-Noradrenalin- Wiederaufnahmehemmer
SSRI	selektive Serotonin- Wiederaufnahmehemmer
TARC	<i>Translational Animal Research Centre</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>time of flight</i>
T-PER	<i>Tissue Protein Extraction Reagent</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Proteomische Analysen der Retina	20
Tabelle 2: Liste der Top 30 signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der ELS-Versuchsreihe	38
Tabelle 3: Liste der Top 30 signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der CSD-Versuchsreihe	43
Tabelle 4: Liste der Top 30 signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der HNK-Versuchsreihe	48
Tabelle 5: Liste aller signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der ELS-Versuchsreihe	83
Tabelle 6: Liste aller signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der CSD-Versuchsreihe	89
Tabelle 7: Liste aller signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der HNK-Versuchsreihe	92

Bildverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Auges mit Abflussweg des Kammerwassers (siehe Pfeil)	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Offenwinkel-/ Engwinkelglaukom.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung des ELS-Versuchsaufbaus	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung des CSD-Versuchsaufbaus	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Netzhautschichtung.....	16
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des verwendeten LTQ-Orbitrap-XL™-Systems von Thermo Fisher Scientific Inc. [87].....	18
Abbildung 8: Venn-Diagramm der identifizierten Proteine in der Kontrollgruppe (grün) und der ELS-Versuchsreihe (blau)	34
Abbildung 9: Volcano Plot der ELS-Versuchsreihe	35
Abbildung 10: Heat Map der unterschiedlich exprimierten Proteine von Kontroll- und ELS-Gruppe in der ELS-Versuchsreihe; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.	36
Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der ELS-Versuchsreihe gemäß der GOCC-Analyse.	37
Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der ELS-Versuchsreihe gemäß der GOMT-Analyse.	37
Abbildung 13: Venn-Diagramm der identifizierten Proteine in der Kontrollgruppe (grün) und der CSD-Gruppe (lila).....	39
Abbildung 14: Volcano Plot der CSD-Versuchsreihe	40
Abbildung 15: Heat Map der unterschiedlich exprimierten Proteine von Kontroll- und CSD-Gruppe in der CSD-Versuchsreihe; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.	41
Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der CSD-Versuchsreihe gemäß der GOCC-Analyse.	42
Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der CSD-Versuchsreihe gemäß der GOMT-Analyse.	42
Abbildung 18: Venn-Diagramm der identifizierten Proteine in der Kontrollgruppe (grün) und der HNK-Gruppe (rot).....	44

Abbildung 19: Volcano Plot der HNK-Versuchsreihe	45
Abbildung 20: Heat Map der unterschiedlich exprimierten Proteine von Kontroll- und HNK-Gruppe in der HNK-Versuchsreihe; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.	46
Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der HNK-Versuchsreihe gemäß der GOCC-Analyse.	47
Abbildung 22: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der HNK-Versuchsreihe gemäß der GOMT-Analyse.	47
Abbildung 23: Heat Map der häufigsten Signalwege „Canonical Pathways“ der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich. (a) Stellt die Aktivität der aufgeführten Signalwege in Abhängigkeit des p-Wertes dar, dabei weist die blaue Farbe auf verminderte und die rote Farbe auf erhöhte Aktivität des Signalweges hin. (b) Stellt die Aktivität der angeführten Signalwege in Abhängigkeit des Z-Scores dar, hierbei weist die violette Farbe auf verminderte und die orangene Farbe auf erhöhte Aktivität des Signalweges hin.	51
Abbildung 24: Heat Map exemplarischer Proteinprofile der jeweiligen Signalwege (a)-(j) in der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.	52
Abbildung 25: Heat Map der wichtigsten pathologischen Prozesse „Diseases and Biological Functions“ der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich. (a) Stellt die Aktivität der aufgeführten Prozesse in Abhängigkeit des p-Wertes dar, dabei weist die blaue Farbe auf verminderte und die rote Farbe auf erhöhte Aktivität des Prozesses hin. (b) Stellt die Aktivität der angeführten Prozesse in Abhängigkeit des Z-Scores dar, hierbei weist die violette Farbe auf verminderte und die orangene Farbe auf erhöhte Aktivität des Prozesses hin.	55
Abbildung 26: Heat Map der signifikantesten Proteine der jeweiligen pathologischen Prozesse (a)-(g) in der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.	56
Abbildung 27: Heat Map der wichtigsten Upstream Regulatoren „Upstream Regulators“ der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich. (a) Stellt die Aktivität der aufgeführten Regulatoren in Abhängigkeit des p-Wertes dar, dabei weist die blaue Farbe auf verminderte und die rote Farbe auf erhöhte Aktivität des Prozesses hin. (b) Stellt die Aktivität der angeführten Regulatoren in Abhängigkeit des Z-Scores dar, hierbei weist die violette Farbe auf verminderte und die orangene Farbe auf erhöhte Aktivität der Regulatoren hin.	59
Abbildung 28: Heat Map der signifikantesten Proteine der jeweiligen Upstream Regulatoren (a)-(g) in der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.	60

1. Einleitung/ Ziel der Dissertation

In der Augenheilkunde gilt das Glaukom als eine der bedeutungsvollsten Pathologien des okularen Systems. Etwa die Hälfte aller Erblindungen weltweit sind auf das Krankheitsbild zurückzuführen. Das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung stellt sich sehr heterogen dar, zu den häufigsten Formen gehören die Offenwinkel- und Winkelblockglaukome sowie das Normaldruckglaukom. Allgemein wird das Glaukom als multifaktoriell bedingte Augenerkrankung eingeschätzt, bei der pathologische Mechanismen in einer chronisch-progredienten Schädigung des Sehnervs münden. Die zugrundeliegenden Prozesse der Krankheit sind noch nicht vollends erforscht. Als derzeit wichtigster Risikofaktor zählt die Erhöhung des Augeninnendrucks. Aktuelle Bemühungen der Forschung zielen auf die Identifikation weiterer ursächlicher Faktoren ab. Dabei rücken vor allem immer wieder psychische Komponenten, wie Stress oder Depressionen ins Interessenfeld. Wiederkehrende medizinische Fallberichte lassen einen Zusammenhang zwischen dem psychischen Gesundheitszustand der Patienten und dem Auftreten okularer Erkrankungen vermuten. Auch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) richtet ihren Fokus auf psychische Erkrankungen, indem sie Stress und Depressionen als eine der größten Gesundheitsgefahren des 21. Jahrhunderts definiert. So leidet etwa jeder Zehnte unter chronischem Stress und jeder Zwanzigste an einer Depression. Ob diese Erkrankungen auch als Motor physischer Krankheitsbilder wie dem Glaukom fungieren, soll unter anderem in dieser Studie untersucht werden. Erkenntnisse hierzu könnten zukunftsweisend für die Therapie und Prävention des Glaukoms sein.

Zusammenfassend verfolgt diese Studie die nachfolgenden Ziele:

- 1.) Massenspektrometrische Charakterisierung des Proteoms der Retina der Maus von
 - a) einem Tiermodell mit Early Life Stress (ELS)
 - b) einem Tiermodell mit chronischem sozialem Stress (CSD)
 - c) einem DBA/2J-Mausmodell für inhärenten Stress
- 2.) Vergleich der unterschiedlichen Stressmodelle in Bezug auf ihre Auswirkungen, Effekte und Wirksamkeit auf das Proteom der Retina
- 3.) Charakterisierung der potentiell schützenden Wirkung von (2R, 6R)-Hydroxynorketamin (HNK) auf das retinale Proteom

2. Literaturdiskussion

2.1 Glaukom

Weltweit leiden etwa 285 Millionen Menschen unter Einschränkungen ihrer Sehkraft, circa 39 Millionen der Betroffenen davon gelten als blind [1]. Viele der zugrundeliegenden okularen Erkrankungen sind durch einen degenerativen Verlauf gekennzeichnet. Nur wenige Erkrankungsbilder lassen sich durch medizinischen Eingriff heilen und auch die Wiederherstellung verloren gegangenen Sehvermögens gilt als unwahrscheinlich. Der Visusverlust ist in der Regel also irreversibel.

Eine der relevantesten Erblindungsursachen stellt hierbei das Glaukom dar, welches für etwa jede zweite Erblindung ursächlich ist [2]. Schätzungen zufolge sind global circa 66 Millionen Menschen von dieser Erkrankung betroffen. Das Glaukom fasst eine Vielzahl heterogener Krankheitsbilder zusammen, die sich durch eine degenerative Neuropathie und dem fortschreitenden Zugrundegehen retinaler Ganglienzellen kennzeichnen [3]. Dieser Zelluntergang hat Sehstörungen und Gesichtsfeldausfälle zur Folge, die bei ausbleibender Diagnose und ohne entsprechende Therapie zur Erblindung führen. Da die Pathophysiologie des Glaukoms noch nicht vollends erforscht ist, erweist sich aber auch die Therapie des Krankheitsbildes nicht immer als zielführend [3]. Zu wenige Risikofaktoren sind bis dato identifiziert um die Krankheit gezielt therapieren zu können. Derzeitige Therapieansätze fokussieren sich nahezu ausschließlich auf die Senkung des Augeninnendrucks, der bewiesenermaßen einen anerkannten Risikofaktor darstellt [2].

2.1.1 Ätiologie und Klassifikation

Gegenwärtig wird das Glaukom als eine multifaktoriell bedingte Augenerkrankung eingeschätzt, bei der verschiedenste Ursachen zum Zelltod retinaler Ganglienzellen führen. Einen wesentlichen Risikofaktor stellt hierbei die Überhöhung des Augeninnendrucks dar. Unter physiologischen Bedingungen liegt dieser in einem Bereich von 10 bis 21 mmHg und wird durch die Sekretion und Drainage des Kammerwassers reguliert [4, 5]. Die Flüssigkeit wird, wie in Abbildung 1 dargestellt, zunächst durch den Ziliarkörper in die hintere Augenkammer sezerniert. Sie gelangt dann durch die Pupille in die Vorderkammer um dort Nährstoffe für Augenlinse, Iris (= Regenbogenhaut) und Kornea (= Hornhaut) bereitzustellen. Im Anschluss fließt das Kammerwasser weiter Richtung Kammerwinkel, der durch die Iris und Kornea gebildet wird. Letztlich verlässt es das Auge hier mehrheitlich über das Trabekelwerk, den Schlemm-Kanal und weitere Sammelkanäle in episklerale Kammerwasservenen, anteilig aber auch über uveoskleralen Abfluss in den allgemeinen venösen Ablauf [3, 4].

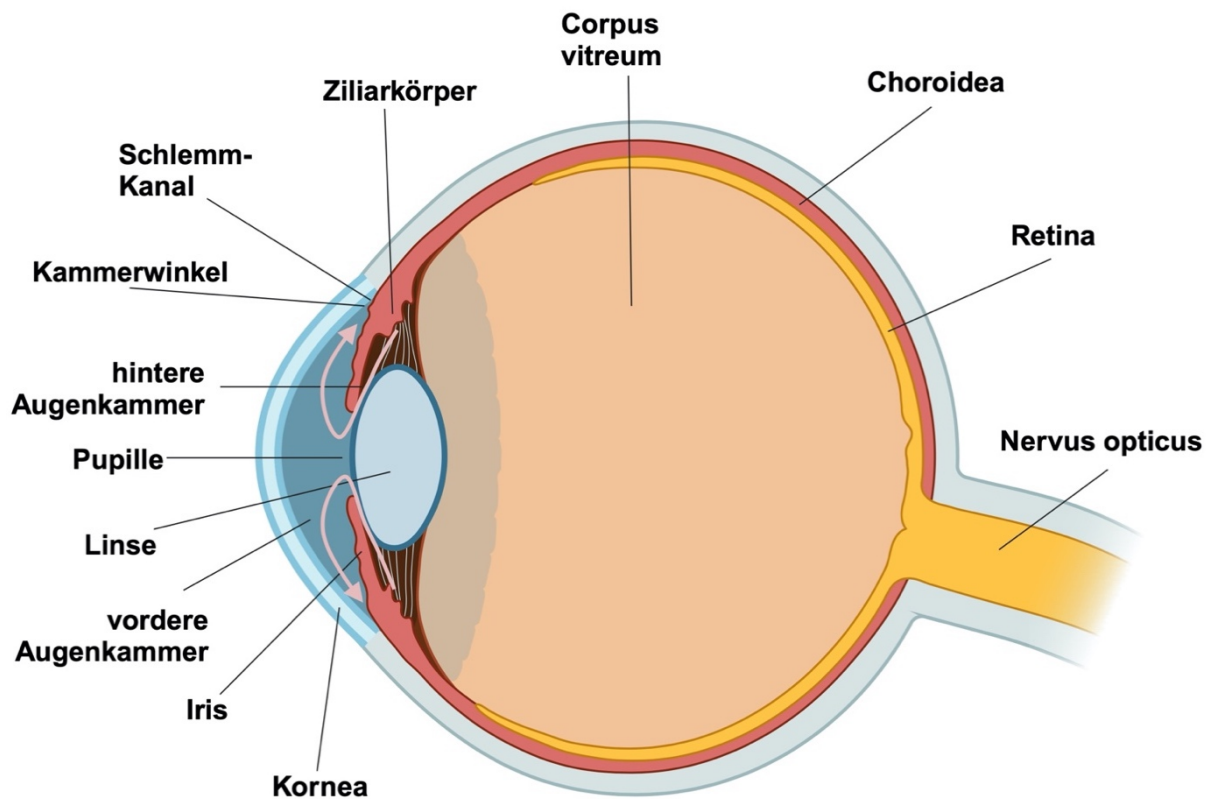


Abbildung 1: Aufbau des Auges mit Abflussweg des Kammerwassers (siehe Pfeil)

Wird der Fluss des Kammerwassers in einem der Abschnitte gestört, gerät die Balance ins Wanken und der Augeninnendruck steigt. Die Klassifikation der verschiedenen Glaukomformen orientiert sich folglich an der blockierten anatomischen Struktur. So unterscheidet man beispielsweise zwischen Offenwinkel-, Engwinkel- und Winkelblockglaukomen. Im Falle von Engwinkel- und Winkelblockglaukomen kommt es durch mechanische Verlegung des Kammerwinkels zu Abflussstörungen. Diese können sehr akut auftreten und sogenannte Glaukomanfälle mit schwersten klinischen Symptomen hervorrufen. Eine notfallmedizinische Intervention ist dann unabdingbar. Bei Offenwinkelglaukomen hingegen liegt die Abflussbehinderung im Trabekelwerk, diese Form verläuft eher chronisch und symptomarm [6]. Abbildung 2 stellt die anatomischen Unterschiede der genannten Glaukomformen schematisch dar. Epidemiologisch betrachtet ist das primäre Offenwinkelglaukom von größter Bedeutung [7]. Hierbei liegt eine idiopathische Abflussstörung im Trabekelwerk vor. Auch hier ist die Senkung des intraokularen Drucks die Therapie der Wahl. Ein Fortschreiten kann durch die symptomatische Therapie aber in der Regel nicht verhindert werden. Die Frage nach der genauen Entstehung der Abflussbehinderung und die Identifikation ihrer Risikofaktoren bleibt weiterhin ungeklärt. Zusätzlich stellt die Entdeckung des Normaldruckglaukoms die Medizin vor weitere

Herausforderungen. Diese Sonderform weist trotz eines normalen Augeninnendrucks typische okuläre Glaukom-Veränderungen auf [5]. Die Frage nach weiteren Risikofaktoren und der genauen Pathophysiologie des Glaukoms wird folglich immer lauter. Zur Entwicklung einer adäquaten und wirkungsvollen Therapie bedarf es unbedingt weiterer Ursachenforschung. Derzeit weisen bereits einige Studien auf weitere Krankheitsauslöser hin. So konnten beispielsweise lokale Durchblutungsstörungen des okulären Systems und gefäßschädigender oxidativer Stress als weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines Glaukoms identifiziert werden [2, 8].

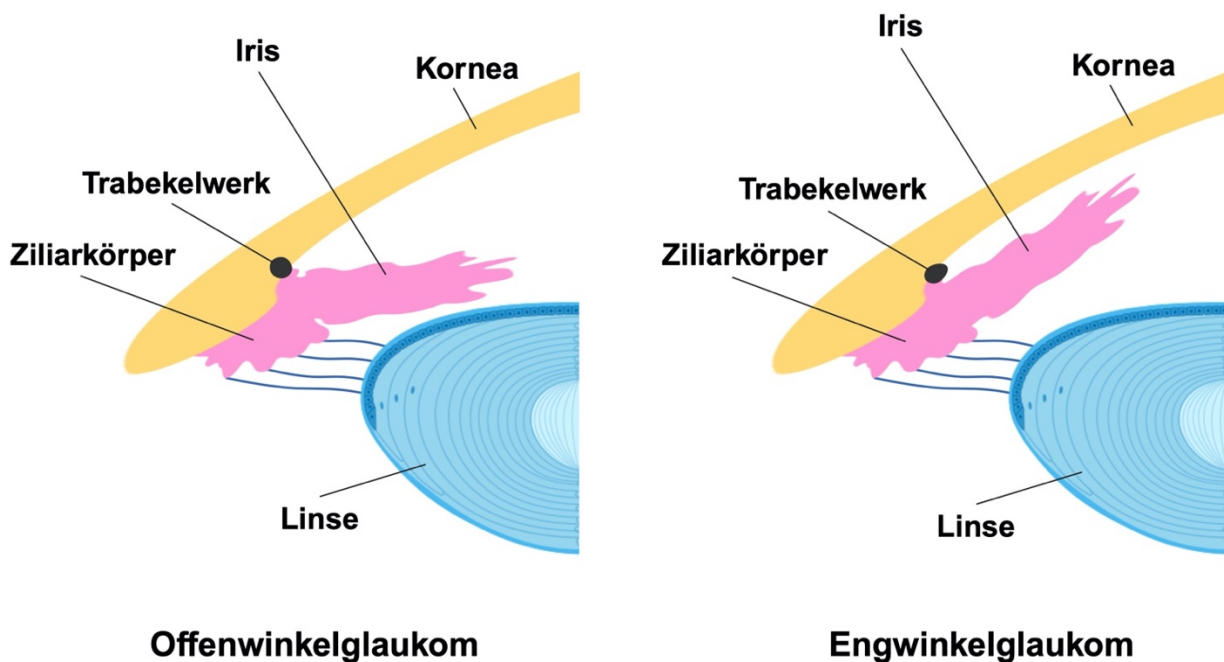


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Offenwinkel-/ Engwinkelglaukom

2.1.2 Okulare Erkrankungen und Stress

Aktuelle Forschungsarbeiten und Fallberichte legen nahe, dass das Auftreten okulärer Erkrankungsbilder oftmals in kausalem Zusammenhang mit verstärktem Stress und psychischen Belastungssituationen steht. Stress wird dabei immer häufiger nicht nur als Folge, sondern auch als nicht unwesentlicher Risikofaktor diskutiert [1, 9].

Zumeist bedeutet die Diagnosestellung einer okulären Erkrankung eine starke psychische Belastung für die Patienten. Durch die Einschränkung ihres Sehvermögens sind sie bisher unbekanntem Problematiken ausgeliefert. Neue Schwierigkeiten bei der Bewältigung des Alltags und Einschränkungen im alltäglichen Leben führen zu vermehrter Abhängigkeit von Dritten. Ein geringeres Selbstwertgefühl und vermindertes Selbstbewusstsein sind die Folge. Kürzlich veröffentlichte Studien weisen außerdem nach, dass sich Glaukom-Patienten

aufgrund ihres Handicaps feststellbar weniger bewegen. So korreliert der Rückgang der täglichen Schrittzahl mit der Schwere der visuellen Einschränkung [10]. Gleichbedeutend verschlechtern sich die mentale Gesundheit und die soziale Interaktion der Erkrankten. Zusätzlich beeinflusst auch die ständige Angst vor der Progredienz der Erkrankung die mentale Gesundheit der Patienten negativ [11, 12]. Betroffene sehen sich folglich einem dauerhaft erhöhten Stresslevel ausgesetzt, das wiederum eine weitere Progredienz der Krankheit begünstigt. Es ergibt sich ein Circulus vitiosus. Dabei führen sowohl akuter als auch chronischer Stress zu einer Erhöhung des intraokularen Drucks [13]. Dauert der Stress über einen längeren Zeitraum an, kann es darüber hinaus zu Dysregulationen der lokalen Mikrozirkulation von Auge und Gehirn kommen. Dies resultiert wiederum in partieller Hypoxie und Hypoglykämie (Hypometabolismus), wodurch betroffene Neuronen zwar nicht absterben, aber in einen Zustand der Inaktivierung eintreten [13]. Diese Inaktivität kann akut sein oder chronisch andauern.

Im Fokus neuer Therapieansätze stehen daher die Stressreduktion und Entspannungstechniken, um die mentale Gesundheit der Patienten zu stabilisieren. Mithilfe von Meditation, autogenem Training und Psychotherapie wird der Risikofaktor Stress dezimiert [14, 15]. Fallberichte und Studien zeigen, dass das Erlernen von Stressmanagement einen positiven Einfluss auf den Verlauf okularer Erkrankungen nimmt [16]. Auch das unterstützt die Schlussfolgerung, dass Stress als ursächlicher Faktor auf die Genese visueller Indispositionen einwirkt. Ein konkreter Nachweis auf pathophysiologischer Ebene fehlt derzeit allerdings noch.

2.2 Stress

Der Begriff Stress wird in vielerlei Hinsicht verwendet und ist demzufolge nicht einer festen Definition zu unterstellen. Näherungsweise lässt sich das Phänomen Stress aber als die Diskrepanz zwischen der Anforderung an ein Individuum und dessen Bewältigungsverhalten beschreiben. Führen äußere Faktoren zur Überforderung des Individuums, induzieren diese Stress [17]. Solche Faktoren können in unterschiedlichster Art und Weise wirken und werden unter dem Begriff ‚Stressor‘ zusammengefasst. Beispielsweise unterscheidet man physikalische (Lärm, Hitze, Nässe, etc.), körperliche (Verletzungen, Schmerzen, Hunger, etc.) und soziale (Konkurrenz, Isolation, Trennung, etc.) Stressoren. Wirken derartige Stressoren auf ein Individuum ein, lösen sie eine Stressreaktion des Organismus aus. Die Antwort des Individuums kann dabei sehr unterschiedlich ausfallen und sich auf unterschiedlichen Ebenen auswirken. Neben Modulationen der zellulären Mechanismen, kann es außerdem zu Veränderungen des humoralen Gleichgewichts oder gar zu Modifikationen der genetischen Expression kommen [17, 18]. Diese Modifizierungen wiederum prädisponieren den gestressten Organismus für die Genese von Folgeerkrankungen [19].

Die WHO stuft den Stress im ‚Europäischen Gesundheitsbericht 2009‘ als eine der größten Gesundheitsgefahren des 21. Jahrhunderts ein. In Deutschland sind laut einer Studie der Techniker Krankenkasse 8 von 10 Personen in unterschiedlicher Häufigkeit stressbelastet und jeder Dritte empfindet sogenannten „Dauerstress“ [20, 21]. Daten einer Studie des Robert-Koch-Instituts legen dar, dass 11 % der Befragten unter chronischem Stress leiden, der nicht selten weitere Krankheitsbilder nach sich zieht. Hierbei sind zumeist psychische Erkrankungen die Folge wie die Depression und das Burn-out-Syndrom [20, 22]. Die Depression selbst stellt mit einer Prävalenz von 5 % weltweit eines der verbreitetsten Krankheitsbilder dar. Frauen sind hierbei deutlich häufiger betroffen als Männer. Nicht selten endet die Erkrankung trotz Therapie im Suizid und zählt dadurch global gesehen zu den 20 häufigsten Todesursachen. In der Altersgruppe der 15 – 29-Jährigen steht der Suizid sogar an vierter Stelle der häufigsten Sterbeursachen [23, 24].

Starke globale Auswirkungen auf die geistige Gesundheit der Bevölkerung sind nun auch durch die Corona-Pandemie zu verzeichnen. Im ersten halben Jahr nach Ausbruch der ersten Covid-19 Fälle im Dezember 2019 untersuchten viele Studien die Konsequenzen der Pandemie für die mentale Gesundheit der Menschen. Eine Metaanalyse zeigt hier, dass die Prävalenz von Stress, Angststörungen und Depressionen bereits in den Anfangsmonaten der Pandemie signifikant gestiegen ist [25]. Weitere Befragungen ergaben folgende Ergebnisse: 77 % der Teilnehmenden fühlten sich einem moderaten Stresslevel ausgesetzt und circa 35 % gaben an unter stärkeren Depressionen zu leiden [26]. Hiervon sind vor allem jüngere Menschen besonders häufig betroffen. Sie gelten daher als äußerst vulnerabel gegenüber psychischen Belastungssituationen. Auch nach Ende der Pandemie und Wiederaufnahme des normalen gesellschaftlichen Lebens leiden gerade Schulkinder weiter unter den Folgen der Pandemie. Erhebliche Lernrückstände durch Schulschließungen während der Lockdowns sind auch heute noch zu konstatieren [27]. So erfahren Schulkinder weiterhin durch schlechte schulische Leistungen akuten Stress. Darüber hinaus sind außerdem Patienten mit dem Long-Covid-Syndrom zu nennen. Das Auftreten der entsprechenden Symptomatik, die von Atemlosigkeit bis zu extremer Fatigue reicht, führt bei Betroffenen zu einem erhöhten Stresslevel [28, 29]. Neben der körperlichen Belastung durch die Krankheitssymptome, leiden die Patienten in der Folge auch unter Beeinträchtigungen ihrer mentalen Gesundheit. Voraussichtlich wird das Gesundheitssystem also auch in Zukunft noch durch die Nachwirkungen der Corona-Pandemie auf die Probe gestellt. Hier könnte insbesondere der Umgang mit Stress und eine frühzeitige Intervention das Fortschreiten in schwerwiegendere Krankheitsbilder verzögern oder sogar abwenden. Oder letztlich eine verlässliche medikamentöse Therapie der Depression deutliche Entlastung bringen.

2.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Ursprünglich ist die Stressbarkeit von Organismen ein überlebenswichtiger Mechanismus. So sorgt der Körper in Gefahrensituationen für höchstes Auffassungsvermögen und eine gesteigerte Leistungsfähigkeit, ohne die das Überleben kaum gesichert werden könnte [30]. Doch neben lebensbedrohenden Ereignissen können auch andere Faktoren eine Stressreaktion auslösen. Dazu gehören sowohl physische als auch psychische Belastungen. Eine Verletzung kann dabei ebenso Stress verursachen wie die Trennung von einem geliebten Menschen. Sieht sich ein Individuum nun einem Stressor ausgesetzt, ganz gleich welcher Art dieser ist, so wird immer die gleiche Reaktion in Gang gesetzt [18, 31]. Der Hauptakteur dieses Prozesses ist die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) (siehe Abbildung 3).

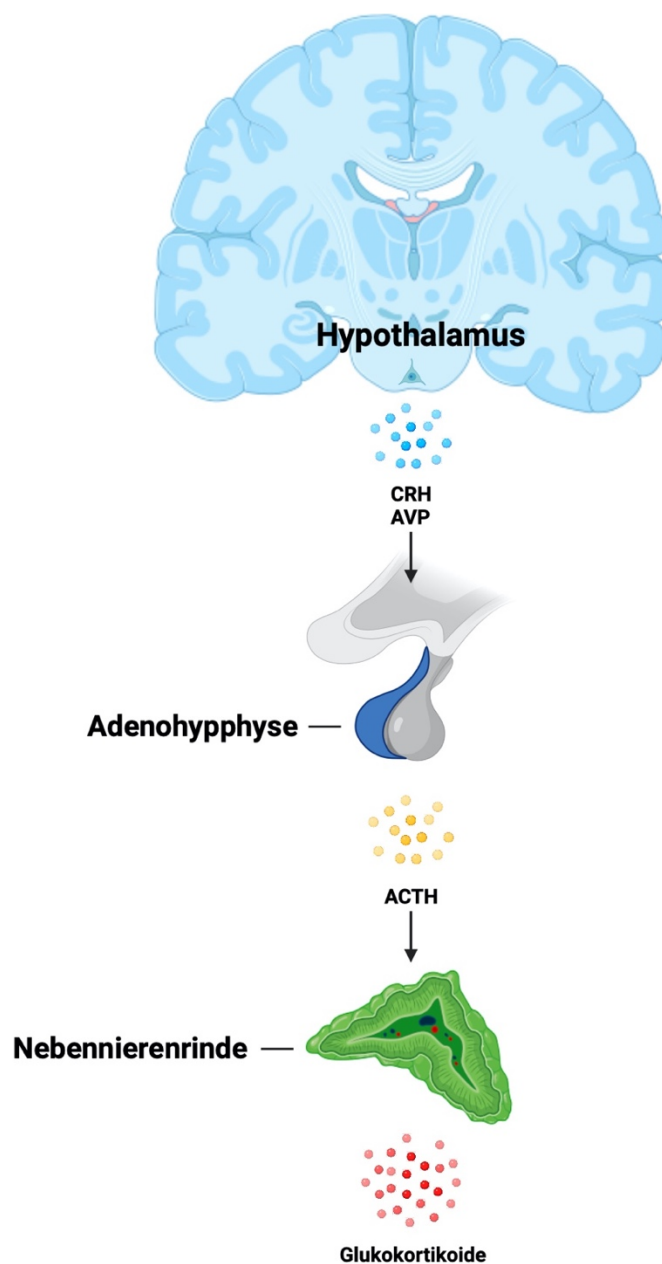


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Sie steuert die Freisetzung des „Stresshormons“ Cortisol (bei Nagetieren Corticosteron). Als Auslöser der Reaktion fungiert der Stress-Stimulus, der parvozelluläre Neurone im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus aktiviert [32]. Infolgedessen werden das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und das antidiuretische Hormon (ADH) (\triangleq Arginin-Vasopressins (AVP)) ausgeschüttet. CRH gelangt anschließend über das hypophysäre Pfortadersystem zur Adenohypophyse und bewirkt dort die Sekretion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH). ACTH wiederum regt die Nebennierenrinde zur Bildung von Glucocorticoiden wie dem Cortisol an [33]. Das Cortisol wirkt dann über Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-Rezeptoren in den Zellen. Die Folgen sind eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels, die Hemmung von Immun- und entzündlichen Prozessen sowie die Steigerung von Herzfrequenz und Blutdruck [33]. Darüber hinaus stimuliert Cortisol ebenso das Nebennierenmark, wodurch es zur Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin und letztlich zur Sympathikusaktivierung kommt [33, 34]. Anhaltende bzw. wiederkehrende Stress-Exposition induziert Adaptations- oder Maladaptationsmechanismen, die die beschriebene Stressreaktion modifizieren. Dabei entscheiden individuelle Faktoren ob dies zu einer Abschwächung oder Verstärkung der Reaktion führt [35].

2.3 Stressexperimente mit Mäusen

Die psychiatrische Grundlagenforschung nimmt sich aufgrund des steigenden Interesses in den vergangenen Jahren der genaueren Untersuchung der Stresseinwirkung an und bedient sich hierfür an der Durchführung von Tierversuchen. Diese ermöglichen es die Auswirkungen auf den Organismus sowohl auf Verhaltensebene als auch auf immunologischer, endokriner und neuronaler Ebene zu analysieren [36, 37]. Die Versuchsmodelle basieren aus praktikablen Aspekten primär auf Experimenten mit Nagetieren, vornehmlich Mäusen, und bieten darüber hinaus den Vorteil, dass sich über 90 % der Gene von Mensch und Nagern gleichen [38, 39]. Die Forschungsergebnisse der Mausmodelle lassen also grundsätzlich translationale Schlüsse zu. Auch das menschliche Gehirn ähnelt dem von Mäusen im strukturellen Aufbau sehr, so sind in beiden Organismen die gleichen Hirnregionen in der Verarbeitung von Stress und Angst beteiligt. Hierzu gehören der präfrontale Kortex, die Amygdala und der Hippocampus [40]. In der Folge werden gleichartige stress-induzierte Verhaltensweisen wie muskuläre Hypertension, Inkontinenz und Vermeidungsverhalten bei den Tieren beobachtet. Die Versuchsmodelle verfolgen unterschiedliche Strategien, um Stress auf die Tiere auszuwirken, dabei sind drei methodische Ansätze zu unterscheiden. Die gewünschte psychische Symptomatik kann einerseits durch Manipulation der äußeren Bedingungen, andererseits durch Genmanipulation oder Pharmakotherapie evoziert werden [41]. Die Umwelt der Tiere kann auf verschiedenste Weise verändert werden. Einige Versuchsskizzen setzen die Tiere dabei akuten Stressoren wie Konfrontationen mit Raubtieren oder einem

Unterwasser-Trauma aus [42, 43]. In der Folge entwickeln die Versuchstiere Verhaltensweisen, die mit einer posttraumatischen Belastungsstörung vergleichbar sind [37]. Andere Modelle wiederum bedienen sich am Einsatz von Pharmaka. Durch die Gabe von Meta-Chlorphenylpiperazin oder Pentetrazol werden beispielsweise Angststörungen imitiert [40]. Auch Modelle des Drogenentzugs weisen hierzu viele Similaritäten auf und bieten sich als Stressmodelle an. Zuletzt ist die Genmanipulation von Mäusen als weiterer Versuchsansatz anzuführen. Das sogenannte Gen-Targeting ermöglicht das vollständige Abschalten einzelner Gene (Gen-Knockout) und somit die Aufzucht von Mausstämmen mit depressionsähnlichem Phänotyp [37, 44]. Zur Validierung der Versuchsmodelle und ihrer Effektivität wurden weitere Testverfahren entwickelt. Im Fokus dieser Kontrollversuche stehen objektivierbare Symptome der psychischen Erkrankungen, wie Anhedonie, Schlafstörungen, verändertes Essverhalten, Gewichtsverlust, psychomotorische Störungen und sozialer Rückzug [45]. Bei Nachweis dieser Symptomatiken kann darauf geschlossen werden, dass das Versuchsmodell zielführend ist. Mögliche Testverfahren stellen hier der Interaktionstest, der Schwimmtest und der Saccharose-Präferenztest dar [35, 46, 47].

Die Art des wirkenden Stressors legt in der Folge die Art des erfahrenen Stress fest. Ob dabei Unterschiede in der Reaktion des Organismus bestehen, gilt es noch zu klären. Diese Studie nimmt sich der Untersuchung von gleich zwei Umständen an. Auf der einen Seite soll geklärt werden ob durch den einwirkenden Stress im Allgemeinen Veränderungen am Auge feststellbar sind. Ist dies der Fall, so soll auf der anderen Seite außerdem untersucht werden ob Stress jeglicher Art dieselbe Reaktion in Gang setzt oder ob unterschiedliche Arten von Stress in ihrer Auswirkung auf das okulare System divergieren. Zuletzt gilt es zudem die involvierten Signalwege und ihre Hauptakteure zu identifizieren. Um diese Thematik tiefgreifender aufzuarbeiten, finden drei etablierte Stressmodelle in dieser Studie Anwendung. Zuerst ist das „Early Life Stress“-Modell zu nennen. Hier erfahren die Versuchstiere bereits kurz nach der Geburt während ihrer Entwicklungsphase eine extreme Belastung. Bisherige Studien des Modells zeigen stabile Ergebnisse und signifikante Auswirkungen des gewählten Ansatzes, die sich sowohl akut als auch bis ins Erwachsenenalter der Tiere manifestieren [48]. Darüber hinaus stellt sich sozialer Stress als überaus potenter und etablierter Stressor dar. Besonders vielversprechende und vor allem reproduzierbare Ergebnisse liefert das „Chronic social defeat“-Modell mit dem Mausstamm C57Bl/6N [40]. Durch wiederholte Konfrontation mit einem aggressiven und dominanten Artgenossen werden auch hier akute und chronische Effekte von Stress ausgelöst. Abschließend wird die durch Inzest entwickelte Mauslinie DBA/2J untersucht. Der Mausstamm gilt als bestes Untersuchungsmodell bei pathologischen Angststörungen und dient in der Forschung außerdem als ein etabliertes Glaukommodell [38, 49, 50]. Somit vereinen die Tiere gleich beide Untersuchungsgegenstände dieser Studie.

Zusätzlich wird der Versuchsgruppe das Pharmakon (2R, 6R)-Hydroxynorketamin verabreicht um dessen Wirksamkeit zu untersuchen.

2.3.1 Early Life Stress (ELS)

In "Early Life Stress"-Modellen werden Jungtiere bereits wenige Tage nach ihrer Geburt durch Stress belastet. Die Tiere befinden sich dabei in einer sehr sensiblen Entwicklungsphase [51]. Dieser Zeitraum wird bewusst gewählt, um herauszufinden welche Auswirkungen der Stress auf die Entwicklung des Tieres nimmt.

Der Versuchsaufbau sieht vor die Welpen über das Verhalten der Mutter zu belasten. Die Interaktion zwischen der Mutter und ihren Jungtieren wird dabei ohne direkte Intervention des Versuchsleiters manipuliert. Dies gelingt, indem die Tiere in ein Gehege mit geringem Angebot an Nistmaterial gesetzt werden. Der Boden der Käfige wird dafür mit weniger Einstreu bedeckt und ein feinmaschiges Aluminiumgitter darübergerlegt. Die Mäuse der Kontrollgruppe hingegen werden mit ausreichend Einstreu und Nistmaterial ausgestattet (in Abbildung 4 schematisch dargestellt). In der Folge zeichnen sich deutliche Unterschiede im Verhalten der Muttertiere ab. Die Maus des Stressmodells verlässt ihre Jungtiere und das Nest deutlich häufiger als die der Kontrollgruppe. Interessanterweise bleibt die Dauer der Nestaufenthalte allerdings unbeeinflusst. Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass sich die Qualität der Fürsorge im Gegensatz zur Quantität nicht ändert.

