

Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Charakterisierung des Cerebrospinalflüssigkeits-Proteoms der Maus in einem Stress-
modell und nach Gabe von 2R,6R-Hydroxynorketamin

Inauguraldissertation
zu Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Milena Sabine Koc, geb. Rossmannith
aus Augsburg

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 06.07.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturdiskussion.....	3
2.1	Stress als Auslöser psychiatrischer Erkrankungen.....	3
2.2	Stress: biologische Grundlagen	3
2.3	Stressexperimente mit Mäusen.....	5
2.3.1	Chronischer sozialer Stress (CSD).....	6
2.3.2	(2R,6R) -Hydroxynorketamin (HNK)-Gabe	7
2.4	Cerebrospinalflüssigkeit	8
2.4.1	Metabolismus und Funktion von Cerebrospinalflüssigkeit	8
2.4.2	Proteine in Cerebrospinalflüssigkeit.....	9
2.4.3	Medizinische Bedeutung von Cerebrospinalflüssigkeit	10
2.4.4	Protein-Biomarker in Cerebrospinalflüssigkeit.....	10
2.5	Protein-Biomarker in der Psychiatrie und Neuropsychiatrie	11
2.6	Massenspektrometrische Proteinanalyse von Cerebrospinalflüssigkeit	12
2.7	Massenspektrometrie und „Discovery Proteomics“	17
2.8	Das Auge als Tor zum Gehirn	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	21
3.2	Studienproben.....	22
3.2.1	Chronischer sozialer Stress (CSD)	22
3.2.2	(2R,6R) -Hydroxynorketamin (HNK)-Gabe	24
3.3	Proteomischer Workflow	27
3.4	Eindimensionale Gelelektrophorese.....	27
3.5	In-Gel Trypsin-Verdau	28
3.6	LC-ESI MS/MS.....	29
3.7	„Discovery Proteomics“- Strategie.....	30
3.8	Bioinformatik und Funktions- und Signalweganalyse	31
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Charakterisierung des Maus-CSF Proteoms.....	33
4.2	Proteine des CSD-Experiments	41
4.3	Proteine des HNK-Experiments	46

4.4	Funktions- und Signalweganalyse.....	52
5	Diskussion	65
5.1	Charakterisierung des Maus-CSF Proteoms.....	66
5.2	Proteine des CSD-Experiments	70
5.3	Proteine des HNK-Experiments	75
6	Zusammenfassung	83
7	Literaturverzeichnis.....	85
8	Anhang	95
	Danksagung	VIII
	Lebenslauf.....	IX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse).....	5
Abbildung 2: Liquorsystem und Zirkulation der Cerebrospinalflüssigkeit.....	9
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des in der Studie genutzten LTQ-Orbitrap-XL von Thermo Fisher Scientific.....	18
Abbildung 4: Prinzip der „Data dependent acquisition“ (DDA)	18
Abbildung 5: Übersicht über das CSD-Experiment.....	24
Abbildung 6: Übersicht über das HNK-Experiment.....	26
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung des proteomischen Workflows der vorliegenden „Discovery Proteomics“-Studie.....	27
Abbildung 8 Venn-Diagramm zur Darstellung der Gesamtzahlen identifizierter CSF-Proteine aus dem CSD- und HNK-Experiment.....	35
Abbildung 9: Venn-Diagramm zur Darstellung der identifizierten Proteine mittels verschiedener Datenbanken im CSD-Experiment (A) und HNK-Experiment (B).....	35
Abbildung 10: Übersicht der 15 am meisten abundanten CSF-Proteine unter Verwendung der Mus musculus Datenbank aus dem CSD-Experiment.	36
Abbildung 11: Übersicht der 15 am meisten abundanten CSF-Proteine unter Verwendung der Mus musculus Datenbank aus dem HNK-Experiment.	37
Abbildung 12: Vergleich der 15 am meisten abundanten CSF-Proteine im CSD- und HNK-Experiment unter Verwendung der Mus musculus Datenbank..	38
Abbildung 13: Identifizierte Signalwege (<i>canonical pathways</i>) des CSD- und HNK-Experiments unter Verwendung der beiden Datenbanken <i>Mus musculus</i> und <i>Homo sapiens</i>	39
Abbildung 14: Identifizierte Erkrankungen und biologischen Funktionen des CSD- und HNK-Experiments unter Verwendung der beiden Datenbanken <i>Mus musculus</i> und <i>Homo sapiens</i>	40
Abbildung 15: Proteinprofile im 1DE-Gel der CSF-Proben aus dem CSD-Modell.	42
Abbildung 16: Pearson’s Korrelationsanalyse zur Darstellung des Grads der Variationen im CSF-Proteom zwischen den biologischen Replikaten und Gruppen im CSD-Experiment.	43
Abbildung 17: Heatmap der hierarchischen Clusteranalyse der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine im CSD-Modell.....	44
Abbildung 18: Proteinprofile im 1DE-Gel der CSF-Proben aus dem HNK-Modell....	47
Abbildung 19: Heatmap der hierarchischen Clusteranalyse der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine im HNK-Modell.....	48
Abbildung 20: Interaktionsnetzwerk der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem CSD-Modell.....	56
Abbildung 21: Interaktionsnetzwerk der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem HNK-Modell zum Zeitpunkt 4h.....	57
Abbildung 22: Interaktionsnetzwerk der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem HNK-Modell zum Zeitpunkt 1w.....	58
Abbildung 23: Identifizierte Signalwege (<i>canonical pathways</i>) des CSD- und HNK-Experiments.	59
Abbildung 24: Relevante Signalwege mit Angabe der assoziierten, signifikant unterschiedlich regulierten Proteine aus dem CSD- und HNK-Experiment.	60

Abbildung 25: A: Heatmap der vorgeschalteten Regulatoren (<i>upstream regulators</i>) aus dem CSD- und HNK-Experiment. B: Netzwerke relevanter vorgeschalteter Regulatoren aus dem CSD- und HNK-Experiment.....	61
Abbildung 26: Identifizierte Erkrankungen und biologische Funktionen des CSD- und HNK-Experiments.....	62
Abbildung 27: Netzwerke relevanter Erkrankungen und biologischer Funktionen des CSD-Experiments.....	63
Abbildung 28: Netzwerke relevanter Erkrankungen und biologischer Funktionen des HNK-Experiments.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über proteomische Studien zu Cerebrospinalflüssigkeit der Maus mit Angabe der Gesamtzahl der identifizierten Proteine.	15
Tabelle 2: Vereinfachte Darstellung der Standardisierung der CSF-Proben im CSD-Experiment.	23
Tabelle 3: Vereinfachte Darstellung der Standardisierung der CSF-Proben im HNK-Experiment.	26
Tabelle 4: Liste der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem CSD-Experiment.	45
Tabelle 5: Liste der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem HNK-Experiment.	49
Tabelle 6: Liste aller identifizierten Maus CSF-Proteine des CSD- und HNK-Experiments.	95

Abkürzungsverzeichnis:

1DE	Eindimensionale Gelelektrophorese
%	Prozent
>	mehr als
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ACTH	Adrenocorticotropin
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
ca.	Circa
CID	Collision-induced Dissociation
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CSD	Chronic Social Defeat, chronischer sozialer Stress
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CTRL	Kontrollgruppe
DDA	Data dependent acquisition
DGPPN	Deutscher Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde
dl	Deziliter
DTT	Dithiotreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electrospray ionization
FDR	False Discovery Rate
GR	Glukokortikoidrezeptor
h	Stunde
HNK	(2R,6R)-Hydroxynorketamin
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal
IAA	Iodacetamid
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
kV	Kilovolt
LC	Liquid chromatography
LFQ	Label-free quantitative
LTQ	Linear quadrupole ion trap

<i>m/z</i>	Masse zu Ladung Verhältnis
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem mass spectrometry
PAGE	Poly acrylamide gel electrophoresis
ppm	Parts per million
PPI	Protein-Protein-Interaktionen
SAL	Saline
SCX	Strong cation exchange
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of Flight
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w	Woche
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystem
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist Stress eine der größten Gesundheitsgefahren des 21. Jahrhunderts. Stress steht in engem Zusammenhang mit psychischen Störungen wie der Depression. Die WHO erwartet, dass bis zum Jahr 2020 Depression weltweit die zweithäufigste Volkskrankheit sein wird. Der Leidensdruck für die erkrankte Person ist dabei enorm hoch und die Suche nach der passenden Therapie oft ein langwieriger Prozess. Die bisherige Forschung liefert bereits umfangreiche Erkenntnisse über die Folgen von Stress und zu psychischen Erkrankungen wie der Depression. Jedoch ist die Pathophysiologie dieser komplexen und multifaktoriellen Erkrankung noch nicht abschließend geklärt. Die Nachfrage nach neuen Therapieoptionen ist, aufgrund von Nachteilen klassischer Therapieansätze, groß. In der psychiatrischen Forschung sind Stressmodelle mit Mäusen von zentraler Bedeutung, um Erkrankungen wie die Depression zu erforschen. Sie bieten ein erhebliches Potenzial, um unser Wissen von der Pathophysiologie stressbezogener psychischer Erkrankungen zu erweitern und um potenziell neue Therapieansätze genauer zu untersuchen.

Proteine stehen als Schlüsselmoleküle des Organismus schon seit langem im Fokus der Forschung, um detaillierte Einblicke in involvierte Signalwege zu gewinnen. Massenspektrometrische (MS) Verfahren haben sich hierbei als geeignete Methode zur Untersuchung von Proteinen in einem Gewebe oder einer Körperflüssigkeit etabliert und werden bereits vielfach eingesetzt. Da Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) eine Körperflüssigkeit ist, die in engem Austausch mit dem Zentralnervensystem (ZNS) steht und dessen physiologische Prozesse ideal widerspiegelt, ist CSF in Bezug auf neuropsychiatrische Erkrankungen von besonderem wissenschaftlichem Interesse. CSF kann im lebenden Organismus durch geeignete Verfahren entnommen werden, um Proteine zu entschlüsseln und um Hinweise auf involvierte Signalwege zu erlangen.

Ziel dieser Studie ist es, mittels „Discovery Proteomics“-Strategie zunächst das CSF-Proteom der Maus umfassend zu charakterisieren. Nachfolgend sollen in einem Mausmodell die Auswirkungen von Stress auf das CSF-Proteom der Maus untersucht werden. Durch einen Vergleich des Proteoms der Stress- und Kontroll-Gruppe sollen Hinweise auf beteiligte physiologische und pathophysiologische Prozesse gefunden und beleuchtet werden. Zum anderen sollen die akuten und länger anhaltenden Folgen des potenziell neuen Antidepressivums (2R,6R)-Hydroxynorketamin (HNK) auf das CSF-Proteom von Mäusen untersucht werden. Die Ergebnisse sollen zum

Verständnis der Pathophysiologie stressbezogener Störungen wie der Depression beitragen und außerdem Erkenntnisse über die Wirkweise des potenziell neuen Antidepressivums HNK liefern.

2 Literaturdiskussion

2.1 Stress als Auslöser psychiatrischer Erkrankungen

Laut WHO ist Stress eine der größten Gesundheitsgefahren des 21. Jahrhunderts. Die Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung bezeichnet Stress als „einen Zustand des Ungleichgewichts“, wobei ein Stressor eine Anpassungsreaktion des Organismus hervorruft [1]. Psychischer Stress entsteht durch eine Diskrepanz zwischen den Anforderungen an ein Individuum und dessen Bewältigungsverhalten [2]. Vor allem anhaltender, dauerhafter Stress steigert laut Deutscher Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) das Risiko für psychische Störungen wie Depression oder Angststörungen, aber auch das Risiko an Krankheiten wie Tinnitus, Bluthochdruck und Infektionskrankheiten zu erkranken [3]. Insbesondere bei der Depression ist die Verbindung zwischen Stress oder stressreichen Lebensereignissen und der Erkrankung bereits vielfach hergestellt und untersucht worden [4-6]. Die WHO nimmt an, dass mehr als 4,4% der Weltbevölkerung unter Depressionen leiden. Das entspricht schätzungsweise 322 Millionen Menschen [7]. Dabei erwartet die WHO, dass 2020 der zweithäufigste Grund für Erwerbsunfähigkeit die Erkrankung Depression sein wird. Unter den diagnostizierten Depressionen beträgt die Lebenszeitprävalenz in Deutschland 11,6%, wobei anzunehmen ist, dass die tatsächliche Zahl, aufgrund nicht diagnostizierter Erkrankungen, höher liegt [8, 9]. Zudem sind psychische Erkrankungen bereits zweithäufigster Grund für krankheitsbedingte Fehltag im Beruf sowie der häufigste Grund für Frühverrentungen in Deutschland und stellen so eine außerordentlich hohe Belastung für das Gesundheitssystem dar [3].

2.2 Stress: biologische Grundlagen

Die biologischen Prozesse der Stressreaktion basieren, neben dem vegetativen Nervensystem, auf der Freisetzung des sogenannten „Stresshormons“ Kortisol aus der Nebennierenrinde. Die Steuerung der Kortisol-Ausschüttung obliegt der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (engl.: Hypothalamic-pituitary-adrenal = HPA), wie vereinfacht in Abbildung 1 dargestellt. Verschiedene Stress-Stimuli aktivieren Neuronen im paraventriculären Nukleus des Hypothalamus und rufen die Ausschüttung von Corticotropin Releasing Hormone (CRH) und Arginin-Vasopressin hervor. Diese Botenstoffe gelangen anschließend in den Vorderlappen der Hypophyse, wo die Ausschüttung von Adrenocorticotropin (ACTH) stimuliert wird. In der Nebennierenrinde wird durch ACTH unter anderem die Biosynthese von Kortisol sowie dessen Freisetzung stimuliert. Kortisol (bei Nagetieren Kortikosteron) entfaltet durch Bindung

an Glukokortikoidrezeptoren (GR) und Mineralokortikoidrezeptoren seine Wirkung. In der Peripherie werden so im Zuge der Stressreaktion der Stoffwechsel und das Immunsystem reguliert. Glukokortikoide haben aber auch entscheidende zentrale Wirkungen und beeinflussen zum Beispiel die Neurogenese, die Bewertung emotionaler Ereignisse und den Erwerb neuer Erinnerungen [10]. Die Anpassungsfähigkeit der HPA-Achse ist von entscheidender Bedeutung. Physiologisch geschieht dies durch negative Rückkopplungsmechanismen. Bei erhöhtem Kortisolspiegel wird die Ausschüttung von Botenstoffen der HPA-Achse vermindert [11]. Fehlgeleitete Anpassungen der HPA-Achse können mit psychischen Störungen wie Depression einhergehen [11, 12]. Eine Hyperaktivität der HPA-Achse ist eine konsistente Veränderung bei Depression [10]. Die Hyperaktivität der HPA-Achsen hat durch zentrale Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren agieren und die Genexpression regulieren, womöglich einen langfristigen Effekt auf Stress-regulierende Gehirnregionen [13]. Darüber hinaus geht eine erfolgreiche antidepressive Therapie offenbar mit einer Normalisierung der HPA-Achsenregulation einher [14].

Einen weiteren Aspekt in Bezug auf den Zusammenhang von Stress und die Ätiologie der Depression liefern womöglich Mitochondrien, die Kraftwerke der Zelle. Die durch Stress induzierten Struktur- und Funktionsveränderungen des Gehirns fordern eine erhöhte Energiebereitstellung. Womöglich ist eine gestörte Mitochondrienfunktion bei einer Subgruppe von Patienten mit Depression krankheitsverursachend [15]. In einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass chronischer Stress die mitochondriale Atmungskette bei Depression hemmt [16].

All diese Studien tragen dazu bei, die Ätiologie und Pathogenese stressinduzierter Störungen wie der Depression aufzuklären. Jedoch sind stressbezogene Störungen wie die Depression sehr komplex und multifaktoriell, weshalb weitere Forschung nötig ist, um in Zukunft die Therapieoptionen und das Behandlungsmanagement zu verbessern. Die Grundlagenforschung zu Stress nimmt dabei eine entscheidende Rolle ein.

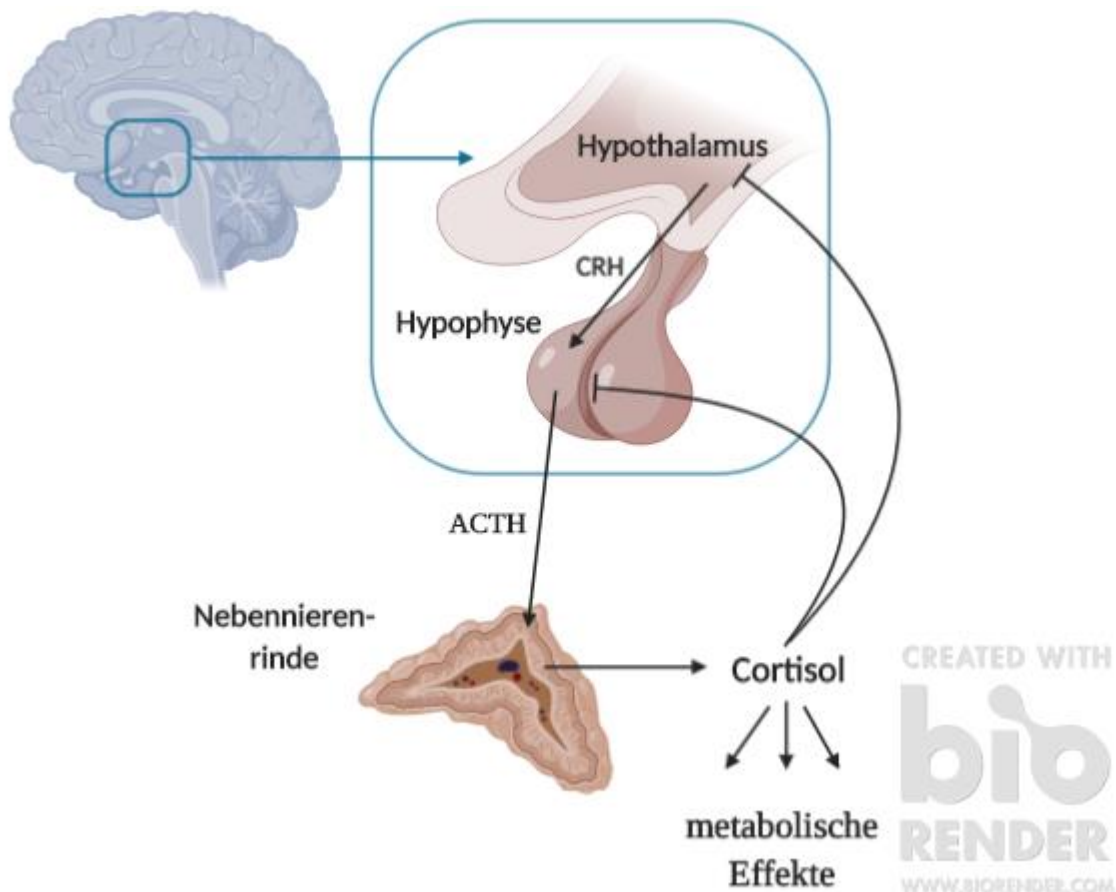


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse).

2.3 Stressexperimente mit Mäusen

In der psychiatrischen Forschung spielen Tierversuche eine zentrale Rolle, um psychische Störungen wie die Depression zu untersuchen und um neue Medikamente zu entwickeln. Die Translation von Erkenntnissen aus der Grundlagenforschung sowie die Entwicklung potenzieller neuer Pharmaka kommen ohne den Einsatz von Tierversuchen nicht aus. Versuche mit Nagetieren haben deshalb früh in der psychiatrischen Forschung Einzug gehalten. Problematisch bei neuropsychiatrischen Erkrankungen ist jedoch, dass die Diagnose beim Menschen oft auf Symptomen beruht, die bei Nagetieren nicht erhoben werden können. Beispiel hierfür sind Wahnvorstellungen, Schuldgefühle, Halluzinationen und Traurigkeit [17]. Der Mangel an objektiven Testverfahren und Biomarkern in der Diagnostik neuropsychiatrischer Erkrankungen stellt eine besondere Herausforderung für die Entwicklung sinnvoller Tiermodelle für psychiatrische Erkrankungen dar. Bei der Diagnosestellung der Depression spielen allerdings mitunter Symptome eine Rolle, die auch bei Nagetieren erhoben werden können, wie Anhedonie, psychomotorisches Verhalten und reduzierte soziale Interaktion. Diese depressiven Symptome können beispielsweise im Saccharose Präferenztest, Interaktionstest

oder im Schwimmtest nachgewiesen werden [18]. Als zusätzliches Kriterium kann außerdem die bei einer Depression häufig anzutreffende HPA-Achsen Dysregulation mit erhöhtem Glukokortikoid-Level nachgewiesen werden [19]. Es existieren bereits einige Stressmodelle mit Nagetieren, die einen depressions-ähnlichen Phänotyp erzeugen und deren erzeugte depressive Symptomatik durch oben genannte Testverfahren validierbar ist [20].

2.3.1 Chronischer sozialer Stress (CSD)

Das Chronischer sozialer Stress (*Chronic social defeat*, CSD) -Modell ist ein Verhaltensmodell, das bei Nagetieren angewandt wird, um chronischen Stress zu induzieren und so Symptome affektiver Störungen bei den Tieren hervorzurufen. Vor allem bei der experimentellen Untersuchung der Depression hat das CSD-Modell sich als hilfreiches Tiermodell mit guten translationalen Eigenschaften erwiesen [20, 21]. Es basiert auf dem natürlichen Verhalten männlicher Mäuse, ihr Territorium zu verteidigen. Dabei wird eine männliche Maus oder Ratte wiederholt über einen längeren Zeitraum mit einem aggressiven, dominanten Artgenossen konfrontiert. Zwischen solchen Konfrontationen wird durch einen Käfigtrenner physischer Kontakt zwischen den Mäusen vermieden, jedoch ist weiterhin sensorischer Kontakt möglich. Durch den so ausgeübten Stress entwickelt das Tier ein Verhalten der Unterordnung und der sozialen Abwendung, welches depressivem und ängstlichem Verhalten ähnelt [18, 22].

Die Mäuse zeigen nicht nur Verhaltensveränderungen, sondern auch physiologische Veränderungen. Beispiele hierfür sind Veränderungen des autonomen Nervensystems, der HPA-Achsen- Aktivität und Regulation, immunologische Veränderungen, und eine veränderte zentrale Zytokin-Expression, die unter anderem nachweisbar sind [19]. Die durch CSD Stress induzierten Veränderungen sind auch durch einen gestörten Glucosestoffwechsel der Mäuse gekennzeichnet [23]. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass CSD Stress anhaltende strukturelle und neuronale Veränderungen in bestimmten Gehirnregionen hervorruft [24]. Ob ein Tier tatsächlich depressives und ängstliches Verhalten entwickelt, kann durch unterschiedliche Tests wie zum Beispiel den Interaktionstest evaluiert werden, der häufig an das CSD-Modell zur Validierung angeschlossen wird [18]. Auch im Schwimmtest zeigen Mäuse, die CSD Stress ausgesetzt waren, depressions-ähnliches Verhalten [23]. Allerdings liegt meist eine geringe Anzahl an Mäusen vor, welche resilient sind und kein depressions-ähnliches Verhalten entwickeln [20]. Bei Mäusen mit depressions-ähnlichen Symptomen erzeugt die wiederholte Gabe des selektiven Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmers

(SSNRI) Venlafaxin einen Antidepressiva-ähnlichen Effekt [25]. Eine Vielzahl von Studien liefert somit Belege für die guten translationalen Eigenschaften des CSD-Modells für Depression.

2.3.2 (2R,6R)-Hydroxynorketamin (HNK)-Gabe

Aufgrund der hohen Prävalenz der Depression ist die Nachfrage nach gut wirksamen, nebenwirkungsarmen Antidepressiva hoch. Die bisher gängigen Antidepressiva vereinen meist einen relevanten Nachteil: die Wirklatenz beträgt einige Wochen bis Monate. Deshalb ist die Suche nach dem jeweils passenden Antidepressivum ein langwieriger Prozess, wobei ungefähr ein Drittel der Patienten kein ausreichendes Therapieansprechen auf klassische Antidepressiva zeigen und somit an einer therapieresistenten Depression leiden [26]. Außerdem gibt es einige häufige, potenziell schwerwiegende Nebenwirkungen der klassischen Antidepressiva, wie zum Beispiel Herz-Kreislaufstörungen, sexuelle Dysfunktion, Gewichtszunahme aber auch eine erhöhte Suizidrate insbesondere bei jungen Patienten [26, 27]. In randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblindstudien konnte der erfolgreiche Einsatz von Ketamin bei Depression und depressiven Episoden bei bipolarer Störung gezeigt werden [26, 28, 29]. In behandlungsresistenten Fällen und depressiven Notfällen mit akuter Suizidgefährdung wird deshalb über den Einsatz von Ketamin diskutiert. Vorteil ist hierbei die schnell einsetzende antidepressive Wirkung, die meist schon in weniger als einer Stunde nach Administration einsetzt [30]. In Europa ist vor Kurzem die Zulassung eines Nasensprays mit Esketamin, eines Ketamin-Enantiomers, erfolgt, welches bereits in den USA seit März 2019 auf dem Markt ist [31]. Jedoch ist das Potenzial von Ketamin für den breiten klinischen Gebrauch durch seine möglichen Nebenwirkungen wie zum Beispiel psychomimetische Effekte, kardiovaskuläre Nebenwirkungen, sowie durch das hohe Abhängigkeitspotenzial eingeschränkt [26, 32]. In Deutschland kommt Ketamin deshalb aktuell nur in Off-Label-Behandlungen unter spezieller klinischer Überwachung intravenös zum Einsatz [33]. Auf der Suche nach schnell-wirkenden, nebenwirkungsarmen Antidepressiva ist ein Metabolit des Ketamin, (2R,6R)-Hydroxynorketamin (HNK), zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. In präklinischen Studien konnte der antidepressive Effekt von HNK gezeigt werden [34-36]. In einem Maus-Experiment verursachte der Metabolit weniger Ketamin-bezogene Nebenwirkungen und hatte weniger Missbrauchs- bzw. Abhängigkeitspotenzial [34]. Auch bei oraler Administration konnte in verschiedenen Tiermodellen die antidepressive Wirkung von HNK gezeigt werden [37]. In anderen Studien mit Ratten und Mäusen zeigte HNK im

Gegensatz zu Ketamin weniger antidepressive Eigenschaften [38-40]. Jedoch ist die Vergleichbarkeit dieser Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen eingeschränkt, da unterschiedliche Depressions-Modelle zum Einsatz kamen. Auch die Modelle zur Überprüfung des depressiven Verhaltens und anschließend der antidepressiven Wirkung von HNK unterscheiden sich voneinander. Außerdem werden teilweise unterschiedliche Spezies (Ratte/Maus) und unterschiedliche Mausstämme eingesetzt. Wie genau die antidepressive Wirkung von Ketamin und HNK zustande kommt und welche Rezeptoren und Signalwege eine Rolle spielen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Womöglich ist die Ursache für die antidepressiven Eigenschaften nicht die Blockade von NMDA-Rezeptoren, sondern geht auf AMPA-Rezeptoren zurück [34, 41]. Weitere Studien sind deshalb sinnvoll, um diese Ergebnisse zu validieren sowie involvierte Signalwege nach Administration von HNK zu identifizieren.

2.4 Cerebrospinalflüssigkeit

2.4.1 Metabolismus und Funktion von Cerebrospinalflüssigkeit

CSF, auch Liquor Cerebrospinalis oder Liquor genannt, ist eine klare, farblose Körperflüssigkeit. CSF zirkuliert in den vier Hirnventrikeln, im Subarachnoidalraum des Gehirn- und Rückenmarks sowie im Zentralkanal. Die Produktion von CSF findet hauptsächlich durch speziell differenzierte Epithelzellen des Plexus choroideus statt. Der Plexus choroideus ist ein Adergeflecht, das sich in den Hirnventrikeln befindet. Hier entsteht CSF als Ultrafiltrat von Blutplasma, wobei zusätzlich auch aktive Sekretion eine Rolle spielt, sowie die Drainage von interstitieller Flüssigkeit des Gehirns [42]. CSF fließt rhythmisch durch die Ventrikel des Gehirns und gelangt über Öffnungen in der Wand des vierten Ventrikels in den Subarachnoidalraum, der sich zwischen den beiden weichen Hirnhäuten Arachnoidea und Pia mater befindet. Über kleine Ausstülpungen der Arachnoidea wird ein Großteil der CSF in das venöse System resorbiert. Diese sogenannten Arachnoidalzotten ragen im Bereich des Gehirns in die venösen Sinus der harten Hirnhaut, Dura Mater. Im Rückenmark befinden sich solche Ausstülpungen im Bereich der Spinalnervenwurzeln. Ein Teil der Resorption findet zudem im Bereich der Spinalnerven und Hirnnerven am Übergang der Arachnoidea in das Perineurium statt, wo die Resorption über das Lymphsystem erfolgt [43]. Die Funktionen der CSF sind vielfältig. Eine lebenswichtige Funktion der CSF besteht in der hydromechanischen Schutzfunktion des ZNS, indem es als Flüssigkeitsraum das ZNS umgibt und eine Art Polster darstellt [44]. CSF übernimmt immunologische Schutzfunktionen und ist zusätzlich bei dem Ausspülen metabolischer Abfallprodukte involviert [44]. Des

Weiteren trägt CSF wesentlich zur Homöostase im ZNS bei, indem aktive Metaboliten zirkulieren können, Abbauprodukte eliminiert werden und Elektrolytausgleich stattfindet [43]. CSF wird beim Menschen vier bis fünfmal pro Tag erneuert. Bei der Ratte beträgt die Erneuerungsrate sogar elfmal pro Tag [43, 44]. Bei Mäusen ist das Volumen ca. 0,04 ml und die Produktionsrate beträgt 0,33 $\mu\text{l}/\text{min}$ [44]. Aufgrund der vielfältigen, lebensnotwendigen Funktionen der CSF sowie der dynamischen Erneuerung ist CSF eine wichtige Körperflüssigkeit zur Untersuchung zentraler Prozesse.