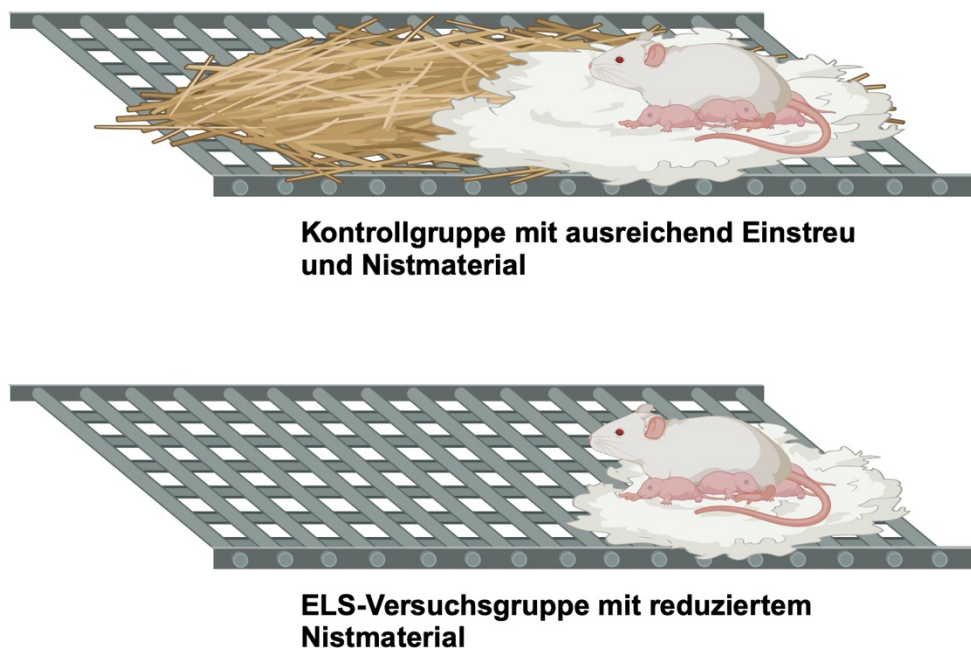


Abbildung 4: Schematische Darstellung des ELS-Versuchsaufbaus

Diese Manipulation reicht bereits aus, um bei den Welpen deutliche Zeichen von Stress festzustellen. Zum einen reduziert sich das Gewicht der Jungtiere merkbar und zum anderen können erhöhte basale Plasma-Corticosteron- und ACTH-Werte gemessen werden. Bei den CRH-Werten allerdings zeigt sich ein anderes Bild, diese sind bei der Kontrollgruppe deutlich höher als bei der Versuchsgruppe. Die Tiere werden diesem Stress etwa 7 Tage lang ausgesetzt und wachsen danach unter gleichen Bedingungen heran. Unterzieht man die ELS-Mäuse und die Kontrollgruppe im ausgewachsenen Zustand weiteren Tests, so werden auch hier klare Unterschiede deutlich. Die Lern- und Erinnerungsleistungen der Tiere des Versuchsmodells unterliegen eindeutig den Leistungen der Kontrolltiere und auch die veränderten Werte von CRH und Plasma-Corticosteron bleiben bestehen. Anhand von ELS-Versuchen lassen sich also akute wie bis ins Erwachsenenalter andauernde neuroendokrine Veränderungen und kognitive Anomalien bei den Versuchstieren provozieren [48, 52].

2.3.2 Chronischer sozialer Stress (CSD)

Im CSD-Modell (*chronic social defeat*, CSD) werden die Versuchstiere sozialem Stress ausgesetzt. Ziel des Versuches ist es dadurch chronischen Stress bei den Tieren auszulösen und dessen Folgen für die Individuen untersuchen zu können [53].

Für den Versuch werden zwei verschiedene Mausstämme ausgewählt, die sich in ihrem Sozialverhalten unterscheiden [54]. Die Grundlage des Modells ist dabei das Territorialverhalten männlicher Mäuse. Eine Art weist deutlich aggressiveres Verhalten auf als die andere. Die Mäuse werden zur Provokation eines Konflikts während des Versuches in einen gemeinsamen Käfig gesetzt. Zur Minimierung der physischen Belastung durch Verletzungen befindet sich zwischen den Tieren eine Trennwand, die lediglich sensorischen Kontakt erlaubt. Ungeachtet dieser Trennung versucht die aggressive Maus, den Konkurrenten zu attackieren. Die Auseinandersetzungen dauern etwa 5-10 Minuten an, bis die unterlegene Art mit weiteren Aggressoren konfrontiert wird (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5: Schematische Darstellung des CSD-Versuchsaufbaus

Der Vorgang wird über mehrere Tage mehrmals täglich wiederholt. Der Versuch beeinflusst das Verhalten der Tiere in dramatischer Art und Weise, es lassen sich Symptome von affektiven Störungen beobachten. In nachfolgenden Versuchen, wie dem Interaktionstest, zeigen die Tiere soziale Vermeidungsstrategien und Unterwürfigkeit [54]. Die Symptome erinnern an depressives und ängstliches Verhalten [53]. Im Rahmen des CSD-Modells entwickeln die Versuchstiere neben den Verhaltensstörungen auch andere Pathologien. Beispielsweise weisen die Tiere im Anschluss an den Versuch einen erhöhten Blutglukosespiegel auf [55]. Der Stress beeinträchtigt damit offensichtlich auch den Glukosestoffwechsel der Mäuse. In der Folge kann es zu Schädigungen des Hippocampus kommen. Davon ist besonders das räumliche Erinnerungsvermögen der Tiere betroffen, wie aus dem Y-Maze-Test hervorgeht [55]. Neueste Studien ergaben, dass die Stressbelastung durch CSD-Versuche zu dauerhaften strukturellen Veränderungen bestimmter Gehirnregionen führt [56]. Synaptischer Umbau im präfrontalen Kortex und der basolateralen Amygdala scheinen ein Anzeichen für die neuronale Adaptation an die chronische Belastung zu sein. Dabei kommt es unter anderem auch zur Herabregulierung der VGLUT1 mRNA in der Amygdala und vermehrter Acetylierung von Histonen im Hippocampus [57, 58]. Weitere identifizierte Biomarker der Versuchsreihe sind Proteine der Signaltransduktion und der synaptischen Plastizität, wie Calmodulin, Phosphatidylinositol-Transferproteine (PITPs) und V-ATPasen [59]. Der durch CSD-Modelle hervorgerufene chronische Stress verursacht zusammenfassend zahlreiche pathologische Veränderungen in der gesamten Physiologie der Mäuse [58].

2.3.3 (2R, 6R)-Hydroxynorketamin (HNK)-Gabe

Derzeit erfolgt bei auftretendem Stress aufgrund eines mangelnden Bewusstseins in der Bevölkerung in der Regel keine therapeutische Intervention zur Reduktion dessen. Nur wenigen Menschen ist bekannt, dass Stress als wesentlicher Risikofaktor in der Genese vieler Erkrankungen agiert. Zur Therapie kommt es meist erst bei Auftreten von Folgeerkrankungen, wie depressiven Störungen. Diese werden gegenwärtig wiederum vorrangig mithilfe der Pharmakotherapie behandelt. Am häufigsten finden selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), selektive Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI) und α_2 -Adrenorezeptor-Antagonisten wie Mirtazapin Anwendung [60, 61]. Diese Substanzen wirken über verschiedene Mechanismen an der Präsynapse und erhöhen die Konzentration von Serotonin und/ oder Noradrenalin im synaptischen Spalt. Dieser Wirkweise bedienen sich auch andere Pharmaka wie Serotonin-Antagonisten-und-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SARI), sowie trizyklische Antidepressiva [60]. Die Konzentrationszunahme der Neurotransmitter hat in der Regel eine stimmungsaufhellende Wirkung zur Folge. Voraussetzung für den Wirkeintritt ist dabei also ein zugrundeliegender Mangel dieser

Neurotransmitter. Liegt ein solcher Mangel nicht vor, bleibt der Therapieansatz allerdings wirkungslos. Behandlungsalternativen bieten der Einsatz von Psychotherapie oder anderen Medikamenten wie Anxiolytika, Antipsychotika und Stimmungsstabilisierern [61].

Bei (2R, 6R)-Hydroxynorketamin (HNK) handelt es sich um einen Metaboliten des (R)-Ketamins, welcher nun in den Fokus aktueller Antidepressiva-Forschungen gerückt ist [62]. Grund dafür sind die Bestrebungen eine neue Generation schnell-wirkender Antidepressiva zu entwickeln. Diese sollen die zuvor angeführten Mittel ablösen und zu einer Verbesserung bei der Therapie depressiver Erkrankungen führen, da der Wirkungseintritt gebräuchlicher Medikamente meist erst nach einigen Wochen oder sogar Monaten erfolgt oder ganz ausbleibt [63, 64]. In der Konsequenz gestaltet sich die Auswahl des wirkungsvollsten Mittels für einen Patienten als ein sehr langwieriger Prozess. Doch gerade bei depressiven Verstimmungen mit beispielsweise suizidalen Zügen ist Eile geboten. Diese Menschen haben weder die Zeit, noch die Kraft sich einer umständlichen Medikamentenauswahl zu stellen [65]. So rückten immer wieder Ketamine in das Zentrum der Forschung. Sie weisen bekanntermaßen einen bedeutend schnelleren Wirkungseintritt von nur wenigen Stunden und gute antidepressive Eigenschaften auf. Allerdings verursachen sie auch starke Nebenwirkungen, wie ein hohes Abhängigkeitspotential und rufen häufig dissoziative Störungen hervor. Folglich wurde Ketaminen für die Behandlung von Depressionen oder ähnlichen Erkrankungen bisher keine Zulassung erteilt. Neuere Ergebnisse einer Studie deuten aber darauf hin, dass nicht das Ketamin selbst für die antidepressive Wirkung verantwortlich ist, sondern vielmehr die Verstoffwechslung dessen eine übergeordnete Rolle im Wirkungsprozess spielt [62, 66]. Besonders häufig werden dabei die Metaboliten (2S, 6S; 2R, 6R)-HNK im Plasma und Gehirn der Versuchstiere nachgewiesen [62, 67]. Bei näherer Untersuchung wird deutlich, dass das (2R, 6R)-Hydroxynorketamin der wirkungsvollere der beiden Enantiomere ist. Das Reagenz scheint entgegen der bislang geltenden Forschungsmeinung seine Wirkung nicht über die direkte Blockade der NMDA-Rezeptoren zu entfalten, sondern über die Aktivierung der AMPA-Rezeptoren. Im Zuge dieser Stimulierung steigert es AMPAR-assoziierte exzitatorische postsynaptische Potenziale (EPSPs) im Hippocampus, die offenbar antidepressiv wirken. Außerdem zeigen die Tiere nach HNK-Gabe nachweislich weniger der fatalen Nebenwirkungen des Ketamins. Andere Studien wiederum sprechen dem Metaboliten ausreichende antidepressive Effekte ab [68-70]. Zellversuche zeigen eine Steigerung der Glykolyse-Aktivität bei Inkubation mit dem Derivat [71]. Es gilt also weiterhin die genauen Umstände des Wirkungsmechanismus zu identifizieren und Unstimmigkeiten in Bezug auf die Wirksamkeit auszuräumen [67, 72]. Grundsätzlich lässt sich jedoch festhalten, dass viele Studien vermuten lassen, dass HNK ein vielversprechendes Mittel zur Therapie depressiver Erkrankungen sein wird. Daher bedarf es trotz gegenteiliger Ergebnisse weiterer Forschung im Einsatz von HNK.

2.4 Retina

Das Auge lässt sich funktionell in lichtbrechende und lichtwahrnehmende Anteile gliedern [73]. Die Netzhaut (= Retina) gilt als das wahrnehmende Segment des Auges. Sie kleidet den Augenhintergrund aus und wandelt den physikalischen Reiz des Lichtes mittels photochemischer Prozesse in neuronale Reize um. Entwicklungsgeschichtlich ist die Retina als ein vorgeschobener Hirnanteil zu betrachten, sie bildet sich als eine Ausstülpung des Zwischenhirns heraus [74]. Definitionsgemäß ist die Netzhaut also Teil des zentralen Nervensystems (ZNS) und als Extension des Gehirns zu betrachten [75]. Dies bestätigt sich ebenfalls in Studien, die die Eigenschaften des Organs untersuchen. Beispielsweise lassen sich sehr ähnliche Immunantworten in Retina, Gehirn und Rückenmark beobachten und auch beim Regenerationsverhalten der Organe zeigen sich Ähnlichkeiten. Sehnerv und Netzhaut verfügen wie das ZNS nur über schlechtes axonales Regenerationspotenzial nach einer Verletzung. Darüber hinaus existiert zwischen den angrenzenden Strukturen und der äußersten Schicht der Netzhaut eine Blut-Retina-Schranke, die dem Aufbau der Blut-Hirn-Schranke gleicht. Aufgrund der zahlreichen Similaritäten ist die Netzhaut beliebter Untersuchungsgegenstand für Forschungen im Bereich des ZNS und dessen Pathologien geworden. Es wird davon ausgegangen, dass Erkenntnisse aus Retina-Studien auf das ZNS übertragbar sind und vice versa. Die Retina bietet dabei aber vor allem den Vorteil der besseren Zugänglichkeit für Untersuchungen, da sie im Gegensatz zu Gehirn und Rückenmark auch non-invasiv examiniert werden kann [75].

Der Aufbau der Netzhaut ist sehr komplex. In der Histologie werden 10 Schichten unterschieden, die sich zwischen der Bruch-Membran der Choroidea (= Aderhaut) und dem Corpus vitreum (= Glaskörper) erstrecken (siehe Abbildung 6) [73, 76]. Zunächst schließt sich das Pigmentepithel an die Bruch-Membran an. Dieses bildet die Blut-Retina-Schranke aus und dient zudem dem Stoffaustausch. Benachbart hieran liegt die Photorezeptorenschicht mit den Außen- und Innensegmenten der Stäbchen und Zapfen. Es folgt die äußere Gliagrenzmembran, die sich aus den Müller-Gliazellen zusammensetzt und die äußere Körnerschicht, welche die Perikaryen der Photorezeptoren enthält. Die nächste Ebene dient der Signalübertragung von den Sinneszellen auf die Bipolarzellen und wird als äußere plexiforme Schicht bezeichnet. Im darauffolgenden Abschnitt befinden sich die Perikaryen der Bipolarzellen, sowie der Amakrin- und Horizontalzellen. Sie sorgen in der inneren Körnerschicht für die Kontrastverstärkung der Signalweitergabe. Ist diese erfolgt, werden die Signale weiter zwischen Bipolarzellen und multipolaren Ganglienzellen übertragen. Dies geschieht auf Ebene der inneren plexiformen Schicht. Es schließt sich die Ganglienzellschicht mit den Perikaryen der multipolaren Ganglienzellen an. Die Axone der benannten Ganglienzellen ziehen dann weiter in die angrenzende Nervenfaserschicht, die zudem auch die großen Blutgefäße der Netzhaut beherbergt. Als letzte Schicht ist die innere

Gliagrenzmembran zu nennen. Hier liegen die Fortsätze der Müller-Gliazellen, die sich im Verlauf zum Nervus opticus vereinigen. Das Licht selbst trifft zuerst auf die innere Gliagrenzmembran und muss anschließend alle weiteren Schichten durchdringen, bis es zu den Photorezeptoren gelangt und dort in elektrische Signale umgewandelt wird. Die neuronale Impulsweiterleitung verläuft dann wieder in die entgegengesetzte Richtung, man spricht daher vom inversen Aufbau der Retina. Der Nervus opticus schließt sich aus den Axonen der retinalen Ganglienzellen zusammen und verlässt den Augapfel zur weiteren Verarbeitung über die Papilla nervi optici (Sehnervpapille) in Richtung des Corpus geniculatum laterale des Thalamus [73, 75]. Im Bereich der Sehnervpapille befinden sich keinerlei Photorezeptoren, einfallendes Licht kann hier also nicht wahrgenommen werden, man spricht vom sogenannten blinden Fleck. Dieser Punkt ist mithilfe eines Ophthalmoskops gut auf dem Augenhintergrund zu erkennen. Hier treten neben dem Nerven auch zahlreiche Äste der Arteria und Vena centralis retinae zur Blutversorgung der Netzhaut ein und aus. Über den Augenspiegel lässt sich außerdem noch ein weiterer markanter Bereich des Augenhintergrunds identifizieren [73]. Dieser liegt lateral der Papille und erscheint als rötlich-gelber Fleck (Macula lutea). Im Zentrum der Macula lutea befindet sich ein gefäßfreier Bereich mit besonders hoher Zapfen-Dichte, die Fovea centralis. Dort leitet jede Photorezeptorzelle ihre Signale über genau eine Bipolarzelle an eine multipolare Ganglienzelle weiter. Damit ergibt sich für dieses Gebiet eine maximale Reizauflösung (da keine Signalkonvergenz) und die Stelle des schärfsten Sehens.

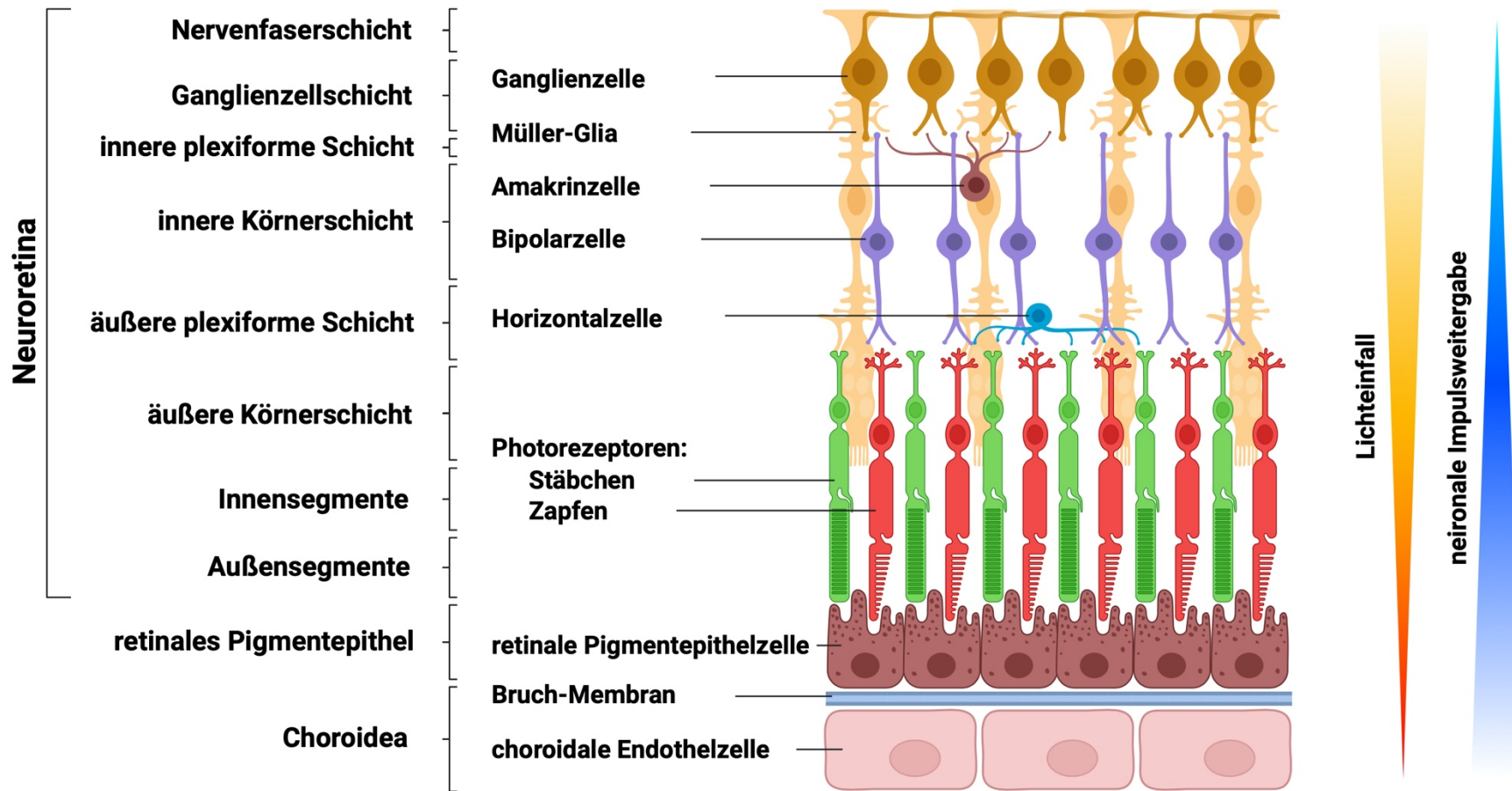


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Netzhautschichtung

2.5 Proteomik

2.5.1 Massenspektrometrische Proteomik

Die Gesamtheit aller Proteine in einem Gewebe oder einer Körperflüssigkeit wird als das Proteom bezeichnet. Der Forschungszweig der Proteomik befasst sich unter standardisierten Bedingungen mit der genauen Untersuchung dessen [77]. In jüngster Vergangenheit rückte das Forschungsfeld immer weiter in den Vordergrund der Krankheitslehre [78]. Mithilfe der Proteomik lassen sich Krankheiten in ihrer Entstehung und Entwicklung besser verstehen. Denn im Unterschied zum Genom befindet sich das Proteom im dynamischen Wandel und reagiert auf verschiedenste Einflüsse [79]. Durch die Aufzeichnung dieses Prozesses lassen sich wichtige Signalwege in der Pathogenese einer Erkrankung identifizieren und der tatsächliche physiologische Status einer Probe festhalten. So könnten proteomische Analysen in Zukunft beispielsweise zur Früherkennung von Krankheiten beitragen und bei der Auswahl, sowie der Entwicklung einer geeigneten und individualisierteren/ individuelleren Therapie, helfen [80].

Um die Proteine einer Probe zu identifizieren, bedient sich die Proteomik hauptsächlich der Methode der Massenspektrometrie (MS). Hier werden Proteine und andere Makromoleküle in einem Ionengas über die Masse einzelner ihrer Ionen analysiert und quantifiziert. Dabei können zwei unterschiedliche Strategien verfolgt werden. Auf der einen Seite gibt es das Prinzip der *Discovery*-Proteomik, die zum Ziel hat, die größtmögliche Anzahl von Proteinen zu identifizieren. So können beim Abgleich von Kontroll- und Krankheitsgruppen bereits erste Abweichungen ausgemacht werden, die wiederum Hinweise auf mögliche Signalmoleküle und Biomarker geben. Auf der anderen Seite existiert die Methodik der *Targeted*-Proteomik. Diese zielt darauf ab lediglich bestimmte Markermoleküle zu detektieren. Dadurch soll vermieden werden, dass wichtige Forschungszeit in das Sichten unbedeutender Moleküle investiert wird [81]. Ein Massenspektrometer setzt sich aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor zusammen [82]. Die Ionenquelle dient der Ionisierung der Proben, der Analysator trennt diese Ionen dann gemäß ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) auf, abschließend misst der Detektor ihre Intensität. Die Generierung von Ionen kann mithilfe verschiedener Verfahren erfolgen. Beispielsweise gibt es die Methode der Matrix-assistierten Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) [83]. Sie wird oftmals in Kombination mit der Flugzeitanalyse freigesetzter Ionen (*time of flight*, TOF) angewandt. Dazu wird die Probe mit einer Matrixlösung vermischt und auf einem Träger fixiert. Im Anschluss wird dieser mit einem Pulslaser bestrahlt, wodurch sich die Moleküle in Form eines heißen Gases aus dem Gemisch herauslösen. Dieser Vorgang ist auch unter dem Begriff Desorption bekannt. Nach Abgabe ihrer Protonen ist die Ionisierung der Moleküle abgeschlossen [84]. Eine andere Möglichkeit zur Ionenerzeugung stellt die Elektrospray-Ionisation (ESI) dar. In dieser Studie wurde Letztere in Verbindung mit dem LTQ-Orbitrap-XL™-System zur Probenanalyse verwendet. Das Zusammenspiel dieser

beiden Systeme zeichnet sich durch eine gute Messgenauigkeit, hohe Sensitivität und ein hervorragendes Auflösungsvermögen aus. Außerdem verwendet das System im Sinne der Tandem-Massenspektrometrie ($m/z/m/z$) zwei Analysatoren nacheinander. Mit dieser Technik können mehr Daten gewonnen werden als mit nur einem Analysator. Im Anschluss an die Ionisierung werden die Ionen durch ein Vakuum geleitet und mithilfe eines elektrischen Feldes beschleunigt. Dabei wird ihre Flugzeit bestimmt. Diese ist von besonderer Bedeutung, da sie in einer proportionalen Beziehung zum Verhältnis von Masse und Ladung (m/z) steht. Anhand der Flugzeit können so also Rückschlüsse auf das Masse-Ladungs-Verhältnis der Ionen gezogen werden. Abbildung 7 zeigt den schematischen Aufbau des verwendeten Systems. Im ersten Schritt nach der Ionisierung gelangen die Ionen in die C-Trap. Diese fungiert als Ionenfalle und sortiert die ankommenden Ionen mittels elektromagnetischer Felder. Nachfolgend entern sie gebündelt und gruppiert nacheinander die Orbitrap. Dort werden die Ionen um eine spindelförmige Elektrode eingefangen und oszillieren auf einer bestimmten Umlaufbahn des elektrischen Feldes. Hierbei wird ihre Frequenz aufgezeichnet und anhand dieser der m/z -Wert berechnet [85, 86].

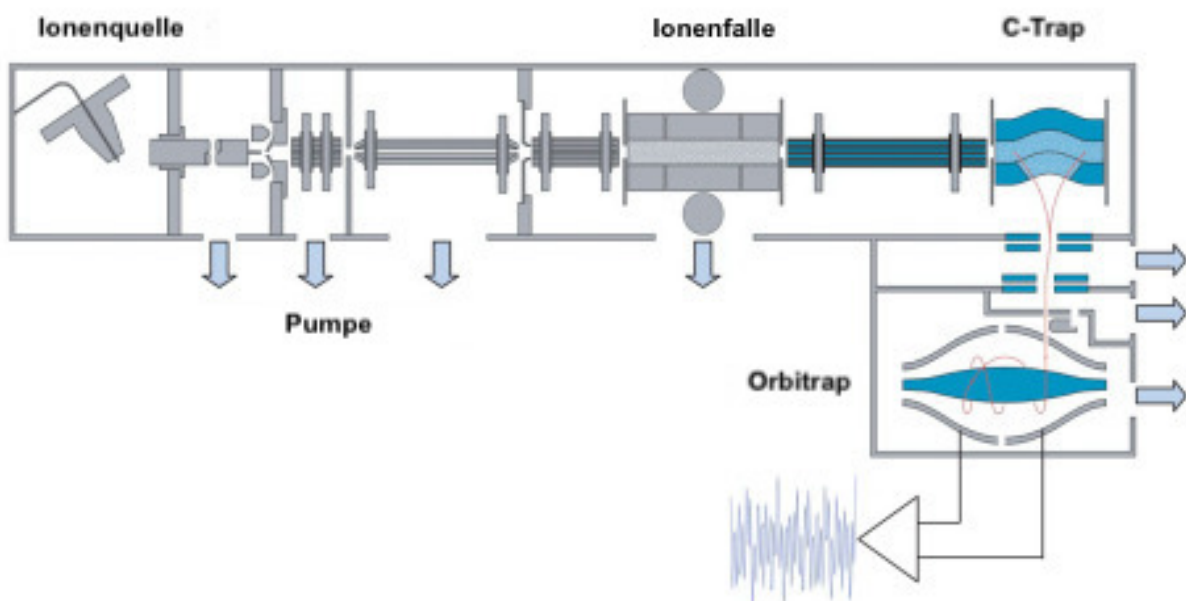


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des verwendeten LTQ-Orbitrap-XL™-Systems von Thermo Fisher Scientific Inc. [87]

In Bezug auf die Identifikation der Proteine werden zwei unterschiedliche Ansätze beschrieben, zum einen gibt es die *bottom-up* Methode und zum anderen die *top-down* Methode. Erstere sieht zunächst die chemische Auftrennung der Proteine vor. Hierfür werden die Probengemische beispielsweise mit dem Enzym Trypsin verdaut. Anschließend kann mithilfe einer Flüssigkeitschromatographie (LC) eine weitere Aufspaltung der Peptide erfolgen,

bevor sie durch das MS-System ausgewertet werden [88]. Im Gegensatz dazu werden die Proben bei der *top-down* Methode unbehandelt, also ohne vorherige Auftrennung, im MS analysiert [89]. Am Ende der Analyse erhält man MS/MS-Spektren, die zur Auswertung mit Proteinsequenz-Datenbanken abgeglichen werden. Die Identifikation der Proteine hängt also davon ab, ob ihre Sequenz bereits in der Datensammlung enthalten ist oder nicht [82]. Nichtsdestotrotz können mit der *Discovery*-Proteomik Proben genauestens untersucht werden und wegweisende Erkenntnisse in der Forschung liefern. Dabei zeichnet sich gerade die Kombination von ESI, LC und MS/MS-Systemen aus, um komplexe biologische Proteingemische auszuwerten. Die Proben können mit moderatem Zeitaufwand und dank der vorangegangenen Aufspaltung mit hoher Effizienz analysiert werden.

2.5.2 Proteomische Analysen der Retina

Bisherige Analysen zum Proteom der Netzhaut zeigen deutliche Unterschiede in der Anzahl der identifizierten Proteine. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher massenspektrometrischer Systeme zurückzuführen. Die höchste Anzahl an identifizierten Proteinen wurde mit dem MS-System Q Exactive Orbitrap erreicht. In der Studie von Koronyo et al., die sich mit der Alzheimer-Krankheit beschäftigt, wurden 8286 Proteine identifiziert [90]. Andere hochauflösende Systeme wie das Orbitrap FusionTM LumosTM lieferten in einer Studie zur Makuladegeneration von Shen et al. bis zu 5941 Proteinen [91]. Auch die Studie von Harman et al. zeigt mit 4041 Proteinen eine hohe Proteinidentifikation, die mit dem Fusion Orbitrap MS-System erzielt wurde [92]. Im Vergleich dazu scheint das LTQ-Orbitrap-XL-System insgesamt weniger Proteine zu identifizieren. Beispielsweise konnten in der Studie von Grotegut et al. zur Minocyclin-Gabe im Retina-Degenerationsmodell nur 854 Proteine nachgewiesen werden [93]. Eine ähnliche Tendenz zeigt sich in der Untersuchung von Perumal et al. zum Normaldruck-Glaukom, in der 985 Proteine erfasst wurden [8]. Dies deutet darauf hin, dass modernere MS-Systeme wie Q Exactive Orbitrap oder Fusion Orbitrap empfindlichere und umfassendere Analysen ermöglichen. Einen weiteren entscheidenden Faktor, der über die Höhe der Identifikation bestimmt, stellt die Art der Probenverarbeitung dar. So verwendet der überwiegende Anteil der Studien gepoolte Proben, um größere Proteinmengen nachweisen zu können. Dies kann jedoch zur Maskierung individueller Unterschiede zwischen einzelnen Proben führen. Zur Vermeidung dessen, sollten zukünftige Studien verstärkt auf individuelle Probenanalysen setzen. Die vorliegende Studie hat sich diesen Umstand zum zentralen Ziel gemacht, um diese spezifischen Unterschiede besser herauszuarbeiten und personalisierte Diagnostikansätze zu ermöglichen. Des Weiteren arbeitete bislang kaum eine der in Tabelle 1 aufgelisteten Studien mit Stressmodellen. Im Fokus der bisherigen Arbeiten liegen stattdessen neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, das Glaukom oder die diabetische Retinopathie. Die Untersuchung von

Netzhautproben bei angewandten Stressmodellen stellt somit eine Forschungslücke dar, welcher sich diese Studie annimmt. In Zukunft sollten Stressmodelle weiter in den Mittelpunkt der Forschung rücken, um die Auswirkungen von Stress auf die Retina besser zu verstehen.

Tabelle 1: Proteomische Analysen der Retina

Gruppe	Spezies, Modell	MS-System	Identifizierte Schlüsselproteine	Identifizierte Proteine	Unterschiedlich exprimierte Proteine
Aryal et al. 2023 [94]	Maus, embryonales Proteinprofil	Orbitrap Fusion	Aldh1a1, Tyr, Kera, Pmel, Hmcn1, Rlbp1, Hras, Heph, Tenm3	3963	keine Angabe
Koronyo et al. 2023 [90]	Mensch, Alzheimer-Krankheit	Q Exactive Orbitrap	S100 β , IBA1, Caspase 3	8286	886
Shen et al. 2023 [91]	Mensch, Makuladegeneration	Orbitrap Fusion Lumos	RPE65, RGR, RDH5	5941	keine Angabe
Suo et al. 2022 [95]	Ratte, NMDA-induzierte neuronale Degeneration	Q Exactive HF Orbitrap	ACSL3, Prnp	3532	155
Bian et al. 2021 [96]	Meerschweinchen, Myopie	Triple-TOF 6600	SLC6A6, PTGES2	3202	58
Liu et al. 2021 [97]	Maus, Normaldruck-Glaukom	keine Angabe	keine Angabe	6364	keine Angabe
Sze et al. 2021 [98]	Maus	Sciex TripleTOF 6600	keine Angabe	5950	keine Angabe
Grotegut et al. 2020 [93]	Ratte, Minocyclin-Gabe im Retina Degenerationsmodell	LTQ Orbitrap XL	keine Angabe	854	142
Harman et al. 2020 [92]	Maus, repetitive hypoxische Vorkonditionierung	Orbitrap Fusion	keine Angabe	4041	471
Mirzaei et al. 2020 [99]	Ratte, Glaukom	Orbitrap Fusion Tribid-MS	Crystalline, S100a10, S100a4, AHNAK, ANXA1, APOE, CSTS, FGG, FGA, FGB, KNG1, KNG2	4304	248

Perumal et al. 2020 [8]	Maus, Normaldruckglaukom	LTQ Orbitrap XL	Cryab, Crybb2, Cryaa	985	107
Funke et al. 2019 [100]	Hausschwein	Ultaflex II MALDI-TOF	keine Angabe	1659	keine Angabe
Murugesan et al. 2019 [101]	Ratte, Bradykinin-induziertes Ödem	LTQ linear ion trap	keine Angabe	1757	50
Luo et al. 2019 [102]	Maus, diabetische Retinopathie	LUMOS	Crystalline $\alpha/\alpha2$, $\alpha\beta$, $\beta\beta1$, $\beta\beta2$, $\beta\beta3$, and γS	>3000	keine Angabe
Saddala et al. 2018 [103]	Maus, diabetische Retinopathie	Q-Exactive hybrid Quadrupole-Orbitrap	Gnb1, Gnb2, Gnb4, Gnai2, Gnao1, Snap2, Gngt1	794	31
Anders et al. 2017 [104]	Ratte, Glaukom	LTQ Orbitrap XL	Akt, Mapk1	931	32
Funke et al. 2016 [105]	Mensch, Glaukom	LTQ Orbitrap XL	ANT3, DFS70, MeCp2	Mehr als 600	keine Angabe
Ly et al. 2014 [106]	Maus, diabetische Retinopathie	LTQ Velos	VGLUT1	844	98
Tu et al. 2015 [107]	Ratte, Sauerstoff-induzierte Retinopathie	LTQ/Orbitrap XL-ETD	Stat1, GFAP	1325	32
Skeie et al. 2013 [108]	Maus	LTQ Velos	keine Angabe	1680	951
Zhang et al. 2013 [109]	Maus, diabetische Retinopathie	LTQ Velos	keine Angabe	1636	348
Kim et al. 2012 [110]	Maus, Sauerstoff-induzierte Retinopathie	LTQ Velos	keine Angabe	1074	77

3. Material und Methoden

3.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Software

3.1.1 Geräte

BBY24M Bullet Blender Storm	Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA
Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Germany
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Germany
EASY-nLC 1200	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
ESI-LTQ-Orbitrap-XL MS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany
Multiskan Ascent V1.24	MTX Lab Systems Inc., Bradenton, FL, USA
Sonorex RK31	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Abdeckfolie PCR, selbstklebend, PP	Ratiolab GmbH, Dreieich, Germany
Acclaim PepMap RSLC Column, 75 µm i.d. × 50 cm, nanoViper	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Units	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Ireland
Costar 3595 96 Well Cell Cluster, Flat Bottom	Corning, Inc., Corning, NY, USA
Eppendorf 0,5, 1,5, 2,0 ml Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Germany
Parafilm M Laboratory Film	Bemis Company, Neenah, WI, USA
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0.2 ml	Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Austria

Sempercare® examination gloves nitrile Latex-Free Powder-Free	Sempermed Europe GmbH, Wien, Österreich
SOLA μ ™ SPE-Platten	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Stainless Steel Beads 0.9 – 2.0 mm	Next Advance Inc., Troy, NY, USA
Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany

3.1.3 Chemikalien

Acetonitril (ACN) für LC-MS grade	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Ameisensäure (FA) für LC-MS grade	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Germany
Essigsäure	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Germany
Indol-3-Essigsäure (IAA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Krebs-Henseleit-Puffer	BioWORLD, Dublin, OH, USA
Methanol für LC-MS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Peptide Calibration Standard 2	Bruker Daltonics, Bremen, Germany
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
Pierce™ BCA-Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pierce™ Reserpin-Standard für LC-MS, 100 pg/ μ l	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega Corporation, Madison, WI, USA

Tissue Protein Extraction Reagent
(T-PER) buffer

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA,
USA

Wasser für LC-MS grade

AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany

3.1.4 Software

Endnote X9

Thomson Reuters, New York City, NY, USA

Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Qiagen, QIAGEN N.V., Venlo, Netherlands

MaxQuant 2.0.3.0

Max Planck Institute of Biochemistry (Cox
und Mann 2008)

Microsoft® Excel 2022

Microsoft Cooperation ©, Redmond, WA,
USA

Microsoft® PowerPoint 2022

Microsoft Cooperation ©, Redmond, WA,
USA

Microsoft® Word 2022

Microsoft Cooperation ©, Redmond, WA,
USA

Perseus 1.6.15.0

Max Planck Institute of Biochemistry (Cox
und Mann 2012)

Proteome Discoverer 1.1.0.263

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA,
USA

3.2 Versuchstiere

Die Studie wurde durch das *Translational Animal Research Centre (TARC)* der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, sowie durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz in Koblenz bewilligt. Alle Experimente wurden gemäß der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt und entsprechend der Erklärung der *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* zum Umgang mit Versuchstieren in der ophthalmologischen Forschung umgesetzt.