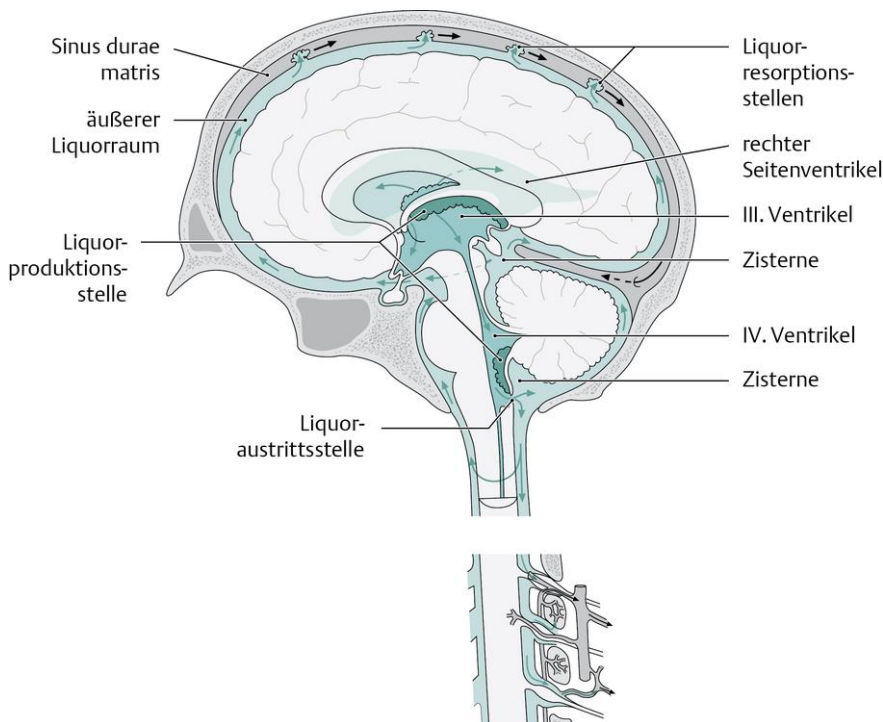


Abbildung 2: Liquorsystem und Zirkulation der Cerebrospinalflüssigkeit. Aus Schünke, Schulte, Schumacher, Prometheus, Kopf, Hals und Neuroanatomie, Thieme, 2014; Grafiker: Markus Voll

2.4.2 Proteine in Cerebrospinalflüssigkeit

CSF ist zell- und proteinarm und besteht zu 99% aus Wasser [44]. Die Normwerte in Liquor des Menschen liegen bei <4 Zellen pro μl sowie 150-450mg/l Proteingehalt [45]. Physiologisch entstammt der Hauptteil der Proteine in CSF dem Blut [46]. Albumin macht dabei mit ca. 50% aller CSF-Proteine den Großteil aus [47]. Gehirn-spezifische Proteine stellen den restlichen Anteil der CSF-Proteine dar [46]. Neurone und Gliazellen tragen zur Proteinzusammensetzung in CSF bei. Die Konzentration und die Zusammensetzung Gehirn-spezifischer Proteine in CSF können sich bei Krankheiten verändern, beispielsweise verändern sich die Konzentrationen von Gehirn-spezifischen Tau-Proteinen und Amyloid-beta bei der Alzheimer-Erkrankung [48]. Das Aufzeigen solcher Protein-Veränderungen kann nicht nur bei der Diagnostik hilfreich sein, sondern kann zudem das Verständnis der Pathophysiologie verbessern. Deshalb sind

Proteine in CSF von besonderem wissenschaftlichem Interesse und können als potenzielle Biomarker für neuropsychiatrische Erkrankungen dienen.

2.4.3 Medizinische Bedeutung von Cerebrospinalflüssigkeit

Im Krankheitszustand verändert sich die Zusammensetzung von CSF [49]. Deshalb spielt die Untersuchung von CSF in der Diagnostik diverser Krankheitsbilder eine wichtige Rolle, wie bei Multiple Sklerose, Alzheimer Erkrankung oder dem primären ZNS-Lymphom [48-51]. Beim Menschen kann bei einer sogenannten Liquorpunktion, oder Lumbalpunktion, CSF auf Höhe der Lendenwirbelsäule entnommen werden, um beispielsweise Entzündungsparameter zu bestimmen. Die Liquorpunktion dient bei Verdacht auf zentrale entzündliche Geschehen wie Meningitis der Diagnosesicherung und ermöglicht eine Erregerdifferenzierung [52]. Auch bei malignen Geschehen ist eine CSF-Zytologie heutzutage Goldstandard [45, 51]. Zudem ist die Liquorpunktion bei neurologischen Erkrankungen wie Multiple Sklerose für die Diagnosesicherung und Abgrenzung von anderen Erkrankungen weiterhin zentral [50]. Dabei gibt es bei der Liquorpunktion einige, jedoch seltene, Komplikationen. Die häufigste Komplikation ist der postpunktionelle Kopfschmerz [53]. Daneben sind auch schwerwiegende Komplikationen wie Infektionen bis hin zur lebensbedrohlichen Meningitis möglich, die jedoch unter Einhaltung der heutigen Hygienestandards extrem selten geworden sind [54]. Insgesamt ist CSF eine gut zu untersuchende Körperflüssigkeit, risikoarm zu gewinnen und aus der klinischen Diagnostik nicht mehr wegzudenken, da keine andere Körperflüssigkeit die Physiologie und Pathophysiologie des ZNS so gut widerspiegelt.

2.4.4 Protein-Biomarker in Cerebrospinalflüssigkeit

In der Diagnosestellung sowie beim Therapiemanagement und der Differenzierung verschiedener Erkrankungen spielen Biomarker in der Medizin eine wichtige Rolle. Ein Biomarker ist ein messbares Charakteristikum, welches biologische Funktion, Dysfunktion oder Therapieantwort widerspiegelt, oder einen Indikator der Krankheitsprogression darstellt [55]. Da CSF in direktem Kontakt mit dem ZNS ist und unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Situationen Veränderungen des ZNS widerspiegelt, eignet sich CSF als Körperflüssigkeit für die Suche nach potenziellen Biomarkern [56, 57]. So existieren bereits seit langem Protein-Biomarker in CSF, die bei Multipler Sklerose prognostisch zentral sind [58]. Zunehmend werden im Bereich neurodegenerativer Erkrankungen in der Biomarker-Suche wichtige Erfolge erzielt. Bei der Evaluierung und dem Management von Patienten mit Alzheimer-Krankheit hat sich bereits die CSF-Untersuchung auf Biomarker wie Amyloid-beta oder Tau Proteine als

nützliches, zusätzliches Hilfsmittel erwiesen [59]. Auch bei Morbus Parkinson gibt es vielversprechende Forschung nach geeigneten Biomarkern um Fehldiagnosen zu vermeiden und um die Früherkennung zu verbessern [60]. Neben neurodegenerativen Erkrankungen ist die Suche nach potenziellen Biomarkern auch bei malignen Erkrankungen wie dem primären Lymphom des ZNS Gegenstand der Forschung [61]. Es gibt somit bereits eine limitierte Anzahl von Biomarkern in CSF, die auf klinischer Ebene erfolgreich Einzug gehalten haben.

2.5 Protein-Biomarker in der Psychiatrie und Neuropsychiatrie

In den bisher gültigen Klassifikationssystemen psychischer Störungen, der internationalen Klassifikation psychischer Störungen ICD-10, sowie dem in den USA gebräuchlichen „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders“ DMS-V, basiert die Einordnung und Diagnose psychischer Störungen auf den vorliegenden Symptomen und nicht auf biologischen Methoden [62]. Zugrundeliegende ätiologische Unterschiede werden außer Acht gelassen, wodurch sich unter anderem die stark unterschiedliche Remissions- und Ansprech-Rate auf Antidepressiva erklären lässt [63]. Es ist aktueller Gegenstand der Forschung, psychische Störungen zusätzlich auch auf der Basis von objektiven biologischen Markern zu klassifizieren, um die Differenzierung verschiedener Erkrankungen zu erleichtern, sowie Behandlungsstrategien anzupassen und zu verbessern [62]. Biomarker haben hierbei das Potenzial, bei der Klärung der Ätiologie einer Erkrankung mit nicht eindeutiger klinischer Darstellung hilfreich zu sein [64]. Zusätzlich erlauben Biomarker ein besseres Monitoring des Therapieverlaufes und könnten potenziell eine Vorhersage des Therapieansprechens und der Progression einer Erkrankung ermöglichen [65, 66]. Neben der Messung von Gehirnaktivitätsmustern und genetischen Biomarkern sind zunehmend Proteine als potenzielle Biomarker in den Fokus gerückt, da sie den aktuellen physiologischen Status als Effektor am besten repräsentieren [65]. Problematisch sind bei der Suche nach Biomarkern im Bereich psychischer Störungen jedoch die Komplexität der Erkrankungen und die Beteiligung einer Vielzahl von Gehirnsystemen, weshalb es schwer ist, einen einzigen Biomarker zu finden, der für die jeweilige psychische Störung repräsentativ ist [63]. Biomarker haben deshalb im klinischen Alltag im Bereich psychischer Störungen noch nicht Einzug gehalten, obwohl bereits einige potenzielle Biomarker identifiziert werden konnten [66].

2.6 Massenspektrometrische Proteinanalyse von Cerebrospinalflüssigkeit

Unter dem Begriff „Proteom“ versteht man die Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen exprimierten Proteine in einem Gewebe oder in einer Körperflüssigkeit [67]. Mit dessen Entschlüsselung und Analyse beschäftigt sich das Feld der *Proteomics*. Das Proteom ist keine starre Einheit sondern reflektiert den physiologischen Status und unterliegt dynamischen Veränderungen [68]. Solche Veränderungen des Proteoms können zum Beispiel durch Umwelteinflüsse, Krankheiten oder Medikamente hervorgerufen werden.

Durch die Entwicklung moderner massenspektrometrischer Methoden und hochentwickelter Software ergibt sich die Möglichkeit, die Proteine in CSF zu identifizieren, zu quantifizieren und unter unterschiedlichen Bedingungen zu vergleichen. Es gibt bereits eine Vielzahl proteomischer Studien, die sich humaner CSF widmen [69-71]. Dabei wurden bereits für eine Vielzahl von Erkrankungen des ZNS, unter anderem auch für Schizophrenie, unterschiedlich exprimierte Proteine im Vergleich zu gesunden Individuen identifiziert [72]. Zur Gewinnung von humaner CSF ist eine Liquorpunktion nötig, welche mit Komplikationen einhergehen kann [54]. Deshalb ist humane CSF keine Körperflüssigkeit, die der Wissenschaft unlimitiert zur Verfügung steht. Es erfordert besondere wissenschaftliche Rechtfertigung, um bei gesunden Individuen eine Lumbalpunktion durchzuführen. Des Weiteren können in humanen Studien experimentelle Manipulationen wie Stressexposition und Medikamenten-Administration und anschließende CSF-Entnahmen ebenso aus ethischen Gründen schwerer realisiert werden. In einer geringen Anzahl von Studien wurde deshalb bereits das CSF-Proteom von Mäusen untersucht, wie in Tabelle 1 vergleichend dargestellt [73-76].

Allerdings stellt die Untersuchung von Maus-CSF vor allem aufgrund des sehr geringen CSF-Volumens von 0,04 ml eine besondere Herausforderung dar [44]. Hinzu kommt die sehr geringe Proteinkonzentration in CSF. Bei Onaivi *et al.* betrug der Proteingehalt von Maus-CSF, der mittels „nanoOrange quantification technology“ ermittelt wurde, nur ~1µg/µl. Um den Proteingehalt zu erhöhen ist das Zusammenfügen mehrerer individueller Proben zu einem biologischen Replikat eine Möglichkeit, die in mehreren Studien Anwendung findet [73, 75]. Es werden dadurch außerdem Unterschiede im Proteom verringert, die verursacht sind durch interindividuelle Variationen. Nur modernste MS-Systeme mit besonders hoher Messsensitivität können bei sehr geringem

Probevolumen mit niedrigem Proteingehalt eingesetzt werden, oftmals besteht also eine gewisse technische Limitation.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Proteom-Analyse von Maus-CSF ist, dass das Protein Albumin alleine bereits schon ~50% der CSF-Proteine ausmacht [47]. Onaivi *et al.* verwenden deshalb einen Antikörper-basierten Albumin/IgG Entfernungskit um sehr häufig vorhandene (abundante) Proteine wie Albumin und IgG aus der Probe zu entfernen, damit sie die Signale von wenig abundanten Proteinen während der Messung nicht überlagern. In Cunningham *et al.* kommt eine Antikörper-basierte IgY-14 *Immunodepletion* zum Einsatz, wodurch sogar die 14 häufigsten Proteine, die in humanen Körperflüssigkeiten vorkommen, aus den Proben entfernt werden. Allerdings gehen durch diesen Entfernungsschritt auch Proteine verloren, die an das Carrierprotein Albumin gebunden vorliegen und potenziell als Biomarker dienen könnten [77]. Außerdem können durch die Verwendung von Affinitäts-basierten Entfernungskits (Immunodepletion) auch unspezifisch gebundene Proteine zusätzlich verloren gehen wie in Günther *et al.* in einer Studie mit CSF von Hunden gezeigt wurde [78]. Um Überlagerungseffekte von sehr abundanten Proteinen während der Messung zu verhindern und um die Komplexität der Probe im Vorfeld zu reduzieren, kann deshalb alternativ eine Prä-Fraktionierung des Proteingemisches zum Einsatz kommen wie das Verfahren der Gelelektrophorese [79]. Des Weiteren kann, wie Smith *et al.* es praktizieren, eine „strong cation exchange“ (SCX) Chromatographie in einer zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie (2D-LC) genutzt werden, um eine gute Auftrennung des Proteingemischs zu erzielen [80].

Für die CSF-Entnahme bei einer Maus gibt es verschiedene Methoden. Es besteht die Möglichkeit CSF, wie Cunningham *et al.* es darstellen, aus der Cisterna Magna zu gewinnen. Allerdings ist diese Methode schwierig durchführbar, aufgrund interindividueller anatomischer Unterschiede. Blutkontaminationen stellen bei der CSF-Entnahme aus der Cisterna Magna ein häufiges Problem dar [81]. Um die CSF-Entnahme präziser und reproduzierbarer zu machen und um Blutkontamination zu vermeiden, stehen alternativ stereotaktische Operationsmethoden zur Verfügung, um direkt aus dem Seitenventrikel CSF zu entnehmen [81]. Wie auch in Onaivi *et al.* angewendet, wird im Rahmen der Stereotaxie-Operation die in den Seitenventrikel platzierte Kanüle mittels Dentalzement am Schädel fixiert und die Operationswunde nachfolgend verschlossen. Damit sind bei der lebendigen Maus mehrere CSF-Entnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten möglich [73, 81]. Ein solches Verfahren bietet die Möglichkeit

dynamische Veränderungen des CSF-Proteoms im lebenden Organismus nachzuweisen und kann so auch genutzt werden, um Proteom-Veränderungen durch Medikamenten-Administration darzustellen.

Es gibt bisher nur eine limitierte Anzahl von Studien, die sich mit der proteomischen Analyse von Maus-CSF beschäftigen, jedoch können Ergebnisse aus solchen Untersuchungen wichtige Erkenntnisse liefern, die eine Basis für weitere Studien mit humaner CSF darstellen. Aufgrund der experimentellen Schwierigkeiten sind zuverlässige Entnahme-Methoden sowie ein verlässlicher proteomischer Workflow notwendig.

Tabelle 1: Übersicht über proteomische Studien zu Cerebrospinalflüssigkeit der Maus mit Angabe der Gesamtzahl der identifizierten Proteine.

Entnahmemethode	Individuell/ gepoolt	Immunodepletion	Separationsmethode der Proteine	MS-System	Filterparameter	Identifizierte Proteine	Mausmodell	Arbeitsgruppe
Punktion der Cisterna Magna	Gepoolt zu 100 µl (10 bis 12 Mäuse pro Gruppe)	Ja: IgY-14 (modifiziert)	In-Solution Trypsin-Verdau, nanoLC	AmaZon ETD	Mascot score ≤30.0	289	Transgenes Mausmodell der Alexander-Krankheit (Tg73.7)	[75]
Stereotaktische Operation (Seitenventrikel)	Gepoolt zu ~18 µl (~2µl/Entnahme, 9 Mäuse/Gruppe)	Ja: Albumin/IgG-Entfernungs-Kit	Keine Angaben	LTQ-Orbitrap Velos	Keine Angaben	268	Wild-Typ Mäuse (♂, C57BL/6) Stressmodell, Kokaingabe-Modell	[73]
Stereotaktische Operation (Seitenventrikel)	Individuell (4µl), 3 Mäuse insgesamt	Nein	In-Solution Trypsin-Verdau, 2D-LC (strong-cation-exchange (SCX), nanoLC)	LTQ-Orbitrap Velos	FDR 5%	261	Wild-Typ Mäuse (♂, C57BL/6)	[74]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Entnahmemethode	Individuell/ gepooled	Immunodepletion	Separationsmethode der Proteine	MS-System	Filterparameter	Identifizierte Proteine	Mausmodell	Arbeitsgruppe
Punktion der Cisterna Magna	Individuell (5µl), 13 Mäuse insgesamt	Nein	In-Solution Trypsin-Verdau, Easy nLC 1000	Q-Exactive	FDR 1%	715	Wild-Typ und BACE 1-/- Mäuse (C57BL/6)	[76]

2.7 Massenspektrometrie und „Discovery Proteomics“

Massenspektrometrische Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen in einer Körperflüssigkeit oder in einem Gewebe sind mittlerweile unabdingbar geworden. Das Aufzeigen dynamischer Veränderungen des Proteoms unter unterschiedlichen Bedingungen liefert entscheidende Hinweise auf involvierte Signalwege. Es können Schlüssel-moleküle als potenzielle Biomarker identifiziert sowie pathophysiologische Prozesse beleuchtet werden [63]. „Discovery Proteomics“-Strategien haben das Ziel, das gesamte Proteom einer Körperflüssigkeit oder eines Gewebes möglichst umfassend zu charakterisieren. Durch den Vergleich einer Kontroll- und einer Krankheitsgruppe können erste Hinweise auf potenzielle Markermoleküle gefunden werden.

Um dieses Ziel zu verfolgen, kommen Massenspektrometer zum Einsatz. Ein Massenspektrometer besteht dabei vereinfacht aus einer Ionenquelle, die aus den zu analysierenden Molekülen fragmentierte Ionen herstellt; des Weiterem einem Analysator oder Masseselektor, der die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs- (m/z) Verhältnis trennt; und einem Detektor, der die Ionen bei einem bestimmten m/z Wert detektiert [82]. Zur Erzeugung der Ionen können zum Beispiel Verfahren wie die Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) oder die Elektrosprayionisation (ESI) zum Einsatz kommen. Die Elektrosprayionisation wurde von John B. Fenn etabliert, der dafür 2002 den Nobelpreis der Chemie erhielt [83]. Bei diesem Verfahren werden die Moleküle aus einer Lösung ionisiert, weswegen es häufig mit Flüssigkeitschromatographie (LC-)-Verfahren gekoppelt ist. LC-ESI MS-Systeme eignen sich besonders bei der Analyse komplexer Proteingemisch-Proben aufgrund der vorherigen Fraktionierung durch das LC-Verfahren [82].

Die erzeugten Ionen werden nachfolgend im Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladungs- (m/z) Verhältnis separiert. Es gibt verschiedene Analysatoren. Viele Systeme gebrauchen zwei oder mehr Analysatoren für Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Ein Beispiel für ein Tandem-Massenspektrometer ist das von Thermo Fisher Scientific entwickelte LTQ-Orbitrap-XL-System. Es ist ein Tandem-Massenspektrometer, welches die Ionenfallen-Massenspektrometer *Linear quadrupole ion trap* (LTQ) mit der *Orbitrap* kombiniert. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3 zu sehen. Vereinfacht wandern die von der Ionenquelle produzierten Ionen zunächst durch eine erste Ionenfalle, wo sie durch elektromagnetische Felder gezielt gehalten oder weiter

gelassen werden, in die C-Trap. Aus der C-Trap gelangen gebündelte „Ionenpakete“ nacheinander in die Orbitrap [84]. Die Orbitrap ist ein hochauflösender MS-Analysator, in dem die Ionen in einer Umlaufbahn um eine zentrale, spindelförmige Elektrode gefangen werden. Sie oszillieren in ihrer Umlaufbahn entlang eines elektrischen Feldes und durch die Aufzeichnung der Frequenz kann ihr m/z Wert ermittelt und in ein Massenspektrum umgewandelt werden [84, 85].

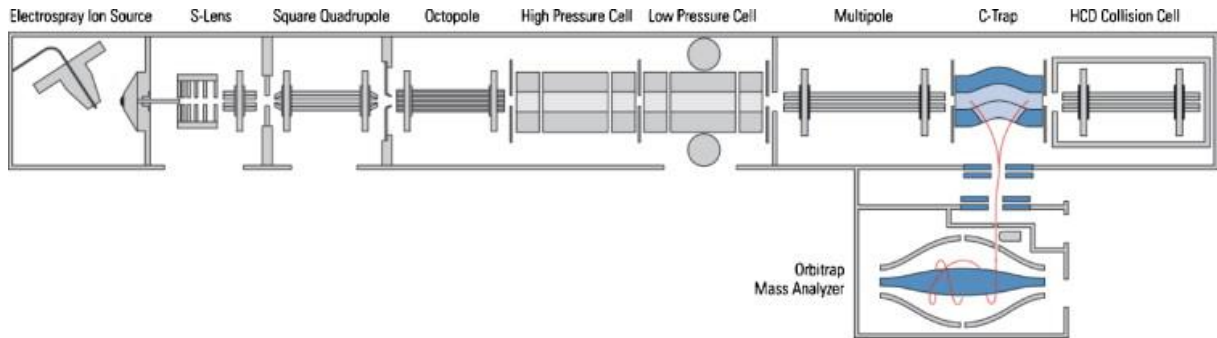


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des in der Studie genutzten LTQ-Orbitrap-XL von Thermo Fisher Scientific. Aus Makarov et al., 2010 [84]

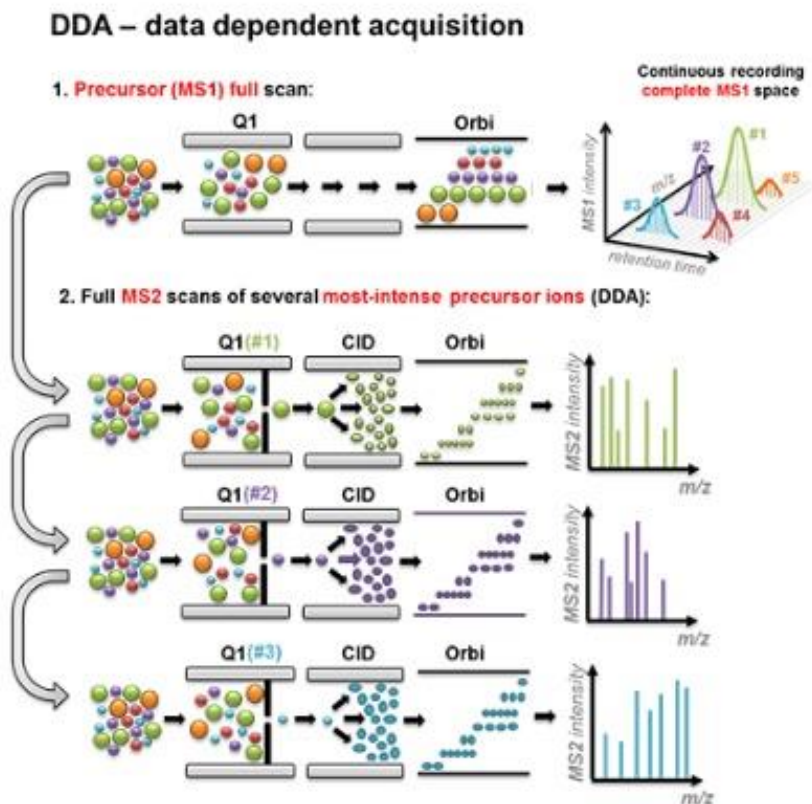


Abbildung 4: Prinzip der „Data dependent acquisition“ (DDA), aus dem MS1 Scan werden die top N Vorläufer-Ionen für eine weitere Fragmentierung für den MS2 Scan ausgewählt. [86]

Bei der „Data dependent acquisition“ (DDA) entstehen dabei zuerst *full-Scan* Massenspektren (MS1) und die top N Peptide bzw. Ionen mit der höchsten Intensität, auch

Vorläufer-Ionen genannt, werden fragmentiert und MS/MS (MS2) Spektren generiert, wie schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Ziel der DDA ist es, zu einem Zeitpunkt möglichst viele Peptide zu identifizieren. Jedoch ist die Auswahl der Peaks ein stochastischer Prozess und die entstehenden MS2 Spektren somit vom Elutionsprofil abhängig, das sich von Lauf zu Lauf trotz der gleichen Probe verändern kann [87].

Die akquirierten MS und MS/MS-Spektren werden mit bestehenden Protein-Sequenz-Datenbanken abgeglichen, um eine Identifikation der Peptide und Proteine zu ermöglichen. Diese Art von Protein-Identifikation, die auf Übereinstimmungen mit Sequenz-Datenbanken beruht, ist dadurch limitiert, dass umfassende Sequenz-Datenbanken vorhanden sein müssen [82]. Durch den Vergleich der Peak-Intensitäten des Massenspektrums eines Peptids zwischen verschiedenen Proben ist eine relative Quantifizierung möglich [87]. Absolute Quantifizierungsmethoden sind mit erhöhtem Aufwand der Proben Präparation und deutlich erhöhten Kosten verbunden, weswegen sie nicht für „Discovery Proteomics“-Studien zur Identifizierung möglichst vieler Proteine geeignet sind [87]. Allerdings können im Anschluss an eine solche „Discovery Proteomics“-Studie die potenziellen Markermoleküle mittels absoluter Quantifizierungs-Methoden und „Targeted Proteomics“ Strategien verifiziert werden. Trotz gewisser Limitierungen ist das LC-ESI MS/MS-System im Sinne einer „Discovery Proteomics“-Strategie ein gut anwendbares System, um das Proteom einer Probe zu charakterisieren und potenzielle Markermoleküle aufzufinden.

2.8 Das Auge als Tor zum Gehirn

Das Auge bzw. die Retina hat denselben embryologischen Ursprung wie das ZNS und kann als eine Ausstülpung des Gehirns betrachtet werden [88]. Ähnlich wie die Blut-Hirnschranke und die Blut-Liquorschranke besitzt das Auge eine Blut-Retina- und eine Blut-Kammerwasserschranke [89]. Das Auge beheimatet die gleiche Art der spezialisierten Immunantwort wie das Gehirn und Rückenmark [88]. Das Kammerwasser des Auges ist eine Flüssigkeit mit immunregulierenden Mediatoren und erinnert an CSF des Gehirns [88].

Aufgrund des gleichen embryologischen Ursprungs zeigen einige neurodegenerative Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Alzheimer-Erkrankung und Morbus Parkinson auch Manifestationen am Auge [88]. Bei Multipler Sklerose sowie bei der Alzheimer Erkrankung ist beispielsweise ein Verlust retinaler Ganglienzellen und eine Verdünnung der retinalen Nervfaserschicht nachweisbar [88]. Aufgrund der guten

Zugänglichkeit des Auges und der non-Invasivität einiger augenärztlicher Untersuchungsmethoden stellen Sehtests und okulare Bildgebung potenziell ein nützliches zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel für Erkrankungen des ZNS dar.

Umgekehrt zeigen auch klassische Augenerkrankungen wie das Glaukom charakteristische Veränderungen von neurodegenerativen Erkrankungen. Es konnten in einigen Studien Gemeinsamkeiten zwischen dem Verlust von retinalen Ganglienzellen bei dem Glaukom und dem Verlust von Neuronen bei der Alzheimer-Erkrankung gezeigt werden [90-92]. Der glaukomatöse Schaden ähnelt der Neuron-Degeneration bei Alzheimer-Erkrankung und geht dabei über die Retina und den Sehnerv hinaus entlang der zentralen Sehbahn [90, 92]. Die Alzheimer-Erkrankung ist stark assoziiert mit der Anreicherung von Amyloid-beta (A β), neuronaler Apoptose und Zellverlust [93]. In einem experimentellen Glaukommodell konnte eine Anreicherung von A β gezeigt werden sowie durch exogenes A β der apoptotische Zelltod von retinalen Ganglienzellen eingeleitet werden [90]. Substanzen, die in Formations- und Aggregationswege von A β eingreifen, können umgekehrt in vivo den glaukomatösen Verlust retinaler Ganglienzellen reduzieren [90].