Die Bedingungen der Tierhaltung entsprachen den folgenden Standards: Den Tieren standen sowohl Futter als auch Tränke ad libitum zur Verfügung. Die Temperatur wurde bei $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $50\% \pm 5\%$ gehalten. Um einen Tag-Nacht-Rhythmus zu etablieren wurde das Tierlabor von 8 Uhr morgens bis 20 Uhr abends beleuchtet. Die restlichen zwölf Stunden des Tages wurde der Raum nicht erhellt. Die Tierversuche wurden durch die Forschungsgruppe Müller durchgeführt, während die anschließende Probengewinnung durch Dr. Manicam erfolgte. Insgesamt wurden 44 Mäuse untersucht, von denen zehn Tiere dem ELS-Versuch, 14 dem CSD-Versuchsmodell und 20 der HNK-Versuchsreihe angehörten. Dabei waren in allen Modellen jeweils gleich viele Tiere dem Versuch und der entsprechenden Kontrollgruppe zugeordnet.

3.2.1 Early Life Stress (ELS)

In der ELS-Versuchsreihe wurden Muttertiere der Gattung C57BL/6J dem Versuchsmodell zugewiesen und weitere der Kontrollgruppe zugeteilt, die Einteilung erfolgte dabei zufällig. Die Wurfgröße lag zwischen 5-6 Jungtieren, von denen mindestens eines weiblich war. Die Muttertiere des Stressmodells wurden am zweiten postnatalen Tag (P2) mitsamt ihren Jungtieren in Käfige mit reduziertem Angebot an Einstreu und Nistmaterial umquartiert. Der Boden dieser Käfige wurde mit etwa 60 ml Mais Einstreu bedeckt. Mit einem Mindestabstand von 1,5 cm wurde darüber ein Aluminiumgitter platziert. Zum Nestbau stand den Tieren ein Viertel der Käfigfläche mit Nistmaterial zur Verfügung. Die Käfige der Kontrollreihe hingegen wurden mit etwa 650 ml Mais Einstreu und doppelt so viel Nistmaterial ausgestattet (Hälfte der Käfigfläche). Alle Tiere hausten unter temperierten (Temperatur von $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, Luftfeuchtigkeit von $50\% \pm 5\%$) und ruhigen Bedingungen in 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Während der Versuchsdurchführung (P2 - P9) blieben die Tiere ungestört unter Beobachtung. Am Morgen des neunten postnatalen Tags (P9) wurden einige der männlichen Welpen zur Untersuchung der Akutfolgen des Stressmodells gewogen und anschließend eingeschläfert. Die Tiere, die der Erfassung der Langzeitschäden dienten, wurden ebenfalls am neunten Tag (P9) gewogen und im Anschluss unter den Bedingungen der Kontrollgruppe gehalten. Am 21. Tag (P21) wurden die Jungtiere schließlich von ihren Müttern entwöhnt, die männlichen Nachkommen

lebten nun bis zur achten Lebenswoche in Gruppenkäfigen. Danach wurden die Tiere in Einzelkäfige umgesetzt. Mit acht Monaten durchliefen die Tiere dann Verhaltenstests wie das CORT Measurement. Nach Abschluss dieser Tests wurden die Mäuse eingeschläfert, die Augen wurden unmittelbar nach dem Tod enukleiert und in eiskaltem *Krebs-Henseleit-Puffer* aufbewahrt.

3.2.2 Chronischer sozialer Stress (CSD)

Im CSD-Stressmodell wurden ausgewachsene männliche C57BL/6J Mäuse zehn aufeinanderfolgende Tage lang sozialem Stress ausgesetzt. Die etwa acht Wochen alten Tiere stammten aus Janvier, Frankreich. Nach Ankunft im Tierlabor hatten sie circa eine Woche Zeit, um sich an die neuen Umgebungsbedingungen zu gewöhnen, bevor die Versuchsreihe begann. Die Mäuse wurden in Einzelgehegen bei Futter und Tränke ad libitum, 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus, einer Temperatur von $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $50\% \pm 5\%$ gehalten. Als Stressor fungierten regelmäßige Konfrontationen mit aggressiven männlichen Mäusen der Art CD-1, die ebenfalls aus Janvier stammten. Diese Spezies zeichnet sich durch ihr aggressives Territorialverhalten und ihre hohe Kampfbereitschaft aus (*latency to attack* < 1 min) [54]. Zur Versuchsdurchführung wurden die C57BL/6J Mäuse dreimal täglich in den Käfig einer unbekanntes CD-1 Maus gesetzt. Um physischen Kontakt vor und nach diesen Konfrontationen zu vermeiden und körperliche Schädigungen möglichst gering zu halten, wurde der Käfig nach zehn Sekunden durch ein Einsetzgitter getrennt. Das Gitter verblieb zwischen den physischen Konfrontationen für 15 Minuten und erlaubte lediglich sensorischen Kontakt zwischen den beiden Mäusen. Waren die drei Konfrontationen absolviert, wurden Aggressor (CD-1) und Eindringling (C57BL/6J) bis zum Beginn des nächsten Versuchstages im Heimat-Käfig der CD-1 Maus mit installierter Trennwand gehalten. Die Tiere der Kontrollgruppe hingegen wurden über die Dauer der zehn Versuchstage täglich für 90 Sekunden in einen ihnen unbekanntes und unbewohnten Käfig gesetzt. Darüber hinaus wurden ihre Heimat-Käfige mit einem Trenngitter ausgestattet, um die Bedingungen des Stressmodells nachzuahmen. Zur Validierung der stressinduzierten Veränderungen durch die CSD-Versuchsreihe wurden die Mäuse einem Interaktionstest unterzogen. Hierbei konnte bei erfolgreicher Versuchsdurchführung ein deutlich reduziertes Sozialverhalten der Versuchstiere bei Begegnung mit unbekanntes Mäusen nachgewiesen werden. Bemerkbar machte sich dies durch verringerte Interaktionszeiten mit dem unbekanntes Tier während des Tests [35]. Weiterhin ließen sich die Auswirkungen des ausgeübten sozialen Stresses über Messungen des peripheren Glukose-Wertes belegen. Allgemeinen Erkenntnissen nach bedingt Stress unter anderem einen Anstieg des benannten Wertes [111]. Im Falle der Mäuse der Versuchsreihe war dieser wie zu erwarten ebenfalls gesteigert. Nach Abschluss der Testreihe wurden die Versuchstiere eingeschläfert. Die Präparation der Netzhaut erfolgte unmittelbar

nach der Tötung der Tiere und wurde anschließend zur weiteren proteomischen Verarbeitung aufbewahrt.

3.2.3 (2R, 6R)-Hydroxynorketamin (HNK)-Gabe

Im Versuchsmodell der (2R, 6R)-Hydroxynorketamin-Gabe wurden männliche Mäuse der Art DBA/2J aus Charles River, Frankreich examiniert. Dieser Mausstamm wurde aufgrund seines inhärenten hohen Angstlevels ausgewählt. Die Tiere zeigten sich von Natur aus verängstigt und stark gestresst [112]. Folglich bedurfte es in dieser Versuchsreihe keiner zusätzlichen Experimente zur Auslösung des Stresses, was zur Reduktion möglicher Fehlerquellen führte [40]. Nach Ankunft der Tiere im Labor hatten diese etwa eine Woche lang Zeit zur Umgewöhnung an die neuen Behausungen. Die Mäuse wurden auch hier in Einzelgehegen bei Futter und Tränke ad libitum, 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus, einer Temperatur von $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $50\% \pm 5\%$ gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere zur genauen Bestimmung ihres Körpergewichts gewogen. In den ersten drei aufeinanderfolgenden Tagen des Versuchsmodells wurden die Mäuse täglich für 2 min an die Handhabung gewöhnt. Im Anschluss erfolgte dann die HNK-Gabe über eine intraperitoneale Injektion. Dabei erhielten die Mäuse 10 mg/kg KG des Wirkstoffes [62]. Der Kontrollgruppe wurde stattdessen 0,9%ige Kochsalzlösung auf die gleiche Art und Weise injiziert. Um die antidepressive Wirkung der Substanz zu untersuchen, wurden die Mäuse vier Stunden und eine Woche nach Injektion einem Schwimmtest unterzogen. Reduziertes Immobilitätsverhalten konnte hier als Bestätigung der gewünschten Wirkungsweise betrachtet werden. Nach abgeschlossener Versuchsdurchführung wurden die Tiere ebenfalls eingeschläfert. Zur Probengewinnung erfolgte anschließend die Entnahme der Netzhaut, die dann für die weitere Aufbereitung konserviert wurde.

3.3 Vorgehensweise der proteomischen Experimente

3.3.1 Vorbereitung der Proben

Die Netzhautproben wurden, wie in vorherigen Studien von Manicam et al. beschrieben unter einem Seziermikroskop gewonnen [113, 114]. Die Präparation des Gewebes erfolgte dabei unter ständiger Kühlung durch *Krebs-Henseleit-Puffer* mit einem pH-Wert von 7,4 (in folgender Zusammensetzung: $118,3\text{ mM NaCl}$, $4,7\text{ mM KCl}$, $2,5\text{ mM CaCl}_2$, $1,2\text{ mM MgSO}_4$, $1,2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, 25 mM NaHCO_3 und 11 mM Glukose). Zur Sicherstellung einer ausreichenden Gewebekühlung während der Probengewinnung wurde die gekühlte Flüssigkeit alle 20 bis 30 Minuten ausgetauscht. Um die Retina von ihren benachbarten intraokularen Gewebsanteilen und Fettschichten isolieren zu können, wurde zunächst mithilfe einer Kanüle ein kleines Loch in die Cornea der Augen gestochen. Unter Zuhilfenahme einer mikrochirurgischen Schere (*Vannas Capsulotomy Scissors*) wurde dieses Loch erweitert, so

dass anschließend sowohl die Linse als auch der Glaskörper durch schonendes Zupfen mit einer Präzisionspinzette entfernt und letztlich die Retina gewonnen werden konnte. Unmittelbar danach wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die gewonnenen Proben im Anschluss zunächst homogenisiert. Dazu wurde jeder der Proben $300\text{ }\mu\text{l}$ *T-PER-Puffer* sowie drei Löffel einer Mischung aus $0,9\text{ mm} - 2\text{ mm}$ großen rostfreien Stahl-Beads hinzugefügt. Diese Zugaben dienten dem chemischen und mechanischen Auftrennen der Molekülbindungen. Im Anschluss kam es zum eigentlichen Vorgang des Homogenisierens mithilfe des *BBY24M Bullet Blender Storm*. Dieser wurde für zwei Minuten auf die Geschwindigkeitsstufe 6 eingestellt. Die Proben wurden dann für eine Minute auf Eis gelegt, um einer Denaturierung der enthaltenen Proteine durch Wärme vorzubeugen. Dieser Vorgang wurde nun noch zweimal wiederholt, bis die Gewebeprobe nicht mehr zu erkennen war. Mittels der *Centrifuge 5804 R* wurde das Probengemisch anschließend bei 5000 rpm für 4 min zentrifugiert. Durch Examinieren der Reaktionsgefäße konnte endgültig festgestellt werden, dass der Schritt der Homogenisierung erfolgreich abgeschlossen war. Als nächster Versuchsschritt folgte die Aufreinigung der Probengemische. Um diese nun von den Überresten des *T-PER-Puffers* zu reinigen, wurde die Flüssigkeit aus den *1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes* in *0,5 ml Amicon Ultra® Centrifugal Filters*-Einheiten mit 3 kDa cutoff transferiert. Des Weiteren wurden $75\text{ }\mu\text{l}$ des *LC/MS grade Water* hinzugefügt. Die Filter-Einheiten wurden dann bei den folgenden Einstellungen zentrifugiert: 14000 rcf ; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 15 min . Der herausgefilterte Überstand wurde verworfen und das im Filter enthaltene Filtrat mit weiteren $200\text{ }\mu\text{l}$ des *LC/MS grade Water* versetzt. Es folgte wieder das Zentrifugieren bei gleichen Einstellungen. Dieser Vorgang wurde noch dreimal wiederholt, sodass insgesamt vier Filterungen stattfanden. Die Proben wurden nun mittels einer $10\text{ }\mu\text{l}$ Pipette aus dem Filter in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Dabei ergab sich ein Gesamtvolumen von $60\text{ }\mu\text{l}$. Die Proben konnten nun bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

Zur weiteren Verarbeitung der Proben mussten Proteinmessungen mithilfe des *BCA-Essay-Kits* zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt werden. Im ersten Schritt wurden Entnahmen aus den Proben mit *LC/MS grade Water* im Verhältnis $1:10$ verdünnt. Dann wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ jeder Probe und neun festgelegter Standardlösungen in eine *Costar 3595 96 Well Cell Cluster* pipettiert und ihre entsprechenden Positionen markiert. Um Fehlerquellen und ungenaue Messergebnisse zu vermeiden, wurden Duplikate jeder Probe zur Platte hinzugefügt. Der für die Messung notwendige Zusatz wurde anschließend in einem Mischungsverhältnis von $50:1$ aus zwei bereitstehenden Lösungen zusammengegeben und den Proben sowie den Standards hinzugefügt. Das Mengenverhältnis dieser Mischung lag nun bei $20:1$ ($200\text{ }\mu\text{l}$ des Reagenzes und $10\text{ }\mu\text{l}$ der zu untersuchenden Probe). Im Anschluss inkubierte die Platte für 30 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Wärmeschrank. Mithilfe der *Ascent*

Software for Multiskan Ascent wurde bereits während der Inkubationszeit der *Multiskan Ascent V1.24* für die Messung vorbereitet. Die Positionen der Proben und ihre Verdünnung wurden markiert und entsprechend benannt. Nach erfolgter Inkubation konnte die Platte für die Konzentrationsmessung in den *Multiskan Ascent V1.24* inseriert werden. Dieser ermittelt die Proteinkonzentrationen durch eine Farbmessung. Die Ergebnisse wurden dann mithilfe der Software in einer Datei zusammengefasst und dienten nun der weiteren Verarbeitung der Proben. So konnte der gesamte Proteingehalt, sowie die Konzentration der Probe ermittelt werden.

3.3.2 In-Lösung Verdauung

Die gewonnenen Informationen sind für die sich anschließende Verdauung der Proben von höchster Bedeutung. Bei diesem Versuchsschritt gibt das Versuchsprotokoll vor 20 µg Proteine zu verarbeiten. Mithilfe der ermittelten Proteinkonzentrationen und den Gesamtmengen aus dem vorangegangenen Schritt konnte nun errechnet werden welches Volumen aus den Proben entnommen werden muss, um die gewünschte Proteinmenge zu erhalten. Um also mit der Proteinverdauung starten zu können wurden nun die ermittelten Volumina aus den Proben entnommen und in PCR-Reaktionsgefäße gegeben in denen später auch die Proteinverdauung stattfinden sollte. Die Verdauungsreagenzien wurden im nächsten Schritt angemischt. Dazu wurden für den *Digestion Buffer* 20 mg Ammoniumbikarbonat in 25 ml *HPLC grade water* gelöst, für den *Reducing Buffer* wurden 18 mg Dithiothreitol und 2 ml des *Digestion Buffers* vermengt. Die Proteinverdauung begann damit, dass je 10 µl des zuvor angemischten *Reducing Buffers* einer Probe hinzugefügt wurden. Dieses Gemisch wurde anschließend für 30 Minuten in einen Wärmeschrank bei 56 °C gegeben.

Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurde die nächste Lösung angesetzt und beigemischt. Dabei handelte es sich um den *Alkylation Buffer*, welcher sich aus 20 mg Indol-3-Essigsäure und 1 ml des *Digestion Buffers* zusammensetzt. Zu beachten war nun, dass die Verdauungslösung unmittelbar vor Gebrauch vorbereitet und durch Aluminiumfolie vor Licht geschützt wurde. Nachdem die Proben etwas abgekühlt waren, konnten pro PCR-Reaktionsgefäß 10 µl des *Alkylation Buffers* beigemischt werden. In der Folge schlossen sich weitere 30 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln und bei Raumtemperatur an. Weiterhin benötigte es noch den *Trypsin Buffer*, der aus 9 ml des *Digestion Buffers* und 1 ml des *ACN grade Waters* bestand. Davon wurden je 200 µl zu einer Phirole des *20 µg Sequencing Grade Modified Trypsin* hinzugefügt. Der letzte Schritt der Proteinverdauung bestand nun darin den Proben jeweils 10 µl der Trypsin-Lösung unterzumengen und diese dann für 16 Stunden bei 37 °C inkubieren zu lassen. Damit war die Verdauung der Proben abgeschlossen. Um die Überreste der beigefügten Lösungen aus den Proben zu entfernen, wurden diese im

Concentrator 5301 für ca. eine Stunde bei 60 °C verdampft und im Anschluss bei -20 °C eingelagert.

3.3.3 Probenaufreinigung mittels *SOLA μ SPE well plates*

Für die massenspektrometrische Analyse bedurfte es nun noch der Aufreinigung der gewonnenen Peptide. Dies erfolgte mittels des Protokolls der *Thermo Scientific SOLA μ SPE well plates*. Zunächst wurden die Proben in 100 μ l einer 2,5%igen ACN-Lösung (9,75 ml H₂O + 0,25 ml ACN + 10 μ l FA) gelöst. Um die Peptide vollständig in der Flüssigkeit und vom Rand des Reaktionsgefäßes zu lösen, wurden die Proben für drei Minuten in ein Ultraschallbad gegeben und anschließend für wenige Sekunden zentrifugiert. Damit waren diese bereit für die Reinigung durch die *Thermo Scientific SOLA μ SPE well plates*. Darüber hinaus mussten auch die Filter der Platten vorbereitet werden. Dazu wurden je 100 μ l einer 100%igen ACN-Lösung (10 ml ACN + 10 μ l FA) in die markierten Positionen der Platte gegeben und eine Minute lang bei 3000 rpm in der *Centrifuge 5804 R* zentrifugiert. Die Flüssigkeit lief so zur dessen Aktivierung durch den Filter und wurde von einer *Costar 3595 96 Well Cell Cluster* aufgefangen. Die Reste in der Platte wurden verworfen und die Filter auf ein Neues mit 100 μ l der 2,5%igen ACN-Lösung befüllt. Es folgte die Zentrifugation unter gleichen Einstellungen. Mithilfe dieser Lösung erfolgte die Equilibrierung der Filter-Einheiten, wodurch die Vorbereitung der Platten nun ebenfalls abgeschlossen war. Im nächsten Schritt wurden die Proben positionsgetreu in die Filter-Einheiten pipettiert und zentrifugiert. Um Kontaminierungen zu minimieren, wurde eine neue *Costar 3595 96 Well Cell Cluster* gewählt, um die Proben wieder aufzufangen. Die Überstände der Proben wurden gemäß ihrer Position nun noch einmal in die Filter gegeben, um sicherzugehen, dass alle Peptide durch den Filter aufgenommen werden konnten. Nach der Zentrifugation der Proben konnten die Überreste aus der Platte verworfen werden. Als nächstes folgten zwei Waschvorgänge mit 100 μ l der 2,5%igen ACN-Lösung, welche dafür sorgt, dass die Filter von Kontaminierungen befreit werden. Zuletzt wurden zum Ausspülen der Filter und somit zur Wiedergewinnung der Peptide 75 μ l einer 50%igen ACN-Lösung (5 ml ACN + 5 ml H₂O + 10 μ l FA) in die Filter-Einheiten pipettiert. Die Platte unterhalb der Filter wurde ein weiteres Mal ausgetauscht, um eine Verunreinigung durch die vorangegangenen Schritte zu vermeiden. Im Anschluss an das Zentrifugieren wurden noch einmal 75 μ l der gleichen Lösung hinzugegeben und wieder zentrifugiert. Nun konnten die 150 μ l Proben aus der *Costar 3595 96 Well Cell Cluster* entnommen und in beschriftete PCR-Reaktionsgefäße transferiert werden. Für die weitere Verarbeitung wurden die Proben wieder im *Concentrator 5301* für ca. 2 Stunden bei 60 °C verdampft und anschließend bei -20 °C gelagert. Abschließend wurden die Proben in einer 0,1%igen Methansäure-Lösung gelöst. Wichtig war hier das korrekte Volumen zu verwenden um die gewünschte Konzentration von 500 ng/ μ l zu erhalten. Im Falle der 20 μ g Protein ergab

sich das benötigte Volumen von 40 µl. Auch hier wurden die Probengemische wieder für drei Minuten in ein Ultraschallbad gegeben, um alle Peptide vom Rand des Reaktionsgefäßes abzulösen und in der Flüssigkeit zu verteilen. Danach wurden die Proben für wenige Sekunden zentrifugiert, um durch das Ultraschallbad entstandene Lufteinschlüsse aus der Flüssigkeit zu entfernen. Nun wurden jeweils 10 µl der Proben in eine *V-Bottom-Plate* pipettiert. Dabei war darauf zu achten die Pipettenspitze direkt auf dem Boden der Einlassungen zu platzieren um die Probe dort ohne Lufteinschlüsse abzugeben. Neben den zu untersuchenden Lösungen wurden einige Schächte der Platte noch mit 100 µl einer 80%igen ACN-Lösung gefüllt. Diese diente dem System als Waschlösung. Zuletzt versiegelte eine Abdeckfolie die befüllte Platte. Die Positionen der Proben wurden entsprechend notiert und in das System eingegeben. Die Messung konnte anschließend gestartet werden.

3.3.4 Flüssigkeitschromatographie (LC) – Electrospray-Ionisation (ESI) – MS/MS-Analyse

Die Proben wurden zunächst in ein LC-System zur Flüssigkeitschromatografie geleitet. In dieser Studie wurde dafür das *EASY-nLC 1200* in Kombination mit einer *Acclaim PepMap RSLC Column* verwendet. Die Peptide wurden durch benanntes System unter Zuhilfenahme zweier Lösungen, einer 0,1%igen Methansäure-Lösung und einer 20%igen ACN-Lösung, aufgetrennt. Anschließend wurden die massenspektrometrischen Daten durch das *ESI-LTQ-Orbitrap-XL MS* System erhoben. Zur Protokollierung der Ergebnisse befand sich das Gerät im datenabhängigen Modus. So konnte automatisch zwischen Orbitrap-MS- und LTQ-MS/MS-Erfassung umgeschaltet werden. Die allgemeinen Einstellungs-Parameter lauteten wie folgt:

- *Positive ion electrospray ionization mode*
- *Spray voltage: 2,15 kV*
- *Capillary temperature: 220 °C*
- *Normalized Collision Energy (NCE) 35 % mit einem Repeat Count: 3*
- *Aktivierungszeit: 30 ms*
- *Dynamic Exclusion Duration: 600 ms*
- *Orbitrapauflösung der Massenspektren (m/z 300 bis 1600): 30000 bei m/z 400*
- *Automatic Gain Control (AGC): 1.0×10^6 Ionen*
- *Lock mass-Option im MS Modus aktiviert*
- *Polydimethylcyclsiloxan (PCM)-Ionen mit m/z 445,120025 zur internen Rekalibrierung in Echtzeit*

Die Tandem-Daten wurden dabei fortlaufend erstellt, indem die ersten fünf Vorläufer-Ionen sequenziell isoliert und durch eine *Collision-induced Dissociation (CID)* fragmentiert wurden. Der hochauflösende MS-Scan des *Orbitrap-Fourier transform mass spectrometry (FTMS)*

analyser ermöglichte dabei die Bereitstellung der benannten Vorläufer-Ionen. Das System nutzte hierfür Heliumgas. Die fragmentierten Ionen wurden dann im LTQ verzeichnet. Die verwendete Methode und deren Parameter entspricht dem Protokoll nach Manicam et al. [115, 116]. Im Anschluss wurden die Rohdaten mithilfe des Proteome Discoverer-Programms in der Version 1.1.0.263 auf das allgemeine Vorhandensein von Proteinen und Peptiden geprüft.

3.3.5 „Discovery Proteomik“- Strategie

Die gewonnenen massenspektrometrischen Daten wurden anschließend mit der MaxQuant Software weiterverarbeitet. Diese wurde in der Version 2.0.3.0 und in Verbindung mit der integrierten Andromeda Suchmaschine sowie der Swissprot-Datenbank verwendet. Durch den Abgleich dieser Datenbanken und der Tandem MS-Spektren konnte die Protein- und Peptididentifikation erfolgen [117-119]. Um diese auf ein Maximum zu heben, wurden die Uniprot-Proteinlisten von *Mouse* und *Human* aus den Swissprot-Datenbanken genutzt [120-123]. Zum Zeitpunkt des Downloads (09.02.2022) zählte die Datenbank ‚*Human*‘ 20375 Proteine und die der *Mouse* 17090 Proteine. Die Identifizierung erfolgte unter den folgenden Standardeinstellungen:

- *Peptide mass tolerance*
- *Fragment mass tolerance* ± 0.5 Da
- *Amino acid residues* ≥ 6 und *Unique plus razor peptides*
- *False discovery rate (FDR)* 0.01
- Modifikationen Oxidation von Methionin, N-terminale Acetylierung
- Verwendetes Enzym Trypsin
- Maximale Anzahl verpasster Trypsin-Spaltstellen 2
- *Matching time window* 5 min
- *Alignment time window* 20 min

Die generierten Daten wurden dann in einer Tabelle namens „*proteingroups.txt*“ festgehalten und einer Filterung unterzogen, um sie von Kontaminationen und entgegengesetzten Treffern zu befreien. Dazu wurde die Datei in ein Excel-Workbook-Format exportiert (Microsoft Office Excel 2022). Erst im Anschluss an diese Filtrierung konnte mit der statistischen Analyse sowie der Funktions- und Signalweganalyse vorangeschritten werden.

3.3.6 Bioinformatik und Funktions- und Signalweganalyse

Zur statistischen Auswertung der gewonnenen Daten fand die Perseus-Software in der Version 1.6.15.0 Anwendung. Sie dient der Analyse großer proteomischer Datensätze, wie auch in dieser Studie [124]. Dazu wurde zunächst die in 3.3.5 erstellte Excel-Datei in die Perseus-Software überführt und die gewünschten LFQ-Datensätze ausgewählt. Die

normalisierten Daten sollten dabei vor allem der besseren Beurteilung der experimentellen Reproduzierbarkeit und der Homogenität der festgelegten Gruppen dienen. Die daraus resultierende Matrix wurde dann \log_2 transformiert um die Werte der LFQ-Intensitäten in einer Normalverteilung fassbarer zu machen. Auf diese Weise ließ sich auch die Auf- und Herabregulation der einzelnen Proteine graphisch in gleicher Größe und in gleichen Abständen darstellen. Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Datensätze der Matrix aus Gründen der Übersichtlichkeit umbenannt. Es folgte eine erneute Filterung basierend auf gültigen Werten (percentage 100 %, in at least one of the groups). Danach wurden fehlende Werte aus einer Normalverteilung (width, 0.3; down shift, 1.8) generiert und ersetzt (*imputation*). Im Anschluss konnte der zweiseitige *Student's T-Test* (p-Werte < 0,05) durchgeführt werden um die signifikant unterschiedlich abundanten Proteine der Gruppen (Kontrollgruppe und Modell) zu identifizieren. Eine letzte Filterung löschte die restlichen Daten der insignifikant abundanten Proteine (*based on categorical column*). Dann wurde mithilfe der Z-Scores eine unkontrollierte hierarchische Clustering-Analyse entsprechend des Euklidischen Abstands erstellt. Das Ergebnis dieser Analyse wurde zuletzt durch eine *Heat Map* veranschaulicht. Ihren Abschluss fand die experimentelle Auswertung in der Funktions- und Signalweganalyse mithilfe der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) Software. Dazu wurden die Daten der vorangegangenen statistischen Analyse in das Programm eingespeist und mit folgenden Annotationen versehen: *molecular function* (GOMF), *biological processes* (GOBP) oder *cellular component* (GOCC). Diese Bemerkungen dienten einer ersten Einteilung der Proteine gemäß ihren Aufgabenbereichen und ihrer Lokalisation in der Zelle. Eine vergleichende Analyse brachte Aufschluss über identifizierte Signalwege, biologische Funktionen und relevante Erkrankungsbilder. Weiterhin gelang es mithilfe der IPA-Software durch eine *Benjamini-Hochberg multiple testing correction* ($-\log B-H > 1.3$) die relevantesten biologischen Funktionen, Signalwege und Erkrankungen der signifikant unterschiedlich abundanten Proteine auszumachen und in einer weiteren Darstellung mit den entsprechenden p-Werten hervorzuheben. Darüber hinaus konnten durch das Programm auch vorgeschaltete Regulatoren identifiziert werden. Diese Moleküle und Transkriptionsfaktoren waren maßgeblich an der Regulation der Proteine beteiligt. Die Software konnte also genauen Aufschluss über Zelllokalisierung, molekulare Funktion und Molekültypen und vorgeschaltete Regulatoren (*upstream regulators*) der regulierten Proteine geben. Sie greift hierfür auf Informationen aus Lehrbüchern, veröffentlichten Studien und Reviews, sowie anerkannten Datenbanken zurück. Das gewählte Verfahren zur IPA-Analyse orientierte sich an den Veröffentlichungen von Krämer et al. und Modifizierungen der Gruppe Manicam et al. [116, 125, 126].

4. Ergebnisse

Die Proteinidentifikation der Versuchsreihen erfolgte mithilfe der MaxQuant Software und einer FDR von $< 1\%$. Um das gesamte Potential der Proben auszuschöpfen, fanden die UniProt Datenbanken von Maus und Mensch Anwendung. In der Folge schloss sich die statistische Analyse der LFQ-Datensätze der Versuchsreihen und ihrer Kontrollgruppen durch die Perseus Software an. Hier diente die Durchführung des zweiseitigen *Student's T-Test* der gruppeninternen Protein-Kategorisierung entsprechend ihrer Regulation. So wurde zwischen signifikant ($p < 0,01$) erhöhter, verminderter oder nicht signifikanter Expression unterschieden und eingeteilt.

4.1 ELS-Versuchsreihe

In der ELS-Versuchsreihe wurden jeweils fünf individuelle Proben des Versuchsmodells und der Kontrollgruppe analysiert. Insgesamt wurden dabei 942 Proteine identifiziert. Sieben dieser Proteine wurden ausschließlich in der Versuchsreihe nachgewiesen. Andere zehn Proteine wiederum wurden exklusiv der Kontrollgruppe zugeordnet. Somit gehören 935 der nachgewiesenen Proteine der Kontrollgruppe und insgesamt 932 Proteine der ELS-Versuchsreihe an. Diese Zuteilung ist in Abbildung 8 bildlich dargestellt.

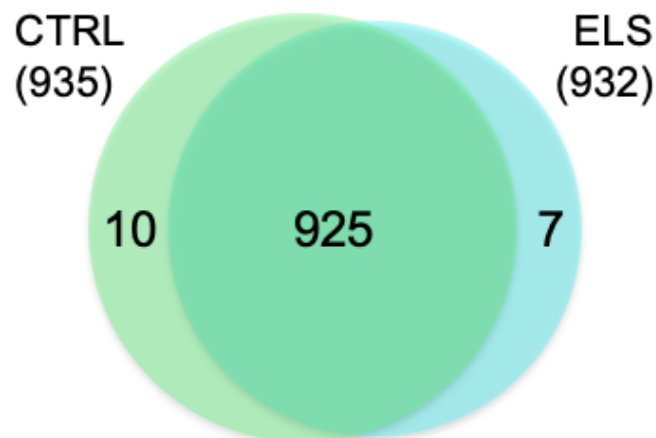


Abbildung 8: Venn-Diagramm der identifizierten Proteine in der Kontrollgruppe (grün) und der ELS-Versuchsreihe (blau)

Die Analyse der Expressionsprofile ergab eine signifikante Regulierung von 173 Proteinen, von denen 79 vermindert und 94 vermehrt exprimiert wurden. 759 Proteine wurden folglich nicht wesentlich reguliert. Abbildung 9 stellt die Verteilung der Expressionsprofile mithilfe eines *Volcano Plot* grafisch dar.

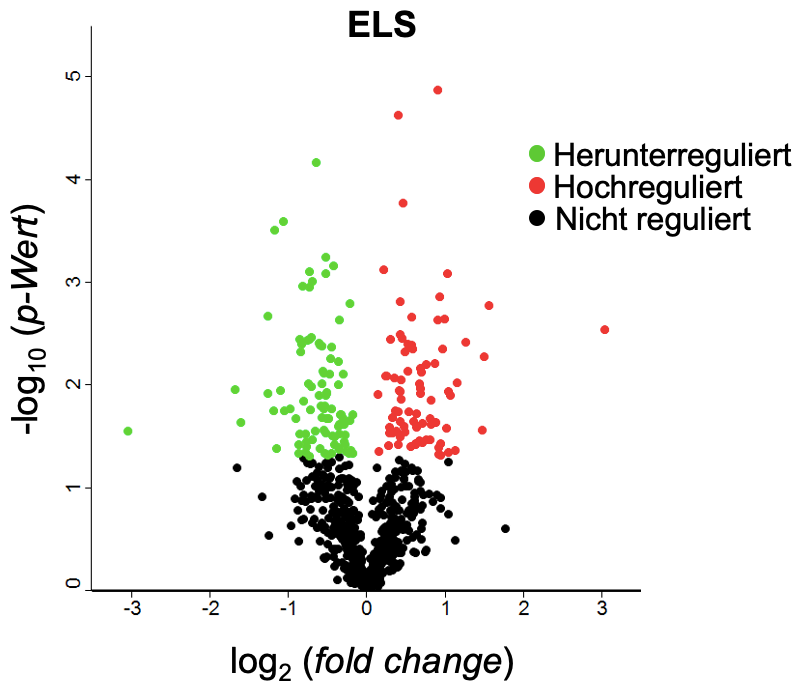


Abbildung 9: Volcano Plot der ELS-Versuchsreihe

Verminderte Expressionsprofile zeigte insbesondere die Gruppe der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP). So wurden sieben Proteine dieser Familie signifikant herunterreguliert. Dazu gehören Hnrnpab, Hnrnpa2b1, HNRNPA3, HNRNPD, Hnrnph1, Hnrnpc und Hnrnpu. Am stärksten herabreguliert wurden *Thymosin beta-4* (*Tmsb4x*, $p = 2,89E-03$), *Mitochondrial fission 1 protein* (*Fis1*, $p = 1,69E-03$) und *Fascin* (*FSCN1*, $p = 5,35E-03$). Erhöhte Expressionsprofile hingegen zeigten einige NADH-Dehydrogenasen, wie *Ndufa12*, *Ndufb4*, *Ndufb8* und *Ndufv2*. Auch Crystalline wie *Alpha-crystallin A chain*, *Beta-crystallin B1* und *B2* wurden vermehrt exprimiert. Die signifikanteste Erhöhung erfuhr das *60S ribosomal protein L15* (*RPL15*, $p = 2,81E-02$), gefolgt von der *ATP synthase subunit gamma, mitochondrial* (*Atp5c1*, $p = 1,11E-02$). Abbildung 10 visualisiert die unterschiedlich exprimierten Proteine beider Gruppen in einer *Heat Map*. Weiterhin wurden die 173 signifikanten Proteine mithilfe der *Gene Ontology* analysiert. So wurden sie zum einen nach zellulärem Kompartiment (GOCC, *gene ontology cellular component*) und zum anderen nach molekularer bzw. biochemischer Funktion (GOMT, *gene ontology molecular function*) kategorisiert.