Es gibt eine große Nachfrage nach Biomarkern aus gut zugänglichen, noninvasiv entnehmbaren Körperflüssigkeiten. Erste proteomische Studien konnten im Tränen-Proteom von Patienten mit Multipler Sklerose potenzielle Biomarker für die Erkrankung identifizieren [94]. Auch bei psychiatrischen Erkrankungen wie der Depression konnte eine Assoziation zur Keratokonjunktivitis sicca, dem Syndrom des trockenen Auges, bereits vielfach hergestellt werden [95-97]. Die Untersuchung des Tränen-Proteoms bei Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen könnte deshalb in Zukunft potenziell noninvasiv-verfügbare Biomarker liefern. Bisher konnten einige Studien Hinweise liefern, dass das Auge als Objekt wissenschaftlichen Interesses gute translationale Eigenschaften für Erkrankungen des ZNS und für psychiatrische Erkrankungen zeigt.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Geräte

Biofuge primo R	Heraeus, Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany
Intelli Mixer	neoLab, Heidelberg, Germany
Heizblock KTMR133	Haep Labor Consult, HPL, Germany
LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK31, Berlin, Germany

Verbrauchsmaterial

well cell culture cluster, v-bottom,	Greiner bio-one, Frickenhausen
96 well cell culture cluster	Costar 3595, Corning Incorporated
Eppendorf 0,5, 1,5, 2,0 ml Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Germany
Bio-one, pp-Röhrchen, 15 ml	Greiner, Frickenhausen, Germany
Abdeckfolie PCR, selbstklebend,PP	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
NuPage 4-12 % Bis-Tris Gel, 10 Wells	Novex, life technologies, Carlsbad, CA, USA
Novex [®] Colloidal Blue Staining Kit, (Stainer A, Stainer B)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
C18 ZipTips [®] . Millipore,	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien

Acetonitril (ACN) LC-MS grade	AppliChem GmbH Darmstadt Deutschland
Ameisensäure LC-MS grade	AppliChem GmbH Darmstadt Deutschland
Ammoniumbicarbonat	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim
Antioxidant	NuPage novex life technologies Carlsbad, CA, USA
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH+CoKG Karlsruhe DE
HPLC-Wasser,	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
MOPS-Buffer,	NuPage novex life technologies, Carlsbad, CA, USA
Methanol LC-MS	AppliChem GmbH Darmstadt Deutschland
NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies Carlsbad CA USA
NuPage Reducing Agent (10x)	Novex life technologies Carlsbad CA USA
Seebule Plus2 Prestained Standard	Invitrogen AG Carlsbad Kalifornien USA
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Trypsin (EC: 3.4.21.4, Serinprotease)	Promega Madison WI 53711 USA
Water LC-MS grade	AppliChem GmbH Darmstadt Deutschland

Software:

Microsoft Excel 2019	Microsoft Cooperation ©, Redmond, USA
Microsoft Word 2019	Microsoft Cooperation ©, Redmond, USA
Endnote X9	Thomson Reuters, New York City, NY
Ingenuity Pathway Analysis Software	Qiagen, Germantown, USA
MaxQuant 1.6.1.16	Max Planck Institute of Biochemistry (Cox und Mann 2008)

3.2 Studienproben

Die Studienproben entstammen von zwei Mausmodellen, bei denen jeweils CSF gewonnen wurde. Die gewonnenen Proben wurden in dieser Arbeit anschließend mittels MS-Verfahren untersucht, um die Proteine der Proben zu identifizieren und zu analysieren. Die Mausexperimente, von denen die untersuchten Proben stammen, wurden von verschiedenen Wissenschaftlern unter der Leitung von, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Sektion translationale Psychiatrie der Universitätsmedizin Mainz, durchgeführt. Alle Experimente liefen dabei in Übereinstimmung mit der europäischen Richtlinie 2010/63/EU für Tierexperimente ab und wurden vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz, Deutschland, genehmigt.

3.2.1 Chronischer sozialer Stress (CSD)

CSD ist ein gängiges Stressmodell, das mit Nagetieren durchgeführt wird. Aufgrund der guten translationalen Aussagekraft eignet es sich für die Erkrankung der Depression [21]. Dies zeigt sich dadurch, dass die Mäuse zum Beispiel Verhaltensweisen und physiologische Veränderungen entwickeln, die an das Krankheitsbild der Depression und der Angststörung erinnern [20]. Dieser Teil der Studie wurde durchgeführt von. Zusammenfassend wurden männliche Mäuse (C57Bl/6J) für 10 Sekunden mit verschiedenen männlichen, aggressiven Mäusen (CD-1 Mäuse) in deren Heimat-Käfig konfrontiert. Die Konfrontationen mit den aggressiven Mäusen wurden dreimal pro Tag für zehn aufeinanderfolgende Tage wiederholt. Um physischen Kontakt vor und nach jeder Konfrontation zu verhindern, wurde jeweils eine Trennwand installiert. Für die Kontrollgruppe wurden die Mäuse in neue, leere Käfige gesetzt, anstatt in die Käfige der aggressiven CD-1 Mäuse.

Um stressinduzierte Veränderungen der Mäuse durch das CSD-Modell zu validieren, wurde in einem Interaktionstest die Zeit gemessen, die die Mäuse in sozialer Interaktion mit einer unbekanntem Maus verbringen. Eine im Vergleich zu den Kontrollmäusen reduzierte Interaktionszeit konnte die erfolgreichen Auswirkungen des CSD-Modells zeigen (unpublizierte Daten, Perumal *et al.*). Reduziertes Sozialverhalten kennzeichnet das depressions-ähnliche Verhalten, welches durch das CSD-Modell erzeugt werden kann [18]. Zudem wurden bei den Mäusen, die CSD-Stress erfahren hatten, gesteigerte periphere Glukose-Werte nachgewiesen, wodurch das CSD-Modell zusätzlich erfolgreich validiert werden konnte (unpublizierte Daten, Perumal *et al.*).

Für die Probeentnahme wurde ein Verfahren verwendet, das auf Onaivi et al. basiert [73]. Es ermöglicht in der lebenden Maus mehrere CSF-Entnahmen hintereinander. So können mögliche dynamische Veränderungen in der CSF-Proteinzusammensetzung detektiert werden [73]. In diesem minimalinvasiven Operationsverfahren kann ein Zielobjekt mittels dreidimensionaler, stereotaktischer Koordinaten im Körper platziert werden. Zusammenfassend wurde in der Stereotaxie-Operation eine Kanüle in den seitlichen Hirnventrikel der Mäuse platziert und in dieser Position mittels Dentalzement fixiert. Über diese Kanüle konnte, im Anschluss an das CSD-Modell, zweimal pro Maus CSF entnommen werden. Dabei konnten, in Schritten von 1 µl pro Minute, pro Entnahme 5-12µl CSF gewonnen werden. Die gewonnenen CSF-Proben wurden visuell auf Blut-Kontamination untersucht und falls nötig ausgeschlossen. Die Proben dreier Maus-Individuen wurden zusammengefügt (gepoolt), um den Proteingehalt zu erhöhen, und auf jeweils 42µl pro biologischem Replikat standardisiert. So entstanden jeweils drei biologische Replikate für die CTRL- und die CSD-Gruppe wie in Tabelle 2 dargestellt. Eine Zusammenfassung des zeitlichen Ablaufs des CSD-Experiments ist in Abbildung 5 dargestellt.

Tabelle 2: Vereinfachte Darstellung der Standardisierung der CSF-Proben im CSD-Experiment.

Gruppe	Gesamtvolumen CSF (µl) pro biologischem Replikat (N = 3)	Standardisiertes Gesamtvolumen CSF (µl) pro biologischem Replikat (N = 3)
CTRL_R1_1 (N=3)	42	42
CTRL_R2_1 (N=3)	46	42
CTRL_R3_1 (N=3)	46	42
CSD_R1_1 (N=3)	42	42
CSD_R2_1 (N=3)	46	42
CSD_R3_1 (N=3)	46	42

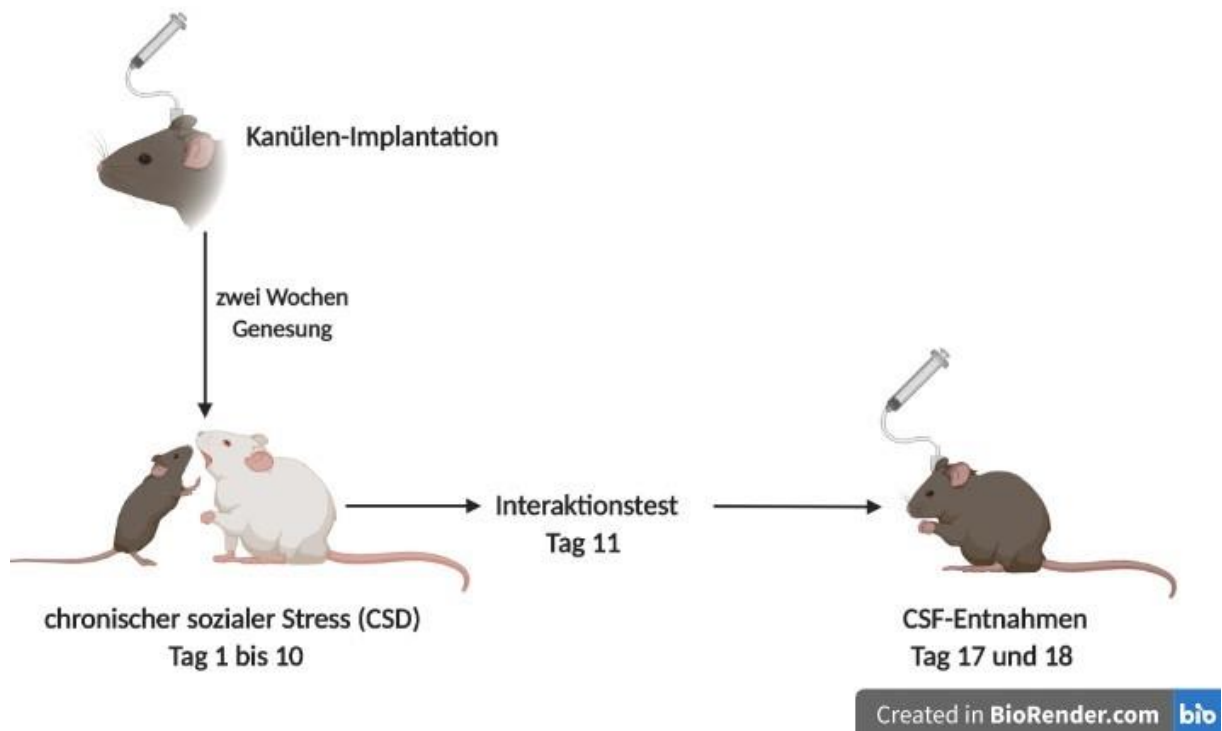


Abbildung 5: Übersicht über das CSD-Experiment. Nach der Kanülen-Implantation erfolgte eine zweiwöchige Phase der Genesung. Der chronische soziale Stress wurde an Tag 1 bis 10 ausgeübt. An Tag 11 erfolgte der Interaktionstest zur Validierung. An den Tagen 17 und 18 erfolgten jeweils CSF-Entnahmen.

3.2.2 (2R,6R)-Hydroxynorketamin (HNK)-Gabe

Jüngste Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass HNK, ein Metabolit von Ketamin, verantwortlich für die antidepressiven Effekte von Ketamin sei, ohne die mit Ketamin verbundenen Nebenwirkungen hervorzurufen [34]. Um das Wissen über die Effekte von HNK zu erweitern, wurde es Mäusen verabreicht, um Veränderungen der Proteinzusammensetzung in CSF zu identifizieren. Das HNK-Gabe Modell wurde durchgeführt. Es wurden hierfür männliche Mäuse (DBA/2J) verwendet. Für diesen Mausstamm ist ein erhöhtes Angstlevel charakteristisch, weswegen sie häufig in Studien verwendet werden, die affektive Störungen wie die Depression erforschen [98, 99]. Bei diesem Mausstamm konnte zudem bereits ein Ansprechen auf klassische Antidepressiva nachgewiesen werden [99]. Durch die Verwendung der DBA/2J Mäuse, bei denen bereits depressions-ähnliches Verhalten angeboren ist, muss kein zusätzliches Mausmodell zum Induzieren von depressions-ähnlichem Verhalten verwendet werden. Dadurch werden potenzielle zusätzliche Einflussfaktoren reduziert [98].

Im Vorfeld wurde im Schwimmtest zur Validierung die Antidepressiva-ähnliche Wirkung von HNK sowie Ketamin bestätigt, da die Mäuse ein reduziertes Immobilitätsverhalten bei HNK- bzw. Ketamin-Administration zeigten (unpublizierte Daten, Herzog *et al.*). Zudem konnten durch einen weiteren Test Ketamin-bezogene Nebenwirkungen im Verhalten der Mäuse bei HNK-Administration im Vergleich zu Ketamin-Administration nicht nachgewiesen werden. In einem weiteren vorausgegangenen Experiment konnte außerdem durch Kortikosteron-Werte im Blutplasma bestätigt werden, dass die CSF-Entnahmemethode nicht wesentlich zum Stress der Tiere beigetragen hat (unpublizierte Daten, Herzog *et al.*).

Um neben den nachgewiesenen Verhaltensveränderungen Proteinveränderungen in CSF nach HNK-Administration zu detektieren, wurde eine stereotaktische Operation durchgeführt. Hierbei wurde den Mäusen eine Kanüle intraventrikulär platziert, wie in 3.2.1. beschrieben. Die intraventrikuläre Platzierung der Kanüle ermöglicht ein longitudinales Studiendesign mit mehreren CSF-Entnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten bei der lebendigen Maus. Nachdem sich die Mäuse mehrere Tage von der Operation erholt hatten, erfolgte die intraperitoneale Injektion von HNK (10 mg/kg BW) für die HNK-Gruppe. Für die Kontrollgruppe (Saline/SAL) erfolgte die Injektion von 0,9%iger Kochsalzlösung. Um die akuten und länger anhaltenden Auswirkungen der HNK-Administration zu untersuchen, wurden vier Stunden (4h) und eine Woche (1w) nach Injektion von HNK bzw. Kochsalzlösung CSF-Entnahmen durchgeführt. Ein Überblick über den Ablauf des HNK-Experiments ist in Abbildung 6 dargestellt. Anschließend erfolgte auch hier eine visuelle Inspektion auf Blutkontamination mit etwaigem Ausschluss. Die gewonnenen Proben wurden in Gruppen von drei biologischen Replikaten (N=7-10) zusammengefasst und das Volumen jeweils auf 40 µl standardisiert, wie der Tabelle 3 zu entnehmen ist. Die Proteine der CSF-Proben wurden anschließend in der vorliegenden „Discovery Proteomics“-Studie durch massenspektrometrische Verfahren analysiert.

Tabelle 3: Vereinfachte Darstellung der Standardisierung der CSF-Proben im HNK-Experiment.

Gruppe	Gesamtvolumen CSF (μl) pro biologischem Replikat (N=7-10)	Standardisiertes Gesamtvo- lumen CSF (μl) pro biologi- schem Replikat (N=7-10)
SAL_4h_R1 (N=8)	40	40
SAL_4h_R2 (N=7)	40	
SAL_4h_R3 (N=7)	41	
SAL_1w_R1 (N=8)	49	40
SAL_1w_R2 (N=8)	47	
SAL_1w_R3 (N=7)	46	
HNK_4h_R1 (N=9)	47	40
HNK_4h_R2 (N=8)	43	
HNK_4h_R3 (N=8)	42	
HNK_1w_R1 (N=10)	58	40
HNK_1w_R2 (N=9)	55	
HNK_1w_R3 (N=9)	53	

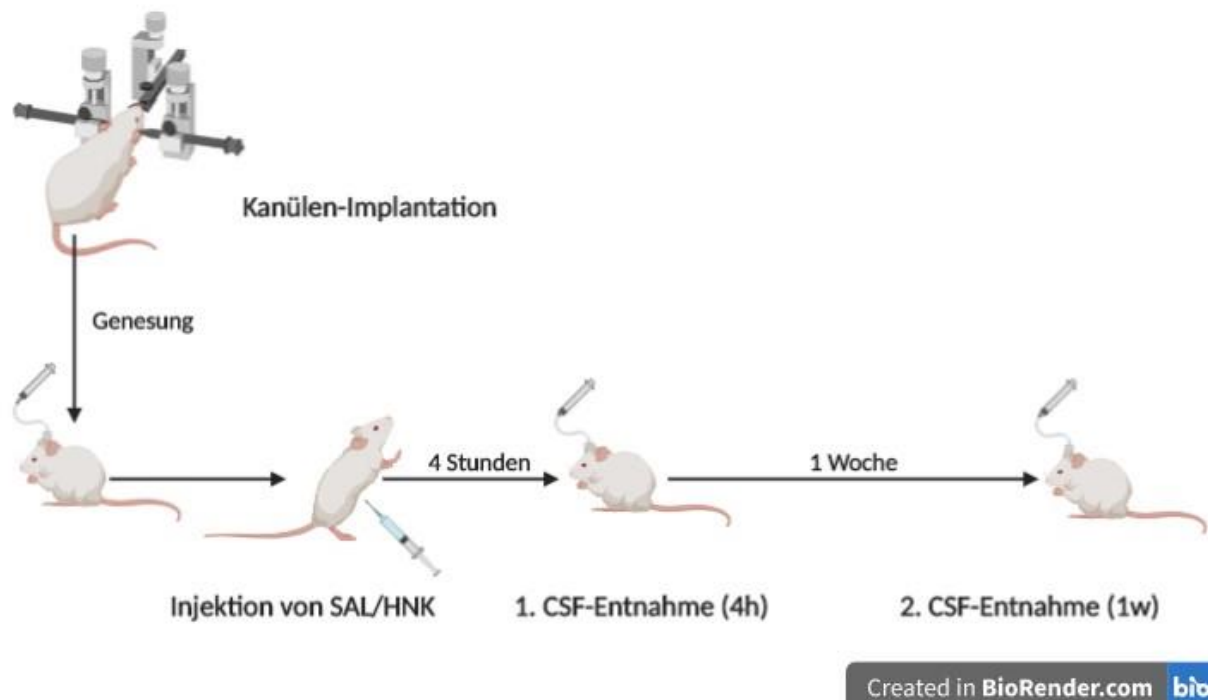


Abbildung 6: Übersicht über das HNK-Experiment. Nach der Kanülen-Implantation erfolgte eine Genesungsphase. Anschließend wurde SAL/HNK intraperitoneal injiziert. 4 Stunden und eine Woche nach der Injektion erfolgten die CSF-Entnahmen.

3.3 Proteomischer Workflow

Eine Übersicht des gesamten proteomischen Workflows ist in Abbildung 7 dargestellt. Zusammenfassend wurde nach dem Zusammenfügen und Standardisieren der Proben das Verfahren der eindimensionalen Gelelektrophorese (1DE) zur Präfraktionierung der Proteingemische genutzt. Nach In-Gel Verdau mit Trypsin und Aufreinigung der Proben erfolgte die massenspektrometrische Analyse mittels LC-ESI MS/MS-System. Durch *Label-free Quantification* (LFQ) fand eine Quantifizierung der identifizierten Proteine statt, mit nachfolgender statistischer Auswertung sowie Funktions- und Signalweganalyse.

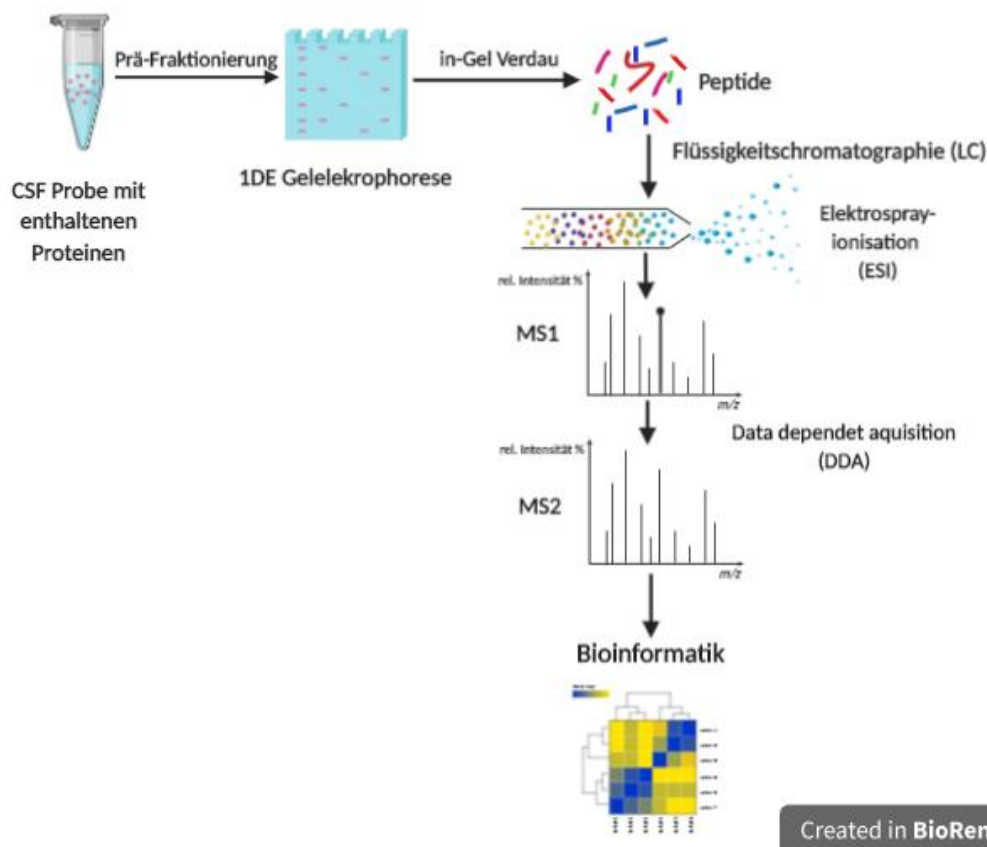


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung des proteomischen Workflows der vorliegenden „Discovery Proteomics“-Studie.

3.4 Eindimensionale Gelelektrophorese

Die Proteinkonzentration in humanem CSF beträgt physiologisch 15-45 mg/dl [45], wobei Albumin dabei mit ca. 50% den Hauptteil ausmacht [47]. Um trotz des sehr geringen Proteingehalts der Probe Proteine differenzieren und identifizieren zu können, ist die Verwendung modernster MS-Systeme mit hoher Messsensitivität obligat. Des Weiteren empfiehlt sich eine vorherige Fraktionierung des Proteingemischs um Überlagerungseffekte von sehr abundanten Proteinen wie Albumin zu vermeiden [79]. Wäre

dies nicht der Fall, so würden Signale von sehr gering enthaltenen Proteinen, die potenziell als Biomarker dienen können, von den Signalen sehr abundanter Proteine überlagert [79]. Das Verfahren der Eindimensionalen Gelelektrophorese ist hilfreich, um dieses Problem zu umgehen und das Proteingemisch im Vorfeld aufzutrennen [79]. Dabei wandern die Proteine in einem Polyacrylamid-Gel entlang eines elektrischen Feldes und werden aufgrund ihrer Massenunterschiede aufgetrennt und anschließend sichtbar gemacht. Mit den Proben der beiden Mausexperimente wurde hierbei gleich verfahren. Vorgeschnittene NuPAGE 4-12% Bis-Tris 10-well mini Protein Gele (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) wurden mit den Proben bestückt. Anschließend versah man das Gel mit einem vorgefärbten Protein-Standard (SeeBlue Plus 2, invitrogen, Karlsruhe, Germany) als molekularer Massemarker in der ersten Gel-Tasche. Das Gel wurde unter reduzierenden Bedingungen mit 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MOPS) Laufpuffer für eine Stunde bei 4 °C und konstant 150V laufen gelassen. Durch das Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) wurden die Gele nach Herstellerangaben gefärbt.

3.5 In-Gel Trypsin-Verdau

Der In-Gel Verdau dient dazu, aus den im Gel vorhandenen Proteinen kleinere Peptide herzustellen, die anschließend dem Massenspektrometer zur Identifikation der Proteine dienen. Der tryptische Verdau von Proteinen in einem Gel ist ein gut etabliertes und bereits vielfach beschriebenes Verfahren [100-102]. Prinzipiell besteht der In-Gel Verdau aus vier Schritten: Entfärbung, Reduktion und Alkylierung der Cysteine, proteolytische Spaltung und Extraktion der entstandenen Peptide. Zunächst wurden die durch den Färbeschritt sichtbar gemachten Proteine pro Replikate (Zeile) im CSD-Experiment in 14 Banden geschnitten. Mit den Proben der beiden Mausversuche wurde weitestgehend gleich verfahren, im HNK-Modell wurden hier jedoch 15 Banden pro Replikate geschnitten. Die geschnittenen Gel-Banden wurden zerkleinert und mit 100mM Ammoniumbicarbonat/Acetonitril (1:1, v/v) entfärbt. Die Entfärbelösung musste hierzu ca. 30 Minuten einwirken und die Proben gelegentlich geschüttelt werden. Die Lösung wurde anschließend verworfen. Um ein weiteres Auffalten der Tertiärstruktur der Proteine zu erzielen, wurde zur Reduzierung der Disulfidbrücken Dithiothreitol-Lösung (10mM DTT in Wasser) hinzugefügt und für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert. Der Überstand wurde dann verworfen. Zur Alkylierung der entstandenen SH-Gruppen der Cysteine wurde zu den Proben Iodacetamid-Lösung (55mM Iodacetamid (IAA) in 100mM Ammoniumbicarbonat) hinzugegeben, wodurch die Cysteine in das

stabilere S-Carboxyamidomethylcystein überführt wurden. Die IAA-Lösung wurde mit den Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert und der Überstand anschließend verworfen. Um ein besseres Eindringen der Trypsin-Lösung in die Gelstücke zu gewährleisten, wurden die Gelstücke jetzt mit Acetonitrillösung für ca. 10 Minuten dehydriert. Die Lösung wurde anschließend entfernt und die Gelstücke für einige Zeit unter der Abzugshaube getrocknet. Um die Proteine nun enzymatisch in kleinere Peptide zu spalten, wurde den Proben Trypsin hinzugefügt. Die Serinprotease Trypsin spaltet die Proteine an charakteristischen Stellen und erzeugt so Peptide mit charakteristischen Schnittenden. Für den Trypsinpuffer wurden 1,5 ml einer Lösung aus 10mM Ammoniumbicarbonat mit 10% (v/v) Acetonitril zum Auflösen von 20 µg Trypsin verwendet. Zu den Proben wurde jeweils so viel Trypsinpuffer hinzugegeben, dass sie vollständig bedeckt waren. Die Proben wurden für 16 Stunden mit dem Trypsinpuffer bei 37°C inkubiert. Der Verdauungsprozess wurde durch die Hinzugabe von Extraktionspuffer (1:2 (v/v) 5% Ameisensäure/Acetonitril) gestoppt und die entstandenen Peptide in den Gelstücken wurden durch Einwirken des Extraktionspuffers für 60 Minuten auf einem Schüttelgerät herausgelöst. Der Überstand mit den enthaltenen Peptiden wurde nachfolgend in einem Vakuumkonzentrator eingetrocknet und bei – 80°C aufbewahrt.

Vor der MS-Analyse wurden die Proben wieder in Trifluoressigsäure-Lösung (0,1% TFA) verflüssigt und mittels ZipTip C18 Pipettenspitzen (Millipore, Billerica, MA, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Hierbei werden Salze und andere Schadstoffe zuverlässig entfernt, um die Reinheit der Probe zu garantieren und das sensible MS-System nicht zu behindern. Hierbei binden die vorhandenen Peptide an C18-Kohlenstoffketten, die sich auf der Oberfläche von Silikatkügelchen in der Pipettenspitze befinden. Nach mehreren Waschvorgängen in denen die Salze entfernt werden, können die Peptide durch Acetonitril eluiert werden. Die Aufreinigung mittels ZipTip Pipettenspitzen wurde viermal pro Probe wiederholt. Die Eluate wurden im Vakuumkonzentrator nochmals eingetrocknet und bei -20°C aufbewahrt. Vor der MS-Analyse wurden die Proben wieder in 0,1% TFA Lösung verflüssigt.

3.6 LC-ESI MS/MS

Das Flüssigkeitschromatographie (LC)- ESI MS/MS System, das in diesem Experiment zum Einsatz kommt, wurde bereits umfassend in unserem Labor optimiert [101, 103]. Durch das LC-Verfahren werden die Peptide vor ihrer Analyse im

Massenspektrometer fraktioniert. Das LC-System besteht aus einer Rheos Allegro Pumpe (Thermo Scientific, Rockford, USA) und einem HTS PAL Autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Er enthält eine BioBasic C18, 30 x 0.5 mm Vorsäule, die verbunden ist mit einer BioBasic C18, 150 x 0.5 mm analytischen Hauptsäule (Thermo Scientific, Rockford, USA). Lösungsmittel A bestand aus Wasser mit 0,1% (v/v) Ameisensäure und Lösungsmittel B aus Acetonitril mit 0,1% (v/v) Ameisensäure. Der resultierende Gradient der beiden Lösungen hatte pro Probe eine 60 minütige Laufdauer mit folgenden Konzentrationen: 0-35 min: 15-40 % B, 35-40 min: 40-60 % B, 40-45 min: 60-90 % B, 45-50 min: 90 % B, 50-53 min: 90-10 % B: 53-60 min: 10 % B. Diese lange Laufdauer des Gradienten wurde gewählt, um eine gute Fraktionierung zu gewährleisten und um die Komplexität der Probe während der Datenerfassung zu reduzieren.

Die Generierung der MS-Daten erfolgte fortlaufend mittels ESI-LTQ Orbitrap XL-MS System (Thermo Scientific, Bremen, Germany) wie in 2.6 beschrieben. Die allgemeinen Parameter des MS-Systems wurden dabei wie folgt festgelegt: Elektrospray-Ionisation im positive-Ionen Modus, Spray-Spannung von 2.15 kV und die Temperatur der erhitzten Kapillare auf 220°C. Das System wurde im DDA-Modus betrieben und wechselte zwischen Orbitrap-MS und LTQ MS/MS während der Datenerfassung automatisch. Die *Survey full scan* MS-Spektren, die in der Orbitrap generiert wurden, variierten von m/z (Masse zu Ladung) 300 bis 1600 mit einer Auflösung von 30000 bei m/z 400 und einer *target automatic gain control* Einstellung von 1.0×10^6 Ionen. Die *lock mass* Option wurde im MS-Modus aktiviert und die interne Rekalibrierung wurde mit Polydimethylcyclsiloxane m/z 445.120025 Ionen in Echtzeit durchgeführt [104]. Tandem Daten wurden fortlaufend erfasst. Hierfür wurden die Top fünf Vorläufer-Ionen sequenziell für die Fragmentierung mittels *Collision-induced dissociation* (CID) isoliert und die fragmentierten Ionen anschließend in der LTQ erfasst. Die dafür genutzten Parameter waren: *Normalized collision energy* (NCE): 35 %, Aktivierungszeit: 30 ms, *Repeat counts*: 3, *Dynamic exclusion duration*: 600 s.