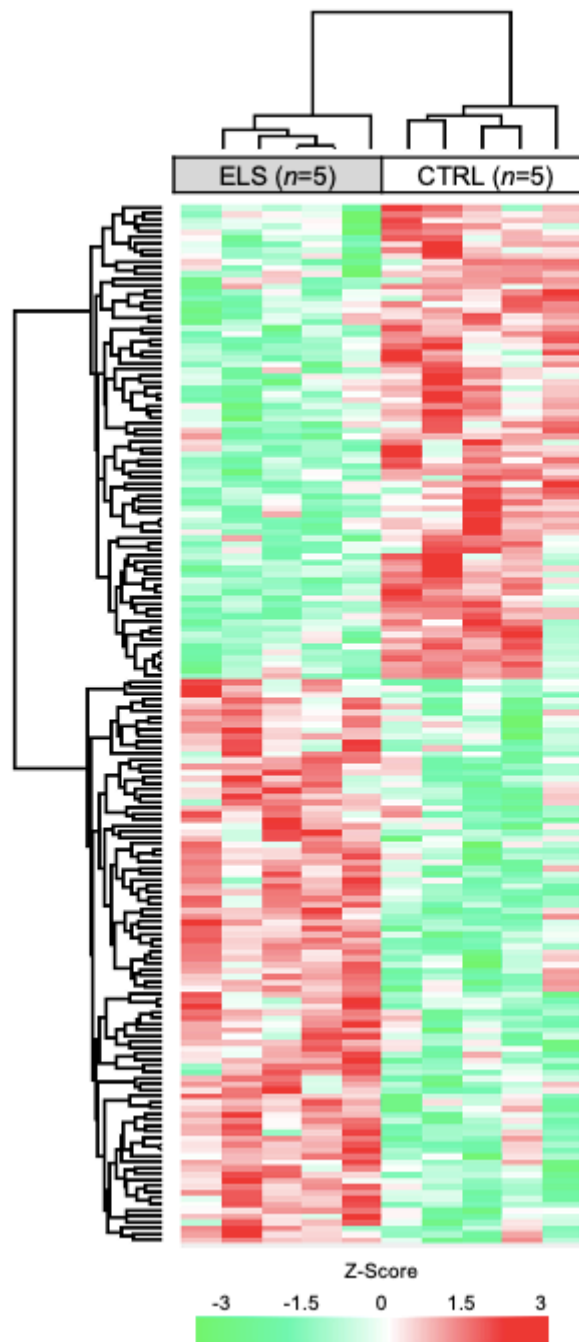


Abbildung 10: *Heat Map* der unterschiedlich exprimierten Proteine von Kontroll- und ELS-Gruppe in der ELS-Versuchsreihe; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.

Die Ergebnisse sind durch die Kreisdiagramme in Abbildung 11 und 12 veranschaulicht. Dabei sind nahezu 100 Proteine dem Zytoplasma zuzuordnen (56 %). Etwa 21 % der Proteine stammen aus dem Zellkern und circa 18 % aus der Plasmamembran. Lediglich 5 % sind im Extrazellularraum und anderen Zellkompartimenten zu lokalisieren. Betrachtet man die Zuordnung nach Funktion, so wird schnell ersichtlich, dass diese deutlich diverser ausfällt. Die

größte definierte Proteinklasse stellen die Enzyme (29 %) dar, gefolgt von Transportern (9 %), Transkriptionsregulatoren (7 %), Ionenkanälen (3 %) und Kinasen (3 %).

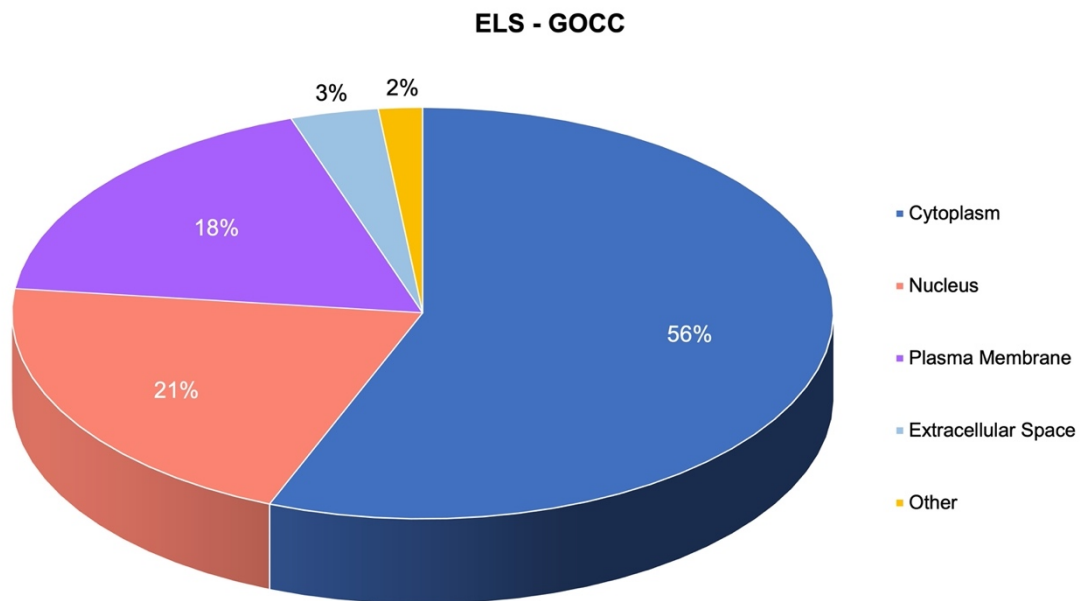


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der ELS-Versuchsreihe gemäß der GOCC-Analyse.

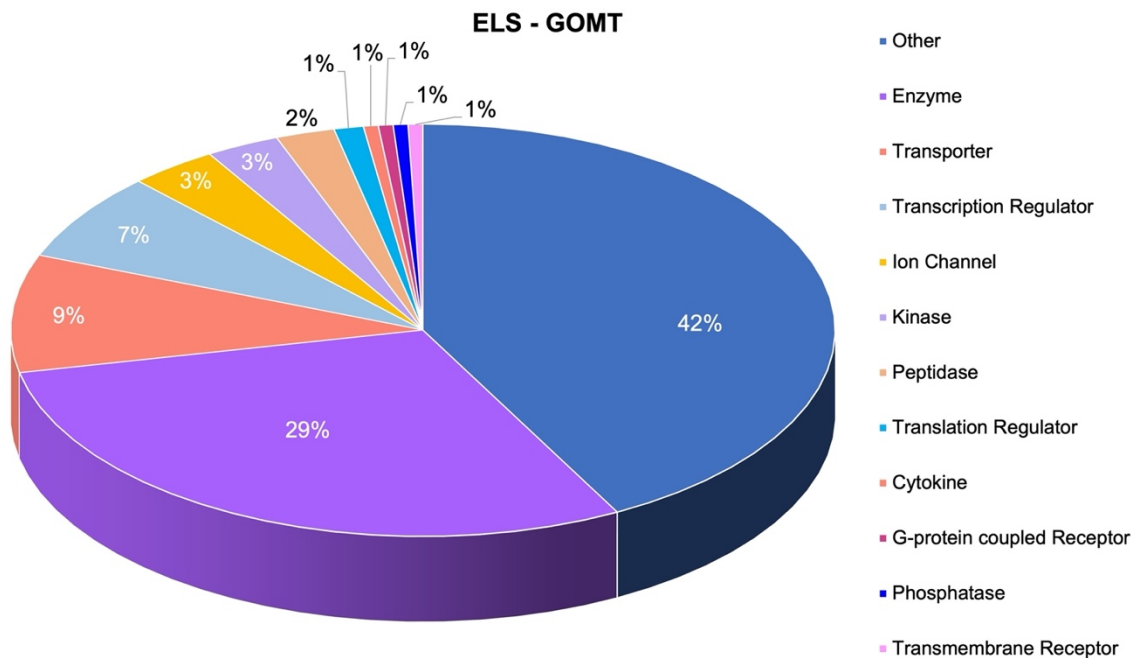


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der ELS-Versuchsreihe gemäß der GOMT-Analyse.

Tabelle 2 listet die 30 Proteine mit der stärksten Regulierung innerhalb der signifikant regulierten Proteine und ihre entsprechenden Werte auf.

Tabelle 2: Liste der Top 30 signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der ELS-Versuchsreihe

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
1	P20065	Thymosin beta-4	Tmsb4x	2,89E-03	-3,03	Vermindert
2	Q9CQ92	Mitochondrial fission 1 protein	Fis1	1,69E-03	-1,56	Vermindert
3	Q16658	Fascin	FSCN1	5,35E-03	-1,50	Vermindert
4	P84089	Enhancer of rudimentary homolog	Erh	2,77E-02	-1,46	Vermindert
5	Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC1A	3,84E-03	-1,26	Vermindert
6	Q9Z127	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Slc7a5	9,53E-03	-1,15	Vermindert
7	P46660	Alpha-internexin	Ina	4,31E-02	-1,12	Vermindert
8	P62492	Ras-related protein Rab-11A	Rab11a	1,27E-02	-1,06	Vermindert
9	Q9WTP6	Adenylate kinase 2, mitochondrial	Ak2	1,10E-02	-1,04	Vermindert
10	P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52	4,56E-02	-1,04	Vermindert
11	Q8BR65	Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3	Suds3	8,23E-04	-1,03	Vermindert
12	Q61205	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	Pafah1b3	2,62E-02	-1,02	Vermindert
13	Q9JM96	Cdc42 effector protein 4	Cdc42ep4	2,29E-03	-0,99	Vermindert
14	P28352	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	Apex1	4,47E-03	-0,97	Vermindert
15	Q00688	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	FKBP3	3,74E-02	-0,94	Vermindert
16	C0HKE5	Histone H2A type 1-H	Hist1h2ah	4,65E-02	0,86	Erhöht
17	Q9ULU8	Calcium-dependent secretion activator 1	CADPS	3,82E-02	0,87	Erhöht
18	P31786	Acyl-CoA-binding protein	Dbi	2,10E-02	0,91	Erhöht
19	Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	Ndufa12	1,73E-02	0,97	Erhöht
20	P62881	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5	Gnb5	1,76E-02	1,06	Erhöht
21	Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Vdac2	2,56E-04	1,07	Erhöht
22	P61247	40S ribosomal protein S3a	RPS3A	1,14E-02	1,11	Erhöht
23	Q9JII5	DAZ-associated protein 1	Dazap1	4,11E-02	1,14	Erhöht
24	P02489	Alpha-crystallin A chain	CRYAA	3,13E-04	1,17	Erhöht
25	P12074	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	COX6A1	1,77E-02	1,19	Erhöht
26	Q9CQC7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	Ndufb4	1,22E-02	1,26	Erhöht
27	P62696	Beta-crystallin B2	Crybb2	2,16E-03	1,27	Erhöht
28	Q9WVJ5	Beta-crystallin B1	Crybb1	2,31E-02	1,60	Erhöht
29	Q91VR2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Atp5c1	1,11E-02	1,68	Erhöht
30	P61313	60S ribosomal protein L15	RPL15	2,81E-02	3,05	Erhöht

4.2 CSD-Versuchsreihe

Insgesamt wurden 1353 Proteine in den 14 Proben der CSD-Versuchsreihe identifiziert. Dabei wurden je sieben Proben der Versuchs- sowie der Kontrollgruppe individuell verarbeitet und analysiert. Vier Proteine konnten ausschließlich im Versuchsmodell nachgewiesen werden. Weitere acht Proteine wurden im Gegenzug nur in der Kontrollgruppe identifiziert. Insgesamt sind somit 1349 der nachgewiesenen Proteine auf die Kontrollgruppe und 1345 Proteine auf die CSD-Versuchsreihe zurückzuführen (siehe Abbildung 13).

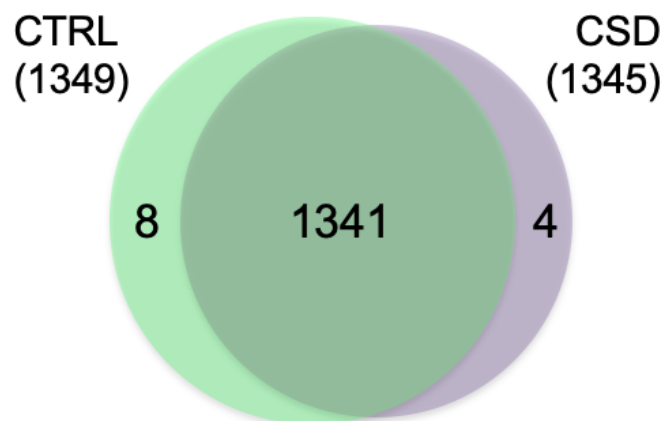


Abbildung 13: Venn-Diagramm der identifizierten Proteine in der Kontrollgruppe (grün) und der CSD-Gruppe (lila)

Die Auswertung der Expressionsprofile zeigte insgesamt 71 Proteine mit signifikanter Regulation. Hiervon wurden 31 Proteine vermindert und 40 Proteine vermehrt exprimiert. Die restlichen 1274 der gefundenen Makromoleküle wurden nicht signifikant reguliert. Dies ist Abbildung 14 schematisch mithilfe eines *Volcano Plots* zu entnehmen.

Am deutlichsten wurden die Proteine *D-dopachrome decarboxylase* (Ddt, $p = 8,85E-03$), *Histone H1.4* (HIST1H1E, $p = 3,10E-02$) und *S-formylglutathione hydrolase* (Esd, $p = 4,90E-02$) herabreguliert. Zudem wurden in der Versuchsreihe weitere Histone vermindert exprimiert. Dazu zählen Hist1h1a, Hist1h1d und Hist1h1e. Die Proteingruppe der H1 Histone teilt sich in insgesamt 11 Subtypen ein und ist für die Komprimierung von Chromatin in Chromatinfasern essenziell [126]. Die H1 Histone regeln darüber hinaus die Zugänglichkeit des Chromatins für regulatorische Proteine der Transkription. Demgegenüber wiesen der *Transcription elongation factor B polypeptide 2* (tceb2, $p = 3,42E-02$), *Xaa-Pro aminopeptidase 1* (Xpnpep1, $p = 1,13E-02$) und *Endophilin-B2* (Sh3glb2, $p = 3,80E-02$) besonders erhöhte Expressionsprofile auf. Das Protein Recoverin wurde ebenfalls signifikant hochreguliert. Einen Gesamtüberblick über die

Proteinverteilung und -regulierung von Versuchsmodell und Kontrollgruppe liefert die *Heat Map* in Abbildung 15.

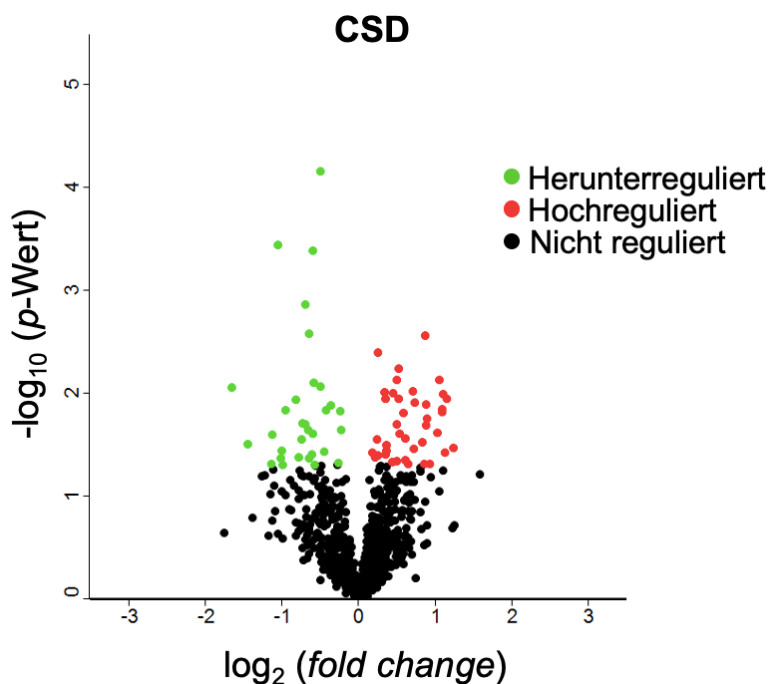


Abbildung 14: *Volcano Plot* der CSD-Versuchsreihe

Zudem wurden die 71 signifikanten Proteine der *Gene Ontology*-Analyse unterzogen. Hierdurch erfolgte die Kategorisierung der Proteine anhand ihres zellulären Kompartiments (GOCC) und ihrer molekularen bzw. biochemischen Funktion (GOMT). Die Kreisdiagramme in Abbildung 16 und 17 veranschaulichen die prozentuale Verteilung. Hieraus geht hervor, dass 54 % der Proteine dem Zytoplasma entstammen. Etwa ein Drittel ist im Nukleus lokalisiert und ungefähr 14 % sind als Bestandteile der Plasmamembran zu identifizieren, die restlichen 3 % stammen aus anderen Zellkompartimenten. Die Analyse der biochemischen Funktionen zeigt, dass die Mehrheit (42 %) der signifikanten Proteine als Enzyme fungieren. Ebenfalls vertretende Proteinklassen sind Ionenkanäle (8 %), Transporter (8 %), Kinasen (6 %) und Transkriptionsregulatoren (5 %).

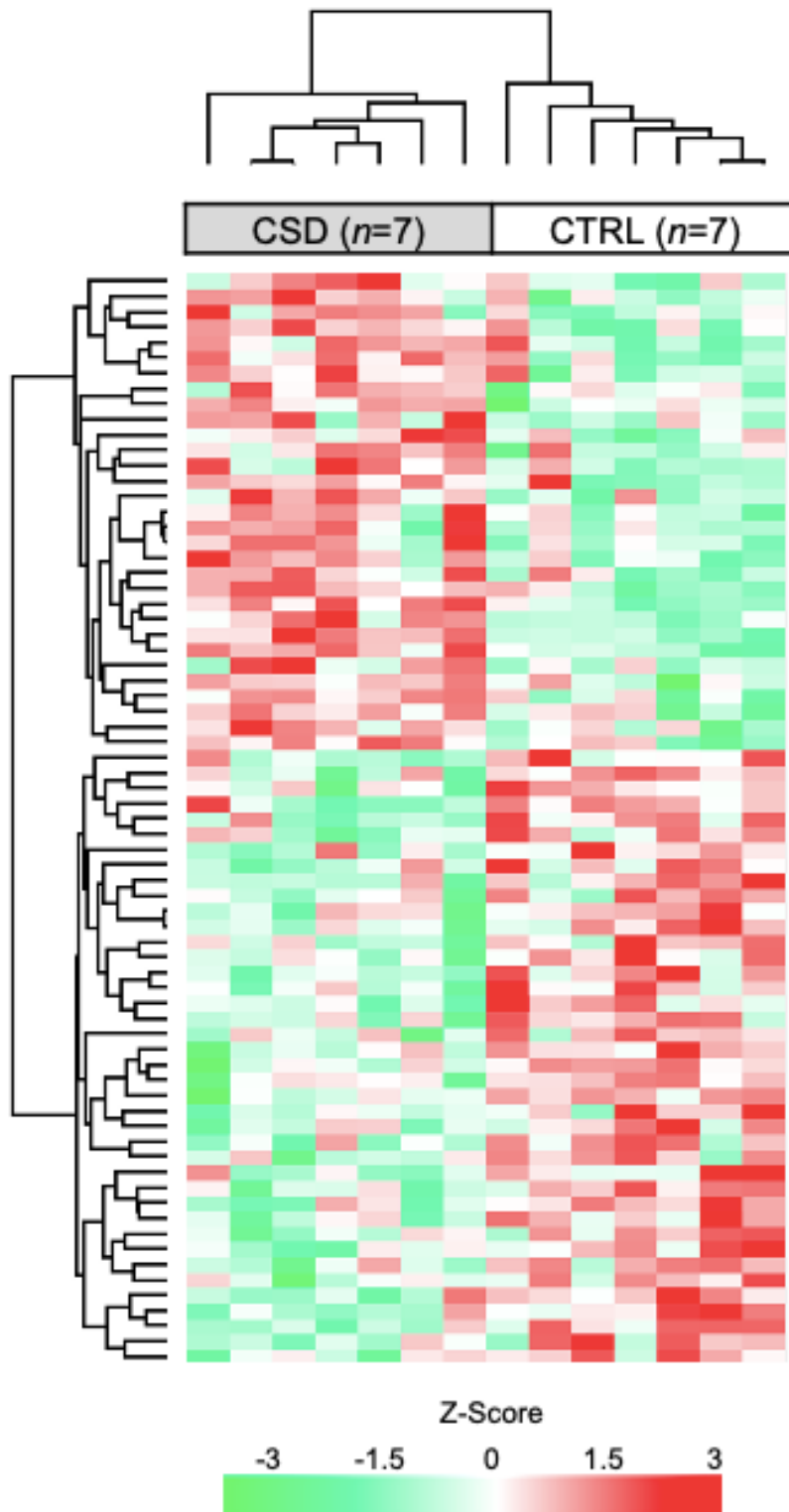


Abbildung 15: *Heat Map* der unterschiedlich exprimierten Proteine von Kontroll- und CSD-Gruppe in der CSD-Versuchsreihe; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.

CSD - GOCC

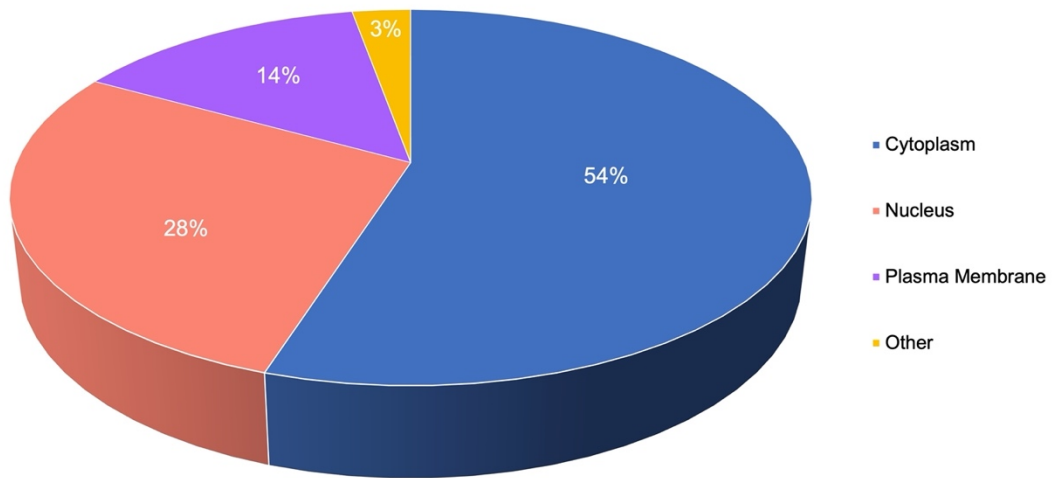


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der CSD-Versuchsreihe gemäß der GOCC-Analyse.

CSD - GOMT

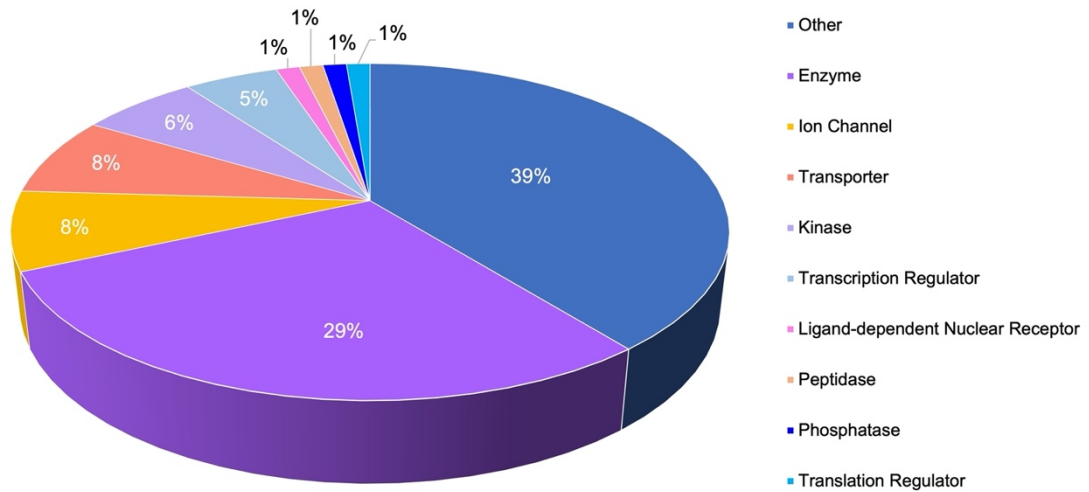


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der CSD-Versuchsreihe gemäß der GOMT-Analyse.

Eine Auflistung der 30 signifikantesten exprimierten Proteine und ihrer entsprechenden Intensitäten ist in Tabelle 3 zu finden.

Tabelle 3: Liste der Top 30 signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der CSD-Versuchsreihe

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
1	O35215	D-dopachrome decarboxylase	Ddt	8,85E-03	-1,66	Vermindert
2	P10412	Histone H1.4	HIST1H1E	3,10E-02	-1,44	Vermindert
3	Q9R0P3	S-formylglutathione hydrolase	Esd	4,90E-02	-1,14	Vermindert
4	P62829	60S ribosomal protein L23	RPL23	2,54E-02	-1,13	Vermindert
5	Q9Z0P4	Paralemmin-1	Palm	3,58E-04	-1,05	Vermindert
6	Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Vdac2	3,59E-02	-1,01	Vermindert
7	Q9DCT8	Cysteine-rich protein 2	Crip2	4,27E-02	-1,01	Vermindert
8	Q8VE97	Serine/arginine-rich splicing factor 4	Srsf4	4,95E-02	-0,99	Vermindert
9	P43275	Histone H1.1	Hist1h1a	1,45E-02	-0,95	Vermindert
10	Q99K48	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	Nono	1,16E-02	-0,82	Vermindert
11	Q8K0H5	Transcription initiation factor TFIID subunit 10	Taf10	4,21E-02	-0,78	Vermindert
12	O75525	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3	KHDRBS3	1,94E-02	-0,74	Vermindert
13	P43274	Histone H1.4	Hist1h1e	2,80E-02	-0,74	Vermindert
14	O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	SYNCRIP	1,36E-03	-0,70	Vermindert
15	P0C6F1	Dynein heavy chain 2, axonemal	Dnah2	1,99E-02	-0,69	Vermindert
16	Q9QXZ7	Photoreceptor-specific nuclear receptor	Nr2e3	2,98E-02	0,82	Erhöht
17	Q96K17	Transcription factor BTF3 homolog 4	BTF3L4	4,89E-02	0,85	Erhöht
18	Q9WU78	Programmed cell death 6-interacting protein	Pdcd6ip	2,73E-03	0,87	Erhöht
19	P53702	Cytochrome c-type heme lyase	Hccs	1,29E-02	0,88	Erhöht
20	P45376	Aldose reductase	Akr1b1	2,06E-02	0,88	Erhöht
21	Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC1A	1,75E-02	0,89	Erhöht
22	O70161	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma	Pip5k1c	4,86E-02	0,92	Erhöht
23	P31648	Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1	Slc6a1	2,44E-02	1,02	Erhöht
24	Q9D198	Pre-mRNA-splicing factor SYF2	Syf2	7,34E-03	1,06	Erhöht
25	Q9WUR9	Adenylate kinase 4, mitochondrial	Ak4	1,43E-02	1,09	Erhöht
26	O35887	Calumenin	Calu	1,53E-02	1,09	Erhöht
27	O88531	Palmitoyl-protein thioesterase 1	Ppt1	1,01E-02	1,10	Erhöht
28	Q8R3V5	Endophilin-B2	Sh3glb2	3,80E-02	1,12	Erhöht
29	Q6P1B1	Xaa-Pro aminopeptidase 1	Xpnpep1	1,13E-02	1,15	Erhöht
30	P62869	Transcription elongation factor B polypeptide 2	Tceb2	3,42E-02	1,24	Erhöht

4.3 HNK-Versuchsreihe

In der HNK-Versuchsreihe wurden pro Gruppe zehn individuelle Proben zur Analyse verarbeitet. Insgesamt wurden hierbei 1275 Proteine identifiziert, von denen zwei ausschließlich im Versuchsmodell nachgewiesen wurden. Andere vier Proteine dagegen konnten nur in der Kontrollgruppe identifiziert werden. Im Gesamten weist die Kontrollgruppe somit 1273 Proteine und die HNK-Versuchsreihe 1271 Proteine auf. Abbildung 18 veranschaulicht die Zuordnung aller Proteine mithilfe eines *Venn-Diagramms*.

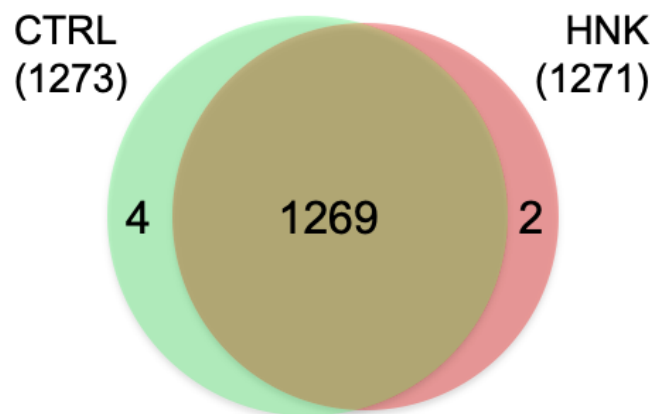


Abbildung 18: *Venn-Diagramm* der identifizierten Proteine in der Kontrollgruppe (grün) und der HNK-Gruppe (rot)

Nach Durchführung des *Student's T-Test* wurden 88 unterschiedlich exprimierte Proteine gefunden, die restlichen 1183 Proteine wurden demnach im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant reguliert. Während 37 Proteine ein vermindertes Expressionsprofil zeigten, wurden 51 Proteine verstärkt exprimiert. Die grafische Darstellung in Abbildung 19 stellt diese Verteilung in einem *Volcano Plot* dar.

Am stärksten herabreguliert wurden die Proteine *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2* (Ndufa2, $p = 3,60E-04$), *Voltage-dependent anion-selective channel protein 2* (VDAC2, $p = 2,51E-03$) und *Neuroplastin* (Nptn, $p = 2,28E-03$). Zudem wurden zwei weitere NADH-Dehydrogenasen, wie Ndufs3 und Ndufb10, vermindert exprimiert. Besonders auffallend sind darüber hinaus aber die Expressionsprofile Cytochrom assoziierter Proteine. So wurden in der Versuchsreihe acht solcher Makromoleküle signifikant herunterreguliert. Zum einen handelte es sich dabei um vier Untereinheiten des *Cytochrome bc-1 complex*, wie Uqcrc1, Uqcrc2, Uqcrc3 und Uqcrc4, zum anderen um vier Protomere der *Cytochrome c oxidase*.

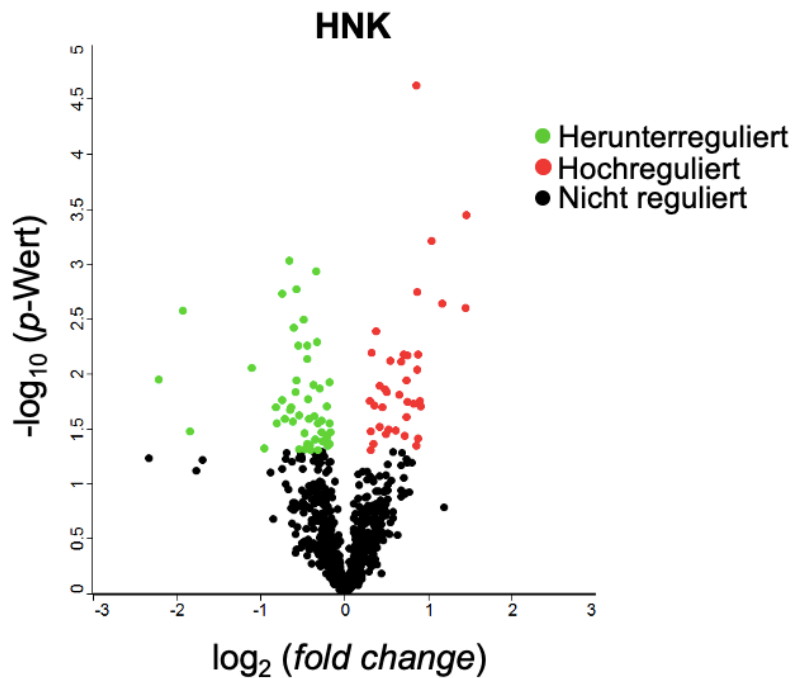


Abbildung 19: *Volcano Plot* der HNK-Versuchsreihe

Letztere sind wie folgt zu benennen: Cox4i1, Cox5a, Cox6b und Cox6c. Erhöhte Expressionsprofile hingegen zeigten *Beta-crystallin A2* (Cryba2, $p = 1,12E-02$), *Dynein heavy chain 2, axonemal* (Dnah2, $p = 2,63E-03$) und *Beta-crystallin B* (Crybb1, $p = 3,34E-02$). In Abbildung 20 fasst eine *Heat Map* die Intensitäten der einzelnen Proben von Versuchsmodell und Kontrollgruppe farblich zusammen und stellt diese gegenüber. Zuletzt schloss sich auch hier die Analyse und Kategorisierung der 88 Proteine mittels der *Gene Ontology* an. Dabei wurden die Proteine einerseits ihrem zellulären Kompartiment (GOCC) und andererseits ihrer molekularen bzw. biochemischen Funktion (GOMT) zugeordnet. Abbildung 21 und 22 stellen die prozentuale Verteilung mithilfe eines Kreisdiagramms anschaulich dar. Hier zeigt sich, dass über zwei Drittel der Proteine im Zytoplasma (68 %) lokalisiert sind. 14 % fungieren im Zellkern, weitere 11 % entstammen der Plasmamembran und jeweils 3 % sind dem Extrazellularraum bzw. anderen Zellkompartimenten zuzuordnen. In Bezug auf die molekulare Funktion der Proteine zeigt sich ein vielfältigeres Bild. Zu den wichtigsten Proteinklassen gehören die Enzyme (32 %), Transporter (9 %), Peptidasen (7 %), Kinasen (6 %), Phosphatasen (5 %) und die Transkriptionsregulatoren (5 %).

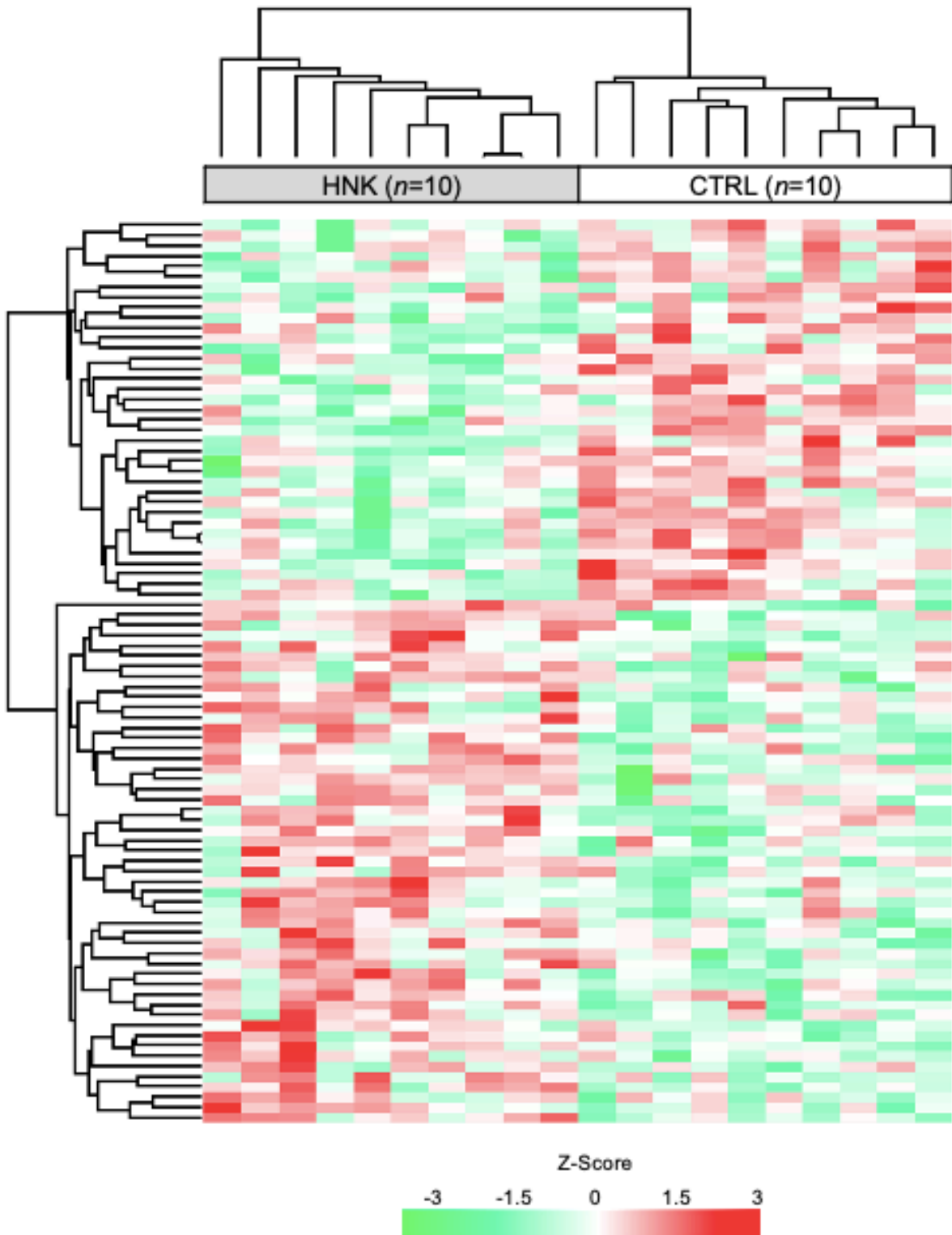


Abbildung 20: *Heat Map* der unterschiedlich exprimierten Proteine von Kontroll- und HNK-Gruppe in der HNK-Versuchsreihe; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.