3.7 „Discovery Proteomics“- Strategie

Für die Proteinanalyse und *Label-free Quantification* wurde die MaxQuant Software Version 1.6.1.16 genutzt, mit der eingebauten Andromeda Suchmaschine für Peptid- und Proteinidentifikation [105]. Die neueste Versionen der Uniprot *Homo sapiens* (5. Februar 2018) und *Mus musculus* (3. Februar 2018) Datenbanken wurden herunter

geladen und in MaxQuant integriert, um das Ergebnis der Proteinidentifikationen zu maximieren. Die Tandem MS-Spektren wurden mit den Datenbanken abgeglichen unter Verwendung der Standardeinstellungen mit einer *Peptide mass tolerance* von ± 20 ppm, *Fragment mass tolerance* von ± 0.5 Da, mit ≥ 6 *Amino acid residues* und *Unique plus razor peptides*, die zu einem Protein gehören, wurden ausgewählt. Die *False Discovery Rate* (FDR) für Peptid- und Proteinidentifikation betrug 0,01. Als festgelegte Modifikation wurde Carbamidomethylation von Cysteinen eingestellt, wobei N-terminale Acetylierung und Oxidation von Methionin als variable Modifikation festgelegt wurde. Das verwendete Enzym Trypsin wurde eingegeben und die maximale Anzahl von verpassten Trypsin-Spaltungen wurde auf 2 festgelegt. Das hervorgebrachte Ergebnis wurde als Datentabelle „proteingroups.txt“ gefiltert um Kontaminationen und entgegengesetzte Treffer vor der statistischen Analyse und Funktions- und Signalweg-Analyse zu entfernen.

3.8 Bioinformatik und Funktions- und Signalweganalyse

Für die statistische Auswertung wurde die Perseus Software Version 1.6.1.3 verwendet, welche für die statistische Analyse großer proteomischer Datensätze geeignet ist [106]. Alle LFQ Intensitäten wurden zuerst \log_2 transformiert um eine Normalverteilung mit erfassbareren Werten zu erzielen. Um den Grad der Variationen im Proteom zwischen den biologischen Replikaten und Gruppen zu vergleichen, wurde die Pearson's Korrelationsanalyse eingesetzt. Die Daten wurden dann gefiltert mit mindestens drei Werten in mindestens einer Gruppe und fehlende Werte wurden aus der Normalverteilung ersetzt (width, 0.3; down shift, 1.8). Um die signifikant unterschiedlich abundanten Proteine zwischen den Gruppen zu identifizieren, wurde der bilaterale Student's *t*-Test angewendet mit *p*-Werten < 0.05 . Durch Verwendung der *z*-scores der LFQ Intensitäten wurde von diesen signifikant unterschiedlich abundanten Proteinen eine nicht-überwachte, hierarchische Clusteranalyse erstellt, visualisiert durch eine Heatmap.

Anschließend wurde durch die Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software eine Funktions- und Signalweg-Analyse durchgeführt. Die Funktions- und Signalweg-Analyse dient dazu, Zelllokalisierung, molekulare Funktion, Protein-Protein-Interaktionen (PPI) und vorgeschaltete Regulatoren (*upstream regulators*) der regulierten Proteine herauszufinden [107]. Hierfür wurde eine Liste der identifizierten Proteine in Excel erstellt und die Gennamen der Proteine wurden in das IPA Programm eingespeist. Zunächst

wurde eine vergleichende Analyse unter Verwendung der beiden verschiedenen Datenbanken durchgeführt, um relevante identifizierte Signalwege, Erkrankungen und biologische Funktionen zu beleuchten. Nachfolgend wurden in einem PPI-Netzwerk funktionelle Klassen der signifikant unterschiedlich abundanten Proteine des CSD-HNK-Experiments visualisiert. Dabei stellen unterschiedliche Formen der Punkte, die Proteine darstellen, unterschiedliche funktionelle Klassen von Proteinen dar. Die Proteine sind jeweils durch ihren Gennamen vertreten. Die Farbe dieser Punkte, ob rot oder grün, zeigt ein erhöhtes oder erniedrigtes Vorkommen des jeweiligen Proteins an. Die Proteine wurden anschließend noch aufgrund ihrer unterschiedlichen Zelllokalisierung angeordnet. Hierbei stellen die Linien zwischen Proteinen direkte oder indirekte Interaktionen dar. Die top anerkannten Signalwege, Erkrankungen und biologischen Funktionen der signifikant unterschiedlich abundanten Proteine wurden durch p -Werte aufgezeigt die durch *Benjamini-Hochberg multiple testing correction* ($-\log B-H > 1.3$) errechnet wurden. Mittels IPA-Software wurden zudem die vorgeschalteten Regulatoren (*upstream regulators*) identifiziert, um Moleküle und Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die signifikant in der Regulation der unterschiedlich abundanten Proteine involviert sind.

4 Ergebnisse

Aufgrund dessen, dass die Proben zweier verschiedener Mausmodelle in dieser Studie analysiert wurden, sind die Ergebnisse in verschiedene Abschnitte gegliedert. Zunächst werden die „Discovery-Proteomics“ Ergebnisse beider Mausmodelle beleuchtet. Anschließend werden die weiteren Ergebnisse des CSD-Experiments und des HNK-Experiments nacheinander aufgeführt und Ergebnisse der Funktions- und Signalweganalyse dargelegt.

4.1 Charakterisierung des Maus-CSF Proteoms

In der „Discovery Proteomics“- Phase wurde mittels MS-Methoden das gesamte CSF-Proteom der gewonnenen Maus-Proben aus den beiden Experimenten umfangreich untersucht. Insgesamt konnten durch Verwendung der *Mus musculus* und *Homo sapiens* Datenbanken mittels MS-Methoden eine Gesamtzahl von 462 Proteinen in Maus-CSF beider Mausmodelle identifiziert werden (FDR 1%). Die Liste aller identifizierten CSF-Proteine aus dieser Studie ist im Anhang zu sehen. Von den 462 CSF-Proteinen konnten 177 Proteine (ca. 38%) in beiden Mausmodellen identifiziert werden, wie im Venn-Diagramm in Abbildung 8 zu sehen. Die Mehrheit von 210 CSF-Proteinen wurde ausschließlich im HNK-Experiment festgestellt.

Dabei wurden im CSD-Experiment durch die MaxQuant-Software unter Verwendung der *Homo sapiens* und *Mus musculus* Datenbanken eine Gesamtzahl von 254 unterschiedlichen Proteinen (FDR 1%) identifiziert. Eine Gesamtzahl von 195 Proteinen konnte durch die Verwendung der *Mus musculus* Datenbank identifiziert werden, mit einer Überlappung von 83 Proteinen, die ebenso durch die *Homo sapiens* Datenbank identifiziert wurden, wie im Venn-Diagramm in Abbildung 9 (A) zu sehen. Hier ist die Verteilung der identifizierten Proteine durch die beiden unterschiedlichen Datenbanken dargestellt. 57 Proteine konnten ausschließlich mit der *Homo sapiens* Datenbank identifiziert werden, wodurch sich durch Inkludieren der *Homo sapiens* Datenbank eine Maximierung der Gesamtzahl der identifizierten Proteine ergibt.

Im HNK-Experiment wurde im Rahmen der „Discovery-Proteomics“-Strategie mittels MaxQuant Software unter Verwendung der *Mus musculus* (309 Proteine) und *Homo sapiens* (229 Proteine) Datenbanken und einer *False Discovery Rate* von 1% insgesamt 387 CSF-Proteine identifiziert. Zwischen den Datenbanken herrschte eine Überlappung von nur 151 Proteinen (ca. 39%), die in beiden Datenbanken identifiziert

werden konnten, wie dem Venn-Diagramm in Abbildung 9 (B) entnommen werden kann. Hierdurch wird die Diskrepanz der annotierten Proteine der Datenbanken erkenntlich. Insgesamt 78 Proteine konnten ausschließlich durch die *Homo sapiens* Datenbank identifiziert werden, sowie 158 Proteine ausschließlich durch die *Mus musculus* Datenbank.

In Abbildung 10 ist unter Verwendung der *Mus musculus* Datenbank und mit Hilfe der LFQ-Intensitäten der Anteil der 15 am meisten abundanten Proteine am gesamten CSF-Proteom im CSD-Experiment dargestellt. Das Protein Serum Albumin (Alb) allein macht ca. 44% des gesamten Proteoms aus. Zweit- und drittgrößten Anteil am CSF-Proteom haben die Proteine Hemoglobin subunit beta-1 (Hbb-1) und Hemoglobin subunit alpha (Hba) mit ca. 19% bzw. 13%. Die übrigen 180 Proteine, die nicht zu den 15 am meisten abundanten Proteine im CSF-Proteom gehören, repräsentieren nur etwa 9% des gesamten CSF-Proteoms. Somit sind ca. 91% des gesamten CSF-Proteoms nur durch die 15 am meisten abundanten CSF-Proteine repräsentiert.

Der Anteil der 15 am meisten abundanten Proteine am gesamten CSF-Proteom des HNK-Experiments ist in Abbildung 11 dargestellt. Hierbei wurden die *Mus musculus* Datenbank und die LFQ-Intensitäten aus dem HNK-Experiment verwendet. HBB-1 und ALB repräsentieren bereits jeweils ca. 27% des gesamten CSF-Proteoms. HBA, welches am dritthäufigsten abundant ist, repräsentiert ca. 17% des gesamten Proteoms. Alle anderen 294 identifizierten Proteine, die nicht zu den 15 am meisten abundanten Proteinen gehören, repräsentieren nur ca. 5% des gesamten CSF-Proteoms. 95% des CSF-Proteoms werden somit durch die 15 am meisten abundanten CSF-Proteine repräsentiert. In Abbildung 12 sind die Gesamtintensitäten der 15 am meisten abundanten CSF-Proteine unter Verwendung der *Mus musculus* Datenbank der beiden Mausmodelle gegenübergestellt. Alb, Hbb-1, und Hba nehmen dabei zusammen ca. 75% des gesamten CSF-Proteoms im CSD-Experiment und ca. 79% des gesamten CSF-Proteoms im HNK-Experiment ein.

In einer vergleichenden Analyse mittels IPA-Software wurden die relevantesten Signalwege, Erkrankungen und biologischen Funktionen der Proteine, die mittels verschiedener Datenbanken identifiziert wurden, durch *p*-Werte aufgezeigt, welche durch *Benjamini-Hochberg (B-H) multiple testing correction* ($-\log B-H > 1.3$) errechnet wurden. Hierdurch zeigt sich, wie in Abbildung 13 zu sehen, dass bestimmte relevante Signalwege nur unter Verwendung einer bestimmten Datenbank durch hohe *p*-Werte

repräsentiert werden. Beispielsweise ist der *FXR/RXR-Activation*-Signalweg lediglich durch die Verwendung der *Mus musculus* Datenbank ein relevanter Signalweg in CSD oder HNK. Zum anderen zeigt sich, dass beispielsweise mitochondriale Dysfunktion (*Mitochondrial Dysfunction*) nur im HNK-Experiment unter den Top 5 relevantesten Signalwegen vorkommt. In Abbildung 14 sind die identifizierten Erkrankungen und biologischen Funktionen unter Verwendung der beiden Datenbanken vergleichend dargestellt. Unter den relevantesten Erkrankungen und biologischen Funktionen befinden sich interessanterweise auch progrediente neurologische Erkrankungen (*Progressive neurological disorder*), Alzheimer Erkrankung (*Alzheimer disease*) und Entzündungsreaktion (*Inflammatory response*).

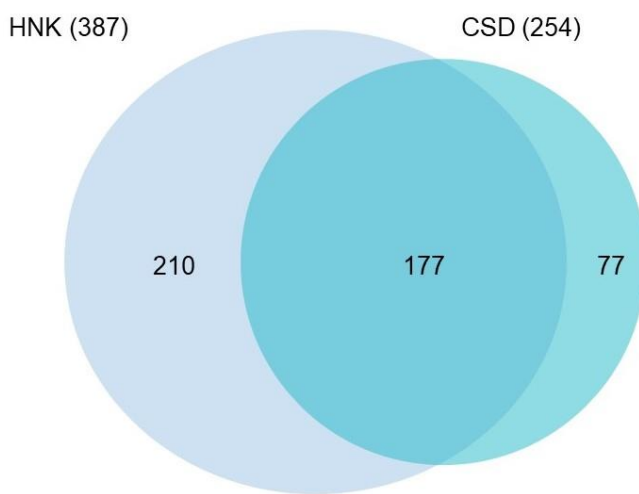


Abbildung 8 Venn-Diagramm zur Darstellung der Gesamtzahlen identifizierter CSF-Proteine aus dem CSD- und HNK-Experiment. Insgesamt wurden 462 CSF-Proteine in beiden Mausmodellen gemeinsam identifiziert.

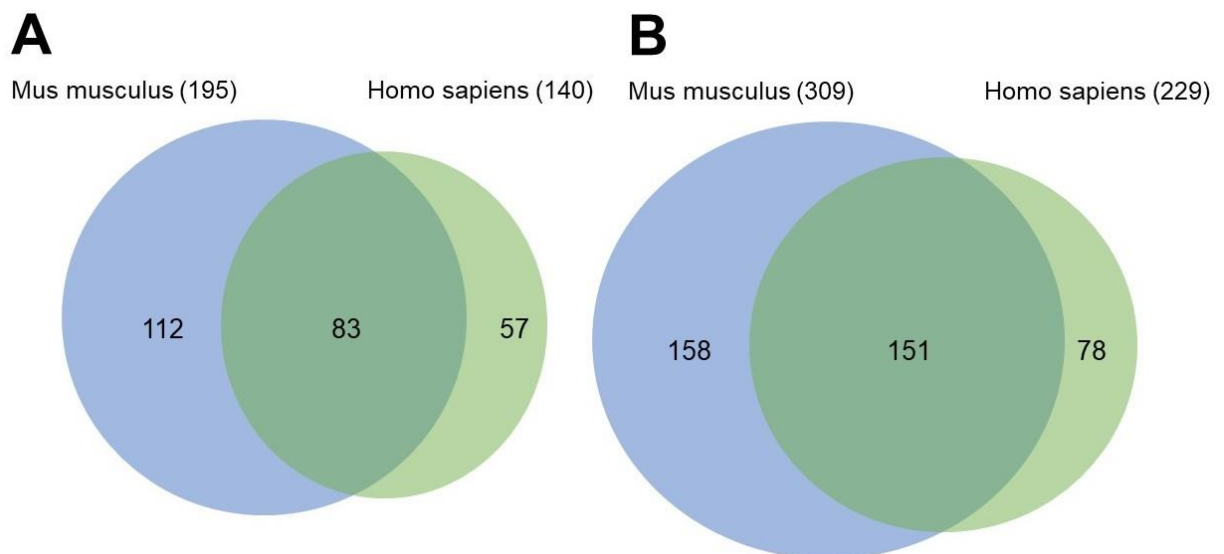


Abbildung 9: Venn-Diagramm zur Darstellung der identifizierten Proteine mittels verschiedener Datenbanken im CSD-Experiment (A) und HNK-Experiment (B).

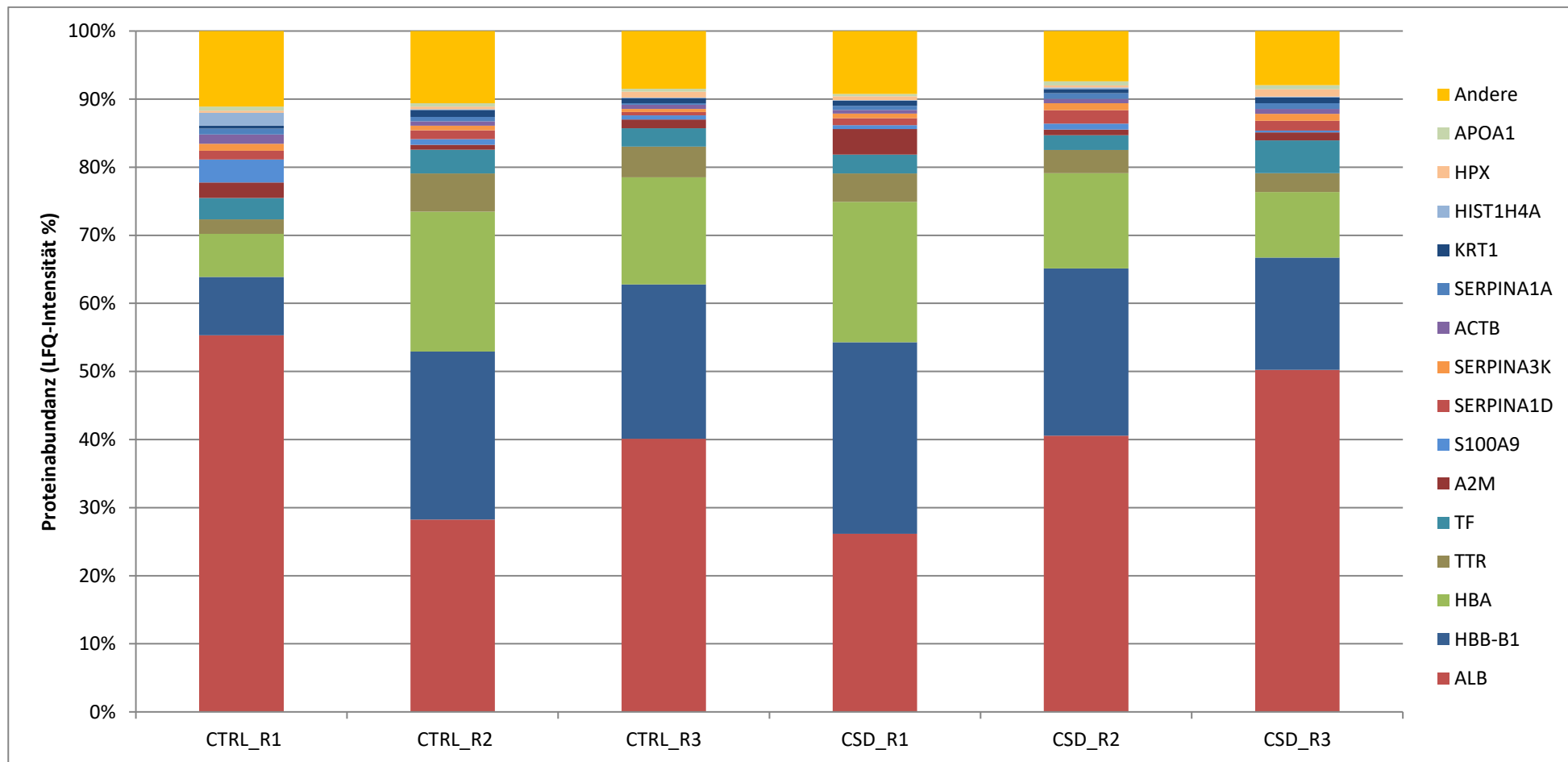


Abbildung 10: Übersicht der 15 am meisten abundanten CSF-Proteine unter Verwendung der Mus musculus Datenbank aus dem CSD-Experiment. Bei der Erstellung des Diagramms wurden die LFQ-Intensitäten aus der MaxQuant-Analyse verwendet.

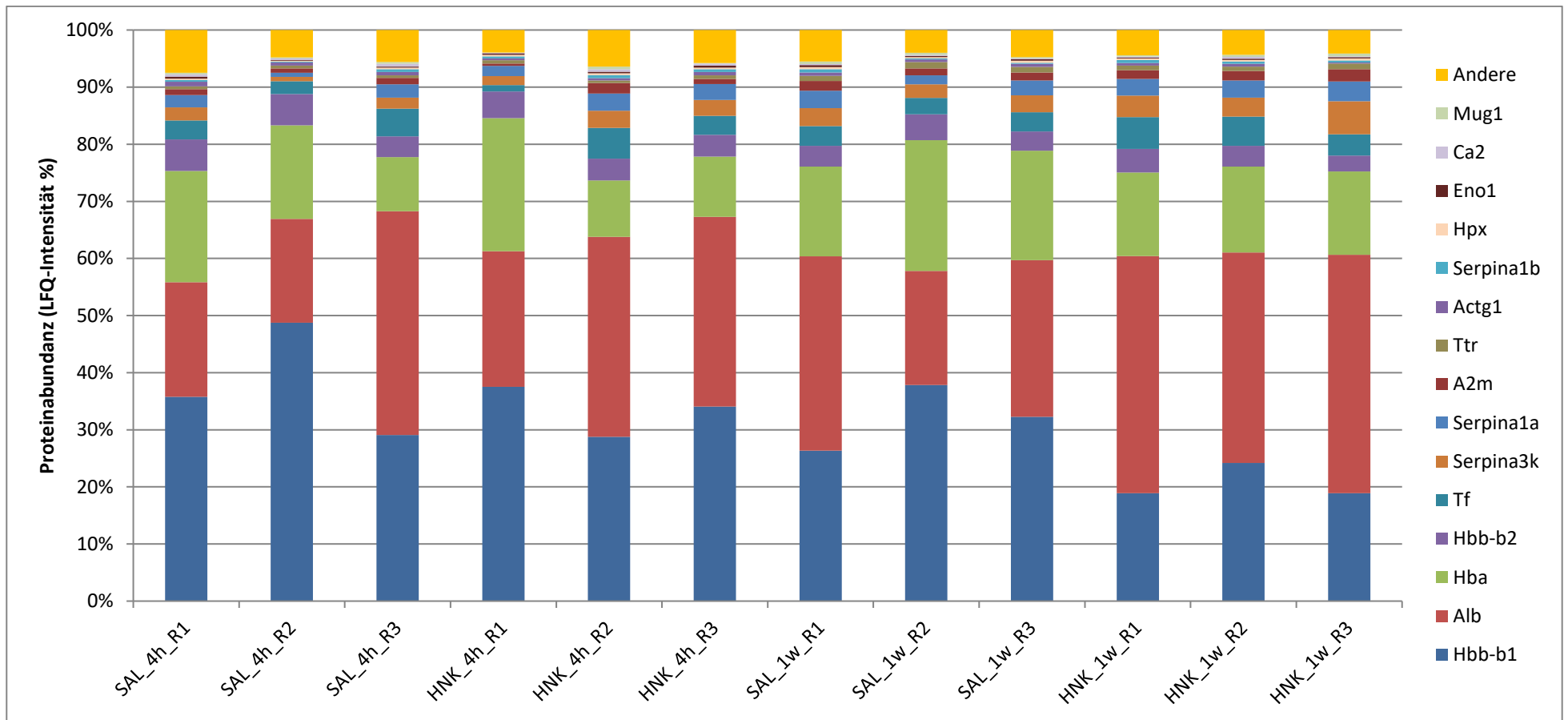


Abbildung 11: Übersicht der 15 am meisten abundanten CSF-Proteine unter Verwendung der Mus musculus Datenbank aus dem HNK-Experiment. Bei der Erstellung des Diagramms wurden die LFQ-Intensitäten aus der MaxQuant-Analyse verwendet.

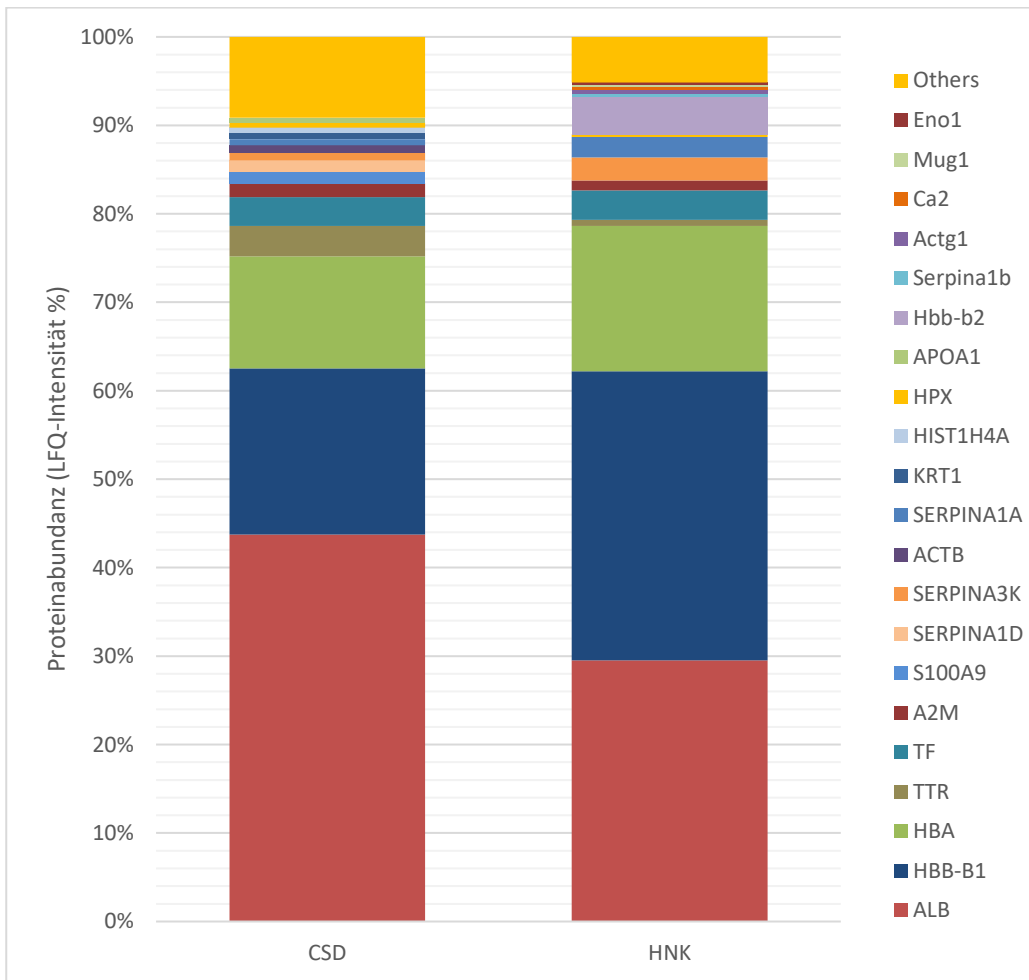


Abbildung 12: Vergleich der 15 am meisten abundanten CSF-Proteine im CSD- und HNK-Experiment unter Verwendung der Mus musculus Datenbank. Bei der Erstellung des Diagramms wurden die LFQ-Intensitäten aus der MaxQuant-Analyse verwendet.

Identifizierte Signalwege

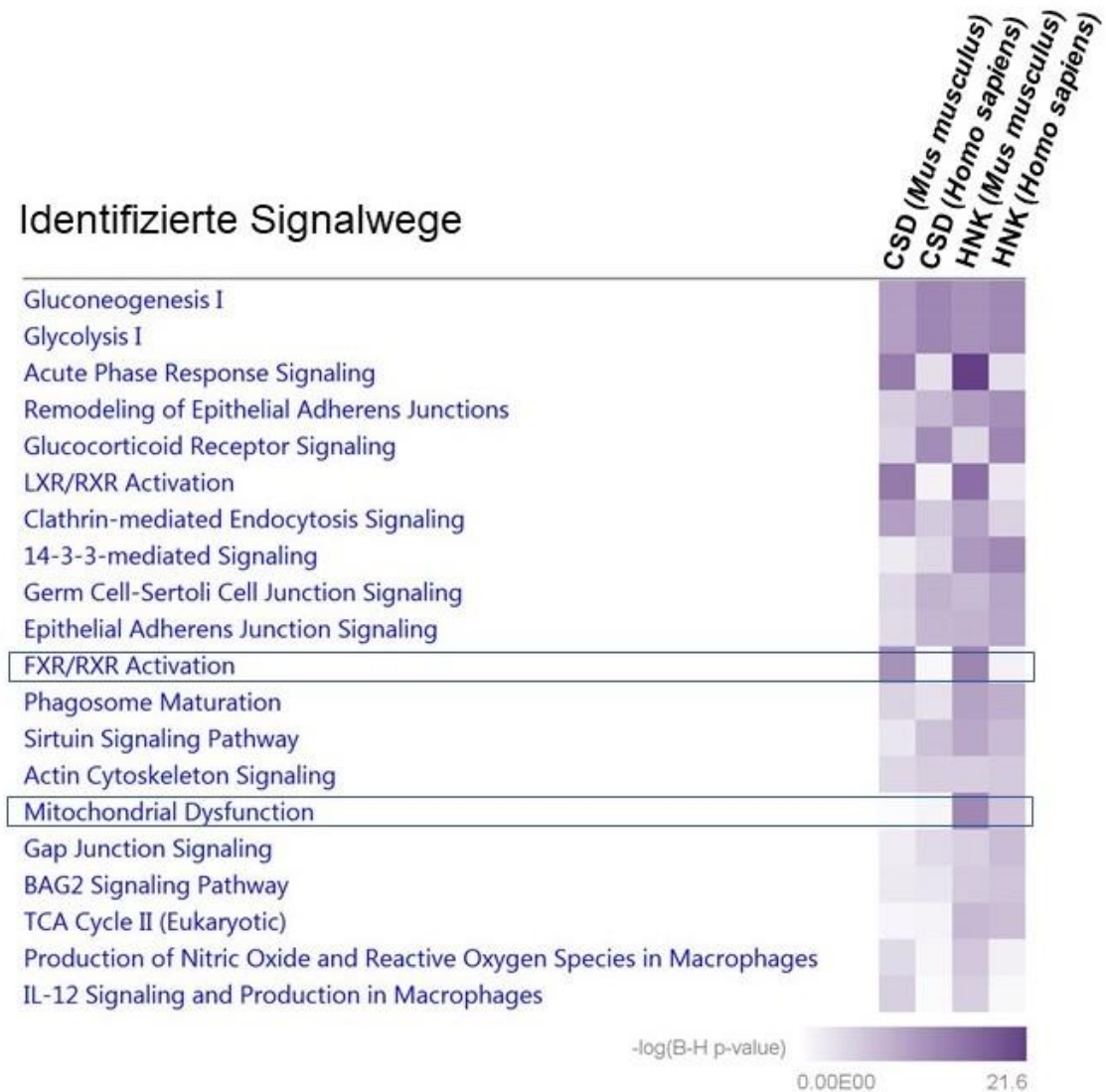


Abbildung 13: Identifizierte Signalwege (*canonical pathways*) des CSD- und HNK-Experiments unter Verwendung der beiden Datenbanken *Mus musculus* und *Homo sapiens*.