HNK - GOCC

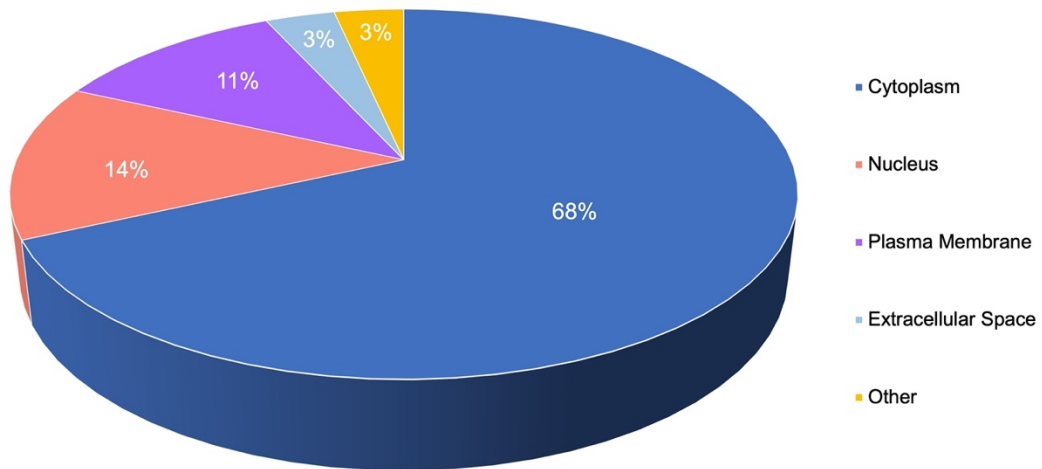


Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der HNK-Versuchsreihe gemäß der GOCC-Analyse.

HNK - GOMT

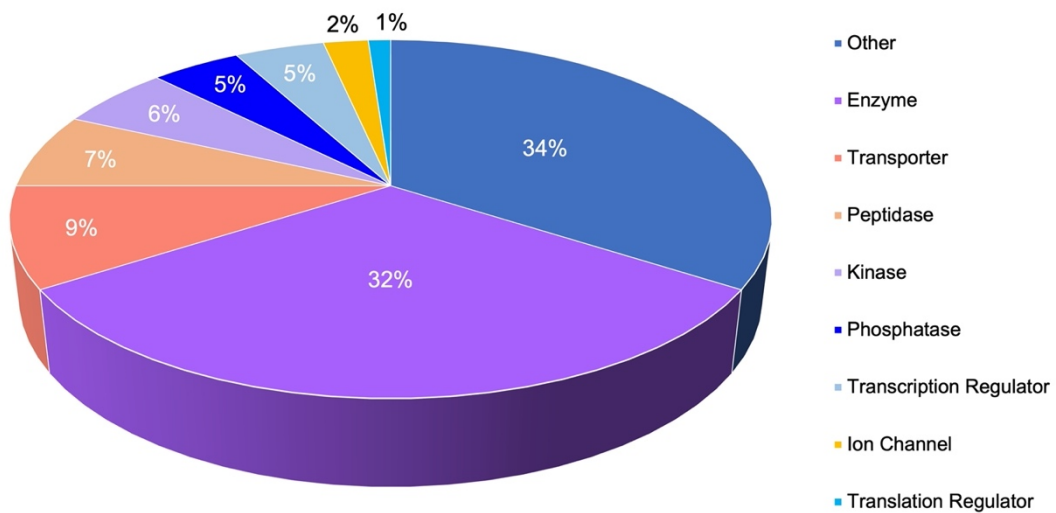


Abbildung 22: Prozentuale Verteilung der signifikanten Proteine aus der HNK-Versuchsreihe gemäß der GOMT-Analyse.

Die Proteinnamen der 30 signifikantesten regulierten Proteine sowie ihre numerischen Intensitäten sind in Tabelle 4 notiert.

Tabelle 4: Liste der Top 30 signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der HNK-Versuchsreihe

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
1	Q9CQ75	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	Ndufa2	3,60E-04	-1,46	Vermindert
2	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	2,51E-03	-1,45	Vermindert
3	P97300	Neuroplastin	Nptn	2,28E-03	-1,16	Vermindert
4	P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	Cox5a	6,14E-04	-1,03	Vermindert
5	Q15637	Splicing factor 1	SF1	1,95E-02	-0,91	Vermindert
6	P23506	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	Pcmt1	1,75E-02	-0,90	Vermindert
7	O94776	Metastasis-associated protein MTA2	MTA2	6,69E-03	-0,88	Vermindert
8	P19783	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Cox4i1	3,85E-02	-0,87	Vermindert
9	P56391	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	Cox6b1	9,14E-03	-0,86	Vermindert
10	Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	1,78E-03	-0,86	Vermindert
11	Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Ndufs3	2,36E-05	-0,85	Vermindert
12	Q91VR2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Atp5c1	4,44E-02	-0,85	Vermindert
13	Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1	1,85E-02	-0,82	Vermindert
14	Q9DCS9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	Ndufb10	6,80E-03	-0,75	Vermindert
15	Q9DB77	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Uqcrc2	1,80E-02	-0,74	Vermindert
16	O88544	COP9 signalosome complex subunit 4	Cops4	3,81E-03	0,61	Erhöht
17	Q99LI8	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Hgs	2,71E-02	0,62	Erhöht
18	P78356	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 beta	PIP4K2B	2,00E-02	0,64	Erhöht
19	P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	Hspa1l	2,10E-02	0,65	Erhöht
20	O60282	Kinesin heavy chain isoform 5C	KIF5C	9,23E-04	0,66	Erhöht
21	Q80TZ3	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin	Dnajc6	2,55E-02	0,72	Erhöht
22	P18242	Cathepsin D	Ctsd	1,86E-03	0,74	Erhöht
23	Q8NHM4	Putative trypsin-6	PRSS3P2	1,72E-02	0,75	Erhöht
24	Q64012	RNA-binding protein Raly	Raly	2,80E-02	0,81	Erhöht
25	Q9JK81	UPF0160 protein MYG1, mitochondrial	Myg1	2,01E-02	0,82	Erhöht
26	Q92747	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	ARPC1A	4,69E-02	0,96	Erhöht
27	P20444	Protein kinase C alpha type	Prkca	8,71E-03	1,11	Erhöht
28	Q9WVJ5	Beta-crystallin B1	Crybb1	3,34E-02	1,85	Erhöht
29	P0C6F1	Dynein heavy chain 2, axonemal	Dnah2	2,63E-03	1,94	Erhöht
30	Q9JJV1	Beta-crystallin A2	Cryba2	1,12E-02	2,22	Erhöht

4.4 Vergleichende Signalweg-Analyse aller Versuchsreihen

Die identifizierten Proteine der jeweiligen Versuchsreihen wurden nun mithilfe der Ingenuity Pathway Analyse-Software weiterverarbeitet. Das Programm erlaubt es, die entsprechenden Signalwege der zugrundeliegenden Protein-Cluster sichtbar zu machen. So kann untersucht werden ob und inwiefern das veränderte Proteom innerhalb der Versuchsreihen an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt ist. Um die Identifikation ausschließlich signifikant regulierter Proteine sicherzustellen, wurden die Daten der *Benjamini-Hochberg multiple testing correlation* ($-\log B-H > 1,3$) unterzogen.

4.4.1 Signalweg-Analyse der „Canonical Pathways“

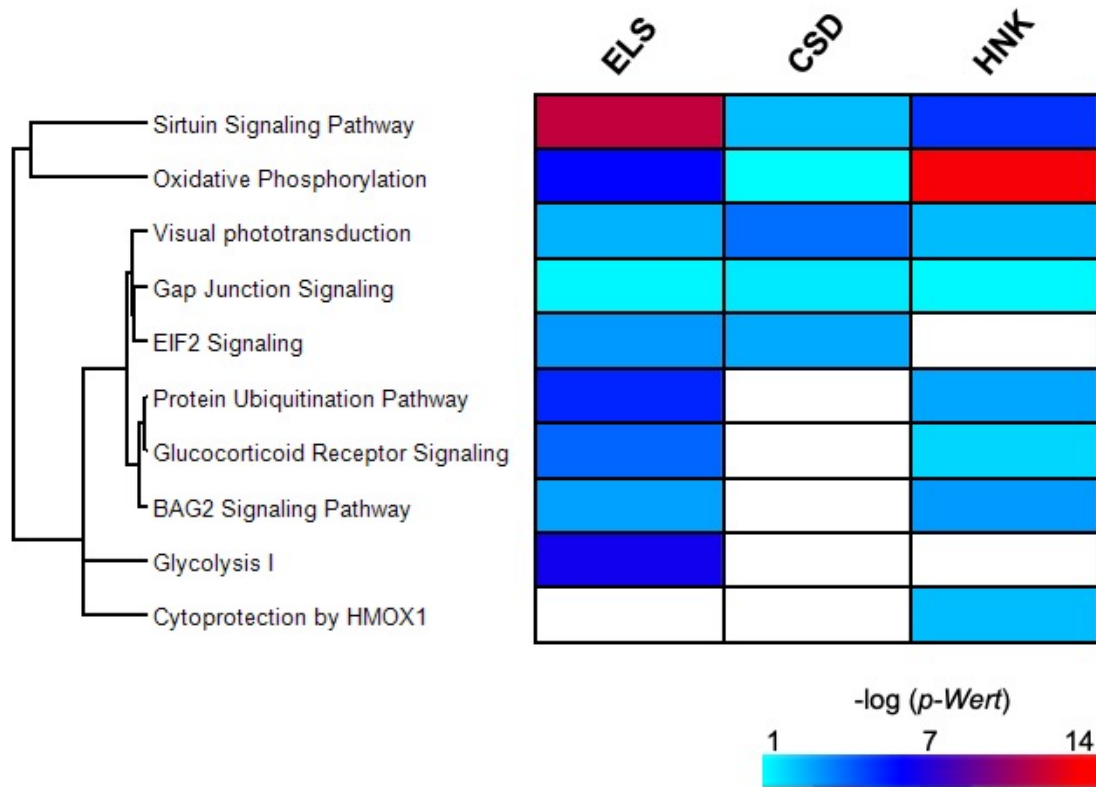
Zunächst wurden die häufigsten Signalwege „Canonical Pathways“ identifiziert (siehe Abbildung 23). Hierzu zählen in allen Versuchsgruppen der Sirtuin-Signalweg „*Sirtuin Signaling Pathway*“ (ELS $p = 2,85E-13$; CSD $p = 1,56E-03$; HNK $p = 1,17E-06$), die oxidative Phosphorylierung „*Oxidative Phosphorylation*“ (ELS $p = 1,06E-07$; CSD $p = 4,19E-02$; HNK $p = 8,20E-15$), die visuelle Phototransduktion „*Visual Phototransduction*“ (ELS $p = 8,67E-04$; CSD $p = 2,78E-05$; HNK $p = 1,37E-03$) und die Gap-Junction-Signalübertragung „*Gap Junction Signaling*“ (ELS $p = 2,85E-02$; CSD $p = 1,47E-02$; HNK $p = 3,10E-02$). Daneben wurde der EIF2-Signalweg „*EIF2 Signaling*“ lediglich in der ELS- ($p = 2,42E-04$) und CSD-Versuchsreihe ($p = 5,47E-04$) moduliert. Drei weitere Signalwege wie der Protein-Ubiquitinierungsweg „*Protein Ubiquitination Pathway*“, Glukokortikoid-Rezeptor-Signalweg „*Glucocorticoid Receptor Signaling*“ und der BAG2-Signalweg „*BAG2 Signaling Pathway*“, wurden nur in der ELS- und HNK-Versuchsgruppe aktiviert. Die Glykolyse I „*Glycolysis I*“ nahm hingegen ausschließlich im ELS-Versuch ($p = 3,01E-08$) und die Zytoprotektion durch HMOX1 „*Cytoprotection by HMOX1*“ allein in der HNK-Versuchsreihe ($p = 1,51E-03$) eine merkliche Rolle ein. Auffallende Unterschiede in der Aktivierung der genannten Signalwege waren vor allem zwischen dem ELS- und HNK-Versuch auszumachen. So wies die oxidative Phosphorylierung in der ELS-Gruppe einen Z-Score von 3,00 und im HNK-Versuch einen Wert von -3,32 auf. Ähnlich verhielt sich der Sirtuin-Signalweg, dieser erfuhr in der ELS-Versuchsgruppe wiederum eine Deaktivierung (Z-Score = -1,27) und in der HNK-Versuchsgruppe eine Aktivierung (Z-Score = 1,00). Zuletzt ist hier die Gap-Junction-Signalübertragung mit einem deutlichen Unterschied der Z-Scores innerhalb der einzelnen Versuchsreihen anzuführen, während der ELS Z-Score bei 2,45 lag, so verzeichnete dieser im HNK-Versuch einen Wert von -2,00. Auch die CSD-Gruppe wies hier eine Modulation auf und erreichte einen Z-Score von -1,00.

Abbildung 24 zeigt *Heat Maps* exemplarischer Proteinprofile der aufgeführten Signalwege. Bei Betrachtung dieser fallen einige Proteingruppen besonders ins Auge. So zeigte sich im Sirtuin-Signalweg, der oxidativen Phosphorylierung und im Glukokortikoid-Rezeptor Signalweg ein

Cluster von NADH-Dehydrogenasen (NDUFB4, NDUFA12, NDUFV2, NDUFS1, NDUFB8, NDUFB10, NDUFA2 und NDUFS3). Im Gegensatz dazu konnten im BAG2-Signalweg und Protein-Ubiquitinierungsweg zahlreiche Hitzeschockproteine (HSPA1L, HSP90AA1, HSPA5, HSPA6, HSPA8, HSP90B1 und HSPE1) und Anteile von Proteasomen (PSMA7, PSMB1, PSMD7 und PSMA6) nachgewiesen werden. Die Proteinprofile der Zytoprotektion durch HMOX1 weist ausnahmslos Proteine auf, die in Zusammenhang mit der Cytochrom-c-Oxidase stehen, wie COX6A1, COX6B1, COX4I1 und COX5A. Zuletzt ist ein Cluster von Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (GNB5, GNGT1, GNB1 und GNAT1) in der visuellen Phototransduktion zu nennen.

Canonical Pathways

(a)



(b)

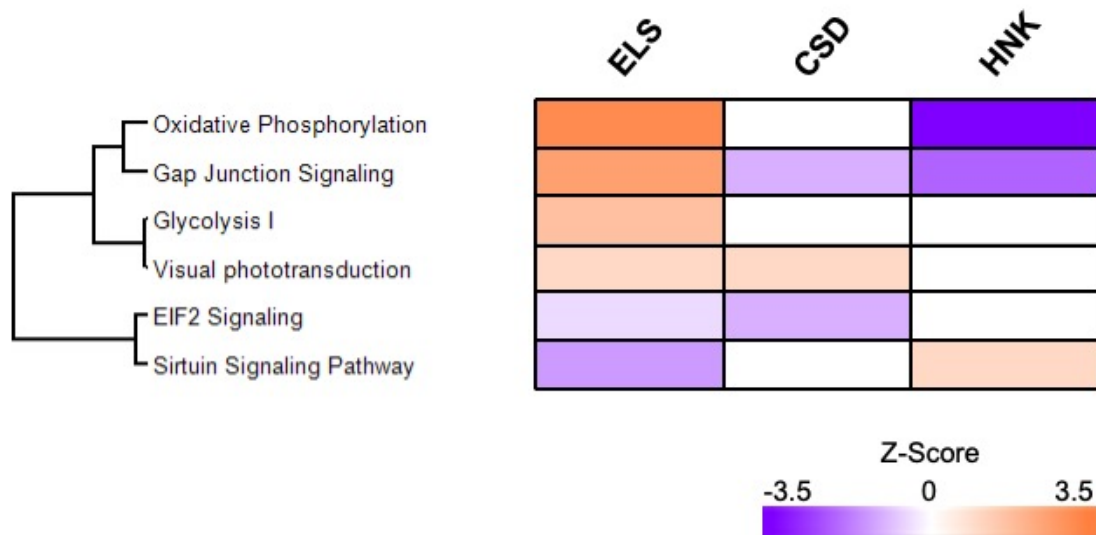


Abbildung 23: *Heat Map* der häufigsten Signalwege „Canonical Pathways“ der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich. (a) Stellt die Aktivität der aufgeführten Signalwege in Abhängigkeit des p-Wertes dar, dabei weist die blaue Farbe auf verminderte und die rote Farbe auf erhöhte Aktivität des Signalweges hin. (b) Stellt die Aktivität der angeführten Signalwege in Abhängigkeit des Z-Scores dar, hierbei weist die violette Farbe auf verminderte und die orangene Farbe auf erhöhte Aktivität des Signalweges hin.

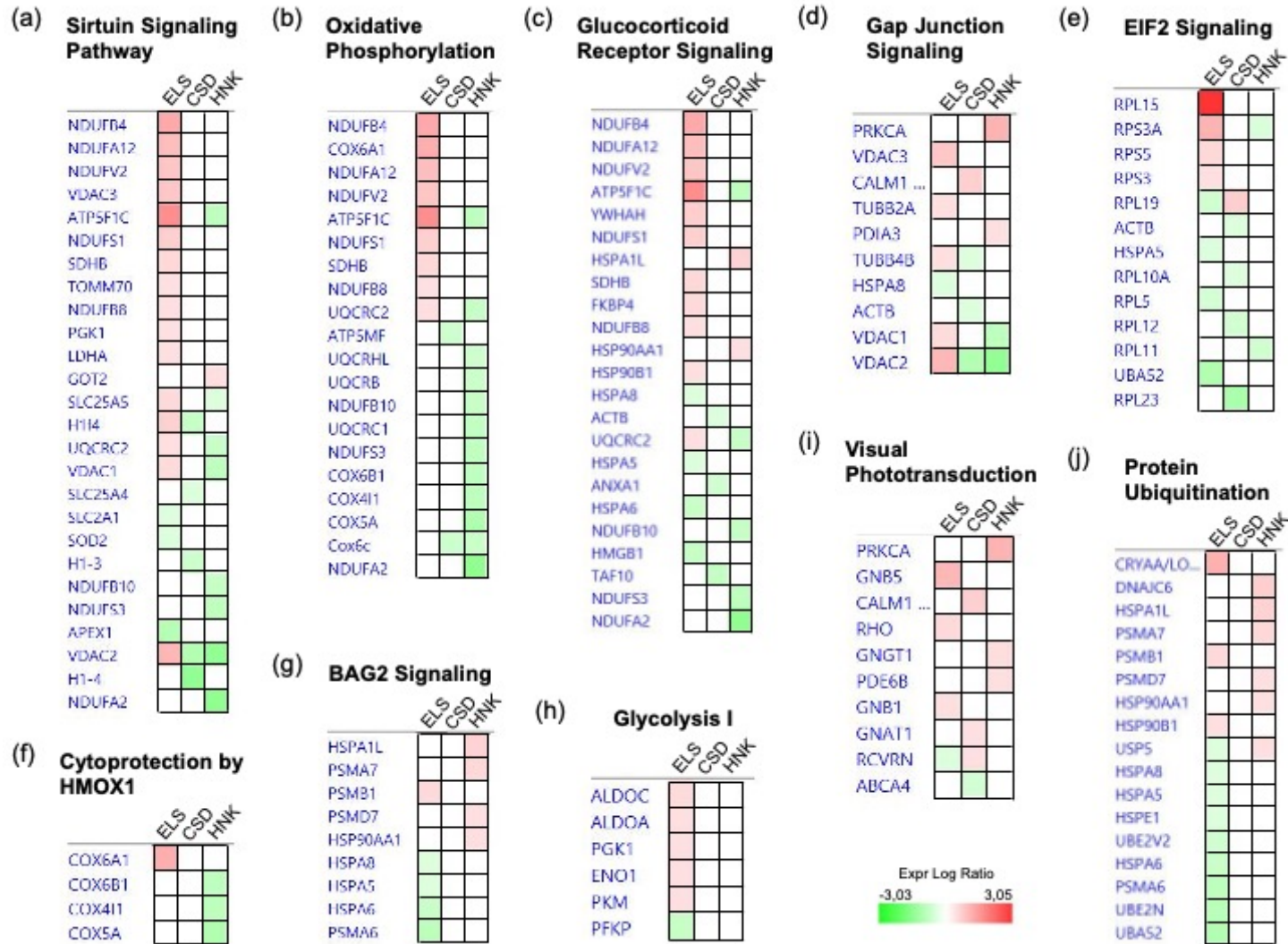


Abbildung 24: Heat Map exemplarischer Proteinprofile der jeweiligen Signalwege (a)-(j) in der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.

4.4.2 Signalweg-Analyse der „Diseases and Biological Functions“

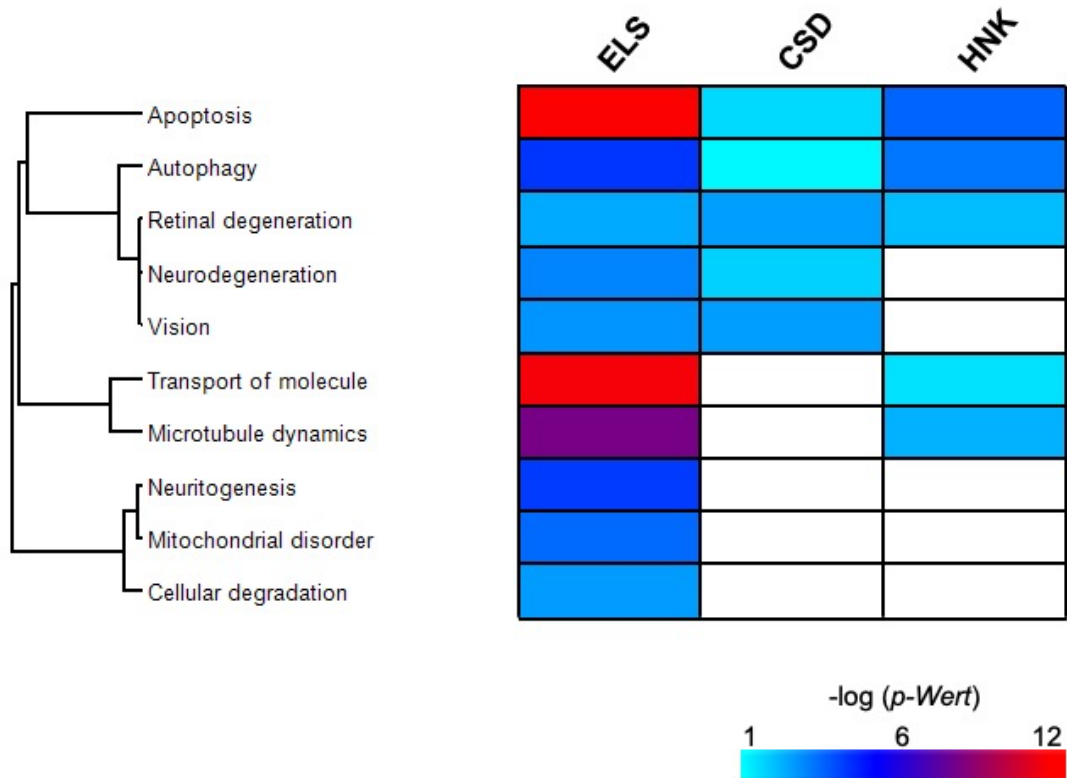
Im zweiten Schritt erfolgte die Identifikation der wichtigsten pathologischen Prozesse „Diseases and Biological Functions“. Hierbei ließen sich in allen Versuchsreihen die Apoptose „*Apoptosis*“ (ELS $p = 1,13E-11$; CSD $p = 1,03E-02$; HNK $p = 6,91E-05$), Autophagie „*Autophagy*“ (ELS $p = 9,18E-06$; CSD $p = 3,76E-02$; HNK $p = 1,50E-04$) und die retinale Degeneration „*Retinal Degeneration*“ (ELS $p = 1,31E-03$; CSD $p = 7,98E-04$; HNK $p = 3,03E-03$) nachweisen. Die Neurodegeneration „*Neurodegeneration*“ (ELS $p = 2,78E-04$; CSD $p = 6,98E-03$) und das Sehvermögen „*Vision*“ (ELS $p = 5,52E-04$; CSD $p = 7,96E-04$) hingegen waren nur in den ELS- und CSD-Versuch involviert. Weitere zwei Prozesse wie der Transport von Molekülen „*Transport of Molecule*“ und die Mikrotubuli-Dynamik „*Microtubule dynamcis*“ waren wiederum ausschließlich in der ELS- und HNK-Versuchsreihe signifikant. Die Prozesse der Neuritogenese „*Neuritogenesis*“, mitochondrialen Erkrankung „*Mitochondrial Disorder*“ und des zellulären Abbaus „*Cellular Degradation*“ wiesen ausnahmslos in der ELS-Gruppe nennenswerte p -Werte auf. Mithilfe der Z-Scores wurden in der Folge gegensätzliche Modellierungen der angeführten pathologischen Prozesse sichtbar gemacht. Auch hier fielen insbesondere konträre Werte von ELS- und HNK-Versuchsgruppe, aber auch der CSD-Versuchsreihe auf. Deutliche Unterschiede waren im Falle des Transports von Molekülen (ELS Z-Score = -1,52; HNK Z-Score = 0,96) und der Mikrotubuli-Dynamik (ELS Z-Score = -2,98; HNK Z-Score = 0,99) zu erkennen. Die Stressmodelle führten außerdem zu vermehrter Neurodegeneration (ELS Z-Score = 0,82; CSD Z-Score = 1,04) und retinaler Degeneration (ELS Z-Score = 0,29; CSD Z-Score = 1,04), während es hier durch den HNK-Versuch zu einer verminderten retinalen Degeneration (Z-Score = -0,88) kam. Weitere Unterschiede waren bei der Autophagie und Apoptose festzustellen. Während es bei den Stressmodellen zur Inaktivierung dieser Prozesse kam, erfuhren sie durch den Einsatz von HNK eine Aktivierung. Dabei lagen die Z-Scores der Stressmodelle zwischen -2,00 und -0,21. Der HNK-Versuch verzeichnete Z-Scores von 0,91 (Apoptose) und 0,41 (Autophagie). Zuletzt waren ausschließlich Proteine des ELS-Versuches bei der Aktivierung des zellulären Abbaus (Z-Score = 1,04) und Deaktivierung der Neuritogenese (Z-Score = -1,59) involviert.

Weiterführend wurden für die benannten Prozesse Proteinprofile erstellt (siehe Abbildung 26). Dabei zeigten sich einige Schlüsselproteine, die in zahlreiche dieser Prozesse eingebunden waren. Das Protein Rhodopsin (RHO) beispielsweise wurde durch den ELS-Versuch bei der retinalen Degeneration, Neurodegeneration, dem zellulären Abbau und dem Sehvermögen hochreguliert. Im Gegensatz dazu wurde das in der Neurodegeneration, Neuritogenese, dem zellulären Abbau und dem Sehvermögen involvierte neuronale Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1) durch die ELS-Versuchsreihe herunterreguliert. Ebenso herunterreguliert wurde *Prosaposin* (PSAP), welches an Autophagie, retinaler Degeneration, Neurodegeneration und zellulärem Abbau beteiligt war. Ein Protein-Cluster wurde lediglich bei der mitochondrialen

Erkrankung sichtbar. Hier zeigten sich vermehrt NADH-Dehydrogenasen wie NDUFA12, NDUFV2, NDUFS1 und NDUFB8.

Diseases and Biological Functions

(a)



(b)

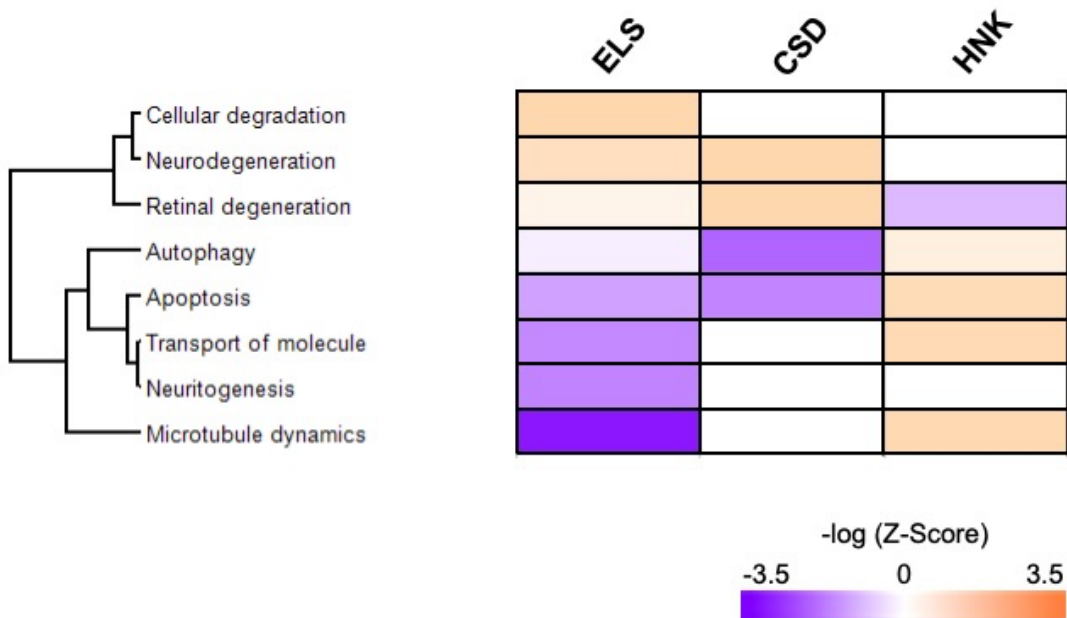


Abbildung 25: *Heat Map* der wichtigsten pathologischen Prozesse „Diseases and Biological Functions“ der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich. (a) Stellt die Aktivität der aufgeführten Prozesse in Abhängigkeit des p-Wertes dar, dabei weist die blaue Farbe auf verminderte und die rote Farbe auf erhöhte Aktivität des Prozesses hin. (b) Stellt die Aktivität der angeführten Prozesse in Abhängigkeit des Z-Scores dar, hierbei weist die violette Farbe auf verminderte und die orangene Farbe auf erhöhte Aktivität des Prozesses hin.

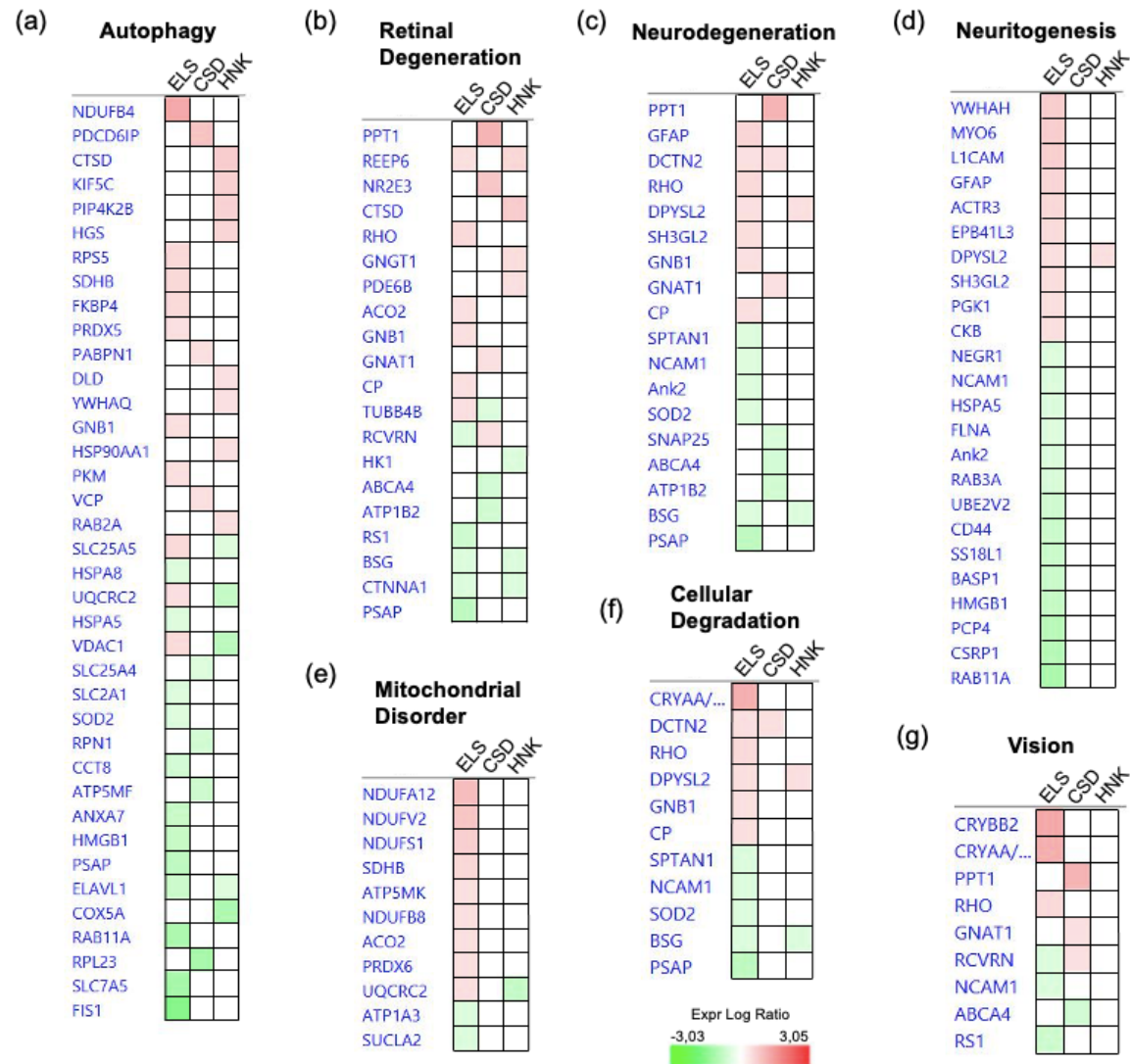


Abbildung 26: Heat Map der signifikantesten Proteine der jeweiligen pathologischen Prozesse (a)-(g) in der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.

4.4.3 Signalweg-Analyse der „Upstream Regulators“

Zuletzt wurden die Upstream Regulatoren „Upstream Regulators“ identifiziert (siehe Abbildung 27). Dabei ließen sich insgesamt 21 signifikante Regulatoren festhalten. Zehn dieser Regulatoren wurden in allen Versuchsreihen nachgewiesen, dazu zählen das Amyloid-Precursor-Protein (APP) (ELS $p = 1,38E-30$; CSD $p = 6,22E-03$; HNK $p = 1,74E-11$), Mikrotubuli-assoziiertes Tau-Protein (MAPT) (ELS $p = 1,63E-26$; CSD $p = 7,70E-06$; HNK $p = 2,03E-21$), Präsenilin-1 (PSEN1) (ELS $p = 3,84E-26$; CSD $p = 8,53E-04$; HNK $p = 7,25E-12$), Myc-Protoonkogen-Protein (MYC) (ELS $p = 7,23E-20$; CSD $p = 4,46E-03$; HNK $p = 6,60E-05$), Zelluläres Tumorentigen p53 (TP53) (ELS $p = 5,05E-14$; CSD $p = 1,76E-10$; HNK $p = 8,28E-04$), Rapamycin-unempfindlicher Begleiter von mTOR (RICTOR) (ELS $p = 8,23E-08$; CSD $p = 1,15E-03$; HNK $p = 4,61E-18$), Transformierender Wachstumsfaktor Beta-1 (TGBF1) (ELS $p = 1,33E-07$; CSD $p = 4,06E-03$; HNK $p = 1,69E-03$), La-related protein 1 (LARP1) (ELS $p = 1,57E-06$; CSD $p = 8,29E-05$; HNK $p = 2,94E-03$), *mechanistic target of rapamycin* (MTOR) (ELS $p = 4,23E-05$; CSD $p = 6,65E-05$; HNK $p = 8,48E-03$) sowie das Protein L-Myc (MYCL) (ELS $p = 1,95E-02$; CSD $p = 8,67E-05$; HNK $p = 3,38E-02$). Weitere vier Regulatoren konnten lediglich in der ELS- und HNK-Versuchsreihe nachgewiesen werden, darunter *Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 3* (UQCC3) (ELS $p = 4,49E-14$; HNK $p = 6,53E-14$), *Hepatocyte nuclear factor 4-alpha* (HNF4A) (ELS $p = 1,40E-09$; HNK $p = 1,61E-02$), *Cardiotrophin-like cytokine factor 1* (CLCF1) (ELS $p = 4,20E-06$; HNK $p = 2,44E-06$) und *Transcriptional enhancer factor TEF-1* (TEAD1) (ELS $p = 1,84E-05$; HNK $p = 4,80E-13$). Die ELS-Versuchsreihe weist darüber hinaus alleinig folgende fünf regulierenden Moleküle auf: *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) ($p = 1,27E-09$), *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) ($p = 5,69E-08$), Transkriptionsfaktor E2F1 (E2F1) ($p = 1,63E-07$), *G1/S-specific cyclin-D1* (CCND1) ($p = 7,45E-03$) und Levodopa ($p = 1,47E-02$). Weiterhin ist die *Histone-lysine N-methyltransferase EZH2* (EZH2) ($p = 1,47E-02$) nur im CSD-Versuch signifikant, während der *Nuclear respiratory factor 1* (NRF1) ($p = 4,70E-06$) ausschließlich in der HNK-Versuchsreihe identifiziert wurde. Mithilfe der zugehörigen Z-Scores ließen sich zum Teil deutliche Unterschiede in der Aktivierung der Regulatoren zwischen den Versuchsgruppen ausmachen. Diese Gegensätze zeigten sich vor allem zwischen der ELS- und HNK-Versuchsreihe. Dabei erfuhr CLCF1 beispielsweise im ELS-Durchgang eine Deaktivierung (Z-Score = -1,66) und im HNK-Versuch eine deutliche Aktivierung (Z-Score = 2,24). TEAD1 und MYC hingegen wurden in der ELS-Versuchsreihe aktiviert (TEAD1 Z-Score = 2,83; MYC Z-Score = 0,80) und durch den Einsatz von HNK deaktiviert (TEAD1 Z-Score = -3,46; MYC Z-Score = -0,66). Die Aktivität des Rapamycin-unempfindlichen Begleiters von mTOR (RICTOR) wurde durch den ELS-Versuch wiederum stark vermindert (Z-Score = -3,05) und sowohl durch den CSD- als auch den HNK-Durchgang deutlich erhöht (CSD Z-Score = 2,24; HNK Z-Score = 2,69). Weiterhin führte die ELS-Versuchsreihe zu deutlich gesteigerter Aktivität im Falle von TP53 (Z-Score =

1,56), MTOR (Z-Score = 1,60), CNTF (Z-Score = 1,67), HNF4A (Z-Score = 1,71) und E2F1 (Z-Score = 2,89). Eine nennenswerte Deaktivierung durch die Gabe von HNK waren bei Levodopa (Z-Score = -2,00) und NRF1 (Z-Score = -2,24) zu verzeichnen.

Die *Heat Maps* in Abbildung 28 veranschaulichen einige Proteinprofile ausgewählter Upstream Regulatoren. Hierbei werden innerhalb einzelner Profile Proteincluster sichtbar. So zeigen sich beim Regulator RICTOR einerseits viele NADH-Dehydrogenasen (NDUFB4, NDUFV2, NDUFS1, NDUFB8, NDUFB10, NDUFS3 und NDUFA2), andererseits aber auch zahlreiche ribosomale Proteine (RPL10A, Rplp1, RPL12, RPL11) und verschiedenste Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase, wie COX6A1, COX6B1, COX4I1, COX5A und Cox6c. Zuletzt genannte Proteingruppen sind ebenfalls clusterartig bei zwei weiteren Upstream Regulatoren vertreten. NRF1 weist eine Vielzahl von Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase auf. Dazu gehören COX4I1, COX5A, COX6B1 und Cox6c. Die Gruppe der ribosomalen Proteine findet sich beim Regulator LARP1 vielfach wieder (RPL15, RPS3A, RPS5, RPS3, RPL19, RPL10A, RPL5, RPL12, RPL11 und RPL23).

Upstream Regulators

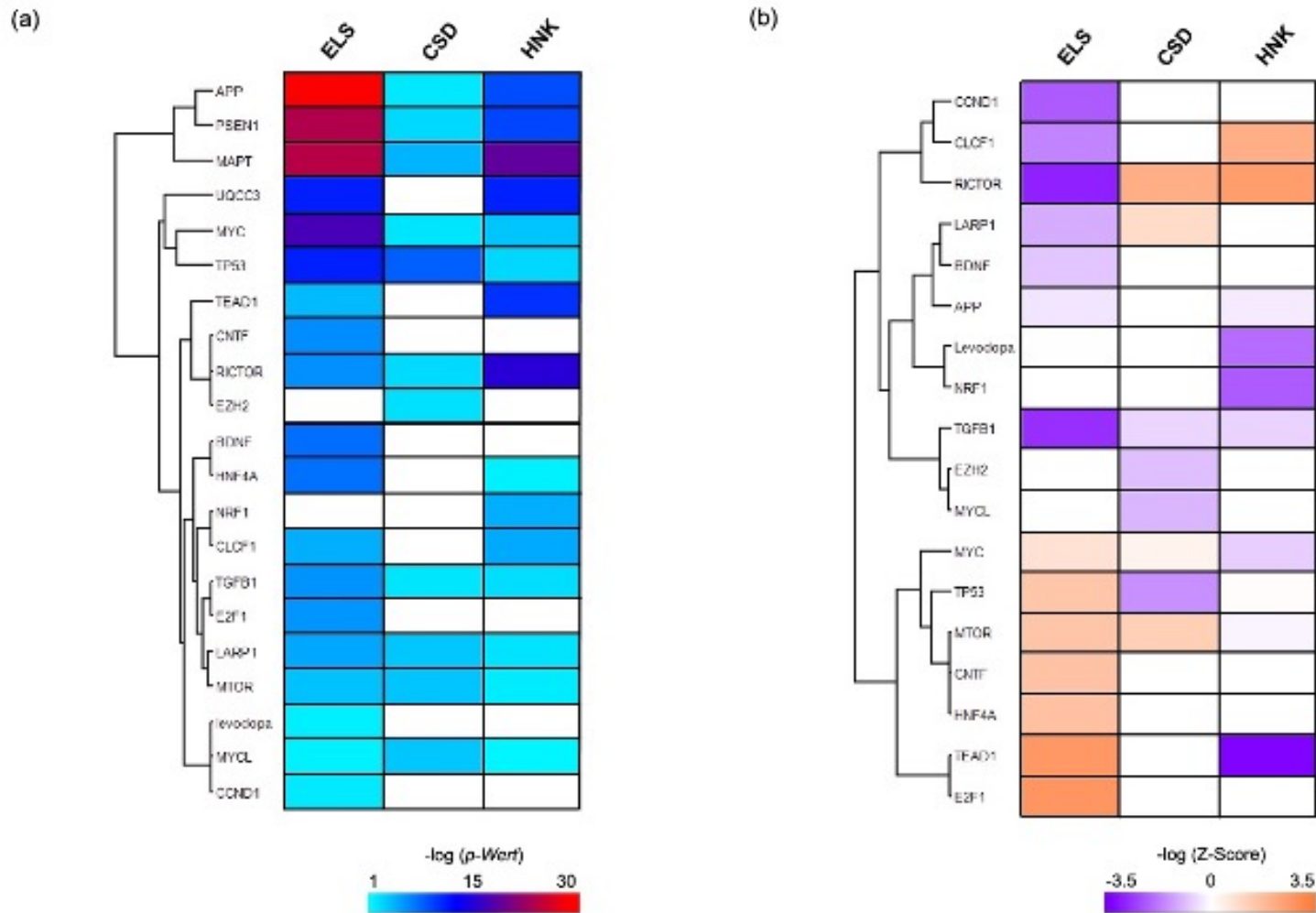


Abbildung 27: *Heat Map* der wichtigsten Upstream Regulatoren „Upstream Regulators“ der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich. (a) Stellt die Aktivität der aufgeführten Regulatorien in Abhängigkeit des p-Wertes dar, dabei weist die blaue Farbe auf verminderte und die rote Farbe auf erhöhte Aktivität des Prozesses hin. (b) Stellt die Aktivität der angeführten Regulatorien in Abhängigkeit des Z-Scores dar, hierbei weist die violette Farbe auf verminderte und die orangene Farbe auf erhöhte Aktivität der Regulatorien hin.

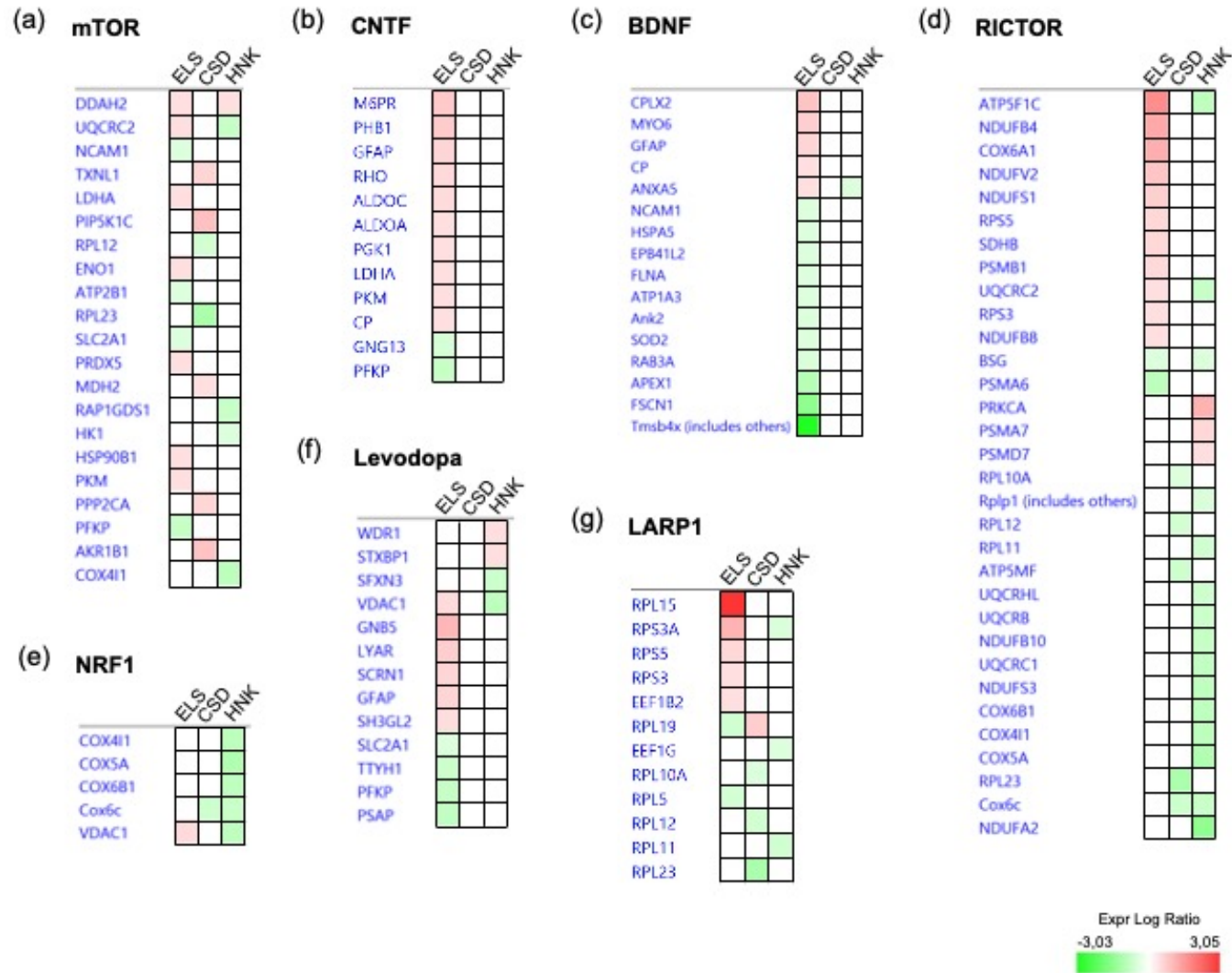


Abbildung 28: Heat Map der signifikantesten Proteine der jeweiligen Upstream Regulatoren (a)-(g) in der ELS-/ CSD-/ HNK-Versuchsreihe im Vergleich; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert; je intensiver die Farbe, desto höher die Abundanz.

5. Diskussion

Okulare Erkrankungen und damit einhergehende Einschränkungen der Sehkraft gelten als irreversibel und oft fortschreitend. Infolgedessen erleben die Betroffenen anhaltenden psychischen Stress, der durch Sorgen, Angst oder Furcht ausgelöst wird und sekundäre Folgen wie Depressionen und soziale Isolation nach sich ziehen kann. Während langanhaltender psychischer Stress zweifelsohne eine Folge von Sehverlust ist, kann er auch das Auge selbst negativ beeinflussen – etwa durch ein Ungleichgewicht im autonomen Nervensystem (sympathische Aktivierung) und eine gestörte Gefäßregulation. Somit könnte Stress eine der Hauptursachen für Erkrankungen des visuellen Systems wie dem Glaukom und der Optikusneuropathie sein. Obwohl Stress als Risikofaktor bekannt ist, wird seine ursächliche Rolle bei der Entstehung oder dem Fortschreiten bestimmter Erkrankungen des visuellen Systems bislang wenig beachtet. Die vorliegende Forschungsarbeit setzt genau an dieser Stelle an und untersucht Stress als einen ursächlichen Faktor für die Entstehung von Erkrankungen des okularen Systems, insbesondere dem Glaukom. Diese Perspektive ist in der Forschung kaum beleuchtet worden, Sabel et al. gehört zu den wenigen Forschungsgruppen, die sich dieser Hypothese bisher angenommen haben [1, 13]. Im Fokus dieser Arbeit stehen psychosoziale Stressmodelle, die die Versuchstiere über verschiedene Strategien und Mechanismen starkem Stress aussetzten. Dabei wurden zwei etablierte Versuchsmodelle eingesetzt, wie der Early Life Stress (ELS) und der Chronische Soziale Stress (CSD). Diese beiden Ansätze erlaubten es, verschiedene Aspekte der Stressbelastung zu untersuchen. ELS bildet die Auswirkungen frühkindlicher belastender Erfahrungen ab, während CSD chronische Stressoren im Erwachsenenalter simuliert. Darüber hinaus fand in diesem Projekt (2R, 6R)-Hydroxynorketamin als ein potenzieller Wirkstoff gegen Depressionen Anwendung. Die Experimente untersuchten die Auswirkungen der vorausgegangenen Versuche im Anschluss durch proteomische Analyse der Netzhaut der Versuchstiere. Hierfür bediente sich die Studie der Massenspektrometrie. Damit stellt dieses Forschungsprojekt eine einzigartige wissenschaftliche Arbeit dar, die den Zusammenhang zwischen Stress und der Ätiologie okularer Erkrankungen ergründet und erste Hinweise auf stressbedingte neurodegenerative Veränderungen in der Netzhaut liefert.

Wie bereits aus dem Ergebnisteil hervorgeht, lassen sich in allen drei Versuchsreihen (ELS, CSD, HNK) deutliche Unterschiede im Proteom der Versuchstiere und dem ihrer Kontrollgruppen ausmachen. Diese Befunde belegen, dass frühkindliche und chronische soziale Belastungen, sowie der Einsatz des potenziellen Wirkstoffes HNK neurobiologische Prozesse nachhaltig beeinflussen können. Dabei zeigen die Stressmodelle vor allem spezifische, aber auch überschneidende Auswirkungen auf das Proteom der Netzhaut. So differieren die jeweiligen Modifizierungen und Veränderungen des Retina-Proteoms der Tiere nach Art des verwendeten Stressors. Der Einsatz des Wirkstoffes liefert ebenfalls

vielversprechende Ergebnisse, die auf dessen Wirksamkeit im hier angewandten Modell hinweisen.

5.1 Identifikation potenzieller Biomarker

5.1.1 Proteine der „Canonical Pathways“

Bei Betrachtung der Protein-Expressionsprofile sind signifikante Unterschiede zu erkennen. Während in der CSD-Versuchsreihe 71 Proteine und im HNK-Versuch 88 Proteine einer signifikanten Regulierung unterlagen, so weist die ELS-Versuchsreihe etwa doppelt so viel signifikant regulierte Proteine auf. Von den insgesamt 173 unterschiedlich exprimierten Proteinen des ELS-Versuches wurden 94 der Makromoleküle vermehrt und 73 vermindert produziert. Folglich scheinen die Auswirkungen auf das Proteom der Retina durch das ELS-Versuchsmodell am gravierendsten zu sein. Diese Unterschiede lassen sich auf die verschiedenen Zeitpunkte und differierenden Mechanismen des einwirkenden Stresses zurückführen. Beim Early Life Stressmodell befinden sich die Versuchstiere anders als im CSD-Versuch in einer äußerst vulnerablen Entwicklungsphase. Die Tiere werden bereits wenige Tage nach ihrer Geburt über das Verhalten des Muttertieres manipuliert. Der Stress im Welpenalter übt folglich großen Einfluss auf den gesamten Organismus der Versuchstiere aus, wie die Organreifung und Entwicklung wichtiger Stoffwechselprozesse. So sind beispielsweise akute und andauernde Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse durch das Stressmodell dokumentiert [48, 127]. Nichtsdestotrotz verursachte auch das CSD-Modell nachweisbar signifikante Veränderungen im Proteom der Netzhaut. Die Intensität und Ausprägung waren allerdings weniger stark, was zur Vermutung führt, dass die ausgewachsenen Versuchstiere auf molekularer Ebene resilienter gegenüber Stress sind. Diese Unterschiede deuten auf eine Bestätigung der anfangs aufgestellten Hypothese hin, dass verschiedene Arten von Stress unterschiedliche Folgen für den betroffenen Organismus haben. Auf Verhaltensebene ist dieser doch merkliche Unterschied zwischen den Stressmodellen weniger nachzuvollziehen, da hier vor allem die Versuchstiere des CSD-Modells depressionsähnliches Verhalten (z.B. im Interaktionstest) zeigen.

Die Besonderheit dieser Studie liegt in der Testung von HNK als potenzieller Wirkstoff in der Therapie von Depressionserkrankungen. Hierfür wurden Mäuse des Stammes DBA/2J verwendet, der sich durch ein inhärent hohes Angstlevel und depressionsähnliche Verhaltensweisen auszeichnet. Frühere Studien der Gruppe Herzog et al. haben dieses Modell etabliert und gezeigt, dass die Anwendung von HNK zur Suppression des Glukokortikoid-Rezeptor Signalwegs führt und die hormonelle Sensitivität dessen reduziert [112]. Als Untersuchungsgegenstand der Studie diente die Cerebrospinalflüssigkeit der Versuchstiere. Der Glukokortikoid-Rezeptor-Signalweg (GR-Signalweg) ist bei der Stressreaktion des Organismus von entscheidender Rolle. Glukokortikoid-Rezeptoren (GR) kommen in nahezu

allen Körperzellen als intrazelluläre Hormonrezeptoren vor und werden durch die Bindung von Glukokortikoiden aktiviert. Zu diesen Glukokortikoiden zählt beispielsweise das Stresshormon Kortisol. Bindet ein solches Glukokortikoid an einen GR, so setzt dieser über Transaktivierung und Transrepression die allgemein bekannte Wirkung von Glukokortikoiden in Gang. Im zentralen Nervensystem reguliert der GR-Signalweg so die temporäre und langfristige Antwort auf einen Stressor und beeinflusst hierüber die Neuroplastizität [128]. Die Ergebnisse zeigen, dass der GR-Signalweg in der Retina durch die Gabe von HNK leicht aktiviert wird. Betrachtet man die Expressionsprofile der involvierten Proteine so wird ersichtlich, dass diese nach der Gabe des Wirkstoffes auch in dieser Studie überwiegend herabreguliert wurden. Als Schlüsselproteine konnte Herzog et al. eine Reihe von Keratinen und Hitzeschockproteinen identifizieren [112]. Auch in dieser Studie ist ein Cluster von Hitzeschockproteinen an der Regulierung des GR-Signalwegs beteiligt. Dabei zeigen HSPA1L und HSP90AA1 ein aktiviertes Expressionsprofil nach der Verabreichung von HNK. Die Hitzeschockproteine HSPA5, HSPA6 und HSPA8 wurden hingegen durch den ELS-Versuch vermindert exprimiert. Das ELS-Versuchsmodell weist darüber hinaus einen signifikanteren p-Wert und damit eine stärkere Anreicherung des GR-Signalwegs auf. Hier zeigen die Expressionsprofile insgesamt eine gegenteilige Reaktion durch den Versuch: die beteiligten Proteine werden vermehrt exprimiert, am stärksten wird der Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen bei der *ATP synthase subunit gamma (ATP5F1C)* und der *Cytochrome b-c1 complex subunit 2 (UQCRC2)* deutlich. Diese Proteine werden durch ELS vermehrt exprimiert und durch die Gabe von HNK herabreguliert. Gleiches widerfährt den NADH-Dehydrogenasen. Nach Gabe des Wirkstoffes zeigen sich einige der Enzyme (NDUFB10, NDUFS3, NDUF A2) supprimiert, während der ELS-Versuch ein Cluster aktivierter und hochregulierter NADH-Dehydrogenasen (NDUFB4, NDUF A12, NDUFV2, NDUFS1, NDUFB8) aufweist.

Die visuelle Phototransduktion umfasst den Prozess, der Lichtreize in elektrische Signale umwandelt. Diese Umwandlung findet in den Photorezeptorzellen der Netzhaut statt und wird anschließend über Nervenfasern an den visuellen Cortex im Okzipitallappen weitergeleitet und dort verarbeitet. Das Protein *Recoverin (Rcvrn)* fungiert dabei als Calciumsensor und reguliert die Phototransduktion der Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen), indem es durch Aktivierung der Guanylatcyclase die Licht-induzierte Exzitation der hyperpolarisierten Rezeptorzellen beendet [129]. So werden die Zellen für neue Lichtreize sensibel und die visuelle Empfindlichkeit gesteigert [130]. Das Molekül spielt dementsprechend im Signalweg der visuellen Phototransduktion, aber auch in den pathologischen Prozessen der retinalen Degeneration, sowie beim Sehvermögen eine tragende Rolle. Durch die Versuchsmodelle wurde die Expression von Rcvrn im ELS-Versuch vermindert und im CSD-Versuch erhöht. Weiterhin findet Rcvrn in Studien Erwähnung, die von einer Recoverin-assoziierten Retinopathie berichten [131]. Hier wurden Antikörper nachgewiesen die spezifisch gegen das

Protein gerichtet waren. Es wird vermutet, dass die immunologische Inaktivierung von Rcvrn, ähnlich wie bei der Krebs-assoziierten Retinopathie, zum Zelluntergang der Photorezeptoren führt und somit ursächlich für die retinale Degeneration der Patienten ist [132]. Rhodopsin (RHO) gilt im Prozess der Phototransduktion als weiteres Schlüsselprotein und steht am Beginn der Signalkaskade. Es wird durch eintreffende Photonen isomerisiert und setzt damit die Transduktion in Gang. Die Proben der ELS-Versuchstiere wiesen eine erhöhte Produktion von RHO auf.

Die Glykolyse I weist durch den einwirkenden Stress des ELS-Versuchs eine erhöhte Aktivität auf. Die Glykolyse stellt den ersten Abschnitt des Glukosestoffwechsels dar. Sie kann unter aeroben und anaeroben Bedingungen stattfinden und kommt daher in nahezu allen Organismen vor. Während der Glykolyse wird ein Molekül Glukose zu zwei Molekülen Pyruvat verstoffwechselt. Dabei entsteht Energie in Form von ATP [133]. Beteiligte Proteine wie die *Aldolase C* (ALDOC) wurden in der ELS-Versuchsreihe vermehrt exprimiert. Eine solche Überexpression von ALDOC wird ebenfalls in vielen Tumorzellen mit erhöhtem Energiestoffwechsel nachgewiesen [134]. Seither dienen die Aldolasen als neue Biomarker in der Tumorthherapie und sind als Gegenstand neuer Therapieansätze zu verstehen. Die Gruppe um Treccani et al. konnte außerdem Veränderungen des ALDOC Vorkommen in Astrozyten und der Cerebrospinalflüssigkeit nachweisen [135]. Diese Veränderungen wurden ebenfalls durch einen ELS-Versuch mit Mäusen hervorgerufen. Nachfolgend untersuchte die Forschungsgruppe zusätzlich hippocampale Proben von verstorbenen Patienten mit diagnostizierter schwerer Depression „*Major Depressive Disorder*“ (MDD), um Zusammenhänge zwischen frühen Lebensbelastungen und dem Auftreten einer MDD zu prüfen. Die Untersuchung zeigte eine deutliche Abnahme ALDOC-positiver Zellen in den Gehirnen der Erkrankten. Somit könnte das Protein den Bogen zwischen dem Auftreten einer schweren Depression bei frühkindlichen Lebenswidrigkeiten spannen und qualifiziert sich als potenzielles Schlüsselprotein [135].

Der Signalweg der Zytoprotektion durch HMOX1 wurde durch die HNK-Gabe aktiviert. Die Expression der Hämoxygenase-1 (HMOX1) wird durch verschiedenste Stressoren induziert. Das Enzym katalysiert die Spaltung von Häm, die dabei anfallenden antioxidativen Metaboliten, wie Kohlenstoffmonoxid, wiederum binden Radikale und schützen die Zellen so vor oxidativem Stress [136]. Darüber hinaus werden dem Enzym entzündungshemmende und antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben. Bei den beteiligten Proteinen handelt es sich um ein Cluster von Cyclooxygenasen (COX6B1, COX4I1, COX5A). Diese wurden nach Gabe des Wirkstoffes allesamt vermindert exprimiert. Cyclooxygenasen wirken im Arachidonsäurestoffwechsel und katalysieren die Bildung von Prostaglandinen und Thromboxanen. Darüber treiben sie die Schmerzvermittlung und Entzündungsprozesse an

[137]. Hieraus lässt sich schließen, dass die Gabe von HNK solche Prozesse herabsetzt und reduziert.

5.1.2 Proteine der „Diseases and Biological Functions“

Die retinale Degeneration wurde durch die beiden Stressmodelle (ELS, CSD) aktiviert, wohingegen die Gabe von HNK eine verminderte Aktivität dieses pathologischen Prozesses bewirkte. Damit scheint der Wirkstoff die Netzhaut vor Degeneration zu schützen. Auch hier tauchen die bereits erwähnten Expressionsprofile von *Recoverin* und Rhodopsin auf. Interessanterweise kommt keines der aufgeführten Proteine in allen drei Versuchsdurchläufen vor, stattdessen scheinen verschiedene Proteine zur Aktivierung bzw. Deaktivierung der retinalen Degeneration in den einzelnen Versuchen zu führen. Das Protein *Prosaposin* (PSAP) beispielsweise wurde durch den ELS-Versuch am signifikantesten herunterreguliert. PSAP zählt zu den neurotrophen Faktoren und stimuliert den Auswuchs von Neuriten, sowie die Aktivität der Acetyl-Cholinesterase [138]. Des Weiteren haben vergangene Studien gezeigt, dass die Sekretion von PSAP durch Stress oder Verletzungen gesteigert wird, um nachfolgend über G-Protein gekoppelte Signalwege zum Schutze von Neuronen und Gliazellen in Gang zu setzen [139]. Eine Herabregulation von PSAP durch das Stressmodell könnte bedeuten, dass die Netzhaut der Versuchstiere den protektiven Effekt des Proteins nicht ausschöpfen kann. Der Stress im Jungtialter kann wie eingangs dargelegt zu veränderten Zellmechanismen führen. Möglicherweise haben diese Veränderungen zur Folge, dass die zellulären Schutzmechanismen in der Retina der Versuchstiere beeinträchtigt werden. Im CSD-Modell überwiegen dagegen andere Proteine, wie der *Photorezeptor-specific nuclear receptor* (NR2E3). Das Protein ist im Proteom der CSD-Mäuse stark exprimiert. Bei NR2E3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der in den Photorezeptorzellen vorkommt und dort eine wichtige Rolle einnimmt. Er reguliert die Entwicklung und Erhaltung der Zellen, dabei dient er als Aktivator der Stäbchen und Repressor der Zapfen [140]. Weitere Untersuchungen zeigen, dass Veränderungen der NR2E3-Aktivität zu mannigfaltigen Erkrankungen der Netzhaut führen und in engem Zusammenhang mit der Degeneration der Retina stehen [141, 142].

Das Sehvermögen (*Vision*) weist in der ELS- und CSD-Versuchsreihe eine Aktivierung auf. Die Expressionsprofile ergeben die Regulierung verschiedener Proteine im Sinne einer Aktivierung und auch Deaktivierung spezifischer Moleküle. Es zeigt sich ein Cluster von Crystallinen (CRYBB2, CRYAA). Das Crystallin *β -crystallin B1* (Crybb1) ist in zwei der Versuchsgruppen signifikant vertreten. Sowohl im ELS- als auch im HNK-Versuch weist das Strukturprotein ein erhöhtes Vorkommen auf. Die Crystalline *β -crystallin A2* (Cryba2) und *β -crystallin B2* (Crybb2) wurden gleichermaßen in einzelnen Versuchsreihen vermehrt nachgewiesen. Grundsätzlich sind Crystalline für die Brechkraft und Transparenz der Augenlinse verantwortlich, übernehmen nebedem in anderen Geweben aber auch wichtige

metabolische und regulatorische Funktionen. Neuere Studien weisen auf eine Beteiligung bei der Stressantwort und nachfolgend der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und auch der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen hin [143]. Die Studie von Perumal et al. zeigte ebenfalls ein solches Cluster von Crystallinen [8]. Hier kam es durch die Induktion von oxidativem Stress allerdings zu einer Herabregulation der Crystalline. Diese Studie fügt sich durch die verstärkte Expression von CRYBB2 und CRYAA in die Annahme vergangener Studien ein, dass Stress zu einer Heraufregulation von Crystallinen führt, um die Zelle resistenter gegenüber stress-induzierter Apoptose zu machen [144]. Weiterhin scheint das überexprimierte CRYAA ebenfalls im pathologischen Prozess des zellulären Abbaus (*Cellular Degradation*) involviert zu sein.

Bei Betrachtung der Abbildung 25 ist zu erkennen, dass HNK zur Aktivierung einiger Prozessen führt. Dazu zählen die Mikrotubuli-Dynamik, Apoptose, Autophagie und der Molekül-Transport. All diese Vorgänge nehmen wichtigen Anteil an der Organisation der Zellen und sind essenzielle Bestandteile eines gesunden Zellzyklus. Eine Aktivierung der Apoptose ist in vielfacher Hinsicht als Schutzmechanismus des Organismus zu verstehen [145]. Zunächst ermöglicht sie dem Körper die Eliminierung von geschädigten Zellen und verhindert somit die Zellteilung potenziell krebserregender bzw. Mutations-tragender oder infizierter Zellen. Weiterhin hält der programmierte Zelltod die Gewebekomöostase aufrecht und sorgt für ein Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zellabbau. Diese Balance ist für die Integrität von Geweben unerlässlich. Auch die Entwicklung und Differenzierung von Zellen wird durch die Apoptose reguliert und gesteuert. Entscheidend ist dabei vor allem, dass die Apoptose keine Entzündungsreaktionen hervorruft. Benachbarte Zellen erfahren durch die Apoptose keine schädlichen Auswirkungen durch den Untergang einer anderen Zelle wie bei der Nekrose. Letztere führt durch Freisetzung von Zellinhalten hingegen zu einer umfassenden Inflammationsreaktion und Schädigung der umliegenden Zellen. Die Apoptose wirkt sich also maßgeblich protektiv aus und bewahrt den Organismus vor der Entstehung von Autoimmunerkrankungen oder Krankheiten wie Krebs [145, 146].

5.1.3 Proteine der „Upstream Regulators“

Das Amyloid-Precursor-Protein (APP) agiert als ein Transmembranprotein, dessen genaue Funktion noch nicht abschließend geklärt ist [147]. In vielen Studien zeigt eine Überexpression des Proteins allerdings einen positiven Effekt auf die Zellgesundheit und das Zellwachstum von Neuronen. So wird vermutet, dass APP die Motilität, das Wachstum, den Neuritenauswuchs und das Zellüberleben von Nervenzellen moduliert und beeinflusst. Bei der Analyse der Upstream Regulatoren zeigt APP eine starke Expression im ELS-Versuch und eine moderat verminderte in der CSD-, sowie stark verminderte Expression in der HNK-Versuchsreihe. Abseits der genannten positiven Eigenschaften steht APP außerdem im Fokus

der Alzheimer-Forschung. Das Protein dient als Ausgangssubstanz für das *β -Amyloid Peptid*, welches wiederum den Hauptbestandteil der Alzheimer verursachenden Plaques darstellt. Folglich können erhöhte Vorkommen auch in Verbindung mit der Alzheimer-Erkrankung, sowie weiteren neurodegenerativen Krankheiten auftreten. Studien zeigen, dass zu Beginn der Erkrankung der mitochondriale Energiestoffwechsel, sowie die Apoptose hochreguliert werden [148]. Dieses Muster zeigt sich ebenfalls im ELS-Versuch, hier präsentieren die Ergebnisse vor allem eine deutliche Erhöhung der Apoptose. Möglicherweise wird die Überproduktion von APP durch bereits eingetretene, stressinduzierte Gewebeschäden ausgelöst, um Reparaturmechanismen zu aktivieren. Der übermäßige Abbau von APP könnte in der Folge jedoch zur Bildung amyloider Plaques führen, die ihrerseits neurodegenerative Prozesse fördern. So würde ein *Circulus vitiosus* eingeleitet, der schlussendlich die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen weiter vorantreibt. Das Transmembranprotein Präsenilin-1 (PSEN1) zeigt dasselbe Regulierungsmuster wie APP und steht in direktem funktionellem Zusammenhang mit dem Protein. PSEN1 fungiert als ein Teil der Gamma-Sekretase, einem Proteinkomplex, dessen Untereinheiten unterschiedliche Funktionen erfüllen. Der Anteil PSEN1 ist an der enzymatischen Synthese von APP beteiligt [149]. Mutationen beider Gene führen nachweislich zur familiären Form der Alzheimer Erkrankung mit früher Erstmanifestation [150]. So ist mit großer Wahrscheinlichkeit zu bestätigen, dass Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen, wie auch Alzheimer, spielt.

Die Proteinkinase mTOR ist als zentraler Regulator des zellulären Stoffwechsels auch ein wichtiger Übermittler von Signalkaskaden, die durch Stresssignale in Gang gesetzt werden [151]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen in allen drei Versuchsreihen eine signifikante Regulierung von mTOR. Die Stressmodelle führen dabei wie zu erwarten zu einer Aktivierung des Proteins. Eine Herabregulation des Regulators ist bei der Progression von Krebserkrankungen, Diabetes und dem Alterungsprozess zu beobachten [151, 152].

Der *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) gehört zu den neurotrophen Faktoren und beeinflusst das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Funktionen von Neuronen in entscheidender Weise [153]. Studien zeigten, dass CNTF auch in der Retina wichtige protektive sowie regenerative Funktionen übernimmt, vor allem zum Schutz der Stäbchen und ihrer Außensegmente [154, 155]. Ein signifikanter Nachweis des neurotrophen Faktors erfolgte lediglich im ELS-Versuch, hier weist der Z-Score auf eine erhöhte Aktivität hin. Dieser Umstand lässt den Schluss zu, dass durch den einwirkenden Stress möglicherweise Schäden in der Retina entstanden sind, die der Organismus durch eine vermehrte Produktion von CNTF zu reparieren versucht.

Das Neurotrophin BDNF gehört zur übergeordneten Gruppe der Zytokine und wirkt vor allem im Vorderhirn, dem Hippocampus und der Großhirnrinde als Neuromodulator [156]. BDNF

zeigt dabei eine vorwiegend protektive Wirkung auf bereits existierende Neurone und Synapsen und gilt als entscheidendster Wachstumsfaktor der adulten Neurogenese [157]. Veränderte Spiegel von BDNF stehen in Zusammenhang mit einer Vielzahl von Erkrankungen, hierzu zählen auch die Depression und Alzheimer. Die Untersuchung von Antidepressiva und ihrer Wirkweise identifizierte die verstärkte Aktivierung und Ausschüttung von BDNF als maßgeblichen Faktor der antidepressiven Wirkung [157]. Im ELS-Versuch zeigt sich eine verminderte Aktivität des Neurotrophins. Diese Herabregulation könnte als Bestätigung des unmittelbaren Zusammenhangs zwischen chronischem Stress und Depressionen betrachtet werden.

Levodopa (L-Dopa) zeigt in der HNK-Versuchsreihe einen inhibierten Z-Score, weist also durch die Gabe des Wirkstoffes HNK eine verminderte Aktivität auf. L-Dopa dient als Vorläufer vieler wichtiger Stoffe, wie Melanin, Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Im Gegensatz zu Letzterem ist L-Dopa in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und wird daher insbesondere in der Parkinson Therapie eingesetzt. Die Gabe von L-Dopa soll den bei Morbus Parkinson zugrundeliegenden Dopaminmangel zeitweise kompensieren. Dies gelingt nur so lange bis der zunehmende Untergang dopaminerger Neuronen überwiegt und eine Kompensation durch die Substitution von L-Dopa schließlich wirkungslos bleibt.