Erkrankungen und biologische Funktionen

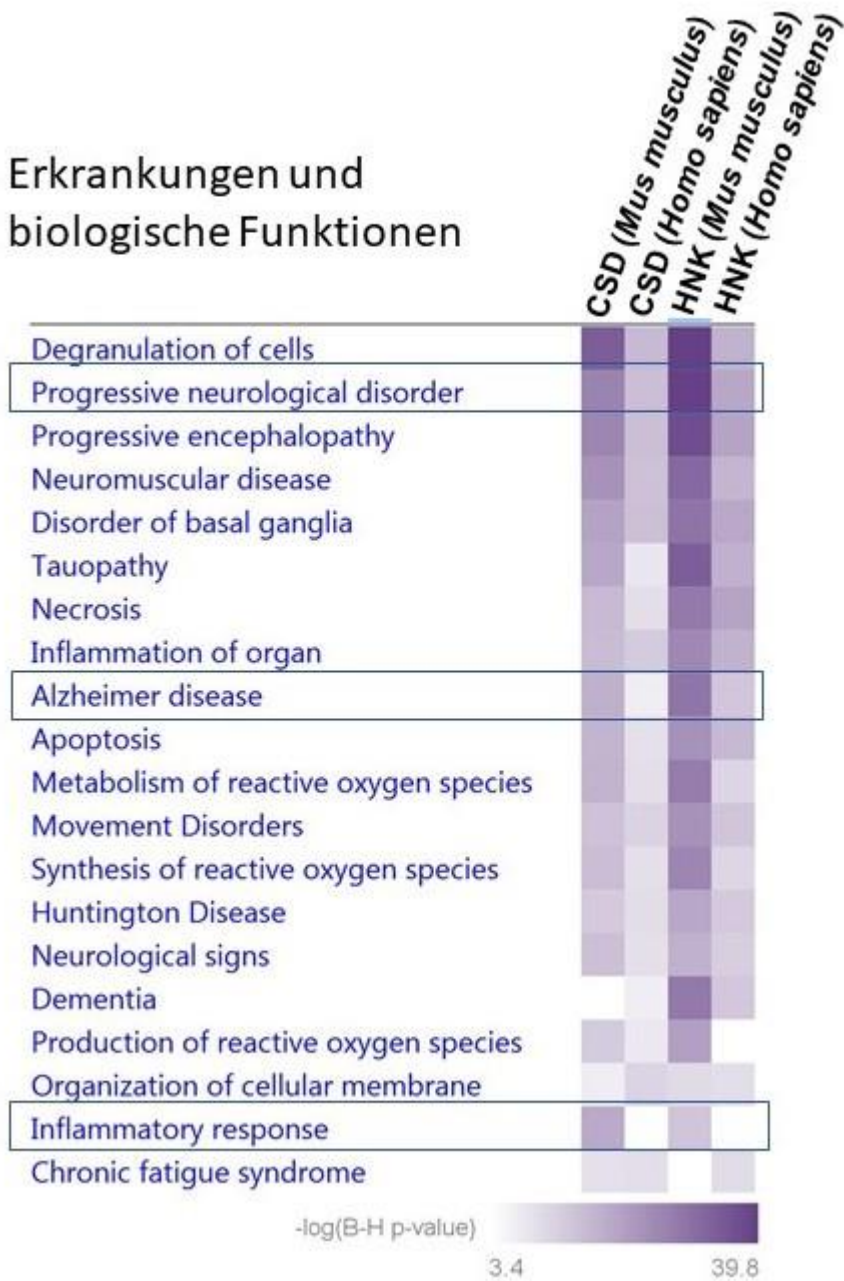


Abbildung 14: Identifizierte Erkrankungen und biologischen Funktionen des CSD- und HNK-Experiments unter Verwendung der beiden Datenbanken *Mus musculus* und *Homo sapiens*.

4.2 Proteine des CSD-Experiments

In Abbildung 15 ist das 1DE-Gel des CSD-Experiments zu sehen. Vergleicht man die drei biologischen Replikate der CTRL-Gruppe mit denen der CSD-Gruppe fallen rein visuell keine Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten (R1-R3) und Gruppen (CTRL, CSD) auf, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit anzunehmen ist. Anhand R3 (CSD) ist stellvertretend das Schneiden in die 14 Banden veranschaulicht. In der linken Spalte ist der molekulare Massemarker sichtbar.

Um den Grad der Variation des CSF-Proteoms zwischen den biologischen Replikaten und Gruppen zu erheben, wurde die Pearson's Korrelationsanalyse durchgeführt. Dabei wurden die relativen Intensitäten aus der MaxQuant Analyse verwendet. Die Ergebnisse der Pearson's Korrelationsanalyse sind in Abbildung 16 zu sehen. Es zeigt sich eine gute experimentelle Reproduzierbarkeit des proteomischen Workflows mit Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen den biologischen Replikaten von $0,84 \pm 0,09$ (CTRL) und $0,91 \pm 0,02$ (CSD). Zwischen der CTRL- und der CSD-Gruppe lag der Pearson's Korrelationskoeffizient bei $0,87 \pm 0,07$.

Um die signifikant unterschiedlich abundanten Proteine zwischen CSD und CTRL zu identifizieren, wurde mittels Perseus Software ein Students t-Test durchgeführt, mit einer Grenze von p-Werten < 0.05 . 24 CSF-Proteine im CSD-Modell sind demnach signifikant unterschiedlich abundant zwischen der CSD- und CTRL-Gruppe. Eine vollständige Liste dieser Proteine mit Angabe der Students t-Test p-Werte ist in Tabelle 4 zu sehen. Hier sind zusätzlich die Proteinklassen und Zellkompartimente aller 24 signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus der Funktions- und Signalweganalyse des CSD-Experiments aufgelistet. Dabei sind in der CSD-Gruppe, im Vergleich zur CTRL-Gruppe, 6 Proteine vermehrt und 18 Proteine vermindert abundant. Die hierarchische Clusteranalyse unter Verwendung der z-Scores der LFQ-Intensitäten ergab zwei große Cluster der vermehrt und vermindert abundanten Proteine, wie durch die Heatmap in Abbildung 17 visualisiert.

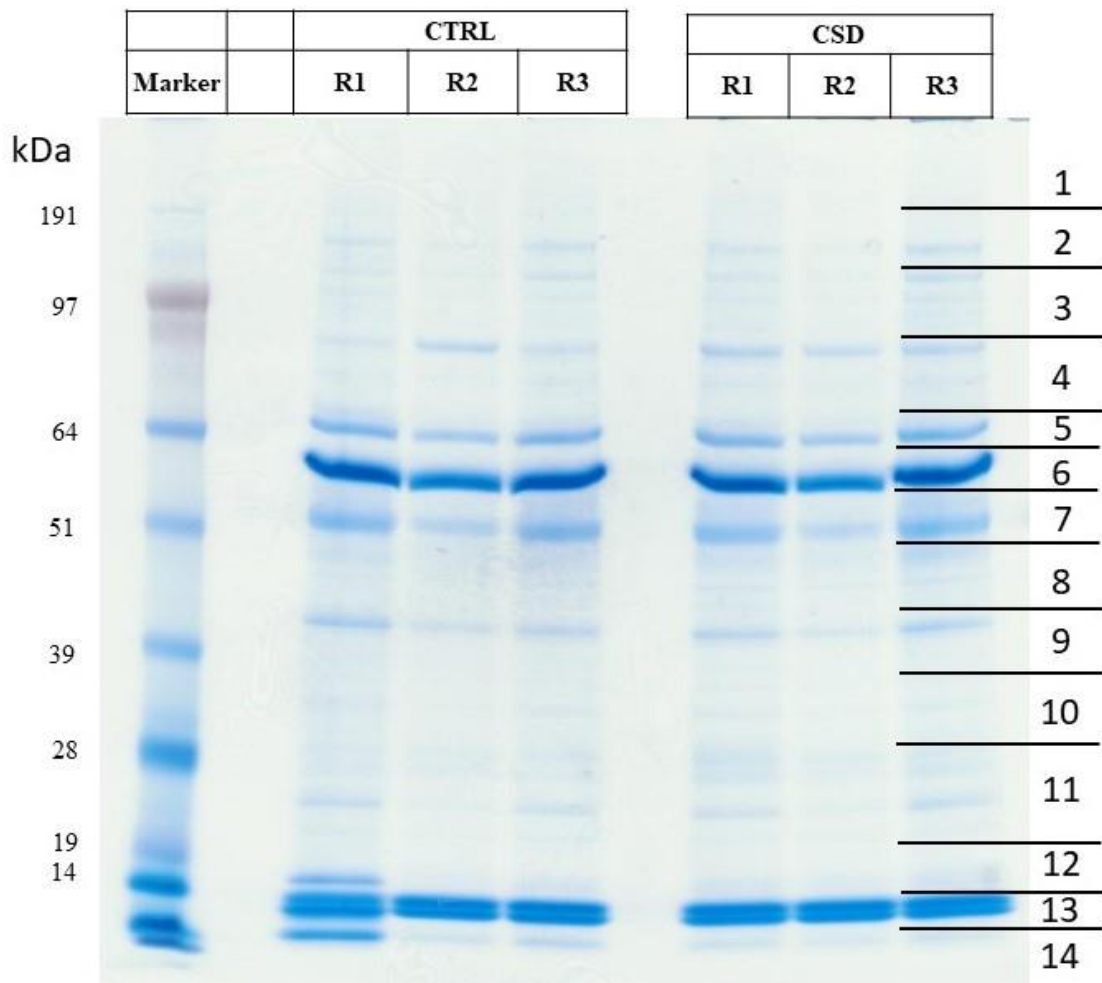


Abbildung 15: Proteinprofile im 1DE-Gel der CSF-Proben aus dem CSD-Modell. R1-R3 stellen jeweils die biologischen Replikate dar. Pro biologischem Replikat wurden 42µl CSF verwendet. In der ersten Spalte ist der molekulare Massemarker zu sehen. Anhand der Spalte R3 (CSD) ist das Schneiden in 14 Banden stellvertretend dargestellt.

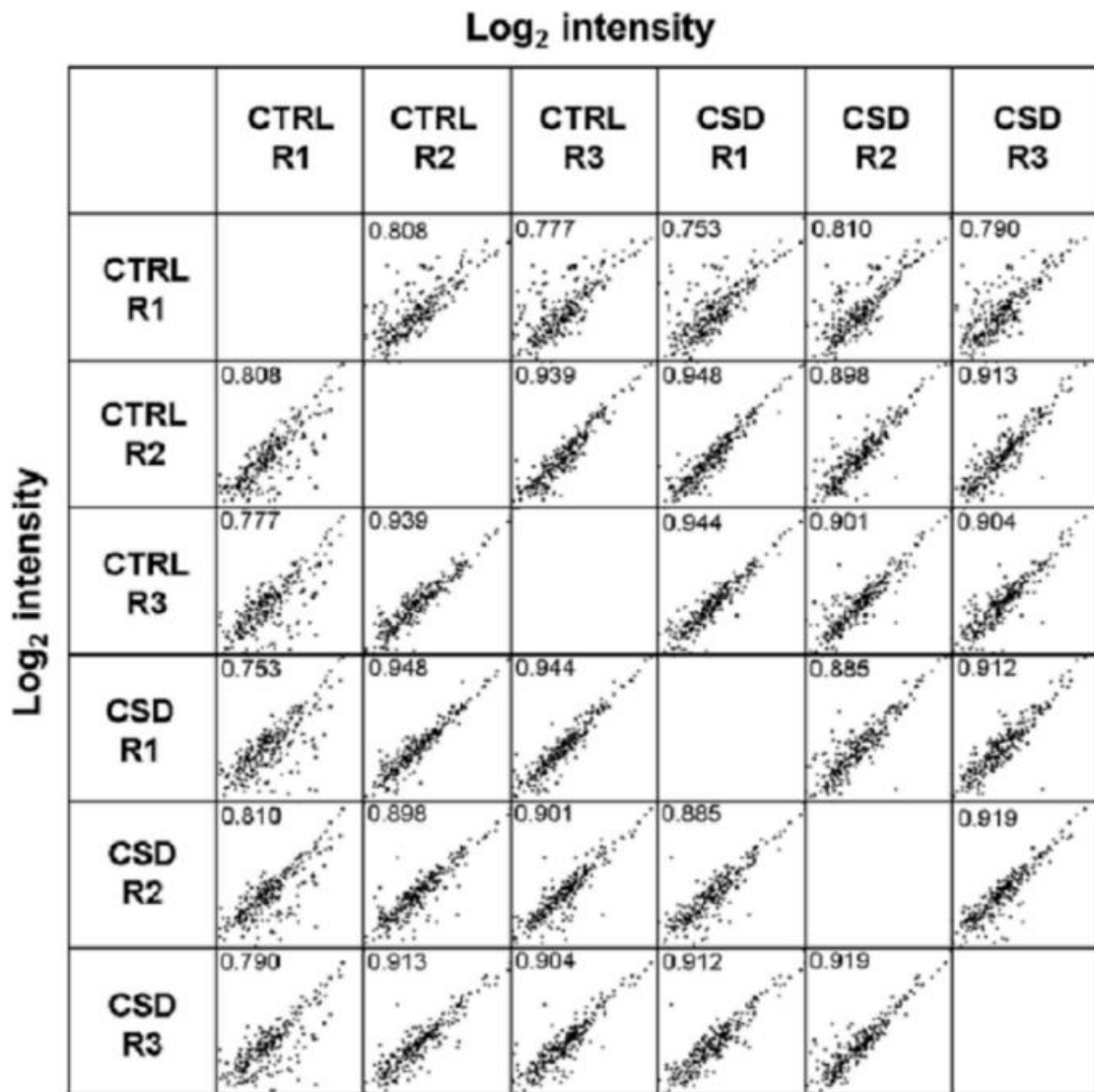


Abbildung 16: Pearson's Korrelationsanalyse zur Darstellung des Grads der Variationen im CSF-Proteom zwischen den biologischen Replikaten und Gruppen im CSD-Experiment.

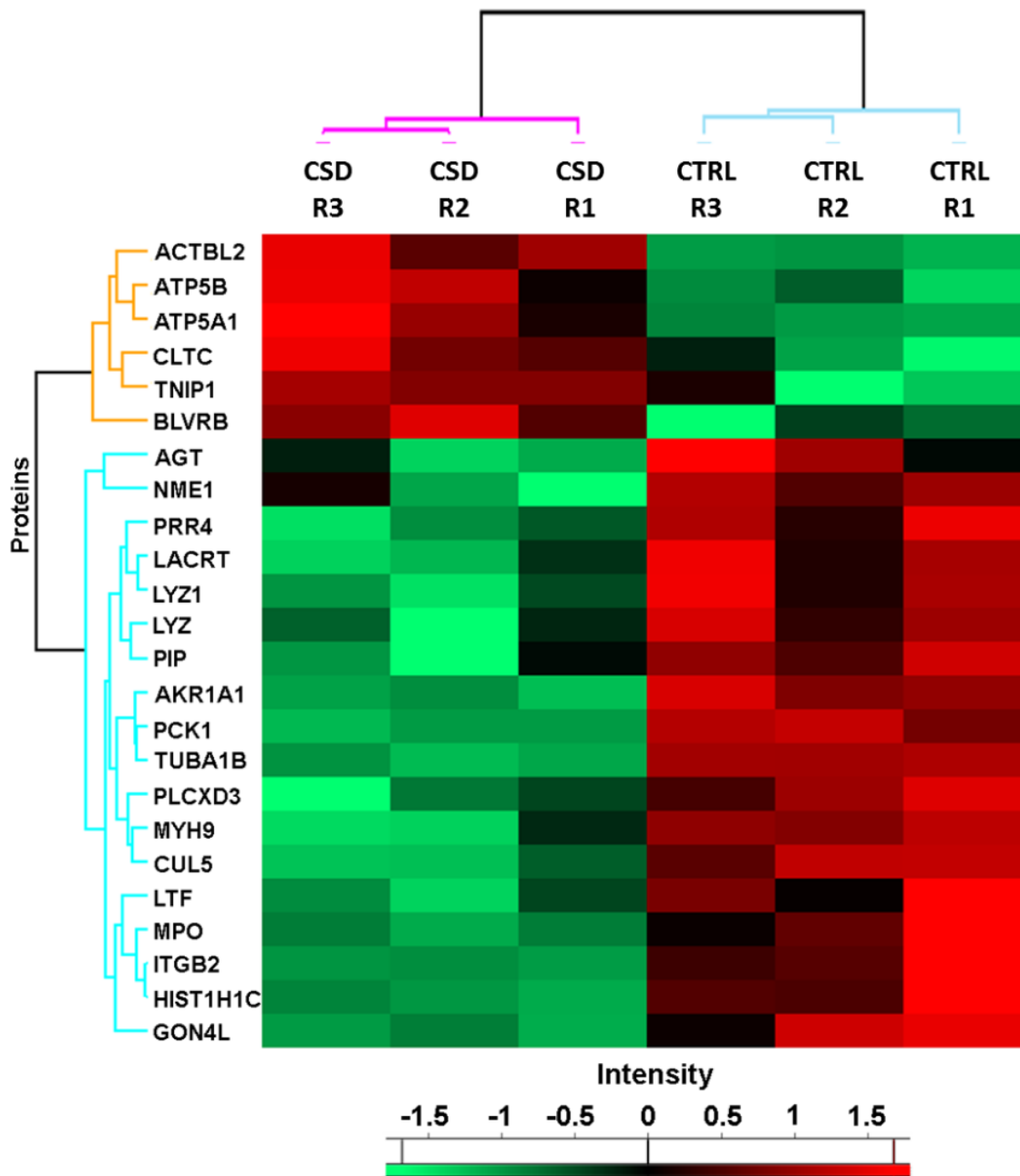


Abbildung 17: Heatmap der hierarchischen Clusteranalyse der signifikant unterschiedlich abunden CSF-Proteine im CSD-Modell. Die Proteine sind durch ihre Gennamen vertreten.

Tabelle 4: Liste der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem CSD-Experiment.

Datenbank	Protein IDs	Namen der Proteine	Gennamen	Student's T-test p-Werte CSD vs. CTRL	Student's T-test Unterschied CSD vs. CTRL	Zellkompartiment	Proteinklassen
<i>Homo sapiens</i>	Q562R1	Beta-actin-like protein 2	ACTBL2	1,68E-03	8,59	Zellkern	andere
<i>Mus musculus</i>	P11859	Angiotensinogen	AGT	4,47E-02	-1,25	Extrazellularraum	Wachstumsfaktor
<i>Mus musculus</i>	Q9JII6	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	AKR1A1	4,37E-04	-5,24	Zytosol	Enzym
<i>Homo sapiens</i>	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	1,41E-02	5,05	Zytosol	Transporter
<i>Homo sapiens</i>	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	1,85E-02	1,22	Zytosol	Transporter
<i>Mus musculus</i>	Q923D2	Flavin reductase (NADPH)	BLVRB	1,83E-02	0,59	Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	Q68FD5	Clathrin heavy chain 1	CLTC	2,07E-02	5,23	Plasmamembran	andere
<i>Mus musculus</i>	Q9D5V5	Cullin-5	CUL5	2,65E-03	-2,54	Zellkern	Ionenkanal
<i>Mus musculus</i>	Q9DB00	GON-4-like protein	GON4L	1,32E-02	-0,53	Zytosol	Transkriptionsregulator
<i>Mus musculus</i>	P15864	Histone H1.2	HIST1H1C	1,38E-02	-7,68	Zellkern	andere
<i>Mus musculus</i>	P11835	Integrin beta-2	ITGB2	1,69E-02	-5,67	Plasmamembran	Transmembranrezeptor
<i>Homo sapiens</i>	Q9GZZ8	Extracellular glycoprotein lacritin	LACRT	2,05E-02	-1,71	Extrazellularraum	Wachstumsfaktor
<i>Homo sapiens</i>	P02788	Lactotransferrin	LTF	3,84E-02	-2,67	Extrazellularraum	Peptidase
<i>Homo sapiens</i>	P61626	Lysozyme C	LYZ	3,58E-02	-1,28	Extrazellularraum	Enzym
<i>Mus musculus</i>	P17897	Lysozyme C-1	LYZ1	1,69E-02	-1,08	Extrazellularraum	Enzym
<i>Homo sapiens</i>	P05164	Myeloperoxidase	MPO	3,71E-02	-7,53	Zytosol	Enzym
<i>Homo sapiens</i>	P35579	Myosin-9	MYH9	6,82E-03	-3,22	Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	P15532	Nucleoside diphosphate kinase A	NME1	3,87E-02	-1,09	Zytosol	Kinase
<i>Homo sapiens</i>	P35558	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]	PCK1	2,36E-04	-7,76	Zytosol	Kinase
<i>Homo sapiens</i>	P12273	Prolactin-inducible protein	PIP	2,72E-02	-3,13	Extrazellularraum	Peptidase
<i>Mus musculus</i>	Q8BLJ3	PI-PLC X domain-containing protein 3	PLCXD3	1,46E-02	-0,95	andere	andere
<i>Homo sapiens</i>	Q16378	Proline-rich protein 4	PRR4	1,30E-02	-4,70	Extrazellularraum	andere
<i>Mus musculus</i>	Q9WUU8	TNFAIP3-interacting protein 1	TNIP1	3,08E-02	7,81	Zellkern	andere
<i>Homo sapiens</i>	P68363	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	1,14E-05	-6,18	Zytosol	andere

4.3 Proteine des HNK-Experiments

In Abbildung 18 sind die 1DE-Gel-Profile der CSF-Proben aus dem HNK-Experiment zu sehen. Für die HNK-Gruppe und SAL-Gruppe sind jeweils zwei Gele abgebildet. Jeweils ein Gel pro HNK- bzw. SAL-Gruppe enthält dabei die CSF-Proben, die vier Stunden (4h) oder eine Woche (1w) nach Administration gewonnen wurden. Somit sind vier 1DE-Gele zu sehen, die jeweils drei biologische Replikate (R1-R3) enthalten. Aufgrund der Homogenität aller dargestellten Protein-Profile ist von einer guten Reproduzierbarkeit auszugehen. Anhand R3 (HNK_1w) ist das Schneiden in 15 Banden demonstriert. Der molekulare Massemarker ist in der linken Spalte sichtbar.

Um die unterschiedlich abundanten Proteine der HNK- und der SAL-Gruppe zu identifizieren, wurde ein Students t-Test mittels Perseus Software durchgeführt. Er ergab vier Stunden nach Injektion von HNK- bzw. Kochsalzlösung (4h) 21 unterschiedlich abundante Proteine und eine Woche nach Injektion (1w) 57 unterschiedlich abundante Proteine zwischen der HNK- und der SAL-Gruppe mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$. In Tabelle 5 sind alle signifikant unterschiedlich abundanten Proteine mit Angabe der p-Werte des t-Tests zu den Zeitpunkten 4h und 1w des HNK-Experiments dargestellt, sowie t-Test Unterschiede aufgelistet. Alle Zellkompartimente und Proteinklassen der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine des HNK-Experiments aus der Funktions- und Signalweganalyse sind angegeben. Hier können ebenso die vollständigen Proteinennamen nachgelesen werden.

Um diese signifikant unterschiedlich abundanten Proteine zu den beiden Zeitpunkten zu gliedern, wurde eine hierarchische Clusteranalyse unter Verwendung der z-Scores der LFQ-Intensitäten durchgeführt. Wie in Abbildung 19 in der Heatmap zu sehen, zeigen sich jeweils zwei große Cluster der vermehrt und vermindert abundanten Proteine. Zum Zeitpunkt 4h (A) waren 7 Proteine vermehrt und 14 Proteine vermindert abundant. Zum Zeitpunkt 1w (B) hingegen waren, im Vergleich zur SAL-Gruppe, eine Mehrheit von 37 Proteinen der signifikant unterschiedlich abundanten Proteine vermehrt und 20 Proteine vermindert abundant.

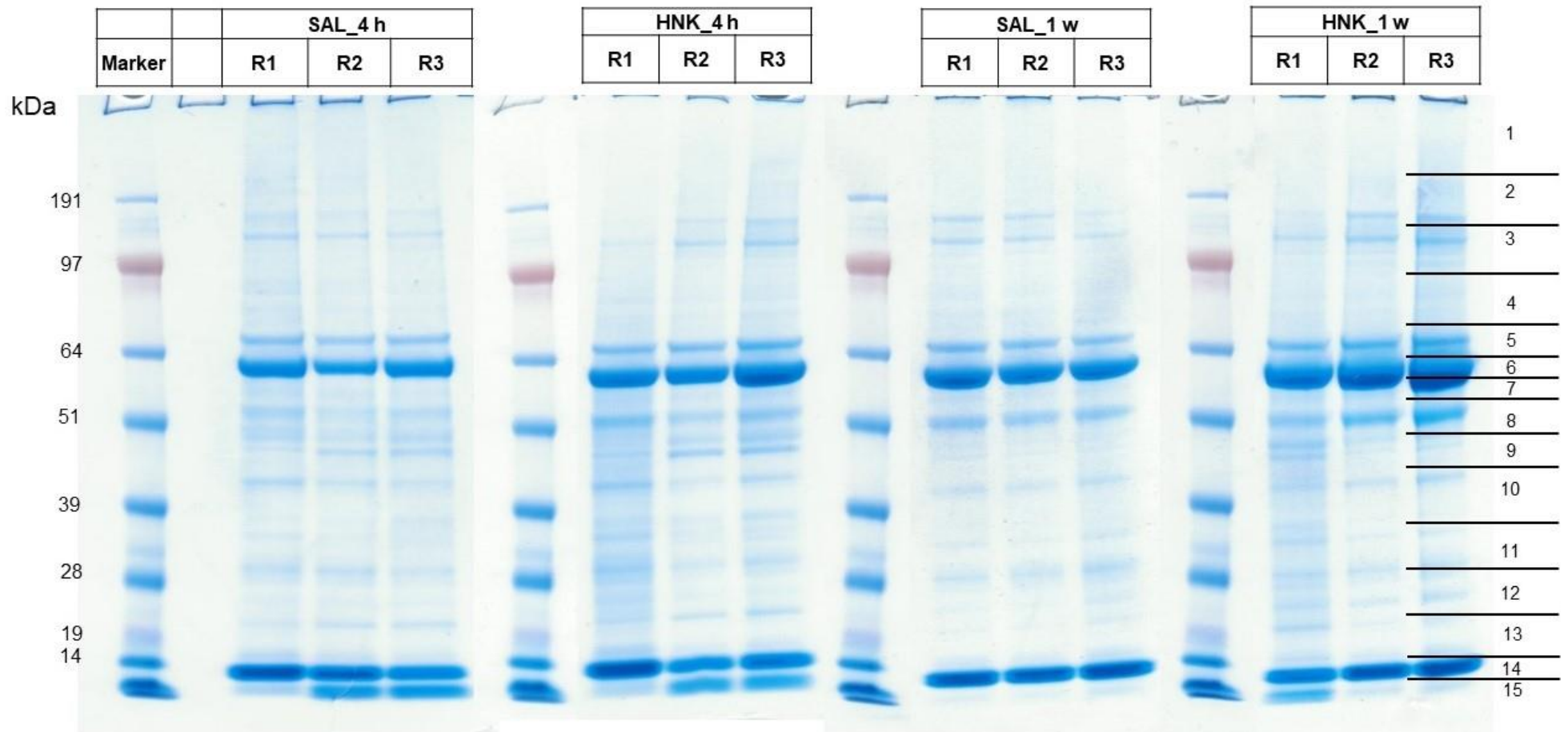


Abbildung 18: Proteinprofile im 1DE-Gel der CSF-Proben aus dem HNK-Modell. R1-R3 stellen jeweils die biologischen Replikate pro Gruppe dar. Pro biologischem Replikat wurden jeweils 40 μ l CSF verwendet. In der ersten Spalte ist der molekulare Massemarker zu sehen. Anhand der Spalte R3 (HNK_1w) ist das Schneiden in 15 Banden stellvertretend dargestellt.