5.1.4 Weitere Schlüsselproteine der Versuchsreihen

Eine genauere Analyse der unterschiedlich exprimierten Proteine ergibt aber auch einige Gemeinsamkeiten zwischen den drei Versuchsgruppen. Das *Voltage-dependent anion selective channel protein 2* (VDAC2) gehört in allen Versuchsreihen zu den am stärksten regulierten Proteinen. Während es im ELS-Versuch hochreguliert wurde, wiesen das CSD- und HNK-Versuchsmodell eine Herabregulierung des Ionenkanals auf. Der Kanal befindet sich in der äußeren Mitochondrienmembran und ermöglicht die Diffusion kleiner hydrophiler Moleküle, wodurch er eine zentrale Rolle im mitochondrialen Stoffwechsel spielt. Eine vermehrte Produktion des Ionenkanals führt zur Inaktivierung des Proteins *Bcl-2 associated X protein* (BAX), das wiederum die Apoptose beschleunigt [158]. Letztendlich modifiziert VDAC2 die Aktivität der aus der Bcl-2-Familie stammenden Proteine und greift hierüber in die Regulation des apoptotischen Signalwegs ein [159]. Dementsprechend folgenreich können Veränderungen der VDAC2-Spiegel sein. Das Protein wird mit Krankheiten wie Alzheimer, ALS und verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht, dabei scheinen erhöhte Vorkommen mit Krebszellen und verminderte Spiegel mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert zu sein [160].

Darüber hinaus ist die *ATP synthase subunit gamma* (Atp5c1) ebenfalls in der ELS- und HNK-Versuchsreihe nachzuweisen. Die ATP-Synthase ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und produziert ATP aus ADP. Die Regulierung fand in den Versuchen in

entgegengesetzte Richtung statt, im ELS-Modell konnte das Protein vermehrt nachgewiesen werden, im HNK-Modell stattdessen vermindert. Zudem wurde das Protein *Dynein axonemal heavy chain 2* (Dnah2) im CSD- und im HNK-Versuchsmodell signifikant reguliert. Dabei kam es im CSD-Modell zu einer verminderten und im HNK-Modell zu einer erhöhten Expression des Proteins. Als Teil des inneren Dynein-Arm-Komplexes spielt das Protein eine zentrale Rolle bei der Ausführung des Zilienschlags. Zuletzt ist das *Protein Structural maintenance of chromosomes protein 1A* (SMC1a) in mehreren Versuchsreihen reguliert worden. Dabei handelt es sich um eine wichtige Komponente des Cohesin-Komplexes, welcher die Chromosom-Segregation bei Mitose und Meiose kontrolliert [161]. Des Weiteren ist SMC1A bei der DNA-Reparatur von essenzieller Wichtigkeit und sichert gleichbedeutend die Genomstabilität. Pathogenetische Varianten des Gens konnten in der Vergangenheit mit seltenen Erkrankungen, wie dem Cornelia de Lange Syndrom oder Epilepsie in Verbindung gebracht werden [162].

Aber auch in den Versuchsreihen selbst stellen sich erwähnenswerte Proteincluster dar. So zeigte die Klasse der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) im ELS-Versuch verminderte Expressionsprofile. Gleich sieben Proteine dieser Familie wurden signifikant herunterreguliert. hnRNPs sind zentrale Akteure im Nukleinsäurestoffwechsel und mit der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer assoziiert [163]. In der HNK-Versuchsreihe treten die Expressionsprofile cytochromassoziierter Proteine hervor. Hier wurden acht dieser Makromoleküle signifikant vermindert exprimiert, darunter vier Untereinheiten des *Cytochrome bc-1 complexes* sowie vier Protomere der *Cytochrom c oxidase*. Cytochrome fungieren als Katalysatoren von Redoxreaktionen und spielen eine essenzielle Rolle in der Atmungskette [164].

5.2 Limitationen der Studie

Trotz der bedeutenden Erkenntnisse dieser Studie sind einige Limitationen zu berücksichtigen, die die Interpretation und Generalisierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse einschränken. Zwar gelten ELS- und CSD-Versuchsmodelle als etablierte Paradigmen der Stressforschung, dennoch bleibt die Übertragbarkeit auf den Menschen begrenzt. So besitzen Mäuse andere soziale Strukturen und Bewältigungsstrategien als der Mensch. Dies erschwert folglich die Ableitung klinischer Implikationen. Hinzukommt, dass die Studie überwiegend männliche Mäuse verwendete, da diese im CSD-Modell eine ausgeprägtere Hierarchiebildung und stärkere Stressreaktionen zeigen. Weibliche Mäuse, die hingegen hormonelle und verhaltensbezogene Unterschiede in der Stressantwort aufweisen, wurden nicht untersucht. Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede könnten jedoch wichtige Erkenntnisse liefern, die insbesondere im Hinblick auf geschlechtsabhängige Prävalenzen von stressbedingten Erkrankungen beim Menschen von Interesse wären. Außerdem fußt das CSD-Modell auf der

sozialen Niederlage, die vor allem durch physische Auseinandersetzungen evoziert wird. Beim Menschen spielen dagegen meist subtilere psychosoziale Stressoren eine Rolle, wie Mobbing oder soziale Isolation, die hier kaum Berücksichtigung finden. Das ELS-Modell simuliert frühkindliche Vernachlässigung, deckt allerdings nicht die gesamte Bandbreite adverser Kindheitserfahrungen ab, wie beispielsweise Missbrauch oder chronische familiäre Konflikte. Somit imitieren die verwendeten Modelle spezifische Stressbelastungen, die zumeist stärker und eindeutiger sind als die chronischen, geringgradigen Stressoren, denen sich der Mensch im Alltag konfrontiert sieht. Hierdurch könnte die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf realitätsnähere Situationen eingeschränkt werden. Weiterhin ist es trotz der Anwendung etablierter Protokolle möglich, dass individuelle Unterschiede der Mäuse, wie genetische Prädispositionen, Alter oder vorangegangene Erfahrungen, die Ergebnisse beeinflusst haben. Diese Variabilität wurde nur eingeschränkt berücksichtigt und könnte zu einer zusätzlichen Verzerrung der Befunde geführt haben.

So sollten zukünftige Untersuchungen die genannten Limitationen durch die Einbeziehung weiblicher Tiere, die Entwicklung komplexerer Stressmodelle und eine stärkere Verknüpfung von tierexperimentellen und klinischen Ansätzen integrieren. Derartige Weiterentwicklungen könnten die Relevanz und Übertragbarkeit der Erkenntnisse für den Menschen erhöhen und die Grundlagenforschung enger mit der klinischen Wissenschaft verknüpfen. Auch die Durchführung humaner Netzhautmodelle und/ oder klinischer Studien könnte zur Validierung der gesammelten Erkenntnisse beitragen und die Translation der Ergebnisse unterstützen.

5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend liefert die Studie wertvolle Erkenntnisse über den Einfluss von Stress auf das Proteom der Netzhaut und die potenziellen neurodegenerativen und metabolischen Folgen dessen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl frühkindliche als auch chronische Stressoren Effekte auf das Stressreaktionssystem und das Gehirn haben können. Dabei hat Stress im frühen Lebensalter (ELS) tiefgreifendere und langfristige Auswirkungen auf die Retina als chronischer sozialer Stress im vorangeschrittenen Alter (CSD). Die Gabe des Wirkstoffes HNK zeigt durch die Herabregulation bestimmter Stresspfade eine protektive Wirkung. Ein besseres Verständnis der Stressreaktion und ihrer Auswirkungen auf das Proteom der Retina könnte in Zukunft zu neuen Wegen in der Prävention und Therapie von okularen Erkrankungen führen. Dabei ergibt sich eine Vielzahl an zukünftigen Forschungs- und Anwendungsansätzen, wie die Entwicklung neuroprotektiver Therapien. Durch die Identifikation von Schlüsselproteinen, könnten zielgerichtet Wirkstoffe entwickelt werden, die an eben jener Stelle eingreifen. So können neue Arzneimittel erarbeitet werden, um die Netzhaut vor degenerativen Schäden zu schützen. Dabei könnten weitere Analysen des

Wirkstoffes HNK zu solch spezifischen Medikamenten führen und bei stressbedingter Neurodegeneration zur Anwendung kommen.

Abgesehen davon legt die vorliegende Studie nicht nur den Grundstein für ein besseres Verständnis stressbedingter Auswirkungen auf die Netzhaut, sondern könnte allgemein wegweisend für die Identifikation neurodegenerativer Mechanismen sein. Die entschlüsselten Signalwege könnten dementsprechend auch auf weitere neuronale Gewebe des zentralen Nervensystems, wie das Gehirn oder das Rückenmark einwirken und Aufschluss über Erkrankungen, wie Alzheimer oder Parkinson, bringen. Dadurch könnten neue und bestehende Präventions- und Therapieansätze weiterentwickelt und etabliert werden und zu besserer Therapierbarkeit, sowie dem Schutz vor langfristigen Schäden führen. Voraussichtlich werden hier vor allem Stressmanagement-Strategien zukünftig an Wichtigkeit gewinnen. Darüber hinaus könnten mithilfe der Schlüsselproteine Biomarker etabliert werden, die der Frühdiagnose neurodegenerativer Erkrankungen dienen. Diese Suche könnte außerdem zur Entdeckung jener Marker führen, die auch in zugänglicheren Proben wie Blut, Tränen oder Cerebrospinalflüssigkeit zu erheben sind. So könnten in Zukunft durch Proteom-basierte Diagnostikmethoden bereits vor Symptom-Eintritt erste degenerative Veränderungen identifiziert und frühzeitig präventive Maßnahmen ergriffen werden. Diese Art der Diagnostik bietet auch die Möglichkeit zur individualisierten Medizin. Durch Analyse der Stressreaktion auf molekularer Ebene können individuelle Unterschiede erkannt werden und zu personalisierten und maßgeschneiderten Therapieansätzen beitragen. Zudem sollten in zukünftigen Versuchen weitere Organsysteme und -gewebe untersucht werden, um ein ganzheitlicheres Bild der Stressantwort zu erfassen. Auch könnten weiterführende Studien Risikofaktoren und genetische Prädispositionen identifizieren, die die Anfälligkeit für stressbedingte Neurodegeneration beeinflussen.

Letztlich leistet die vorliegende Studie in vielerlei Hinsicht einen wertvollen Beitrag zur Grundlagenforschung. Bei weiterer Verfolgung der vorgeschlagenen Ansätze könnte es in näherer Zukunft möglich sein, neurodegenerative Erkrankungen mithilfe einfach gewonnener Tränen- oder Blutproben und proteomischer Analyse frühzeitig zu diagnostizieren und entsprechend zu therapieren. Durch Integration solcher Untersuchungsmethoden ließen sich routinemäßige Vorsorgeuntersuchungen grundlegend revolutionieren. Die zielsichere Diagnostikmethode könnte bereits kleinste Veränderungen des Proteoms wahrnehmen und einordnen, um neurodegenerative Erkrankungen durch Präventionsmaßnahmen schlussendlich vielleicht sogar vor ihrer Entstehung zu hindern.

6. Zusammenfassung

Das Glaukom ist weltweit eine der häufigsten Ursachen für irreversiblen Sehverlust. Die genauen Risikofaktoren sind dabei weitestgehend unbekannt, derzeitige Therapieansätze fokussieren sich nahezu ausschließlich auf die Senkung des Augeninnendrucks. Spätestens seit der Entdeckung des Normaldruckglaukoms aber wurde klar, dass dem Krankheitsbild andere Ursachen zugrunde liegen müssen. Die vorliegende Studie widmet sich dieser Ursachenforschung und untersucht Stress, eine der größten Gesundheitsgefahren des 21. Jahrhunderts, als einen potenziellen Risikofaktor. Hierfür bedient sich die Forschungsarbeit der Durchführung von Tierversuchen mit Mäusen. Dabei fanden zwei etablierte psychosoziale Stressmodelle wie der Early Life Stress (ELS) und der Chronic Social Defeat Stress (CSD) Anwendung. Außerdem wurde ein vielversprechender Wirkstoff namens (2R, 6R)-Hydroxynorketamin (HNK) in einem Mausmodell mit depressionsähnlichem Phänotyp und inhärentem Glaukom getestet. Als Untersuchungsgegenstand der Studie dient die Netzhaut der Versuchstiere. Die Proben wurden durch massenspektrometrische Analyse ausgewertet und das Proteom charakterisiert. Die Netzhaut bietet als Studienobjekt mehrere Vorteile: Zum einen lassen sich Veränderungen unmittelbar im Proteom des betroffenen Gewebes nachweisen, zum anderen lässt sie als Ausstülpung des ZNS translationale Schlüsse auf weitere neuronale Gewebe zu. Auf die MS-basierte Proteomik folgte die Durchführung bioinformatischer Analysen, um die molekularen Veränderungen des Netzhautgewebes auf Proteomebene zu bestimmen. So konnten in allen Versuchsreihen signifikante Regulationsprofile identifiziert werden. Die ELS-Versuchsreihe zeigte dabei eine vermehrte Expression von NADH-Dehydrogenasen und Crystallinen, während hnRNPs herabreguliert wurden. Im CSD-Versuch ließ sich eine Herabregulation von Histonen und eine Aktivierung von *Recoverin* und dem Protein *tceb2* beobachten. Die Gabe des Wirkstoffes HNK führte demgegenüber zur Verminderung von NADH-Dehydrogenasen und Cytochromen, sowie zu einer Hochregulierung von Beta-Crystallinen. Die Gene Ontology-Analysen offenbarten, dass die signifikanten Proteine überwiegend Enzyme, Transporter oder Transkriptionsfaktoren des Zytoplasmas umfassen. Nachfolgend wurden die zugrundeliegenden Signalwege mithilfe einer vergleichenden Analyse identifiziert. Die Versuchsreihen manipulieren vor allem den Sirtuin-Signalweg, die oxidative Phosphorylierung und die Phototransduktion. Dabei bewirkten die unterschiedlichen Modelle verschiedene Modulationen. Während der ELS-Versuch die oxidative Phosphorylierung aktivierte und den Sirtuin-Signalweg deaktivierte, so rief der HNK-Versuch jeweils den gegenteiligen Effekt hervor. Die pathologischen Prozesse der Apoptose, Autophagie und Neurodegeneration spielten in allen Versuchen eine Rolle, wobei die Stressmodelle dabei stärker mit degenerativen Prozessen assoziiert waren. Die Wirkstoffgabe hingegen hatte eine Aktivierung schützender Prozesse und die Reduktion der retinalen Degeneration zur Folge. Die Studie liefert in der Konsequenz folgende Erkenntnisse:

Psychosozialer Stress führt zu signifikanten Veränderungen im Proteom der Netzhaut, dabei zeigt frühkindliches Einwirken (ELS) deutlich stärkere Auswirkungen als Stress im Erwachsenenalter (CSD). Der Einsatz des Wirkstoffes (HNK) zeigt durch die Modulation bestimmter Signalwege, wie dem Glukokortikoid-Rezeptor-Signalweg und der Zytoprotektion, einen potenziell schützenden Effekt. *Recoverin*, Rhodopsin, HMOX1 und Crystalline konnten als Biomarker identifiziert werden. Sie wirken in wichtigen Prozessen wie dem Zellschutz und der Apoptose mit. Weiterhin aktivierte der Stress wichtige Regulatoren wie das Amyloid-Precursor-Protein (APP), Präsenilin-1 (PSEN1) und mTOR und deutet damit auf eine ursächliche Verbindung zwischen Stress und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer hin. ELS reguliert außerdem das Neurotrophin BDNF herab, was wiederum den Zusammenhang zwischen frühkindlichen Belastungen und der Entwicklung einer Depression bekräftigt. Summa summarum ergeben sich aus der Studie viele wichtige Erkenntnisse über die Auswirkungen von Stress auf das Proteom der Netzhaut und potenzielle neurodegenerative Folgen dessen. Dennoch sind einige Limitationen wie die eingeschränkte Übertragbarkeit tierexperimenteller Modelle auf den Menschen und die unzureichende Betrachtung geschlechtsspezifischer Unterschiede zu berücksichtigen. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten daher komplexere Stressmodelle entwickeln und geschlechtsdifferenzierte Analysen sowie humanbasierte Modelle einbeziehen, um die klinische Relevanz und die Entwicklung präventiver und therapeutischer Ansätze zu fördern. Die vorliegende Studie legt hierfür den Grundstein, da zum ersten Mal eine tiefgreifende Analyse der molekularen und funktionellen Änderungen als reaktive Antwort auf psychosozialen Stress in der intraokulären Retina erfolgte. Sie gewährt damit einen ersten Einblick in das komplexe Zusammenspiel molekularer und zellulärer Signalmechanismen in Reaktion auf Stress und den Wirkstoff HNK.

Literaturverzeichnis

1. Sabel, B.A., et al., *Mental stress as consequence and cause of vision loss: the dawn of psychosomatic ophthalmology for preventive and personalized medicine*. EPMA journal, 2018. **9**: p. 133-160.
2. Agarwal, R., et al., *Current concepts in the pathophysiology of glaucoma*. Indian journal of ophthalmology, 2009. **57**(4): p. 257.
3. Weinreb, R.N. and P.T. Khaw, *Primary open-angle glaucoma*. The lancet, 2004. **363**(9422): p. 1711-1720.
4. Machiele, R., M. Motlagh, and B.C. Patel, *Intraocular pressure*. 2018.
5. Anderson, D.R., *Normal-tension glaucoma (Low-tension glaucoma)*. Indian journal of ophthalmology, 2011. **59**(Suppl1): p. S97.
6. Foster, P.J., et al., *The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys*. The British journal of ophthalmology, 2002. **86**(2): p. 238.
7. Leske, M.C., *Open-angle glaucoma—an epidemiologic overview*. Ophthalmic epidemiology, 2007. **14**(4): p. 166-172.
8. Perumal, N., et al., *Bioenergetic shift and actin cytoskeleton remodelling as acute vascular adaptive mechanisms to angiotensin II in murine retina and ophthalmic artery*. Redox biology, 2020. **34**: p. 101597.
9. Gillmann, K., K. Hoskens, and K. Mansouri, *Acute emotional stress as a trigger for intraocular pressure elevation in Glaucoma*. BMC ophthalmology, 2019. **19**(1): p. 1-6.
10. Huang, W., et al., *The adverse impact of glaucoma on psychological function and daily physical activity*. Journal of ophthalmology, 2020. **2020**.
11. Kempen, G.I., et al., *The impact of low vision on activities of daily living, symptoms of depression, feelings of anxiety and social support in community-living older adults seeking vision rehabilitation services*. Quality of life research, 2012. **21**: p. 1405-1411.
12. Bittner, A.K., L. Edwards, and M. George, *Coping strategies to manage stress related to vision loss and fluctuations in retinitis pigmentosa*. Optometry-Journal of the American Optometric Association, 2010. **81**(9): p. 461-468.
13. Sabel, B.A. and L. Lehnigk, *Is mental stress the primary cause of glaucoma?* Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde, 2021. **238**(02): p. 132-145.
14. Pace, T.W., et al., *Effect of compassion meditation on neuroendocrine, innate immune and behavioral responses to psychosocial stress*. Psychoneuroendocrinology, 2009. **34**(1): p. 87-98.
15. Tang, Y.-Y., B.K. Hölzel, and M.I. Posner, *The neuroscience of mindfulness meditation*. Nature reviews neuroscience, 2015. **16**(4): p. 213-225.
16. Brennan, M. and G. Cardinali, *The use of preexisting and novel coping strategies in adapting to age-related vision loss*. The Gerontologist, 2000. **40**(3): p. 327-334.
17. Plaumann, M., A. Busse, and U. Walter, *Grundlagen zu Stress*, in *Weißbuch Prävention 2005/2006*. 2006, Springer. p. 3-12.
18. Kaluza, G., *Stressbewältigung: Trainingsmanual zur psychologischen Gesundheitsförderung*. 2018: Springer-Verlag.
19. Cohen, S., et al., *Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(16): p. 5995-5999.

20. Hapke, U., et al., *Chronischer Stress bei Erwachsenen in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 749-754.
21. Krankenkasse, T., *Entspann dich, Deutschland*. TK-Stressstudie, Hamburg, 2016.
22. Blackburn-Munro, G. and R. Blackburn-Munro, *Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence?* Journal of neuroendocrinology, 2001. **13**(12): p. 1009-1023.
23. Metrics, I.o.H. and Evaluation, *Global health data exchange (GHDx)*. 2021, Institute of Health Metrics and Evaluation Seattle, WA, USA.
24. Woody, C., et al., *A systematic review and meta-regression of the prevalence and incidence of perinatal depression*. Journal of affective disorders, 2017. **219**: p. 86-92.
25. Lakhan, R., A. Agrawal, and M. Sharma, *Prevalence of depression, anxiety, and stress during COVID-19 pandemic*. Journal of neurosciences in rural practice, 2020. **11**(04): p. 519-525.
26. Varma, P., et al., *Younger people are more vulnerable to stress, anxiety and depression during COVID-19 pandemic: A global cross-sectional survey*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2021. **109**: p. 110236.
27. Betthäuser, B.A., A.M. Bach-Mortensen, and P. Engzell, *A systematic review and meta-analysis of the evidence on learning during the COVID-19 pandemic*. Nature Human Behaviour, 2023. **7**(3): p. 375-385.
28. Sykes, D.L., et al., *Post-COVID-19 symptom burden: what is long-COVID and how should we manage it?* Lung, 2021. **199**: p. 113-119.
29. Ladds, E., et al., *Persistent symptoms after Covid-19: qualitative study of 114 "long Covid" patients and draft quality principles for services*. BMC health services research, 2020. **20**(1): p. 1-13.
30. Berndt, C., *Resilienz: Das Geheimnis der psychischen Widerstandskraft–Was uns stark macht gegen Stress, Depressionen und Burn-out*. 2013: Deutscher Taschenbuch Verlag.
31. Selye, H., *The physiology and pathology of exposure to stress*. 1950.
32. Tsigos, C. and G.P. Chrousos, *Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders*. Endocrinology and metabolism clinics of North America, 1994. **23**(3): p. 451-466.
33. Gupta, D. and J.E. Morley, *Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging*. Comprehensive Physiology, 2011. **4**(4): p. 1495-1510.
34. Lupien, S.J., et al., *Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition*. Nature reviews neuroscience, 2009. **10**(6): p. 434-445.
35. Franklin, T.B., B.J. Saab, and I.M. Mansuy, *Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability*. Neuron, 2012. **75**(5): p. 747-761.
36. Ladd, C.O., et al., *Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience*. Progress in brain research, 2000. **122**: p. 81-103.
37. Barroca, N.C.B., et al., *Challenges in the use of animal models and perspectives for a translational view of stress and psychopathologies*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2022: p. 104771.
38. Belzung, C. and G. Griebel, *Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review*. Behavioural brain research, 2001. **125**(1-2): p. 141-149.
39. Kumar, V., Z.A. Bhat, and D. Kumar, *Animal models of anxiety: a comprehensive review*. Journal of pharmacological and toxicological methods, 2013. **68**(2): p. 175-183.

40. Sartori, S.B., R. Landgraf, and N. Singewald, *The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety*. *Future neurology*, 2011. **6**(4): p. 531-571.
41. Planchez, B., A. Surget, and C. Belzung, *Animal models of major depression: drawbacks and challenges*. *Journal of Neural Transmission*, 2019. **126**: p. 1383-1408.
42. Richter-Levin, G., *Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma—potential relevance to stress and post-stress syndromes*. *Psychiatry research*, 1998. **79**(1): p. 73-83.
43. Zoladz, P.R., et al., *Acute episodes of predator exposure in conjunction with chronic social instability as an animal model of post-traumatic stress disorder*. *Stress*, 2008. **11**(4): p. 259-281.
44. Cryan, J.F. and A. Holmes, *The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety*. *Nature reviews Drug discovery*, 2005. **4**(9): p. 775-790.
45. Hasler, G., et al., *Discovering endophenotypes for major depression*. *Neuropsychopharmacology*, 2004. **29**(10): p. 1765-1781.
46. Sial, O.K., et al., *Vicarious social defeat stress: Bridging the gap between physical and emotional stress*. *Journal of neuroscience methods*, 2016. **258**: p. 94-103.
47. Porsolt, R., A. Bertin, and M. Jalfre, *Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants*. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 1977. **229**(2): p. 327-336.
48. Rice, C.J., et al., *A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress*. *Endocrinology*, 2008. **149**(10): p. 4892-4900.
49. John, S., et al., *Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 1998. **39**(6): p. 951-962.
50. Anderson, M.G., et al., *Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice*. *Nature genetics*, 2002. **30**(1): p. 81-85.
51. Rincón-Cortés, M. and R.M. Sullivan, *Early life trauma and attachment: immediate and enduring effects on neurobehavioral and stress axis development*. *Frontiers in endocrinology*, 2014. **5**: p. 33.
52. Bolton, J.L., et al., *Programming of stress-sensitive neurons and circuits by early-life experiences*. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 2019. **13**: p. 30.
53. Toyoda, A., *Social defeat models in animal science: what we have learned from rodent models*. *Animal Science Journal*, 2017. **88**(7): p. 944-952.
54. Golden, S.A., et al., *A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice*. *Nature protocols*, 2011. **6**(8): p. 1183-1191.
55. van der Kooij, M.A., et al., *Chronic social stress-induced hyperglycemia in mice couples individual stress susceptibility to impaired spatial memory*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018. **115**(43): p. E10187-E10196.
56. Colyn, L., et al., *Chronic social defeat stress induces sustained synaptic structural changes in the prefrontal cortex and amygdala*. *Behavioural brain research*, 2019. **373**: p. 112079.
57. Hollis, F., et al., *Individual differences in the effect of social defeat on anhedonia and histone acetylation in the rat hippocampus*. *Hormones and behavior*, 2011. **59**(3): p. 331-337.
58. Venzala, E., et al., *Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors*. *Psychopharmacology*, 2012. **224**: p. 313-325.

59. Carboni, L., et al., *Proteomic analysis of rat hippocampus after repeated psychosocial stress*. Neuroscience, 2006. **137**(4): p. 1237-1246.
60. Ban, T., *Pharmacotherapy of depression: a historical analysis*. Journal of neural transmission, 2001. **108**: p. 707-716.
61. Olfson, M., C. Blanco, and S.C. Marcus, *Treatment of adult depression in the United States*. JAMA internal medicine, 2016. **176**(10): p. 1482-1491.
62. Zanos, P., et al., *NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites*. Nature, 2016. **533**(7604): p. 481-486.
63. Löwe, B., et al., *Monitoring depression treatment outcomes with the patient health questionnaire-9*. Medical care, 2004: p. 1194-1201.
64. Souery, D., G.I. Papakostas, and M.H. Trivedi, *Treatment-resistant depression*. Journal of Clinical Psychiatry, 2006. **67**: p. 16.
65. Bergfeld, I.O., et al., *Treatment-resistant depression and suicidality*. Journal of affective disorders, 2018. **235**: p. 362-367.
66. Lumsden, E.W., et al., *Antidepressant-relevant concentrations of the ketamine metabolite (2R, 6R)-hydroxynorketamine do not block NMDA receptor function*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(11): p. 5160-5169.
67. Pham, T.H., et al., *Common neurotransmission recruited in (R, S)-ketamine and (2R, 6R)-hydroxynorketamine-induced sustained antidepressant-like effects*. Biological psychiatry, 2018. **84**(1): p. e3-e6.
68. Yamaguchi, J.-i., et al., *(2 R, 6 R)-Hydroxynorketamine is not essential for the antidepressant actions of (R)-ketamine in mice*. Neuropsychopharmacology, 2018. **43**(9): p. 1900-1907.
69. Shirayama, Y. and K. Hashimoto, *Lack of antidepressant effects of (2 R, 6 R)-hydroxynorketamine in a rat learned helplessness model: comparison with (R)-ketamine*. International Journal of Neuropsychopharmacology, 2018. **21**(1): p. 84-88.
70. Yang, C., et al., *(R)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than its metabolite (2R, 6R)-hydroxynorketamine*. Biological Psychiatry, 2017. **82**(5): p. e43-e44.
71. Faccio, A.T., et al., *Stereochemical and structural effects of (2R, 6R)-hydroxynorketamine on the mitochondrial metabolome in PC-12 cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2018. **1862**(6): p. 1505-1515.
72. Yao, N., et al., *Ketamine and its metabolite (2R, 6R)-hydroxynorketamine induce lasting alterations in glutamatergic synaptic plasticity in the mesolimbic circuit*. Molecular psychiatry, 2018. **23**(10): p. 2066-2077.
73. Trepel, M., *neuroanatomie: Struktur und Funktion*. 2021: Elsevier Health Sciences.
74. Behrends, J.C., et al., *Physiologie*. 2017: Thieme.
75. London, A., I. Benhar, and M. Schwartz, *The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders*. Nature Reviews Neurology, 2013. **9**(1): p. 44-53.
76. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Taschenbuch Histologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage*. 2015, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Germany New York, NY, USA.
77. Lottspeich, F., *Proteomanalyse—ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen*. Angewandte Chemie, 1999. **111**(17): p. 2630-2647.
78. Liebler, D.C. and L.J. Zimmerman, *Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry*. Biochemistry, 2013. **52**(22): p. 3797-3806.

79. Aebersold, R. and D.R. Goodlett, *Mass spectrometry in proteomics*. Chemical reviews, 2001. **101**(2): p. 269-296.
80. Verrills, N.M., *Clinical proteomics: present and future prospects*. Clinical Biochemist Reviews, 2006. **27**(2): p. 99.
81. Marx, V., *Targeted proteomics*. Nature methods, 2013. **10**(1): p. 19.
82. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
83. Karas, M., D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules*. Analytical chemistry, 1985. **57**(14): p. 2935-2939.
84. Karas, M. and R. Krüger, *Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism*. Chemical reviews, 2003. **103**(2): p. 427-440.
85. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. Journal of mass spectrometry, 2005. **40**(4): p. 430-443.
86. Makarov, A. and M. Scigelova, *Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(25): p. 3938-3945.
87. Olsen, J.V., et al., *Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap*. Molecular & cellular proteomics, 2005. **4**(12): p. 2010-2021.
88. Carvalho, A.S., D. Penque, and R. Matthiesen, *Bottom up proteomics data analysis strategies to explore protein modifications and genomic variants*. Proteomics, 2015. **15**(11): p. 1789-1792.
89. Catherman, A.D., O.S. Skinner, and N.L. Kelleher, *Top down proteomics: facts and perspectives*. Biochemical and biophysical research communications, 2014. **445**(4): p. 683-693.
90. Koronyo, Y., et al., *Retinal pathological features and proteome signatures of Alzheimer's disease*. Acta Neuropathologica, 2023. **145**(4): p. 409-438.
91. Shen, S., et al., *Quantitative Proteomics of Human Retinal Pigment Epithelium Reveals Key Regulators for the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration*. International journal of molecular sciences, 2023. **24**(4): p. 3252.
92. Harman, J.C., et al., *Repetitive hypoxic preconditioning in mice induces intergenerational epigenetic remodeling of the retinal proteome of their F1 offspring*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2020. **61**(7): p. 4996-4996.
93. Grotegut, P., et al., *Minocycline reduces inflammatory response and cell death in a S100B retina degeneration model*. Journal of Neuroinflammation, 2020. **17**(1): p. 1-23.
94. Aryal, S., et al., *Proteomic profiling of retina and retinal pigment epithelium combined embryonic tissue to facilitate ocular disease gene discovery*. Human genetics, 2023: p. 1-21.
95. Suo, L., et al., *Proteomics analysis of N-methyl-d-aspartate-induced cell death in retinal and optic nerves*. Journal of Proteomics, 2022. **252**: p. 104427.
96. Bian, J., et al., *SWATH based quantitative proteomics reveals significant lipid metabolism in early myopic guinea pig retina*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(9): p. 4721.
97. Liu, X., et al., *Proteomic analysis of aged and OPTN E50K retina in the development of normal tension glaucoma*. Human Molecular Genetics, 2021. **30**(11): p. 1030-1044.
98. Sze, Y.H., et al., *High-pH reversed-phase fractionated neural retina proteome of normal growing C57BL/6 mouse*. Scientific data, 2021. **8**(1): p. 1-9.

99. Mirzaei, M., et al., *Retinal proteomics of experimental glaucoma model reveal intraocular pressure-induced mediators of neurodegenerative changes*. Journal of cellular biochemistry, 2020. **121**(12): p. 4931-4944.
100. Funke, S., et al., *An in-depth view of the porcine trabecular meshwork proteome*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(10): p. 2526.
101. Murugesan, N., et al., *Retinal proteome associated with bradykinin-induced edema*. Experimental eye research, 2019. **186**: p. 107744.
102. Luo, S., et al., *Elucidating sexual dimorphism in the retina of mice with type 1 diabetes*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2019. **60**(9): p. 2717-2717.
103. Saddala, M.S., et al., *Proteomics reveals ablation of PIGF increases antioxidant and neuroprotective proteins in the diabetic mouse retina*. Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 1-12.
104. Anders, F., et al., *Proteomic profiling reveals crucial retinal protein alterations in the early phase of an experimental glaucoma model*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2017. **255**(7): p. 1395-1407.
105. Funke, S., et al., *Glaucoma related proteomic alterations in human retina samples*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-18.
106. Ly, A., et al., *Retinal proteome alterations in a mouse model of type 2 diabetes*. Diabetologia, 2014. **57**(1): p. 192-203.
107. Tu, C., et al., *Proteomic profiling of the retinas in a neonatal rat model of oxygen-induced retinopathy with a reproducible ion-current-based MS1 approach*. Journal of proteome research, 2015. **14**(5): p. 2109-2120.
108. Skeie, J.M. and V.B. Mahajan, *Proteomic interactions in the mouse vitreous-retina complex*. PloS one, 2013. **8**(11): p. e82140.
109. Zhang, S.-y., et al., *Effects of phlorizin on diabetic retinopathy according to isobaric tags for relative and absolute quantification–based proteomics in db/db mice*. Molecular vision, 2013. **19**: p. 812.
110. Kim, S.J., et al., *Retinal proteome analysis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy*. Journal of proteome research, 2012. **11**(11): p. 5186-5203.
111. Nowotny, á., et al., *Effects of acute psychological stress on glucose metabolism and subclinical inflammation in patients with post-traumatic stress disorder*. Hormone and metabolic research, 2010. **42**(10): p. 746-753.
112. Herzog, D.P., et al., *Longitudinal CSF proteome profiling in mice to uncover the acute and sustained mechanisms of action of rapid acting antidepressant (2R, 6R)-hydroxynorketamine (HNK)*. Neurobiology of Stress, 2021. **15**: p. 100404.
113. Perumal, N., et al., *Short-term omega-3 supplementation modulates novel neurovascular and fatty acid metabolic proteome changes in the retina and ophthalmic artery of mice with targeted Cyp2c44 gene deletion*. Cells, 2022. **11**(21): p. 3494.
114. Perumal, N., et al., *Proteome landscape and interactome of voltage-gated potassium channel 1.6 (Kv1. 6) of the murine ophthalmic artery and neuroretina*. International journal of biological macromolecules, 2024. **257**: p. 128464.
115. Perumal, N., et al., *Sample preparation for mass-spectrometry-based proteomics analysis of ocular microvessels*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2019(144): p. e59140.
116. Manicam, C., et al., *First insight into the proteome landscape of the porcine short posterior ciliary arteries: Key signalling pathways maintaining physiologic functions*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-13.

117. Luber, C.A., et al., *Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells*. *Immunity*, 2010. **32**(2): p. 279-289.
118. Cox, J., et al., *Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment*. *Journal of proteome research*, 2011. **10**(4): p. 1794-1805.
119. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. *Nature biotechnology*, 2008. **26**(12): p. 1367-1372.
120. Tanca, A., et al., *The impact of sequence database choice on metaproteomic results in gut microbiota studies*. *Microbiome*, 2016. **4**(1): p. 1-13.
121. Shanmugam, A.K. and A.I. Nesvizhskii, *Effective leveraging of targeted search spaces for improving peptide identification in tandem mass spectrometry based proteomics*. *Journal of proteome research*, 2015. **14**(12): p. 5169-5178.
122. Alpi, E., et al., *Analysis of the tryptic search space in UniProt databases*. *Proteomics*, 2015. **15**(1): p. 48-57.
123. Alhaider, A.A., et al., *Survey of the camel urinary proteome by shotgun proteomics using a multiple database search strategy*. *Proteomics*, 2012. **12**(22): p. 3403-3406.
124. Tyanova, S., et al., *The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data*. *Nature methods*, 2016. **13**(9): p. 731-740.
125. Manicam, C., et al., *Proteomics unravels the regulatory mechanisms in human tears following acute renouncement of contact lens use: a comparison between hard and soft lenses*. *Scientific reports*, 2018. **8**(1): p. 1-15.
126. Happel, N. and D. Doenecke, *Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function*. *Gene*, 2009. **431**(1-2): p. 1-12.
127. Van Bodegom, M., J.R. Homberg, and M.J. Henckens, *Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure*. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2017. **11**: p. 87.
128. Madalena, K.M. and J.K. Lerch, *The effect of glucocorticoid and glucocorticoid receptor interactions on brain, spinal cord, and glial cell plasticity*. *Neural plasticity*, 2017. **2017**(1): p. 8640970.
129. Dizhoor, A.M., et al., *Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase*. *Science*, 1991. **251**(4996): p. 915-918.
130. Sampath, A.P., et al., *Recoverin improves rod-mediated vision by enhancing signal transmission in the mouse retina*. *Neuron*, 2005. **46**(3): p. 413-420.
131. Whitcup, S.M., et al., *Recoverin-associated retinopathy: a clinically and immunologically distinctive disease*. *American journal of ophthalmology*, 1998. **126**(2): p. 230-237.
132. Thirkill, C.E., et al., *The cancer-associated retinopathy antigen is a recoverin-like protein*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 1992. **33**(10): p. 2768-2772.
133. Chandel, N.S., *Glycolysis*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2021. **13**(5): p. a040535.
134. Chang, Y.-C., et al., *Roles of aldolase family genes in human cancers and diseases*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2018. **29**(8): p. 549-559.
135. Treccani, G., et al. *Aldolase C in the astrocytes emerges as a protein that may connect early life stress to depression*. in *GLIA*. 2023. WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA.