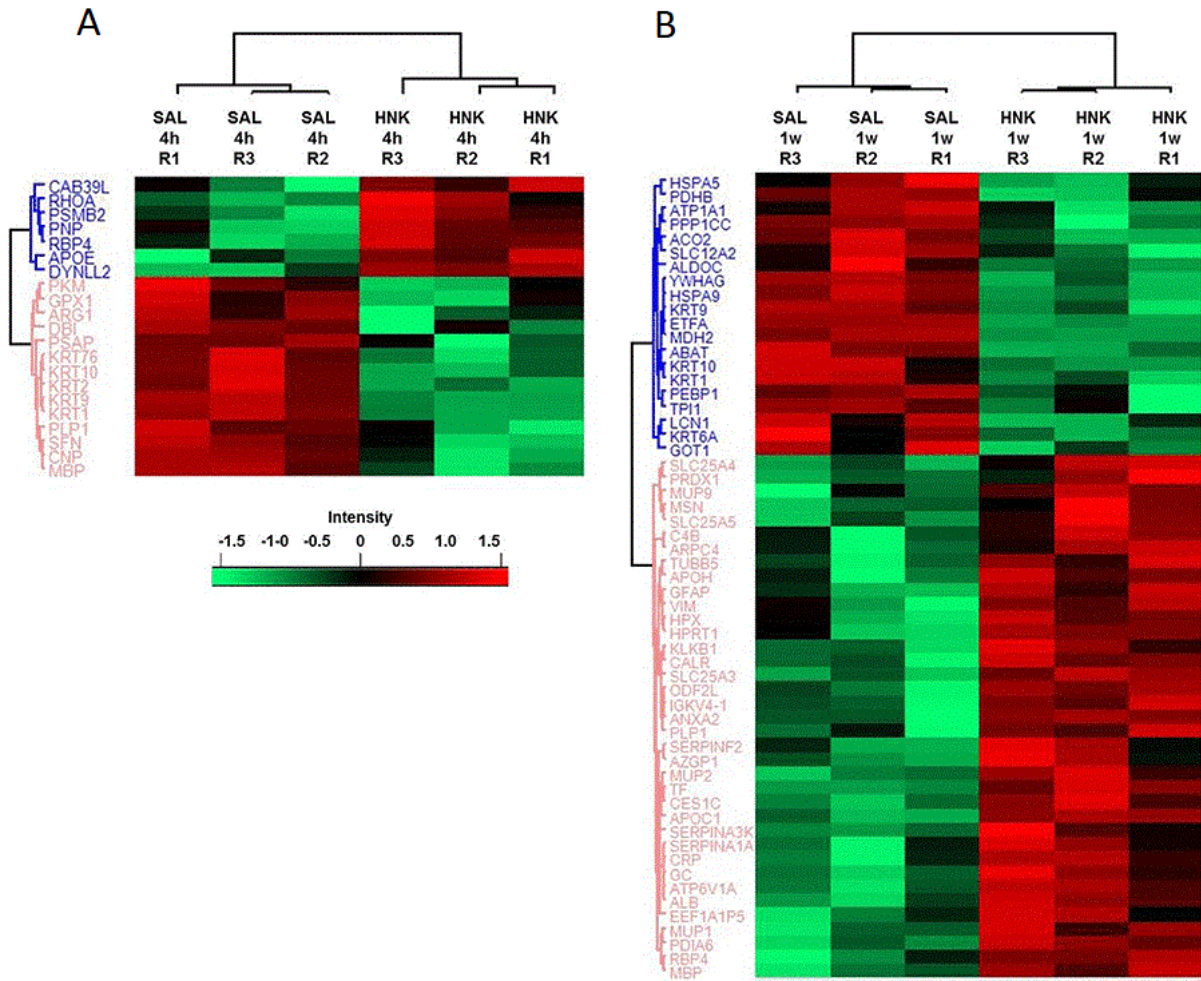


Abbildung 19: Heatmap der hierarchischen Clusteranalyse der signifikant unterschiedlich abunden CSF-Proteine im HNK-Modell.

Tabelle 5: Liste der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem HNK-Experiment.

Datenbank	Protein IDs	Namen der Proteine	Gennamen	Student's T-test p-Werte HNK vs. SAL (4 hours)	Student's T-test Unterschied HNK vs. SAL (4 hours)	Student's T-test p-Werte HNK vs. SAL (1 week)	Student's T-test Unterschied HNK vs. SAL (1 week)	Zellkompartiment	Protein- klassen
<i>Mus musculus</i>	Q61207	Prosaposin	Psap	4,79E-02	-0,31			Extrazellularraum	Enzym
<i>Mus musculus</i>	Q9DB16	Calcium-binding protein 39-like	Cab39l	4,63E-02	1,81			Zytosol	Kinase
<i>Mus musculus</i>	P60202	Myelin proteolipid protein	Plp1	4,54E-02	-1,69	4,94E-02	4,80	Plasmamembran	andere
<i>Mus musculus</i>	P11352	Glutathione peroxidase 1	Gpx1	4,32E-02	-1,60			Zytosol	Enzym
<i>Homo sapiens</i>	P14618	Pyruvate kinase PKM	PKM	4,07E-02	-1,27			Zytosol	Kinase
<i>Mus musculus</i>	P23492	Purine nucleoside phosphorylase	Pnp	3,99E-02	0,94			Nucleus	Enzym
<i>Mus musculus</i>	P31786	Acyl-CoA-binding protein	Dbi	3,92E-02	-0,91			Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	Q61176	Arginase-1	Arg1	3,39E-02	-0,63			Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	Q9QUI0	Transforming protein RhoA	Rhoa	2,01E-02	2,30			Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	O70456	14-3-3 protein sigma	Sfn	1,98E-02	-4,01			Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	P08226	Apolipoprotein E	ApoE	1,93E-02	0,92			Extrazellularraum	Transporter
<i>Mus musculus</i>	Q9R1P3	Proteasome subunit beta type-2	Psmb2	1,78E-02	1,35			Zytosol	Peptidase
<i>Mus musculus</i>	Q00724	Retinol-binding protein 4	Rbp4	1,34E-02	1,93	1,32E-02	1,95	Extrazellularraum	andere
<i>Mus musculus</i>	P16330	2,3-cyclic-nucleotide 3-phosphodiesterase	Cnp	1,07E-02	-3,60			Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	Q3UV17	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	Krt76	6,72E-03	-2,77			Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	P04370	Myelin basic protein	Mbp	6,50E-03	-2,96	7,08E-03	1,78	Extrazellularraum	andere
<i>Mus musculus</i>	Q9D0M5	Dynein light chain 2, cytoplasmic	Dynl2	3,49E-03	0,78			Zytosol	andere
<i>Homo sapiens</i>	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	2,89E-03	-1,79	1,21E-02	-1,80	Zytosol	andere
<i>Homo sapiens</i>	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	2,61E-03	-1,87			Zytosol	andere
<i>Homo sapiens</i>	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	3,21E-04	-3,20	4,44E-03	-2,22	Zytosol	andere
<i>Homo sapiens</i>	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	2,71E-04	-1,91	1,42E-02	-1,27	Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Mdh2			4,97E-02	-0,69	Zytosol	Enzym
<i>Homo sapiens</i>	P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC			4,94E-02	-1,68	Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	P35700	Peroxiredoxin-1	Prdx1			4,80E-02	0,74	Zytosol	Enzym

Tabelle 5: (Fortsetzung)

Datenbank	Protein IDs	Namen der Proteine	Gennamen	Student's T-test p-Werte HNK vs. SAL (4 hours)	Student's T-test Unterschied HNK vs. SAL (4 hours)	Student's T-test p-Werte HNK vs. SAL (1 week)	Student's T-test Unterschied HNK vs. SAL (1 week)	Zellkompartiment	Protein- klassen
<i>Mus musculus</i>	P01029	Complement C4-B	C4b			4,53E-02	0,98	Extrazellularraum	Peptidase
<i>Homo sapiens</i>	Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	EEF1A1P5			4,10E-02	1,46		
<i>Mus musculus</i>	P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1	Serpina1a			4,07E-02	0,91	Extrazellularraum	andere
<i>Mus musculus</i>	Q61247	Alpha-2-antiplasmin	Serpinf2			3,95E-02	5,10	Extrazellularraum	andere
<i>Homo sapiens</i>	P11021	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5			3,87E-02	-0,78	Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	P17751	Triosephosphate isomerase	Tpi1			3,78E-02	-0,97	Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	A2BIM8	Major urinary protein 6	Mup9			3,78E-02	2,75	Extrazellularraum	andere
<i>Mus musculus</i>	P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Pebp1			3,70E-02	-1,11	Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	P26041	Moesin	Msn			3,64E-02	0,53	Plasmamembran	andere
<i>Mus musculus</i>	P07759	Serine protease inhibitor A3K	Serpina3k			3,64E-02	1,05	Extrazellularraum	andere
<i>Mus musculus</i>	P59999	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	Arcp4			3,54E-02	0,99	Zytosol	andere
<i>Homo sapiens</i>	P55011	Solute carrier family 12 member 2	SLC12A2			3,40E-02	-3,68	Plasmamembran	Transporter
<i>Mus musculus</i>	P20152	Vimentin	Vim			3,38E-02	1,38	Zytosol	andere
<i>Homo sapiens</i>	P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1			3,36E-02	-1,67	Plasmamembran	Transporter
<i>Mus musculus</i>	Q64726	Zinc-alpha-2-glycoprotein	Azgp1			3,25E-02	1,56	Extrazellularraum	Transporter
<i>Homo sapiens</i>	P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	KRT6A			3,20E-02	-1,44	Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	P05201	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	Got1			3,10E-02	-0,52	Zytosol	Enzym
<i>Homo sapiens</i>	P02790	Hemopexin	HPX			2,81E-02	1,78	Extrazellularraum	Transporter
<i>Mus musculus</i>	Q01339	Beta-2-glycoprotein 1	ApoH			2,30E-02	1,35	Extrazellularraum	Transporter
<i>Homo sapiens</i>	P31025	Lipocalin-1	LCN1			2,23E-02	-2,28	Extrazellularraum	Transporter
<i>Mus musculus</i>	P14847	C-reactive protein	Crp			2,22E-02	0,97	Extrazellularraum	andere
<i>Mus musculus</i>	P99024	Tubulin beta-5 chain	Tubb5			2,10E-02	1,08	Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	P48962	ADP/ATP translocase 1	Slc25a4			1,91E-02	0,77	Zytosol	Transporter
<i>Homo sapiens</i>	P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT1			1,77E-02	2,93	Zytosol	Enzym

Tabelle 5: (Fortsetzung)

Datenbank	Protein IDs	Namen der Proteine	Gennamen	Student's T-test p-Werte HNK vs. SAL (4 hours)	Student's T-test Unterschied HNK vs. SAL (4 hours)	Student's T-test p-Werte HNK vs. SAL (1 week)	Student's T-test Unterschied HNK vs. SAL (1 week)	Zellkompartiment	Proteinklassen
<i>Mus musculus</i>	P03995	Glial fibrillary acidic protein	Gfap			1,46E-02	1,64	Zytosol	andere
<i>Homo sapiens</i>	P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB			1,43E-02	-2,15	Zytosol	Enzym
<i>Homo sapiens</i>	P06312	Ig kappa chain V-IV region	IGKV4-1			1,37E-02	0,90	Extrazellularraum	Peptidase
<i>Mus musculus</i>	P21614	Vitamin D-binding protein	Gc			1,36E-02	1,25	Extrazellularraum	Transporter
<i>Mus musculus</i>	P63087	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	Ppp1cc			1,31E-02	-2,34	Zytosol	Phosphatase
<i>Mus musculus</i>	P11588	Major urinary protein 1	Mup1			1,24E-02	4,13	Extrazellularraum	Transporter
<i>Mus musculus</i>	P26262	Plasma kallikrein	Klkb1			1,23E-02	2,40	Extrazellularraum	Peptidase
<i>Mus musculus</i>	P14211	Calreticulin	Calr			1,03E-02	1,34	Zytosol	Transkriptionsregulator
<i>Homo sapiens</i>	P07355	Annexin A2	ANXA2			9,00E-03	2,49	Plasmamembran	andere
<i>Mus musculus</i>	P07724	Serum albumin	Alb			7,94E-03	1,07	Extrazellularraum	Transporter
<i>Mus musculus</i>	P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A	Atp6v1a			7,09E-03	1,32	Plasmamembran	Transporter
<i>Homo sapiens</i>	Q9ULJ1	Outer dense fiber protein 2-like	ODF2L			6,38E-03	5,69	Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	Q99KI0	Aconitate hydratase, mitochondrial	Aco2			6,35E-03	-2,03	Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	P11589	Major urinary protein 2	Mup2			6,12E-03	1,74	Extrazellularraum	andere
<i>Mus musculus</i>	P23953	Carboxylesterase 1C	Ces1c			5,77E-03	0,90	Extrazellularraum	Enzym
<i>Homo sapiens</i>	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6			3,60E-03	1,37	Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	Q8VEM8	Phosphate carrier protein, mitochondrial	Slc25a3			2,29E-03	1,42	Zytosol	Transporter
<i>Homo sapiens</i>	P61981	14-3-3 protein gamma	YWHA3			1,44E-03	-1,68	Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	P61922	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	Abat			1,27E-03	-1,96	Zytosol	Enzym
<i>Mus musculus</i>	Q92111	Serotransferrin	Tf			1,17E-03	1,03	Extrazellularraum	Transporter
<i>Homo sapiens</i>	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9			7,80E-04	-2,55	Zytosol	andere
<i>Mus musculus</i>	P34928	Apolipoprotein C-I	Apoc1			5,51E-04	2,05	Extrazellularraum	andere
<i>Homo sapiens</i>	P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA			4,31E-06	-7,52	Zytosol	Transporter

4.4 Funktions- und Signalweganalyse

Mittels IPA-Software konnte von den 24 signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteinen aus dem CSD-Modell durch die Funktions- und Signalweg-Analyse ein Interaktionsnetzwerk erstellt werden, wie in Abbildung 20 zu sehen. Hierbei sind funktionelle Klassen, Lokalisationen und Protein-Protein-Interaktionen der Proteine, sowie deren vermehrte oder verminderte Abundanz, dargestellt. Die Analyse ergab, dass die meisten Proteine (10/24) dem Zytoplasma entstammen. Von diesen zytoplasmatischen Proteinen sind 7 Proteine in der CSD-Gruppe erniedrigt (TUBA1B, MPO, AKR1A1, PCK1, MYH9, NME1 und GON4L) und 3 Proteine erhöht (ATP5F1A, ATP5F1B und BLVRB). Die meisten der zytoplasmatischen Proteine sind Enzyme (4). Unter den zytoplasmatischen Proteinen befindet sich auch eine Kinase, die Nucleosid-Diphosphat-Kinase A (NME1). Sechs Proteine konnten dem Extrazellularraum zugeordnet werden (PRR4, LACRT, AGT, PIP, LYZ und LTF). Diese sechs Proteine sind alle in der CSD-Gruppe erniedrigt. Das Protein mit den meisten PPI ist Cullin-5 (CUL5) mit 5 direkten und einer indirekten Interaktion.

Per IPA-Software durchliefen die 21 signifikant unterschiedlich abundanten Proteine des HNK-Experiments zum Zeitpunkt 4h, die mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ per t-Test identifiziert wurden, einer Funktions- und Signalweganalyse. Das IPA-Netzwerk, das sich hierbei ergab, ist in Abbildung 21 zu sehen. Zytoplasmatische Proteine sind, mit 15 der 21 signifikant unterschiedlichen abundanten Proteine, die Mehrheit. Das zytoplasmatische Protein *Transforming protein RhoA* (RhoA) ist das am signifikantesten hochregulierte Protein zum Zeitpunkt 4h. Von den zytoplasmatischen Proteinen sind 4 Proteine hoch- und 11 Proteine herunterreguliert. Im PPI-Netzwerk ist eine direkte Interaktion der beiden herunterregulierten Proteine basisches Myelinprotein (MBP) und Proteolipid-Protein 1 (PLP1) zu sehen. Das Protein mit den meisten PPI zum Zeitpunkt 4h ist 14-3-3 Protein Sigma (SFN). Alle Interaktionen sind interessanterweise mit Proteinen aus der Familie der Keratine.

Das IPA-Netzwerk der signifikant unterschiedlich abundanten Proteine des HNK-Experiments zum Zeitpunkt 1w, das sich aus der Funktions- und Signalweganalyse per IPA-Software ergab, ist in Abbildung 22 zu sehen. Eine Mehrheit von 29 Proteinen entstammen dem Zytoplasma, gefolgt von 20 Proteinen, die dem Extrazellularraum entstammen. 17 zytoplasmatische Proteine sind herunter- und 11 Proteine hochreguliert. Im Extrazellularraum sind 19 Proteine hochreguliert und nur eines vermindert

abundant. Zu den Proteinen des Extrazellularraums zählen drei Proteine aus der Familie der Serin-Proteinase-Inhibitoren: Alpha-2-Antiplasmin (SERPINF2), Alpha-1-Antichymotrypsin (SERPINA3), Alpha-1-Antitrypsin (SERPINA1). Sie sind alle zum Zeitpunkt 1w hochreguliert. Zum Zeitpunkt 1w war das Hitzeschockprotein der Familie A Mitglied 5 (HSPA5) mit 11 PPI das Protein mit den meisten PPI, gefolgt von Alb mit 9 PPI.

Die relevantesten Funktions- und Signalwege der signifikant unterschiedlich abundanten Proteine wurden durch p -Werte aufgezeigt, die durch *Benjamini-Hochberg multiple testing correction* ($-\log B-H > 1.3$) errechnet wurden. In Abbildung 23 ist eine Zusammenfassung der relevantesten Signalwege von CSD, HNK 4h und HNK 1w zu sehen. Hierzu zählen im CSD-Experiment interessanterweise Proteine, die in mitochondriale Dysfunktion involviert sind (*Mitochondrial Dysfunction*; $p = 5,28E-02$; z-score: 1,278). Wie in Abbildung 24 zu sehen, sind die beiden Proteine mitochondriale ATP Synthase Untereinheit α (ATP5F1A) und ATP Synthase Untereinheit β (ATP5F1B) in der CSD-Gruppe vermehrt abundant. Außerdem zählt zu den relevantesten Signalwegen des CSD-Experiments der GR-Signalwegs ($p = 1,10E-01$; z-score: 0,959), dessen Proteine Angiotensinogen (AGT) und Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PCK1) in der CSD-Gruppe vermindert abundant waren. AGT und ATP5F1A sind dabei insbesondere in direkter Interaktion mit CUL5. PCK1 und ATP5F1B sind über ein weiteres dazwischengeschaltetes Protein ebenso mit CUL5 in Kontakt. In HNK 4h ist der GR-Signalweg der am signifikantesten unterschiedlich durch HNK regulierte Signalweg ($p = 1,50E-03$; z-score: 2,823). Hierzu zählen 5 involvierte Proteine aus der Familie der Keratine: KRT76, KRT9, KRT2, KRT1 und KRT10, wie in Abbildung 24 zu sehen. Diese involvierten GR-Signalweg Proteine sind alle zum Zeitpunkt 4h herunterreguliert und entstammen dem Zytoplasma. Es bestehen hierbei zum Teil direkte Interaktionen dieser Proteine wie in Abbildung 21 abgebildet. Zu den Top 5 der regulierten Signalwege zum Zeitpunkt 4h zählen zudem die Signalwege LXR/RXR (Leber X Rezeptor/ Retinoid X Rezeptor) Aktivierung ($p = 4,31E-02$; z-score: 1,366) und FXR/RXR (Farnesoid X Rezeptor/ Retinoid X Rezeptor) Aktivierung ($p = 4,31E-02$; z-score: 1,366). Ebenso wie zum Zeitpunkt 4h ist zum Zeitpunkt 1w unter den Top 5 der durch HNK regulierten Signalwege der GR-Signalweg ($p = 2,13E-03$; z-score: 2,671), dessen Proteine ebenso herunterreguliert sind. Hierzu zählen: HSPA9, KRT9, KRT6A, KRT1, HSPA5 und KRT10. Zu beiden Zeitpunkten des HNK-Experiments (4h und 1w) waren übereinstimmend drei Proteine des GR-Signalwegs herunterreguliert: KTR9, KTR1 und

KTR10, wie in Abbildung 24 zu sehen. Interessanterweise zählen auch zum Zeitpunkt 1w des HNK-Experiments LXR/RXR Aktivierung und FXR/RXR Aktivierung zu den Top 5 der relevanten Signalwege ($p = 9,23E-10$; z-score: 9,035, $p = 9,23E-10$; z-score: 9,035). Zum Zeitpunkt 1w ist der Akute-Phase-Reaktion Signalweg (*Acute Phase Response Signaling*; $p = 7,15E-11$; z-score: 10,146) der am signifikantesten hochregulierte Signalweg, wie in Abbildung 23 zu sehen ist. Alle assoziierten, signifikant hochregulierten CSF-Proteine dieses Signalwegs sind in Abbildung 24 aufgeführt.

Im Rahmen der Funktion- und Signalweganalyse mittels IPA-Software wurden die prognostizierten vorgeschalteten Regulatoren der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine identifiziert. In Abbildung 25 (A) ist eine Heatmap der identifizierten vorgeschalteten Regulatoren aus dem CSD- und HNK-Experiment zu sehen. Dabei zeigt sich im CSD-Experiment, dass das Zytokin *Transforming growth factor beta* (TGFB1) mit vier jeweils signifikant herunterregulierten Proteinen interagiert, wie in Abbildung 25 (B) zu sehen ist ($p = 1,76E-03$; z-score: -1,91). Im HNK-Experiment wird interessanterweise zum Zeitpunkt 4h eine Inhibierung der Kinase *Mammalian target of rapamycin* (mTOR) prognostiziert ($p = 4,22E-04$; z-score: -0,927), wohingegen zum Zeitpunkt 1w eine Aktivierung vorliegt ($p = 4,75E-03$; z-score: 0,784). Zum Zeitpunkt 1w wird außerdem eine Aktivierung des Wachstumsfaktors *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) prognostiziert ($p = 9,13E-04$; z-score: 0,647).

In Abbildung 26 sind zusammenfassend die relevantesten Erkrankungen und biologische Prozesse aus der Funktions- und Signalweganalyse des CSD- und HNK-Experiments dargestellt. Im CSD-Experiment zählen hierzu Apoptose (*Apoptosis*, $p = 9,88E-03$; z-score: 2,005) und Entzündungsreaktion (*Inflammatory response* $p = 1,13E-02$; z-score: 1,946). In Abbildung 27 werden mit diesen biologischen Prozessen assoziierte CSF-Proteine des CSD-Experiments genauer beleuchtet. Die Funktions- und Signalweganalyse konnte im HNK-Experiment aufdecken, dass zum Zeitpunkt 4h signifikant regulierte CSF-Proteine mit Myelinisierung (*Myelination*, $p = 3,60E-04$; z-score: 3,443) in Verbindung stehen, wie in Abbildung 28 zu sehen ist. Dabei sind die Proteine basisches Myelinprotein (MBP) und Proteolipid-Protein 1 (PLP1) herunterreguliert. Zum Zeitpunkt 1w zählen zu den relevantesten Erkrankungen und biologischen Prozessen progrediente neurologische Erkrankungen (*Progressive neurological disorder*, $p = 9,99E-08$; z-score: 7,0), Alzheimer Erkrankung (*Alzheimer disease*; $p = 7,27E-08$; z-score: 7,139), Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (*Synthesis of reactive oxygen species*; $p = 2,13E-03$; z-score: 2,269), Apoptose (*Apoptosis*; $p = 5,35E-03$; z-score:

2,272) und Filament-Organisation (*Organization of filaments*; $p = 5,27E-05$; z-score: 4,278). Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, zählen interessanterweise zu den Proteinen die mit *Progressive neurological disorder* assoziiert werden die Proteinen HSPA5 und HSPA9, welche beide in HNK 1w herunterreguliert sind. Sie sind zusätzlich mit Alzheimer Erkrankung assoziiert. Unter *Synthesis of reactive oxygen species* befinden sich bemerkenswerterweise bis auf ein einziges Protein nur hochregulierte Proteine, die vermehrt zu Aktivierung führen.

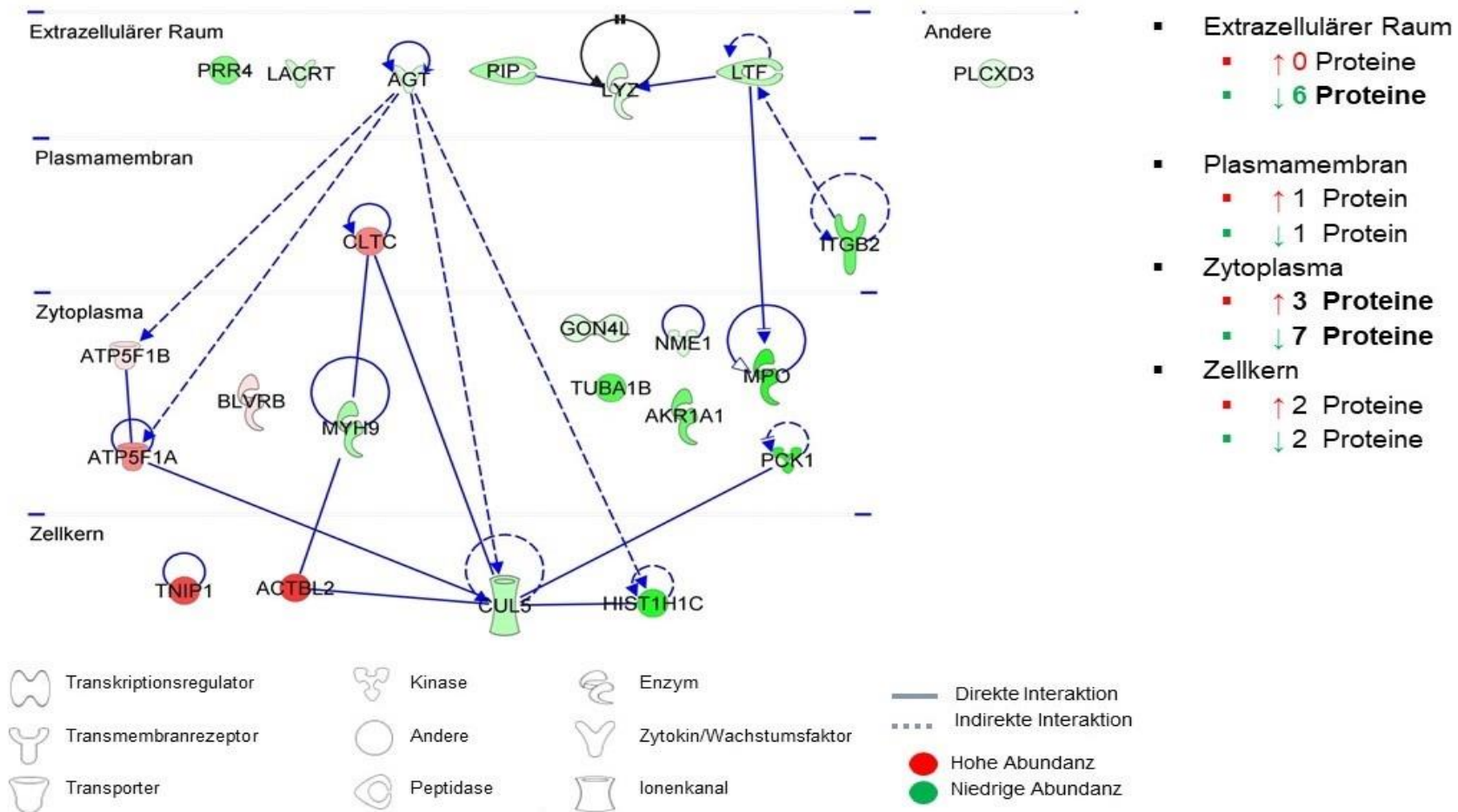


Abbildung 20: Interaktionsnetzwerk der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem CSD-Modell. Die Farbe, ob rot oder grün, zeigt ein erhöhtes oder erniedrigtes Vorkommen des jeweiligen Proteins an. Linien zwischen Proteinen stellen direkte oder indirekte Interaktionen dar.