136. Poss, K.D. and S. Tonegawa, *Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(20): p. 10925-10930.
137. Dubois, R.N., et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. The FASEB journal, 1998. **12**(12): p. 1063-1073.
138. O'Brien, J.S., et al., *Identification of prosaposin as a neurotrophic factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(20): p. 9593-9596.
139. Meyer, R.C., et al., *The protective role of prosaposin and its receptors in the nervous system*. Brain research, 2014. **1585**: p. 1-12.
140. Schorderet, D.F. and P. Escher, *NR2E3 mutations in enhanced S-cone sensitivity syndrome (ESCS), Goldmann-Favre syndrome (GFS), clumped pigmentary retinal degeneration (CPRD), and retinitis pigmentosa (RP)*. Human mutation, 2009. **30**(11): p. 1475-1485.
141. Haider, N.B., et al., *Nr2e3-directed transcriptional regulation of genes involved in photoreceptor development and cell-type specific phototransduction*. Experimental eye research, 2009. **89**(3): p. 365-372.
142. Cheng, H., et al., *Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors*. Human molecular genetics, 2004. **13**(15): p. 1563-1575.
143. Spadaro, P.A., et al., *Long noncoding RNA-directed epigenetic regulation of gene expression is associated with anxiety-like behavior in mice*. Biological psychiatry, 2015. **78**(12): p. 848-859.
144. Piri, N., J.M. Kwong, and J. Caprioli, *Crystallins in retinal ganglion cell survival and regeneration*. Molecular neurobiology, 2013. **48**: p. 819-828.
145. Wyllie, A.H., *Apoptosis: an overview*. British medical bulletin, 1997. **53**(3): p. 451-465.
146. Li, J. and J. Yuan, *Caspases in apoptosis and beyond*. Oncogene, 2008. **27**(48): p. 6194-6206.
147. O'brien, R.J. and P.C. Wong, *Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease*. Annual review of neuroscience, 2011. **34**(1): p. 185-204.
148. Reddy, P.H., et al., *Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease*. Human molecular genetics, 2004. **13**(12): p. 1225-1240.
149. Bagaria, J., E. Bagyinszky, and S.S.A. An, *Genetics, functions, and clinical impact of presenilin-1 (PSEN1) gene*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(18): p. 10970.
150. Lanoiselée, H.-M., et al., *APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases*. PLoS medicine, 2017. **14**(3): p. e1002270.
151. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. Journal of cell science, 2009. **122**(20): p. 3589-3594.
152. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth, metabolism, and disease*. Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
153. Wen, R., et al., *CNTF and retina*. Progress in retinal and eye research, 2012. **31**(2): p. 136-151.

154. Cayouette, M. and C. Gravel, *Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse*. Human gene therapy, 1997. **8**(4): p. 423-430.
155. LaVail, M.M., et al., *Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(23): p. 11249-11253.
156. Park, H. and M.-m. Poo, *Neurotrophin regulation of neural circuit development and function*. Nature Reviews Neuroscience, 2013. **14**(1): p. 7-23.
157. Björkholm, C. and L.M. Monteggia, *BDNF—a key transducer of antidepressant effects*. Neuropharmacology, 2016. **102**: p. 72-79.
158. Cheng, E.H.-Y., et al., *VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis*. Science, 2003. **301**(5632): p. 513-517.
159. Chin, H.S., et al., *VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development*. Nature communications, 2018. **9**(1): p. 4976.
160. Naghdi, S. and G. Hajnóczky, *VDAC2-specific cellular functions and the underlying structure*. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2016. **1863**(10): p. 2503-2514.
161. Musio, A., *The multiple facets of the SMC1A gene*. Gene, 2020. **743**: p. 144612.
162. Deardorff, M.A., et al., *Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation*. The American Journal of Human Genetics, 2007. **80**(3): p. 485-494.
163. Geuens, T., D. Bouhy, and V. Timmerman, *The hnRNP family: insights into their role in health and disease*. Human genetics, 2016. **135**: p. 851-867.
164. Barrientos, A., et al., *Cytochrome oxidase in health and disease*. Gene, 2002. **286**(1): p. 53-63.

Anhang

Tabelle 5: Liste aller signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der ELS-Versuchsreihe

Nummer	Protein ID	Proteinname	Gename	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
1	Q9QYG0	Protein NDRG2	NdrG2	1,36E-05	-0,90	Vermindert
2	Q6PIC6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	Atp1a3	2,34E-05	-0,40	Vermindert
3	Q9Z2I9	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	Sucla2	1,71E-04	-0,46	Vermindert
4	P16546	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	Sptan1	7,53E-04	-0,21	Vermindert
5	Q8BR65	Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3	Suds3	8,23E-04	-1,03	Vermindert
6	P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	1,39E-03	-0,93	Vermindert
7	P09671	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Sod2	1,55E-03	-0,43	Vermindert
8	Q9CQ92	Mitochondrial fission 1 protein	Fis1	1,69E-03	-1,56	Vermindert
9	P27546	Microtubule-associated protein 4	Map4	2,17E-03	-0,57	Vermindert
10	Q9JM96	Cdc42 effector protein 4	Cdc42ep4	2,29E-03	-0,99	Vermindert
11	O00168	Phospholemman	FXYD1	2,32E-03	-0,91	Vermindert
12	P20065	Thymosin beta-4	Tmsb4x	2,89E-03	-3,03	Vermindert
13	P35564	Calnexin	Canx	3,23E-03	-0,42	Vermindert
14	Q64433	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspe1	3,53E-03	-0,45	Vermindert
15	Q9Z204	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	Hnrnpc	3,57E-03	-0,30	Vermindert
16	Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC1A	3,84E-03	-1,26	Vermindert
17	Q8VEK3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Hnrnpu	3,96E-03	-0,52	Vermindert
18	Q8BP92	Reticulocalbin-2	Rcn2	4,10E-03	-0,57	Vermindert
19	P42932	T-complex protein 1 subunit theta	Cct8	4,42E-03	-0,58	Vermindert
20	P28352	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	Apex1	4,47E-03	-0,97	Vermindert
21	O88569	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Hnrnpa2b1	4,72E-03	-0,48	Vermindert
22	Q16658	Fascin	FSCN1	5,35E-03	-1,50	Vermindert
23	Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	EIF4H	6,17E-03	-0,87	Vermindert
24	P09429	High mobility group protein B1	HMGB1	6,27E-03	-0,76	Vermindert
25	P70372	ELAV-like protein 1	Elavl1	6,82E-03	-0,69	Vermindert
26	O70133	ATP-dependent RNA helicase A	Dhx9	7,31E-03	-0,53	Vermindert
27	O75177	Calcium-responsive transactivator	SS18L1	7,52E-03	-0,69	Vermindert

Nummer	Protein ID	Proteinname	Gename	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
28	P13595	Neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	8,19E-03	-0,25	Vermindert
29	Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	8,19E-03	-0,24	Vermindert
30	P18572	Basigin	Bsg	8,56E-03	-0,35	Vermindert
31	O43759	Synaptogyrin-1	SYNGR1	8,84E-03	-0,43	Vermindert
32	Q9Z127	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Slc7a5	9,53E-03	-1,15	Vermindert
33	P15379	CD44 antigen	Cd44	9,76E-03	-0,67	Vermindert
34	P21278	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	Gna11	1,08E-02	-0,69	Vermindert
35	P17809	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	Slc2a1	1,13E-02	-0,41	Vermindert
36	Q8C8R3	Ankyrin-2	Ank2	1,15E-02	-0,43	Vermindert
37	Q9WTP6	Adenylate kinase 2, mitochondrial	Ak2	1,15E-02	-1,04	Vermindert
38	Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	Basp1	1,20E-02	-0,69	Vermindert
39	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	1,24E-02	-0,14	Vermindert
40	P62492	Ras-related protein Rab-11A	Rab11a	1,27E-02	-1,06	Vermindert
41	O95319	CUGBP Elav-like family member 2	CELF2	1,38E-02	-0,44	Vermindert
42	Q61207	Prosaposin	Psap	1,42E-02	-0,82	Vermindert
43	P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	1,77E-02	-0,37	Vermindert
44	Q9JMF3	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-13	Gng13	1,81E-02	-0,54	Vermindert
45	P56399	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	Usp5	1,84E-02	-0,40	Vermindert
46	Q9Z1L4	Retinoschisin	Rs1	1,92E-02	-0,63	Vermindert
47	G5E829	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	Atp2b1	2,05E-02	-0,33	Vermindert
48	P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	2,12E-02	-0,81	Vermindert
49	Q7TNV0	Protein DEK	Dek	2,24E-02	-0,60	Vermindert
50	P26231	Catenin alpha-1	Ctnna1	2,27E-02	-0,42	Vermindert
51	P60900	Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6	2,29E-02	-0,88	Vermindert
52	Q07076	Annexin A7	Anxa7	2,34E-02	-0,71	Vermindert
53	P97797	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	Sirpa	2,40E-02	-0,82	Vermindert
54	Q8VDW0	ATP-dependent RNA helicase DDX39A	Ddx39a	2,50E-02	-0,48	Vermindert
55	Q8BTM8	Filamin-A	Flna	2,55E-02	-0,29	Vermindert
56	Q6ZQ06	Centrosomal protein of 162 kDa	Cep162	2,59E-02	-0,64	Vermindert
57	Q61205	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	Pafah1b3	2,62E-02	-1,02	Vermindert
58	P84089	Enhancer of rudimentary homolog	Erh	2,77E-02	-1,46	Vermindert

Nummer	Protein ID	Proteinname	Gencode	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
59	O35737	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	Hnrnp1	2,79E-02	-0,38	Vermindert
60	P20336	Ras-related protein Rab-3A	RAB3A	2,88E-02	-0,49	Vermindert
61	Q99020	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	Hnrnpab	2,94E-02	-0,33	Vermindert
62	O70318	Band 4.1-like protein 2	Epb4112	2,96E-02	-0,29	Vermindert
63	Q9QYC0	Alpha-adducin	Add1	3,23E-02	-0,43	Vermindert
64	P97807	Fumarate hydratase, mitochondrial	Fh	3,40E-02	-0,81	Vermindert
65	Q9WUA3	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	Pfcp	3,42E-02	-0,75	Vermindert
66	Q9D3A9	Protein tweety homolog 1	Ttyh1	3,46E-02	-0,67	Vermindert
67	P17066	Heat shock 70 kDa protein 6;Putative heat shock 70 kDa protein 7	HSPA6	3,65E-02	-0,71	Vermindert
68	Q00688	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	FKBP3	3,74E-02	-0,94	Vermindert
69	P84098	60S ribosomal protein L19	RPL19	3,76E-02	-0,62	Vermindert
70	P34057	Recoverin	Rcvrn	3,78E-02	-0,40	Vermindert
71	Q15819	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	UBE2V2	3,82E-02	-0,62	Vermindert
72	P20029	78 kDa glucose-regulated protein	Hspa5	3,86E-02	-0,28	Vermindert
73	P46777	60S ribosomal protein L5	RPL5	3,94E-02	-0,56	Vermindert
74	Q8BXZ1	Protein disulfide-isomerase TMX3	Tmx3	4,04E-02	-0,92	Vermindert
75	P46660	Alpha-internexin	Ina	4,31E-02	-1,12	Vermindert
76	Q80Z24	Neuronal growth regulator 1	Negr1	4,44E-02	-0,15	Vermindert
77	P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52	4,56E-02	-1,04	Vermindert
78	P48539	Purkinje cell protein 4	PCP4	4,69E-02	-0,92	Vermindert
79	P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	4,79E-02	-0,94	Vermindert
80	P45954	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADSB	6,83E-05	0,64	Erhöht
81	Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Vdac2	2,56E-04	1,07	Erhöht
82	P02489	Alpha-crystallin A chain	CRYAA	3,13E-04	1,17	Erhöht
83	O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein	PSIP1	5,75E-04	0,52	Erhöht
84	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	Aldoa	6,98E-04	0,43	Erhöht
85	Q9DCG9	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein	Trmt112	7,97E-04	0,74	Erhöht
86	Q9WV92	Band 4.1-like protein 3	Epb4113	8,26E-04	0,52	Erhöht
87	Q91VD9	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Ndufs1	9,81E-04	0,69	Erhöht
88	O14776	Transcription elongation regulator 1	TCERG1	1,10E-03	0,82	Erhöht
89	Q99KP6	Pre-mRNA-processing factor 19	Prpf19	1,12E-03	0,73	Erhöht

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
90	P17182	Alpha-enolase	Eno1	1,61E-03	0,22	Erhöht
91	P62696	Beta-crystallin B2	Crybb2	2,16E-03	1,27	Erhöht
92	Q99KJ8	Dynactin subunit 2	Dctn2	2,34E-03	0,35	Erhöht
93	Q08288	Cell growth-regulating nucleolar protein	Lyar	3,41E-03	0,71	Erhöht
94	P84086	Complexin-2	Cplx2	3,61E-03	0,86	Erhöht
95	P68510	14-3-3 protein eta	Ywhah	3,63E-03	0,73	Erhöht
96	P67778	Prohibitin	Phb	3,68E-03	0,76	Erhöht
97	P50991	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	3,95E-03	0,61	Erhöht
98	Q60931	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Vdac3	4,02E-03	0,83	Erhöht
99	Q9CZC8	Secernin-1	Scrn1	4,12E-03	0,60	Erhöht
100	P34884	Macrophage migration inhibitory factor	Mif	4,14E-03	0,57	Erhöht
101	P99029	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	Prdx5	4,29E-03	0,44	Erhöht
102	Q9D6J6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Ndufv2	4,77E-03	0,84	Erhöht
103	Q13885	Tubulin beta-2A chain	TUBB2A	5,55E-03	0,46	Erhöht
104	Q9D6J5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	Ndufb8	5,94E-03	0,37	Erhöht
105	Q8VBV7	COP9 signalosome complex subunit 8	Cops8	7,38E-03	0,56	Erhöht
106	P05141	ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	7,68E-03	0,55	Erhöht
107	Q99KI0	Aconitate hydratase, mitochondrial	Aco2	7,79E-03	0,30	Erhöht
108	Q9DB77	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Uqcrc2	7,82E-03	0,47	Erhöht
109	P97461	40S ribosomal protein S5	Rps5	9,79E-03	0,57	Erhöht
110	Q05186	Reticulocalbin-1	Rcn1	9,82E-03	0,75	Erhöht
111	O70251	Elongation factor 1-beta	Eef1b	9,90E-03	0,36	Erhöht
112	P11627	Neural cell adhesion molecule L1	L1cam	1,04E-02	0,70	Erhöht
113	Q91VR2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Atp5c1	1,11E-02	1,68	Erhöht
114	P61247	40S ribosomal protein S3a	RPS3A	1,14E-02	1,11	Erhöht
115	Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	1,19E-02	0,52	Erhöht
116	Q9D6Y9	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	Gbe1	1,20E-02	0,52	Erhöht
117	Q9CQC7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	Ndufb4	1,22E-02	1,26	Erhöht
118	P03995	Glial fibrillary acidic protein	Gfap	1,25E-02	0,60	Erhöht
119	P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	Aldoc	1,25E-02	0,52	Erhöht
120	Q925N0	Sideroflexin-5	Sfxn5	1,44E-02	0,81	Erhöht

Nummer	Protein ID	Proteinname	Gename	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
121	P61158	Actin-related protein 3	ACTR3	1,59E-02	0,58	Erhöht
122	P30416	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	Fkbp4	1,61E-02	0,54	Erhöht
123	P15409	Rhodopsin	Rho	1,69E-02	0,54	Erhöht
124	P23396	40S ribosomal protein S3	RPS3	1,72E-02	0,45	Erhöht
125	Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	Ndufa12	1,73E-02	0,97	Erhöht
126	Q9UM54	Unconventional myosin-VI	MYO6	1,73E-02	0,72	Erhöht
127	P62881	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5	Gnb5	1,76E-02	1,06	Erhöht
128	P12074	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	COX6A1	1,77E-02	1,19	Erhöht
129	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	1,93E-02	0,34	Erhöht
130	P19157	Glutathione S-transferase P 1	Gstp1	1,93E-02	0,33	Erhöht
131	P08113	Endoplasmin	Hsp90b1	1,95E-02	0,18	Erhöht
132	P21912	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	SDHB	2,09E-02	0,57	Erhöht
133	P31786	Acyl-CoA-binding protein	Dbi	2,10E-02	0,91	Erhöht
134	P48036	Annexin A5	Anxa5	2,11E-02	0,30	Erhöht
135	Q62420	Endophilin-A1;Endophilin-A2	Sh3gl2	2,11E-02	0,49	Erhöht
136	Q91Z53	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	Grhpr	2,12E-02	0,51	Erhöht
137	Q04447	Creatine kinase B-type	Ckb	2,24E-02	0,22	Erhöht
138	Q9WVJ5	Beta-crystallin B1	Crybb1	2,31E-02	1,60	Erhöht
139	P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	2,40E-02	0,29	Erhöht
140	P09411	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	2,41E-02	0,36	Erhöht
141	P40142	Transketolase	Tkt	2,41E-02	0,32	Erhöht
142	Q61171	Peroxiredoxin-2	Prdx2	2,55E-02	0,36	Erhöht
143	O09061	Proteasome subunit beta type-1	Psmb1	2,73E-02	0,54	Erhöht
144	P43274	Histone H1.4	Hist1h1e	2,79E-02	0,66	Erhöht
145	P61313	60S ribosomal protein L15	RPL15	2,81E-02	3,05	Erhöht
146	Q7TNC4	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	Luc7l2	2,95E-02	0,52	Erhöht
147	O75494	Serine/arginine-rich splicing factor 10	SRSF10	3,00E-02	0,35	Erhöht
148	Q9CRB9	MICOS complex subunit Mic19	Chchd3	3,01E-02	0,86	Erhöht
149	P20645	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6PR	3,03E-02	0,78	Erhöht
150	Q99LD8	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	Ddah2	3,06E-02	0,27	Erhöht
151	O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	TOMM70A	3,10E-02	0,43	Erhöht

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
152	P02088	Hemoglobin subunit beta-1	Hbb-b1	3,21E-02	0,41	Erhöht
153	P60487	Pyridoxal phosphate phosphatase	Pdpx	3,44E-02	0,70	Erhöht
154	P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	Ldha	3,54E-02	0,29	Erhöht
155	A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	RAP1B	3,59E-02	0,77	Erhöht
156	Q9JM62	Receptor expression-enhancing protein 6	Reep6	3,80E-02	0,27	Erhöht
157	P60981	Destrin	DSTN	3,80E-02	0,41	Erhöht
158	Q9ULU8	Calcium-dependent secretion activator 1	CADPS	3,82E-02	0,87	Erhöht
159	Q8BH50	Uncharacterized protein C18orf25 homolog	CR025	3,96E-02	0,77	Erhöht
160	Q14498	RNA-binding protein 39	RBM39	4,05E-02	0,37	Erhöht
161	Q9JII5	DAZ-associated protein 1	Dazap1	4,11E-02	1,14	Erhöht
162	Q15427	Splicing factor 3B subunit 4	SF3B4	4,15E-02	0,60	Erhöht
163	P09103	Protein disulfide-isomerase	P4hb	4,24E-02	0,35	Erhöht
164	P52480	Pyruvate kinase PKM	Pkm	4,30E-02	0,21	Erhöht
165	P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	GNB1	4,38E-02	0,27	Erhöht
166	Q9JLR9	HIG1 domain family member 1A, mitochondrial	Higd1a	4,56E-02	0,79	Erhöht
167	Q61147	Ceruloplasmin	Cp	4,61E-02	0,18	Erhöht
168	P35030	Trypsin-3	PRSS3	4,61E-02	0,54	Erhöht
169	O08709	Peroxiredoxin-6	Prdx6	4,63E-02	0,22	Erhöht
170	Q78IK2	Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5	Usmg5	4,63E-02	0,45	Erhöht
171	C0HKE5	Histone H2A type 1-H	Hist1h2ah	4,65E-02	0,86	Erhöht
172	Q8K021	Secretory carrier-associated membrane protein 1	Scamp1	4,84E-02	0,50	Erhöht
173	Q9D172	ES1 protein homolog, mitochondrial	D10Jhu81e	4,91E-02	0,73	Erhöht

Tabelle 6: Liste aller signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der CSD-Versuchsreihe

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
1	P60879	Synaptosomal-associated protein 25	Snap25	6,96E-05	-0,50	Vermindert
2	Q9Z0P4	Paralemmen-1	Palm	3,58E-04	-1,05	Vermindert
3	P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12	4,08E-04	-0,59	Vermindert
4	O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	SYNCRIP	1,36E-03	-0,70	Vermindert
5	P56135	ATP synthase subunit f, mitochondrial	Atp5j2	2,63E-03	-0,64	Vermindert
6	O35600	Retinal-specific ATP-binding cassette transporter	Abca4	7,92E-03	-0,58	Vermindert
7	P62258	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	8,54E-03	-0,50	Vermindert
8	O35215	D-dopachrome decarboxylase	Ddt	8,85E-03	-1,66	Vermindert
9	Q99K48	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	Nono	1,16E-02	-0,82	Vermindert
10	P48962	ADP/ATP translocase 1	Slc25a4	1,32E-02	-0,37	Vermindert
11	Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1	1,44E-02	-0,42	Vermindert
12	P43275	Histone H1.1	Hist1h1a	1,45E-02	-0,95	Vermindert
13	P60709	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	1,50E-02	-0,24	Vermindert
14	O75525	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3	KHDRBS3	1,94E-02	-0,74	Vermindert
15	P0C6F1	Dynein heavy chain 2, axonemal	Dnah2	1,99E-02	-0,69	Vermindert
16	P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	2,25E-02	-0,23	Vermindert
17	Q9CPQ1	Cytochrome c oxidase subunit 6C	Cox6c	2,29E-02	-0,66	Vermindert
18	P14231	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2	Atp1b2	2,47E-02	-0,60	Vermindert
19	P62829	60S ribosomal protein L23	RPL23	2,54E-02	-1,13	Vermindert
20	P43274	Histone H1.4	Hist1h1e	2,80E-02	-0,74	Vermindert
21	P10412	Histone H1.4	HIST1H1E	3,10E-02	-1,44	Vermindert
22	Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Vdac2	3,59E-02	-1,01	Vermindert
23	P62906	60S ribosomal protein L10a	RPL10A	3,68E-02	-0,45	Vermindert
24	P10107	Annexin A1	Anxa1	3,91E-02	-0,61	Vermindert
25	Q8K0H5	Transcription initiation factor TFIID subunit 10	Taf10	4,21E-02	-0,78	Vermindert
26	P43277	Histone H1.3	Hist1h1d	4,26E-02	-0,65	Vermindert
27	Q9DCT8	Cysteine-rich protein 2	Crip2	4,27E-02	-1,01	Vermindert
28	O70133	ATP-dependent RNA helicase A	Dhx9	4,79E-02	-0,26	Vermindert
29	Q9R0P3	S-formylglutathione hydrolase	Esd	4,90E-02	-1,14	Vermindert

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
30	Q8VE97	Serine/arginine-rich splicing factor 4	Srsf4	4,95E-02	-0,99	Vermindert
31	Q91YQ5	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	Rpn1	4,95E-02	-0,58	Vermindert
32	Q9WU78	Programmed cell death 6-interacting protein	Pdcd6ip	2,73E-03	0,87	Erhöht
33	P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Mdh2	4,02E-03	0,25	Erhöht
34	Q15427	Splicing factor 3B subunit 4	SF3B4	5,77E-03	0,53	Erhöht
35	A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	RAP1B	7,34E-03	0,50	Erhöht
36	Q9D198	Pre-mRNA-splicing factor SYF2	Syf2	7,34E-03	1,06	Erhöht
37	P0DP25	Calmodulin-3	CALM3	9,53E-03	0,70	Erhöht
38	Q93092	Transaldolase	Taldo1	9,77E-03	0,34	Erhöht
39	P34057	Recoverin	Rcvrn	1,00E-02	0,44	Erhöht
40	O88531	Palmitoyl-protein thioesterase 1	Ppt1	1,01E-02	1,10	Erhöht
41	Q6P1B1	Xaa-Pro aminopeptidase 1	Xpnpep1	1,13E-02	1,15	Erhöht
42	Q8R5M8	Cell adhesion molecule 1	Cadm1	1,13E-02	0,52	Erhöht
43	Q9DCD0	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Pgd	1,14E-02	0,35	Erhöht
44	Q91V64	Isochorismatase domain-containing protein 1	Isoc1	1,22E-02	0,73	Erhöht
45	P53702	Cytochrome c-type heme lyase	Hccs	1,29E-02	0,88	Erhöht
46	Q9WUR9	Adenylate kinase 4, mitochondrial	Ak4	1,43E-02	1,09	Erhöht
47	O35887	Calumenin	Calu	1,53E-02	1,09	Erhöht
48	P63330	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	Ppp2ca	1,55E-02	0,59	Erhöht
49	Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC1A	1,75E-02	0,89	Erhöht
50	P56545	C-terminal-binding protein 2	CTBP2	2,02E-02	0,49	Erhöht
51	P45376	Aldose reductase	Akr1b1	2,06E-02	0,88	Erhöht
52	P31648	Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1	Slc6a1	2,44E-02	1,02	Erhöht
53	P49189	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	ALDH9A1	2,48E-02	0,54	Erhöht
54	Q5FWK3	Rho GTPase-activating protein 1	Arhgap1	2,74E-02	0,60	Erhöht
55	Q99KJ8	Dynactin subunit 2	Dctn2	2,82E-02	0,23	Erhöht
56	Q9QXZ7	Photoreceptor-specific nuclear receptor	Nr2e3	2,98E-02	0,82	Erhöht
57	P63101	14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	3,16E-02	0,37	Erhöht
58	P62869	Transcription elongation factor B polypeptide 2	Tceb2	3,42E-02	1,24	Erhöht
59	P84098	60S ribosomal protein L19	RPL19	3,48E-02	0,72	Erhöht
60	P24288	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	Bcat1	3,60E-02	0,36	Erhöht

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
61	Q8R3V5	Endophilin-B2	Sh3glb2	3,80E-02	1,12	Erhöht
62	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	3,80E-02	0,18	Erhöht
63	Q9EQ20	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	Aldh6a1	3,96E-02	0,35	Erhöht
64	P40142	Transketolase	Tkt	4,00E-02	0,25	Erhöht
65	P20612	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1	Gnat1	4,16E-02	0,22	Erhöht
66	O43396	Thioredoxin-like protein 1	TXNL1	4,51E-02	0,61	Erhöht
67	Q9QYB5	Gamma-adducin	Add3	4,54E-02	0,50	Erhöht
68	Q86U42	Polyadenylate-binding protein 2	PABPN1	4,68E-02	0,43	Erhöht
69	Q9D1X0	Nucleolar protein 3	Nol3	4,84E-02	0,64	Erhöht
70	O70161	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma	Pip5k1c	4,86E-02	0,92	Erhöht
71	Q96K17	Transcription factor BTF3 homolog 4	BTF3L4	4,89E-02	0,85	Erhöht

Tabelle 7: Liste aller signifikant hoch- und herunterregulierten Proteine in der HNK-Versuchsreihe

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
1	Q9CQ75	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	Ndufa2	3,60E-04	-1,46	Vermindert
2	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	2,51E-03	-1,45	Vermindert
3	P97300	Neuroplastin	Nptn	2,28E-03	-1,16	Vermindert
4	P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	Cox5a	6,14E-04	-1,03	Vermindert
5	Q15637	Splicing factor 1	SF1	1,95E-02	-0,91	Vermindert
6	P23506	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	Pcmt1	1,75E-02	-0,90	Vermindert
7	O94776	Metastasis-associated protein MTA2	MTA2	6,69E-03	-0,88	Vermindert
8	P19783	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Cox4i1	3,85E-02	-0,87	Vermindert
9	P56391	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	Cox6b1	9,14E-03	-0,86	Vermindert
10	Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	1,78E-03	-0,86	Vermindert
11	Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Ndufs3	2,36E-05	-0,85	Vermindert
12	Q91VR2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Atp5c1	4,44E-02	-0,85	Vermindert
13	Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1	1,85E-02	-0,82	Vermindert
14	Q9DCS9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	Ndufb10	6,80E-03	-0,75	Vermindert
15	Q9DB77	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Uqcrc2	1,80E-02	-0,74	Vermindert
16	Q12792	Twinfilin-1	TWF1	2,47E-02	-0,73	Vermindert
17	E9Q912	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1	Rap1gds1	1,13E-02	-0,73	Vermindert
18	Q9CPQ1	Cytochrome c oxidase subunit 6C	Cox6c	3,65E-02	-0,72	Vermindert
19	Q91V61	Sideroflexin-3	Sfxn3	6,58E-03	-0,71	Vermindert
20	Q9D855	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	Uqcrb	7,74E-03	-0,68	Vermindert
21	P99028	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	Uqcrh	1,55E-02	-0,65	Vermindert
22	P62913	60S ribosomal protein L11	RPL11	3,24E-02	-0,60	Vermindert
23	O35295	Transcriptional activator protein Pur-beta	Purb	7,56E-03	-0,54	Vermindert
24	P15508	Spectrin beta chain, erythrocytic	Sptb	3,19E-02	-0,52	Vermindert
25	P47955	60S acidic ribosomal protein P1	Rplp1	1,45E-02	-0,50	Vermindert
26	P52430	Serum paraoxonase/arylesterase 1	Pon1	3,54E-02	-0,49	Vermindert
27	P61247	40S ribosomal protein S3a	RPS3A	1,39E-02	-0,48	Vermindert
28	P48036	Annexin A5	Anxa5	1,99E-02	-0,45	Vermindert
29	P17710	Hexokinase-1	Hk1	3,01E-02	-0,42	Vermindert

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
30	P05141	ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	1,28E-02	-0,41	Vermindert
31	P26231	Catenin alpha-1	Ctnna1	4,04E-03	-0,38	Vermindert
32	Q6PIE5	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	Atp1a2	1,91E-02	-0,35	Vermindert
33	P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3	4,29E-02	-0,34	Vermindert
34	P70372	ELAV-like protein 1	Elavl1	6,40E-03	-0,32	Vermindert
35	Q9D6Y9	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	Gbe1	3,29E-02	-0,31	Vermindert
36	Q9D8N0	Elongation factor 1-gamma	Eef1g	4,91E-02	-0,30	Vermindert
37	P18572	Basigin	Bsg	1,77E-02	-0,29	Vermindert
38	P53994	Ras-related protein Rab-2A	Rab2a	3,38E-02	0,17	Erhöht
39	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	2,82E-02	0,18	Erhöht
40	P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Got2	4,28E-02	0,18	Erhöht
41	P27773	Protein disulfide-isomerase A3	Pdia3	1,17E-02	0,18	Erhöht
42	O08599	Syntaxin-binding protein 1	Stxbp1	4,45E-02	0,20	Erhöht
43	Q9JHU4	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Dync1h1	3,81E-02	0,21	Erhöht
44	P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa1	1,94E-02	0,22	Erhöht
45	Q3UHQ0	AP2-associated protein kinase 1	Aak1	3,54E-02	0,23	Erhöht
46	O15212	Prefoldin subunit 6	PFDN6	4,23E-02	0,23	Erhöht
47	P68254	14-3-3 protein theta	Ywhaq	4,05E-02	0,27	Erhöht
48	P70349	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	Hint1	2,67E-02	0,28	Erhöht
49	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	3,37E-02	0,28	Erhöht
50	P23440	Rod cGMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase subunit beta	Pde6b	1,34E-02	0,30	Erhöht
51	P80316	T-complex protein 1 subunit epsilon	Cct5	2,81E-02	0,32	Erhöht
52	O08749	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Dld	4,95E-02	0,32	Erhöht
53	P26645	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	5,14E-03	0,33	Erhöht
54	Q99LD8	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	Ddah2	1,15E-03	0,34	Erhöht
55	O88342	WD repeat-containing protein 1	Wdr1	3,93E-02	0,36	Erhöht
56	P26516	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	Psmd7	2,42E-02	0,36	Erhöht
57	P56399	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	Usp5	1,25E-02	0,37	Erhöht
58	P58269	Zinc finger protein DPF3	Dpf3	4,90E-02	0,40	Erhöht
59	Q3THG9	Alanyl-tRNA editing protein Aarsd1	Aarsd1	4,40E-02	0,42	Erhöht
60	Q91VI7	Ribonuclease inhibitor	Rnh1	2,54E-02	0,43	Erhöht

Nummer	Protein ID	Proteinname	Genname	p-Wert	Log ₂ fold difference	Expressionsprofil
61	O35954	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1	Pitpnm1	1,68E-02	0,43	Erhöht
62	O35098	Dihydropyrimidinase-related protein 4	Dpysl4	5,46E-03	0,44	Erhöht
63	O35841	Apoptosis inhibitor 5	Api5	4,33E-02	0,45	Erhöht
64	Q99020	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	Hnrnpab	7,22E-03	0,45	Erhöht
65	P60487	Pyridoxal phosphate phosphatase	Pdpx	3,45E-02	0,48	Erhöht
66	P63211	Guanine nucleotide-binding protein G(T) subunit gamma-T1	GNGT1	4,80E-02	0,49	Erhöht
67	Q04760	Lactoylglutathione lyase	GLO1	3,22E-03	0,49	Erhöht
68	P04424	Argininosuccinate lyase	ASL	2,37E-02	0,54	Erhöht
69	Q9D0F9	Phosphoglucomutase-1	Pgm1	4,81E-02	0,54	Erhöht
70	P49442	Inositol polyphosphate 1-phosphatase	Inpp1	5,50E-03	0,56	Erhöht
71	Q9Z2U0	Proteasome subunit alpha type-7	Psm7	1,13E-02	0,58	Erhöht
72	Q9JM62	Receptor expression-enhancing protein 6	Reep6	1,70E-03	0,58	Erhöht
73	Q9DAK9	14 kDa phosphohistidine phosphatase	Phpt1	1,46E-02	0,59	Erhöht
74	O88544	COP9 signalosome complex subunit 4	Cops4	3,81E-03	0,61	Erhöht
75	Q99LI8	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Hgs	2,71E-02	0,62	Erhöht
76	P78356	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 beta	PIP4K2B	2,00E-02	0,64	Erhöht
77	P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	Hspa1l	2,10E-02	0,65	Erhöht
78	O60282	Kinesin heavy chain isoform 5C	KIF5C	9,23E-04	0,66	Erhöht
79	Q80TZ3	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin	Dnajc6	2,55E-02	0,72	Erhöht
80	P18242	Cathepsin D	Ctsd	1,86E-03	0,74	Erhöht
81	Q8NHM4	Putative trypsin-6	PRSS3P2	1,72E-02	0,75	Erhöht
82	Q64012	RNA-binding protein Raly	Raly	2,80E-02	0,81	Erhöht
83	Q9JK81	UPF0160 protein MYG1, mitochondrial	Myg1	2,01E-02	0,82	Erhöht
84	Q92747	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	ARPC1A	4,69E-02	0,96	Erhöht
85	P20444	Protein kinase C alpha type	Prkca	8,71E-03	1,11	Erhöht
86	Q9WVJ5	Beta-crystallin B1	Crybb1	3,34E-02	1,85	Erhöht
87	P0C6F1	Dynein heavy chain 2, axonemal	Dnah2	2,63E-03	1,94	Erhöht
88	Q9JJV1	Beta-crystallin A2	Cryba2	1,12E-02	2,22	Erhöht

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei _____ für die Möglichkeit bedanken diese Studie durchzuführen und meine Dissertationsarbeit in ihrem Institut zu vollenden. Hierdurch konnte ich wertvolle Fähigkeiten im Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens und Schreibens erwerben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin _____, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit stets uneingeschränkt unterstützt hat. Sie hatte immer ein offenes Ohr für mich und stand mir jederzeit mit ihrer fachlichen Expertise und ihren wertvollen Ratschlägen beiseite. Ich habe die Gespräche mit ihr über Wissenschaft, Karriere, aber auch den privaten Austausch sehr genossen und geschätzt. Mit ihrer motivierenden Art und ihrem wertschätzenden Umgang wird sie mir stets ein Vorbild sein.

Außerdem möchte ich mich bei _____ bedanken, der diese Arbeit durch seine aufschlussreichen Kommentare und unterstützenden Ideen entscheidend ergänzt hat. Der Austausch mit ihm hat mich stets erfreut und meine Arbeit am Institut wirklich bereichert.

Zuletzt möchte ich mich bei _____ bedanken, die mich auf meinem Weg stets liebevoll begleiten. Eure Unterstützung lässt mich aufgeschlossen und couragiert durchs Leben gehen, ich danke Euch von Herzen hierfür. Mein besonderer Dank geht zudem an Dich, _____. Ich danke Dir für Dein unfassbares Durchhaltevermögen beim Korrekturlesen dieses Schmökers.