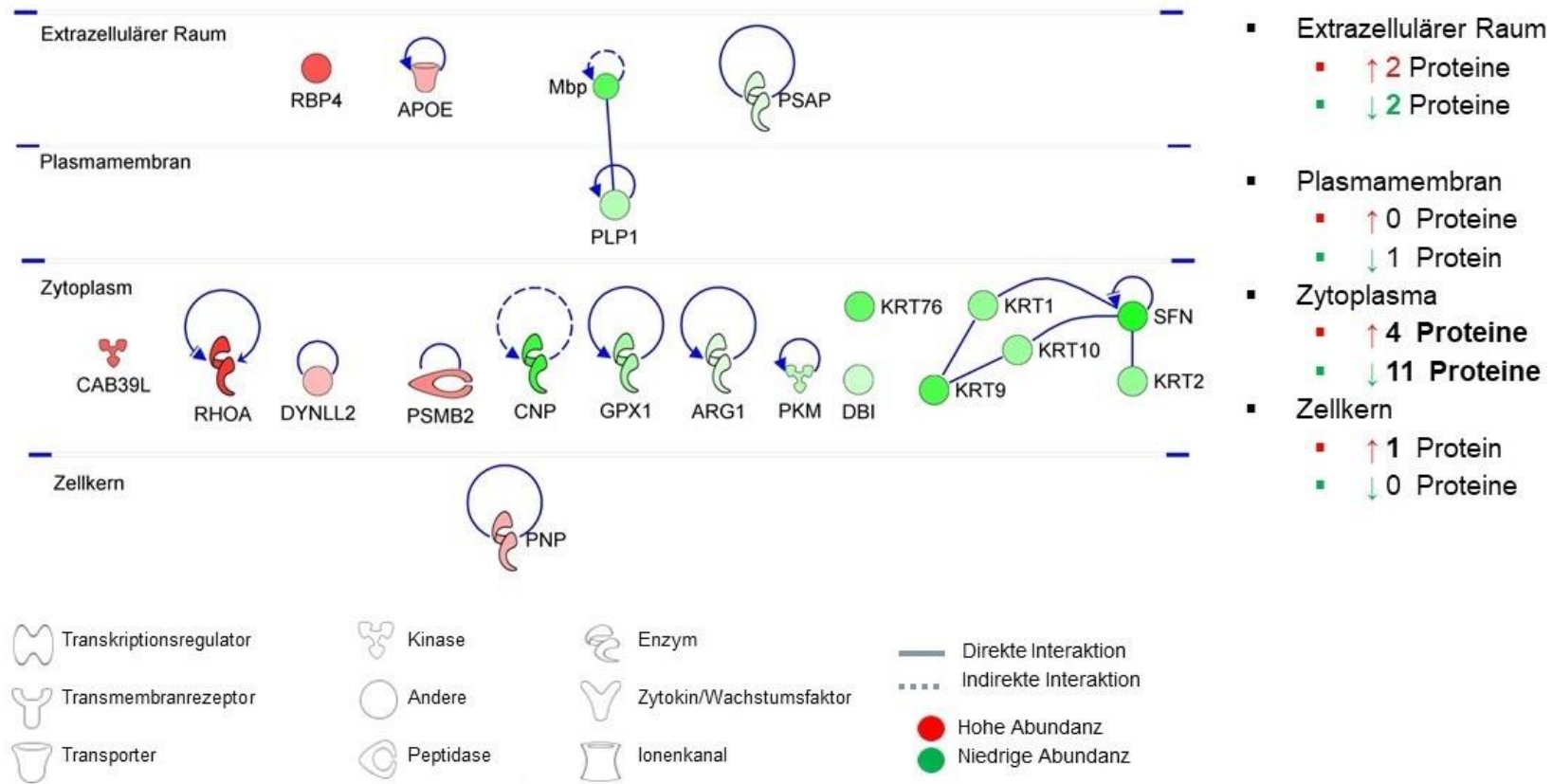
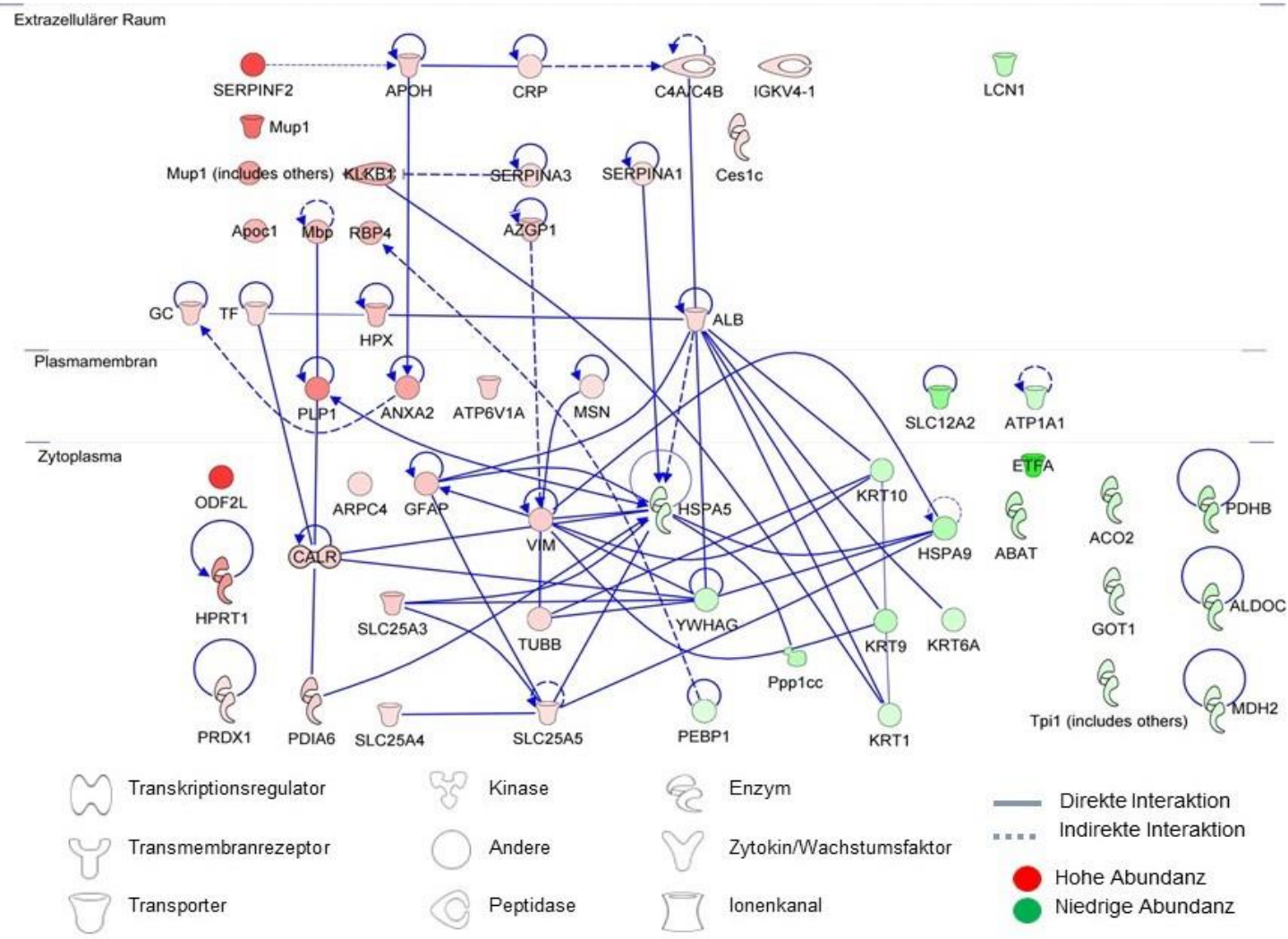


Abbildung 21: Interaktionsnetzwerk der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem HNK-Modell zum Zeitpunkt 4h.



- Extrazellulärer Raum
 - ↑ 19 Proteine
 - ↓ 1 Protein
- Plasmamembran
 - ↑ 4 Proteine
 - ↓ 2 Proteine
- Zytoplasma
 - ↑ 12 Proteine
 - ↓ 17 Proteine

Abbildung 22: Interaktionsnetzwerk der signifikant unterschiedlich abundanten CSF-Proteine aus dem HNK-Modell zum Zeitpunkt 1w.

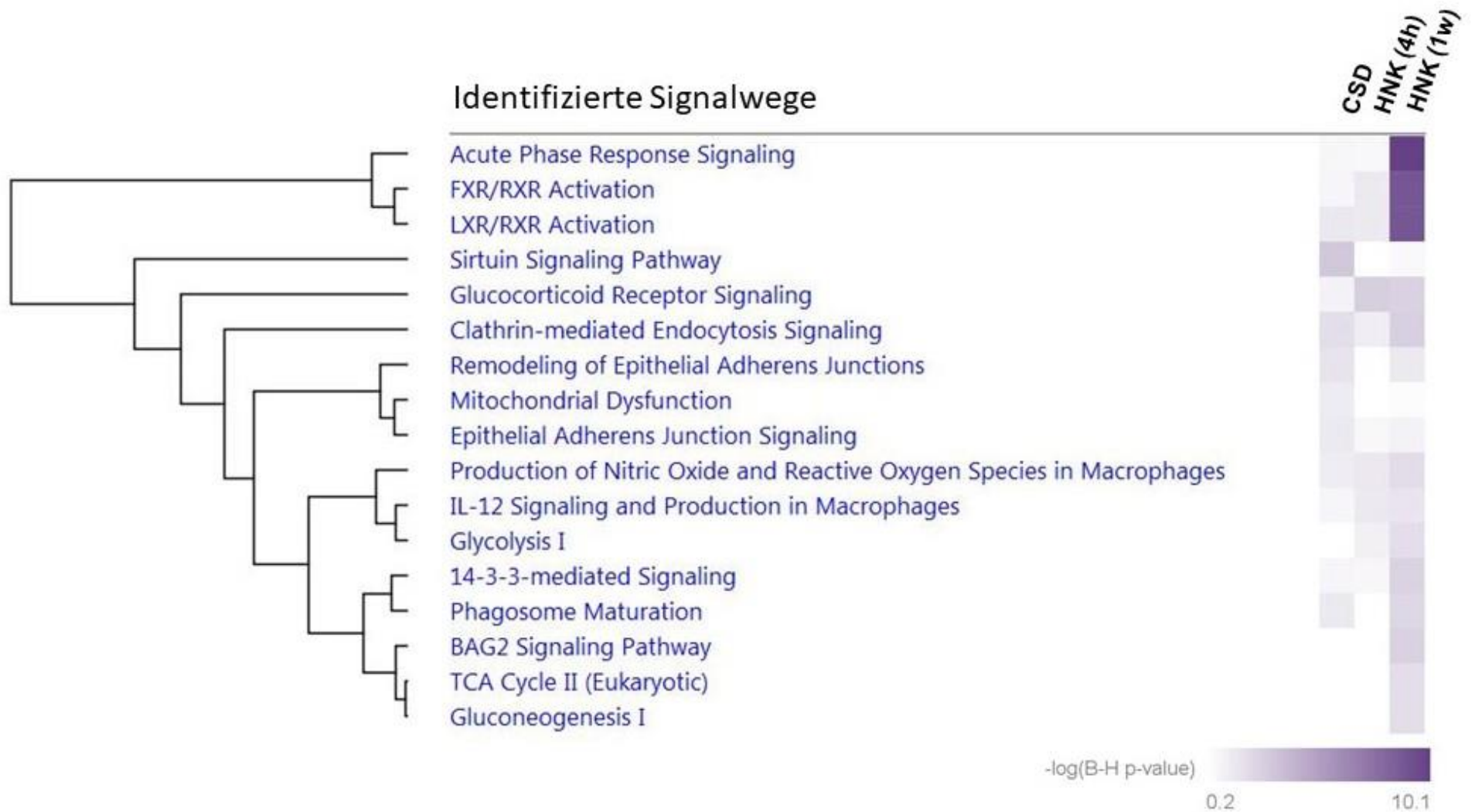


Abbildung 23: Identifizierte Signalwege (canonical pathways) des CSD- und HNK-Experiments.

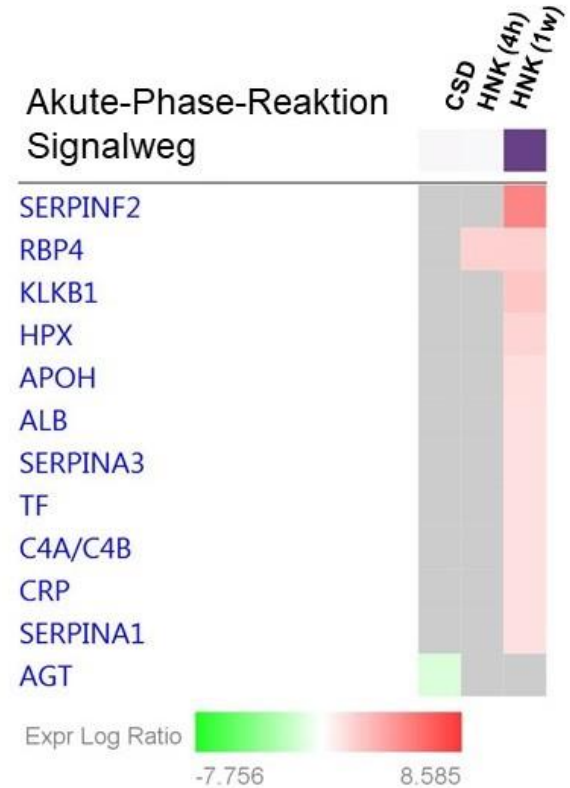
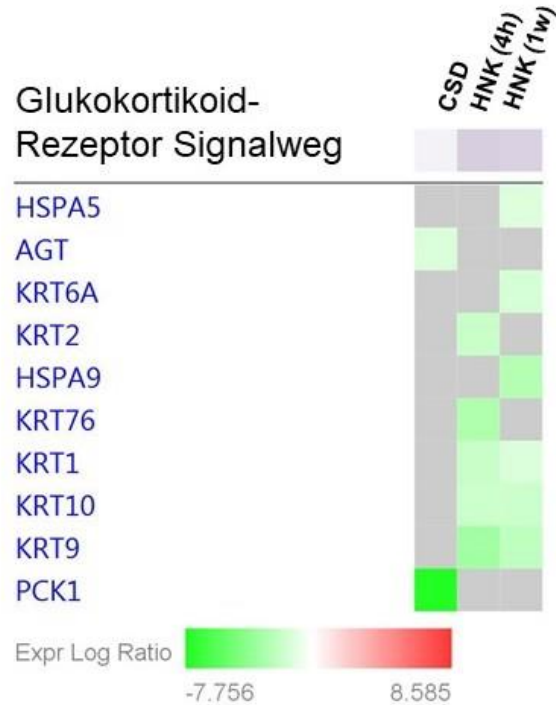
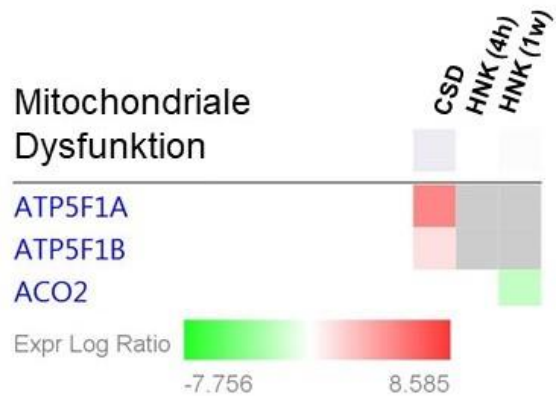


Abbildung 24: Relevante Signalwege mit Angabe der assoziierten, signifikant unterschiedlich regulierten Proteine aus dem CSD- und HNK-Experiment.

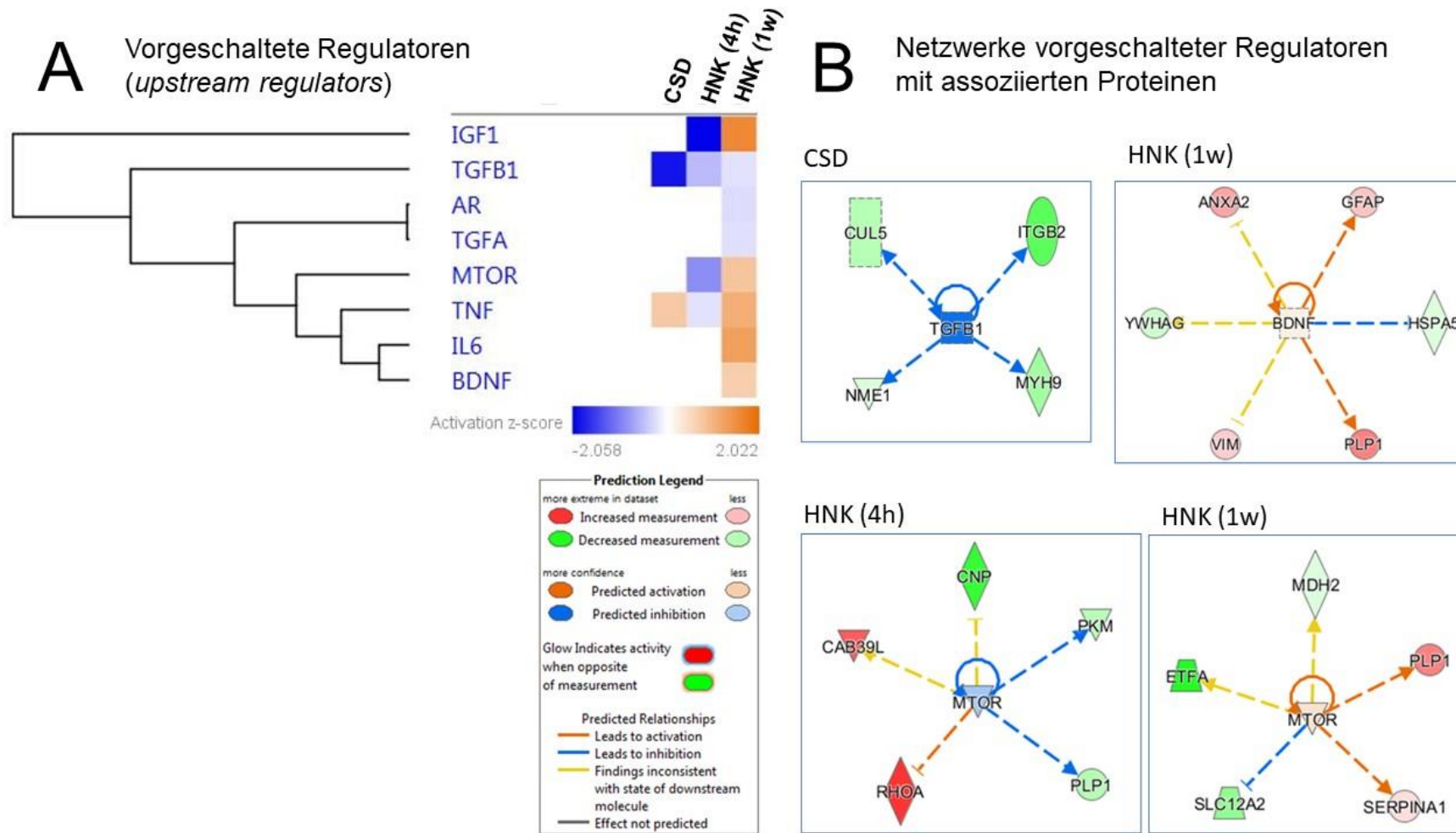


Abbildung 25: A: Heatmap der vorgeschalteten Regulatoren (*upstream regulators*) aus dem CSD- und HNK-Experiment. B: Netzwerke relevanter vorgeschalteter Regulatoren aus dem CSD- und HNK-Experiment.

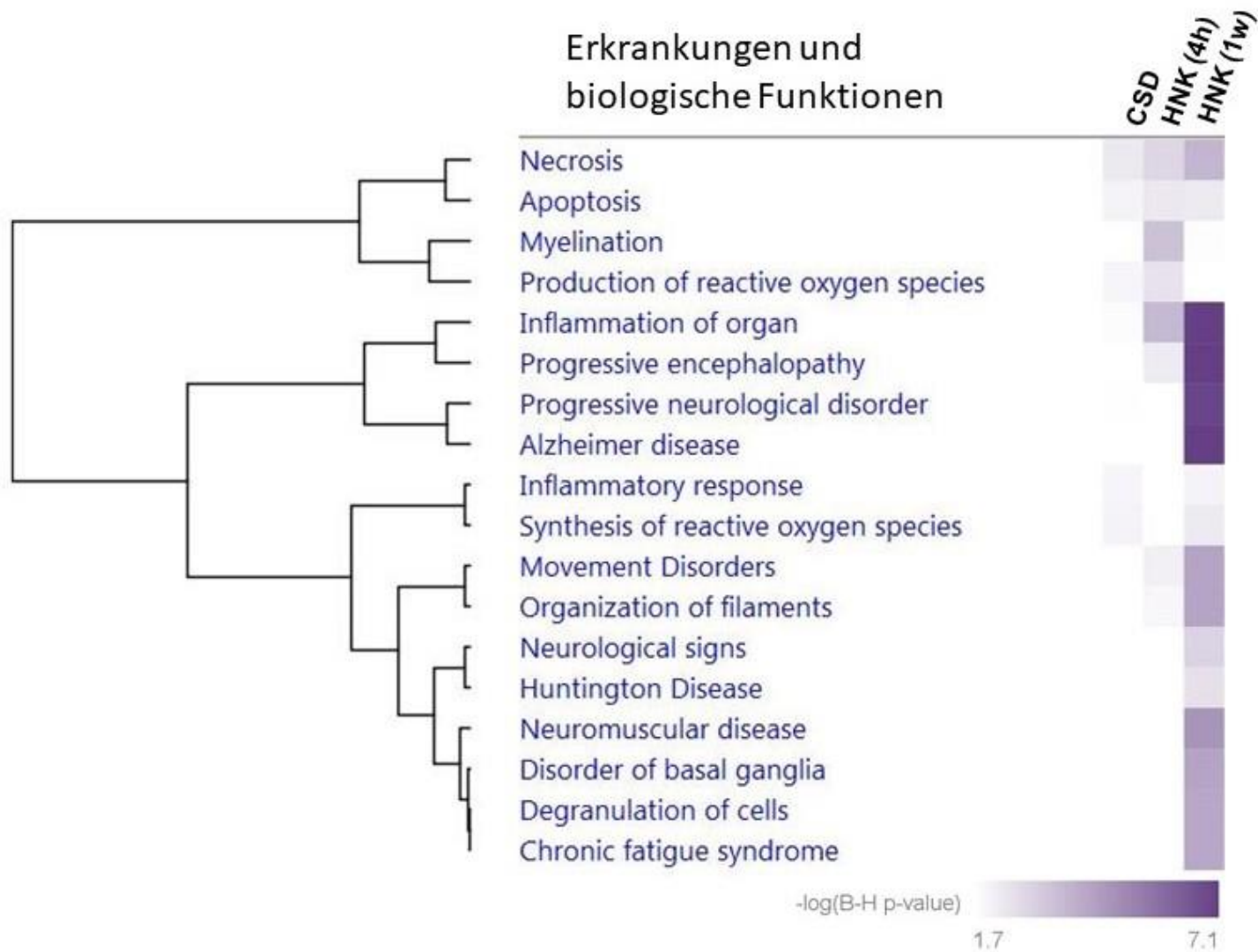


Abbildung 26: Identifizierte Erkrankungen und biologische Funktionen des CSD- und HNK-Experiments.

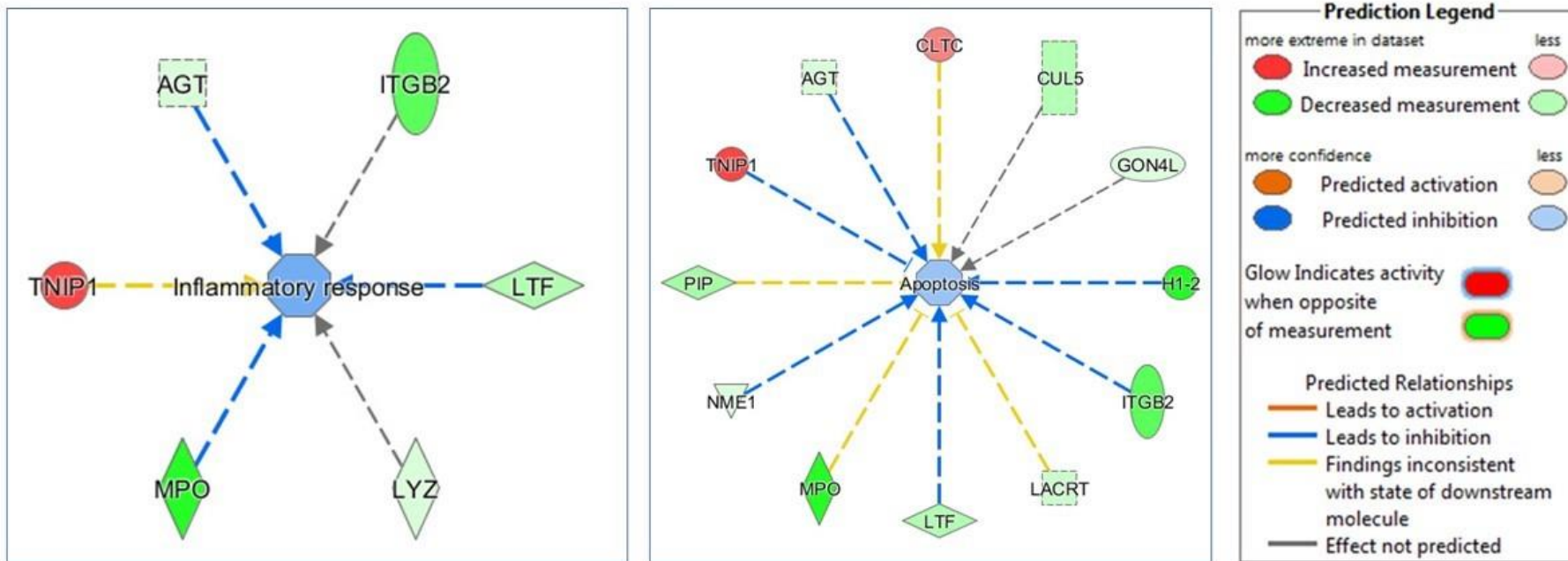


Abbildung 27: Netzwerke relevanter Erkrankungen und biologischer Funktionen des CSD-Experiments.

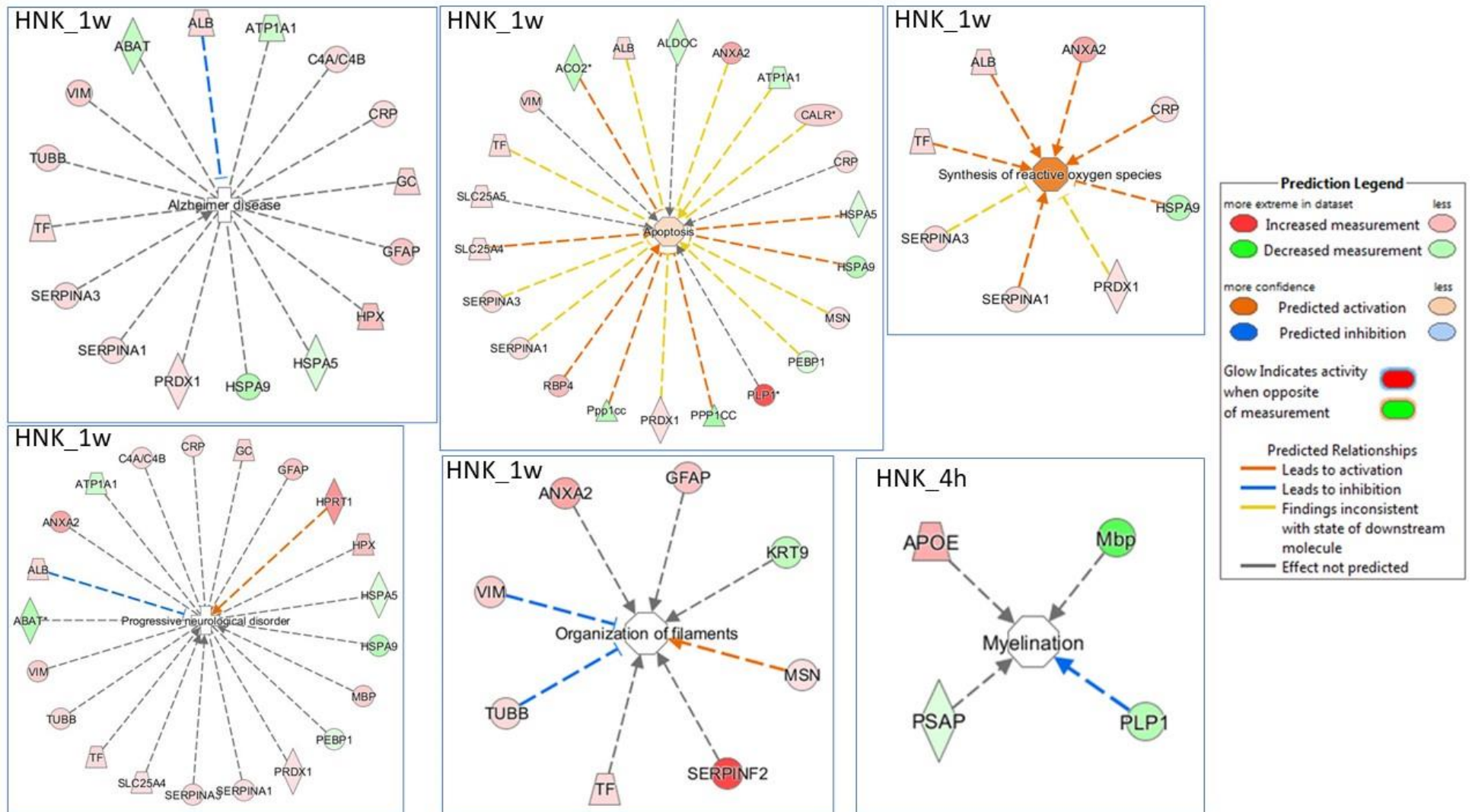


Abbildung 28: Netzwerke relevanter Erkrankungen und biologischer Funktionen des HNK-Experiments.

5 Diskussion

Insbesondere bei der Depression ist der Zusammenhang zwischen Stress, oder stressreichen Lebensphasen, und der Erkrankung bislang bereits vielfach hergestellt worden, jedoch bestehen nach wie vor Unklarheiten in Bezug auf die Ätiologie und zugrundeliegende pathophysiologische Prozesse [4-6]. Die Diagnostik psychischer Störungen wie der Depression basiert weitestgehend auf der Symptomatik der jeweiligen Erkrankung und lässt zugrundeliegende ätiologische Unterschiede außer Acht [63]. Der Ruf nach objektiven biologischen Markern ist in den letzten Jahren deshalb vielfach laut geworden, um die Differenzierung psychischer Störungen zu erleichtern und um diese gezielter und erfolgreicher therapieren zu können [62].

CSF dient bereits seit langer Zeit als hervorragendes diagnostisches Medium vieler Erkrankungen, insbesondere des ZNS [48, 52, 56]. Die Funktionen von CSF sind vielfältig und tragen wesentlich zur Homöostase im ZNS bei [43, 44]. Da CSF die Physiologie und Pathophysiologie des ZNS optimal widergespiegelt, dient CSF außerdem als ideale Körperflüssigkeit, um psychiatrische und neuropsychiatrische Erkrankungen zu untersuchen [49, 56]. Deshalb haben sich Proteinbiomarker in CSF bereits bei bestimmten neurologischen Erkrankungen im klinischen Alltag etabliert [58, 59]. Sie sind dabei in den letzten Jahren auch in der translationalen Psychiatrie immer weiter in den Fokus der Forschung gerückt und bergen ein erhebliches Zukunftspotenzial [64]. MS-Verfahren zur Protein-Analyse sind in diesem Bereich mehr und mehr attraktiv geworden [62, 64, 65]. Darüber hinaus ist der Wunsch nach neuen, nebenwirkungsarmen Antidepressiva mit kurzer Wirklatenz nach wie vor sehr aktuell, da die klassischen Antidepressiva mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehen können und viele Patienten kein adäquates Ansprechen auf klassische Antidepressiva zeigen [26]. Der Einsatz eines Metabolits von Ketamin, HNK, hat sich dabei in jüngster Forschung als potenziell erfolgversprechend erwiesen [34].

Ziel dieser Studie war es mittels „Discovery Proteomics“-Strategie und Mausmodellen zum einen die Auswirkungen von Stress und zum anderen die Folgen der Anwendung des potenziell neuen Antidepressivums HNK auf das CSF-Proteom von Mäusen zu untersuchen, um beteiligte physiologische und pathophysiologische Prozesse zu beleuchten und potenzielle Proteinbiomarker zu identifizieren.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Protein-Analyse von CSF aus den Mausmodellen werden im nachfolgenden Abschnitt nacheinander diskutiert.

5.1 Charakterisierung des Maus-CSF Proteoms

In dieser Studie wurde in einem CSD-Modell und in einem HNK-Gabe-Modell jeweils das CSF-Proteom der Maus untersucht. Mittels „Discovery Proteomics“- Strategien konnten durch Verwendung der *Mus musculus* und *Homo sapiens* Datenbanken eine Gesamtzahl von 462 Proteinen in Maus-CSF beider Mausmodelle gemeinsam identifiziert werden (FDR 1%). Dieses Ergebnis stellt eine der größten Listen identifizierter Proteine in Maus-CSF von lebendigen Mäusen durch eine MS-Studie dar. Betrachtet man beide Maus-Experimente separat, konnten im CSD-Mausmodell mittels MS-Methoden eine Gesamtzahl von 253 unterschiedlichen Proteinen identifiziert werden (FRD 1%). Im HNK-Experiment konnten sogar 387 (FDR 1%) unterschiedliche Proteine identifiziert werden.

Um die Gesamtzahl der identifizierten Proteine in den beiden Mausmodellen zu maximieren, wurden in der Proteinidentifikation mittels MaxQuant-Software zwei Datenbanken, *Mus musculus* und *Homo sapiens*, eingespeist. Indem zwei Datenbanken in die Suche integriert werden, kann das Ergebnis der Proteinidentifikation maximiert werden. Proteine, die beispielweise in der *Mus musculus* Datenbank noch nicht existieren, jedoch in der *Homo sapiens* Datenbank bereits aufgeführt sind, werden hierdurch mit einbezogen. Man minimiert dadurch falsch-negative Identifikationen, die aufgrund von Unvollständigkeits der Datenbanken und noch nicht annotierten Proteinen zustande kommen könnten [102]. Eine weitere Bestätigung für die Verwendung mehrerer Datenbanken zeigt sich auch in der Funktions- und Signalweganalyse. Durch Verwendung der beiden Datenbanken kann man erkennen, dass bestimmte relevante Signalwege unter Verwendung einer Datenbank durch hohe Werte repräsentiert sind, jedoch unter Verwendung der anderen Datenbank von geringerer Signifikanz sind, wie in Abbildung 13 zu sehen. Um eine möglichst umfassende Charakterisierung des CSF-Proteoms zu gewährleisten, scheint es somit sinnvoll, mehrere Datenbanken zu implizieren.

In dieser Studie wurden absichtlich zusammengefügte (gepoolte) Proben verwendet, obwohl bereits in mehreren Studien gezeigt wurde, dass Maus-CSF auch individuell analysiert werden kann [74, 76]. In der Studie von Smith *et al.* wurde mittels individuell analysierter CSF-Proben eine Gesamtzahl von 261 Proteinen identifiziert, vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie [74]. Durch das Pooling der Proben wird allerdings der Einfluss inter-individueller Unterschiede im CSF-Proteom verringert. Überdies lag

in dieser Studie der Fokus auf allgemeinen, gesamtgültigen Veränderungen des CSF-Proteoms, hervorgerufen durch CSD oder durch HNK-Gabe. Inter-individuelle Unterschiede des Proteoms sollten daher bewusst geringen Einfluss nehmen. In einem Konsens Protokoll für die Sammlung von humanem CSF wurde zudem empfohlen ein standardisiertes CSF-Volumen zu verwenden, um fehlerhafte und verzerrte Ergebnisse zu vermeiden, da das CSF-Volumen die Proteinkonzentration von interessierenden Proteinen verändern kann [108, 109]. Dennoch könnte in Zukunft in weiteren Studien der Effekt von CSD oder HNK-Gabe auf das individuelle Maus-Proteom von Interesse sein.

Anders als in den MS-Studien zu Maus-CSF von Cunningham *et al.* und Onaivi *et al.*, wurde in der vorliegenden Studie auf den Einsatz von Entfernungskits (Immunodepletion) zur Entfernung sehr abundanter CSF-Proteine verzichtet [73, 75]. Solche Entfernungskits haben zum Ziel, sehr häufig abundante Proteine aus den Proben zu entfernen. Ein Beispiel hierfür ist das Protein Albumin, das in CSF einen großen Anteil des gesamten Proteoms einnimmt [47]. Somit soll die Überlagerung wenig abundanter Proteine durch Proteine wie Albumin bei der Messung im Massenspektrometer verhindert werden. Allerdings birgt die Verwendung von Immunodepletion die Gefahr, Proteine zu entfernen, die mit den Ziel-Proteinen assoziiert vorliegen und potenzielle Markermoleküle darstellen könnten [77, 78]. Das Verfahren der Gelelektrophorese hat sich deshalb als hilfreich erwiesen, um dieses Problem zu umgehen ohne auf die Verwendung von Immunodepletion zurückzugreifen [79]. Dabei findet eine Prä-Fraktionierung des Proteingemischs statt, wodurch die Komplexität des Proteingemischs im Vorfeld reduziert wird, um Überlagerungseffekte bei der Messung im Massenspektrometer zu verhindern.

Eine weitere Besonderheit der hier vorliegenden Studie war, dass auf eine vorherige Bestimmung des Proteingehalts der CSF-Proben verzichtet wurde. Verantwortlich hierfür ist unter anderem der sehr geringe Proteingehalt von CSF. Der Proteingehalt in humaner CSF liegt physiologisch zwischen 15-45 mg/dl, wobei in Onaivi *et al.* die Proteinkonzentration von Maus-CSF 100 mg/dl betrug [45, 73]. In der Studie von Onaivi *et al.* konnten so insgesamt 268 unterschiedliche Proteine identifiziert werden. Da der tatsächliche Proteingehalt möglicherweise noch unter der Messung von Onaivi *et al.* liegen könnte, ist der Proteingehalt, bei verwendetem Probevolumen von 40 bzw. 42 µl pro biologischem Replikat, sehr gering. Zudem birgt die massenspektrometrische Analyse von Maus-CSF eine weitere Herausforderung: das CSF-Gesamtvolumen

einer Maus beträgt nur ca. 0,04ml, wodurch das entnehmbare Probevolumen ebenso sehr gering ist [44].

In dieser Studie wurde pro CSF-Entnahme durchschnittlich 6,34 μ l CSF aus dem Seitenventrikel der Maus gewonnen. In den Studien von Onaivi *et al.* und Smith *et al.*, in denen CSF ebenso aus dem Seitenventrikel gewonnen wurde, lag das CSF-Volumen sogar nur bei 2 bzw. 4 μ l pro CSF-Entnahme [73, 74]. In Studien, in denen CSF durch Punktion der Cisterna Magna der Mäuse gewonnen wurde, liegt die Entnahmemenge bei 5 bzw. 10 μ l pro Entnahme [75, 76]. Die durchschnittliche CSF-Entnahmemenge dieser Studie ist somit ähnlich wie in bisherigen Publikationen, ungeachtet der Entnahmemethode. Um den Proteingehalt zu erhöhen ist das Pooling mehrerer individueller Proben zu einem biologischen Replikat eine adäquate Methode, die auch in weiteren Studien Anwendung findet [73, 75].

Im CSD-Experiment wurden die 15 am meisten abundanten CSF-Proteine und deren prozentualer Anteil am Gesamt-Proteom hervorgehoben. Es konnte dabei festgestellt werden, dass das Protein Albumin bereits ca. 44% des gesamten Maus-CSF-Proteoms ausmacht. Diese Zahl deckt sich mit den bisherigen Erkenntnissen über CSF des Menschen. Hierbei macht Albumin ebenso den größten Prozentanteil des CSF-Proteoms aus. Meist liegen die Albumin-Werte dabei etwas über den hier berichteten 44% und variieren zwischen 45-75% [47, 110].

Zweit- und drittgrößten Anteil am CSF-Proteom haben in dieser Studie Hämoglobin Untereinheiten. Auch in anderen MS-Studien zu Maus-CSF konnte Hämoglobin detektiert werden [73-75]. In der Studie von Smith *et al.* ist Hämoglobin sogar das am meisten abundante Protein [74]. Auch in humanen CSF-Studien konnte Hämoglobin detektiert werden [69, 111, 112]. Da jedoch in dieser Studie auf eine vorherige Bestimmung des Proteingehalts aus bereits genannten Gründen verzichtet wurde, kann eine Kontamination mit Blut durch die CSF-Entnahmetechnik nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Blutkontamination würde sich im erhöhten Gesamtproteingehalt in CSF widerspiegeln weshalb der Proteingehalt als Kontaminationsmarker dienen kann [57]. Es bleibt daher abschließend ungeklärt, ob eine geringe Kontamination mit Blut für die Abundanz von Hämoglobin-Untereinheiten in dieser Studie verantwortlich gemacht werden kann, da ein Ausschluss potenziell kontaminierter Proben nur rein visuell erfolgte. Allerdings gilt die Abundanz von Hämoglobin-Untereinheiten auch als regulärer Befund in Maus-CSF und wurde in vielen weiteren Studien ebenso detektiert [73-75].

Vergleicht man die Gesamtintensitäten der 15 am meisten abundanten CSF-Proteine unter Verwendung der *Mus musculus* Datenbank der beiden Mausmodelle, dann nehmen die Proteine Alb, Hbb-1, und Hba dabei zusammen ca. 75% des gesamten CSF-Proteoms im CSD-Experiment und ca. 79% des gesamten CSF-Proteoms im HNK-Experiment ein. Aufgrund dieser homogenen Ergebnisse ist eine Verzerrung durch eine potenzielle Blutkontamination nicht anzunehmen.

Im CSD- sowie im HNK-Experiment machen die übrigen Proteine, die nicht zu den 15 am meisten abundanten CSF-Proteinen gehören, nur ca. 9% bzw. 5% des gesamten CSF-Proteoms aus. Da gerade unter diesen sehr gering abundanten Proteinen auch potenzielle Marker-Proteine vorhanden sein könnten, ist deren Detektion von außerordentlicher Wichtigkeit. In Studien zur Untersuchung des Maus-CSF-Proteoms kommen hierfür LC-Verfahren zum Einsatz. In Smith *et al.* beispielsweise wird in einem zweidimensionalen LC-Verfahren eine SCX-Chromatographie mit nanoLC kombiniert [74, 80]. Auch in Cunningham *et al.* wird das nanoLC-Verfahren verwendet [75]. In einer weiteren Arbeit zum Maus-CSF-Proteom kommt das Easy nLC 1000-System zum Einsatz [76]. In den berichteten Studien wurden hoch präzise LC-Systeme verwendet, wobei bei der Probenvorbereitung auf einen Gelelektrophorese-Schritt verzichtet und ein In-Solution Trypsin-Verdau verwendet wurde [74-76]. Präzise Prä-Fraktionierung mittels Gelelektrophorese in Kombination mit LC-Methoden stellen hilfreiche Separationsmechanismen dar, um Überlagerungseffekte von häufig abundanten Proteinen bei der Messung im Massenspektrometer zu vermeiden [79]. Sie kamen daher in dieser Studie erfolgreich zum Einsatz.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie mittels „Discovery Proteomics“-Strategien das gesamte CSF-Proteom der Maus umfassend charakterisiert werden. Durch die Verwendung der *Mus musculus* und *Homo sapiens* Datenbanken konnte eine Gesamtzahl von 462 Proteinen in Maus-CSF beider Mausmodelle gemeinsam identifiziert werden (FDR 1%), wodurch sich eine der größten Listen identifizierter CSF-Proteine der Maus durch eine MS-Studie ergibt. Diese Gesamtzahl identifizierter CSF-Proteine aus dem CSD- sowie HNK-Experiment dieser Studie ist mit den Gesamtzahlen bisheriger MS-Studien zu Maus-CSF vergleichbar, siehe Tabelle 1 (Kapitel 2.6). Allerdings liegen in diesen Studien Unterschiede im experimentellen Ablauf vor. In Bezug auf Probeentnahmetechnik, Probenvolumen (Pooling vs. individuell) und Probeaufbereitung (Immunodepletion vs. 1DE) variiert der MS-Workflow teilweise erheblich. Außerdem werden unterschiedliche MS-Systeme und bioinformatische

Restriktions-Kriterien angewendet, wodurch die Vergleichbarkeit der Gesamtzahlen weiter eingeschränkt wird. Um vergleichbare Datensätze der unterschiedlichen MS-Studien zum Maus-CSF-Proteom zu bekommen, ergibt sich der Wunsch nach einheitlichen Entnahmeprotokollen und einem einheitlichen MS-Workflow. Die vorliegende „Discovery-Proteomics“-Studie liefert einen der bislang größten Datensätze identifizierter CSF-Proteine von lebendigen Mäusen durch eine MS-Studie. Durch Kombination von 1DE, In-Gel Trypsin-Verdau und LC-MS/MS, ohne Verwendung von Immunodepletion, konnte das CSF-Proteom der Maus in zwei unterschiedlichen Mausmodellen umfassend charakterisiert werden.

5.2 Proteine des CSD-Experiments

Durch diese Studie konnte gezeigt werden, dass CSD bei Mäusen die Zusammensetzung der Proteine in CSF ändert. CSF eignet sich somit als ideale Körperflüssigkeit, um stressbedingte Proteinveränderungen zu detektieren, um so involvierte Signalwege aufzudecken. Insgesamt waren 24 CSF-Proteine signifikant unterschiedlich abundant in der CSD-Gruppe im Vergleich zur CTRL-Gruppe. Hiervon traten 6 Proteine vermehrt und 18 Proteine vermindert abundant auf. Die durch CSD-Stress regulierten Proteine sind überwiegend im Zytoplasma und Extrazellularraum lokalisiert und können mehrheitlich folgenden Signalwegen zugeordnet werden: Entzündungsreaktion, Energiestoffwechsel und Zytoskelett-Neuorganisation.

Interessanterweise sind eine Vielzahl der signifikant unterschiedlich regulierten CSF-Proteine bei der Entzündungsreaktion (*Inflammatory response*) involviert, wie in Abbildung 27 zu sehen. Hierzu zählen: Angiotensinogen (AGT), Lacritin (LACRT), Lactotransferrin (LTF), Lysozym (LYZ), TNFAIP3-interagierendes Protein 1 (TNIP1), Myeloperoxidase (MPO) und Integrin β -2 (ITGB2). Eine Dysregulation des Immunsystems ist in bestehender Literatur bereits mehrfach mit stressbedingten psychischen Störungen wie der Depression in Verbindung gebracht worden [113, 114]. Unter chronischem Stress konnte zudem eine erhöhte Infektanfälligkeit nachgewiesen werden [115, 116]. Dabei scheinen insbesondere LTF und LYZ bei Abwehrreaktionen von Bakterien involviert [117]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Studie konnte in einem chronischen Stressmodell mit Mäusen eine Beeinträchtigung der bakteriellen Abwehr nachgewiesen werden [118]. Immunprozesse scheinen somit in die Antwort auf chronischen Stress involviert zu sein. Mit diesen Ergebnissen deckt sich die in dieser Studie vorliegende verminderte Abundanz der Myeloperoxidase (MPO). Die

MPO ist ein zytoplasmatisches Protein, welches zum einen, wie in Abbildung 27 zu sehen, in der Entzündungsreaktion eine Rolle spielt und zum anderen in Abwehrreaktionen von Bakterien involviert ist. Auch das herunterregulierte Protein Integrin β -2 (ITGB2, auch bekannt als CD18) spielt bei Entzündungsprozessen eine Rolle. Die Funktions- und Signalweganalyse konnte zudem aufdecken, dass der vorgeschaltete Regulator TGFB1 potenziell für die Inhibierung von ITGB2 verantwortlich ist, siehe Abbildung 25. TGFB1 ist ein multifunktionelles Zytokin, das sowohl bei der Regulation der Immunantwort entscheidend involviert ist als auch bei der Apoptose eine zentrale Rolle spielt [119]. Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Erkrankung ist TGFB1 durch Modulation von Immunprozessen zentral in die Pathophysiologie verwickelt [120, 121]. In diesem Experiment konnte die Funktions- und Signalweganalyse mittels IPA-Software zeigen, dass die Signalwege der Apoptose und Entzündungsreaktion maßgeblich bei der Stressantwort auf CSD involviert sind. Somit könnte TGFB1 durch Immunmodulation sowie Regulation von Apoptose auch bei der Pathophysiologie stressbedingter Störungen möglicherweise von entscheidender Bedeutung sein. Das nachgeschaltete Protein ITGB2 ist ein Zell-Oberflächenmolekül aus der Gruppe der Integrine. Es ist besonders relevant für die Adhäsion von Leukozyten. Die in dieser Studie aufgezeigten erniedrigten Level von ITGB2 in CSF von gestressten Mäusen könnte ein Hinweis auf eine reduzierte Immunkapazität der Leukozyten darstellen. Ebenso ist eine veränderte Verteilung der Leukozyten unter Stress denkbar, wie bereits in einem Stress-Experiment mit Ratten nachgewiesen worden ist [122]. In einer früheren Studie beim Menschen konnten außerdem Veränderungen der Expression von ITGB2 mit psychologischem und physiologischem Stress in Verbindung gebracht werden [123]. Übergeordnet verantwortlich für die verminderte Abundanz von Proteinen der Entzündungsreaktion und von Proteinen, die an der bakteriellen Abwehr beteiligt sind, könnten möglicherweise veränderte Glukokortikoid-Level sein, die durch chronischen Stress hervorgerufen werden können [124]. Die Funktions- und Signalweganalyse zeigte im CSD-Experiment, dass der GR-Signalweg zu den am signifikantesten regulierten Signalwegen durch CSD zählt, siehe Abbildung 24. Glukokortikoide führen, vermittelt durch den Glukokortikoid-Rezeptor, unter anderem zur Immunsuppression. In der Literatur findet sich außerdem Evidenz, dass bei stressbezogenen Erkrankungen wie der Depression eine verminderte Sensitivität des GR eine Rolle spielt [13, 125].

Unter den unterschiedlich abundanten Proteinen waren interessanterweise auch signifikant erhöhte Level der mitochondrialen ATP Synthase Untereinheit α (ATP5F1A) und ATP Synthase Untereinheit β (ATP5F1B) nachweisbar. Beide spielen bei mitochondrialer Dysfunktion eine Rolle, wie auch die Funktions- und Signalweganalyse, siehe Abbildung 24, ergab. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden im Gehirn von Patienten mit Depression bereits mehrfach erhöhte Level von mitochondrialen Proteinen, darunter ATP-Synthasen, festgestellt [126, 127]. Eine potenziell wichtige Rolle in der Pathophysiologie stressbezogener Störungen wie der Depression scheint deshalb denkbar. Mitochondrien stellen mittels oxidativer Phosphorylierung den Hauptanteil des energieliefernden Adenosintriphosphats (ATP) in einer Zelle bereit und sie können als Antwort auf eine sich ändernde Umwelt ihre metabolischen Funktionen anpassen [128]. Bei den stressinduzierten Proteinveränderungen in CSF der Mäuse scheinen insbesondere metabolische Prozesse eine Rolle zu spielen. Dies stimmt mit Literaturberichten überein, welche eine mitochondriale Dysfunktion mit der Pathophysiologie psychischer Störungen, insbesondere der Depression, in Verbindung bringen [16, 129]. Es gibt sogar Hinweise, dass ein gesteigerter Energiebedarf des Gehirns unter Stresseinwirkung mitochondriale Mal-Adaptation auslöst, was bei einer bestimmten Untergruppe von Patienten zur Depression führen kann [15]. ATP-Synthasen sind Schlüsselenzyme bei der ATP-Produktion, weshalb sie wichtig für die Energiebereitstellung sind. Sie sind bei Eukaryoten auf der inneren Mitochondrienmembran exprimiert [128]. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes, vor allem auch des Gehirns. ATP5F1A und ATP5F1B sind beide Teil des intrazellulären F1 Anteils der ATP-Synthase. An der F1-Untereinheit wird die Bildung von ATP katalysiert. In einem Experiment mit Ratten konnte gezeigt werden, dass CSD zu oxidativem Stress führt [130]. Dieser oxidative Stress könnte verantwortlich für mitochondrialen Untergang sein, wie bereits bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen postuliert [131]. Ihr Vorhandensein in CSF von gestressten Mäusen könnte somit als ektopisch betrachtet werden und möglicherweise mitochondrialen Untergang widerspiegeln. Möglich wäre aber auch, dass ATP5F1A und ATP5F1B in CSF ein Signal für die Dissoziation der ATP-Synthase von der inneren mitochondrialen Membran darstellt. Eine weitere mögliche Ursache für die ATP-Synthase-Untereinheiten in CSF könnte die Einwanderung von Zellen darstellen, hervorgerufen durch eine stressinduzierte verminderte Integrität der Blut-Hirn-Schranke [132].

Ein weiteres Enzym, welches im Metabolismus der Zellen eine Rolle spielt, ist die Nukleosid-Diphosphat-Kinase A (NME1). Diese ist in CSF der gestressten Mäuse vermindert abundant. In der Funktions- und Signalweganalyse konnte der in hohem Maße inhibierte Transkriptionsfaktor TGFB1 im CSD-Experiment als vorangeschalteter Regulator identifiziert werden, der nachfolgend zur Inhibierung von NME1 führt, wie in Abbildung 25 (B) zu sehen ist. Das ubiquitäre Enzym NME1 katalysiert reversibel die Bindung von terminalen Phosphatgruppen an Nukleosid-Diphosphate und Nukleosid-Triphosphaten. Somit ist das Enzym NME1 generell für das Gleichgewicht von Nukleosid-Di- und Triphosphaten in einer Zelle verantwortlich und spielt auch eine Rolle bei neuronalem Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Neurit-Wachstum [133]. Verminderte Level von NME1, wie in der vorliegenden Studie, wurden erstaunlicherweise auch im Gehirn von Patienten mit Alzheimer Erkrankung gefunden [134]. Damit übereinstimmend konnte eine Veränderung von NME1 mit Gedächtnisverlust und Defiziten des räumlichen Gedächtnisses bei gestressten Mäusen in Verbindung gebracht werden [23]. In einer Studie mit Maus- und Ratten-Zelllinien konnte außerdem die protektive Funktion von Nukleosid-Diphosphat-Kinasen vor oxidativem Stress gezeigt werden [135]. Eine Verminderung des NME1-Levels bei CSD könnte auf diesem Weg somit ein Hinweis auf die Pathogenese stressbedingter Störungen geben.

In der vorliegenden Studie gab es einige CSF Proteine, die signifikant unterschiedlich abundant zwischen der CSD- und der CTRL-Gruppe vorkamen, vorwiegend Marker für oxidativen Stress und Entzündungsprozesse. Die Aldo-Keto-Reduktase-Familie 1 Mitglied A1, (AKR1A1) gehört zur Familie der Aldo-Keto-Reduktasen. Die AKR1A1 ist ein ubiquitäres Enzym, das unter anderem bei der Entgiftung einer Reihe von toxischen Aldehyden, Ketonen, körperfremden Stoffen und Medikamenten eine Rolle spielt [136]. Das stressinduzierte Absinken des AKR1A1-Levels könnte durch eine reduzierte Entgiftungsfunktion zusätzlich zu Neuroinflammation und oxidativem Stress führen. Mit diesen Ergebnissen deckt sich das vermehrte Vorkommen von TNFAIP3-interagierendem Protein 1 (TNIP1) in CSF von gestressten Mäusen. TNIP1 hat eine regulierende Funktion auf die Immunantwort und spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Entzündungsreaktion, wie auch aus der Funktions- und Signalweganalyse, Abbildung 27, hervorgeht. TNIP1 wurde bereits mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht [137]. Da TNIP1 durch Tumornekrosefaktor α (TNF α) induziert wird, lässt seine Hochregulation in CSF von gestressten Mäusen ebenso eine Hochregulation des TNF α -Levels vermuten, was in Übereinstimmung mit

bestehender Literatur ist. Erhöhte TNF α -Level konnten bei Mäusen unter CSD nachgewiesen werden [138].

Ein weiteres Protein, das in CSF von CSD-Mäusen vermehrt abundant war, ist Beta-Aktin ähnliches Protein 2 (ACTBL2). Es ist struktureller Bestandteil des postsynaptischen Aktin-Zytoskletts und trägt zu dessen Intaktheit bei. Die erhöhten Werte von ACTBL2 in CSF der gestressten Mäuse könnten somit für Veränderungen der synaptischen Plastizität und des Aktin-Zytoskletts sprechen. Wie bereits in früherer Literatur beschrieben, spielt die Aktin-Dynamik bei Stress in Zusammenhang mit synaptischer Plastizität eine Rolle [139]. Damit übereinstimmend gibt es immer mehr Evidenz für eine gestörte Neuroplastizität in depressiven Phasen, was auch in Mausmodellen nachgewiesen werden konnte [140]. Neuroplastizität spielt eine zentrale Rolle bei der Anpassung des Gehirns auf Stress [141]. Dahingegen waren CSF-Level von Tubulin α -1B Kette (TUBA1B) vermindert abundant in CSD-behandelten Mäusen. Tubulin ist Bestandteil der Mikrotubuli, die ebenso Teil des Zytoskletts einer Zelle sind und dabei eine Rolle beim Transport innerhalb der Zelle und bei der Bewegung der Zelle spielen. Da TUBA1B, anders als ACTBL2 als Teil des Aktin-Zytoskletts, durch CSD herunterreguliert wurde, zeigt sich eine entgegengesetzte Regulation der beiden Zytoskelett-Proteine. Eine veränderte Expression von Tubulin-Isoformen konnte auch bei Yang *et al.* in einem Stressexperiment mit Ratten im Hippocampus nachgewiesen werden [142]. Eine Zytoskelett-Dysfunktion scheint somit, wie bereits in früherer Literatur erwähnt, sowohl in Bezug auf Aktinfilamente als auch Mikrotubuli bei der Pathogenese der Depression involviert zu sein [143].

Neben den Effekten von CSD auf Proteine, die im Zusammenhang mit Energiehaushalt, Entzündungsprozessen und dem Zytoskelett stehen, konnte zudem eine verminderte Abundanz von Histon H1.2 (HIST1H1C) nachgewiesen werden. Histone sind Proteine des Zellkerns, die Bestandteil des Chromatins sind und somit für die Verpackung der DNA essenziell sind. Außerdem spielen sie für die Regulation der Expression mancher auf der DNA codierten Gene eine Rolle. Es konnte bereits in CSD-Experimenten mit Mäusen und Ratten eine modifizierte Genexpression sowie geänderte Acetylierung von Histonen gezeigt werden [144, 145]. Chromatin-modellierende Mechanismen scheinen so bei der Antwort auf CSD involviert zu sein. Die in dieser Studie gezeigte stressinduzierte Veränderung des Histon-Levels in CSF bestätigt somit Ergebnisse bisheriger Studien.

Wie zu erwarten, ist eine Vielzahl der signifikant regulierten CSF-Proteine im Extrazellulärraum lokalisiert. Hierzu zählen Angiotensinogen (AGT), Lacritin (LACRT), Lactotransferrin (LTF), Lysozym (LYZ), Prolactin-induziertes Protein (PIP) und Prolin-reiches Protein 4 (PRR4). All diese Proteine sind im CSF von gestressten Mäusen vermindert abundant. Einige dieser im Extrazellulärraum lokalisierten Proteine spielen, wie bereits erwähnt, bei Entzündungsreaktionen eine Rolle. Zudem sind einige dieser Proteine wie PRR4, LYZ, LACRT und LTF interessanterweise auch wesentlicher Bestandteil von Tränenflüssigkeit [146]. Bei vielen neuropsychiatrischen Erkrankungen sind Manifestationen am Auge bereits bekannt [88]. Da humane CSF-Proben der Wissenschaft nicht unbegrenzt zur Verfügung stehen, könnte in nachfolgenden Studien möglicherweise Tränenflüssigkeit dazu dienen, um stressbedingte Proteinveränderungen im Zusammenhang mit Erkrankungen wie der Depression detektieren zu können.

Zusammenfassend waren die in dieser Studie beobachteten Veränderungen der Proteinzusammensetzung in CSF, hervorgerufen durch CSD, vorwiegend in Immunprozessen, im Energiestoffwechsel und in der Zytoskelett-Neuorganisation involviert. CSD scheint eine Inhibierung der Entzündungsreaktion zur Folge zu haben. Außerdem liefert das vorliegende Stressmodell Hinweise darauf, dass mitochondriale Dysfunktion in der Pathophysiologie stressbedingter psychischer Störungen involviert sein könnte. Die Ergebnisse liefern umfangreiche Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen der Stressantwort und erscheinen in Übereinstimmung mit Erkenntnissen bereits existierender Literatur. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich CSF als gut verfügbare Körperflüssigkeit im lebenden Organismus ideal eignet, um zentrale Prozesse zu beleuchten, die einer bestimmten Pathophysiologie zugrunde liegen. Die Untersuchung des CSF-Proteoms kann nicht nur das Verständnis von zentralen Prozessen unter bestimmten Bedingungen erweitern, sondern auch zur Identifizierung potenzieller neuer Biomarker dienen. Diese Studie liefert umfassende Belege dafür, dass sich insbesondere MS-Verfahren für das Aufzeigen dynamischer Veränderungen des CSF-Proteoms unter unterschiedlichen Bedingungen eignen und zum Verständnis pathophysiologischer Signalwege beitragen.

5.3 Proteine des HNK-Experiments

In diesem Teil der Studie konnte in einem Mausexperiment gezeigt werden, dass die Administration von HNK die Proteinzusammensetzung von Maus-CSF beeinflusst. Hierbei wurde ein Verfahren erfolgreich angewandt, in dem in der lebendigen Maus

mehrere CSF-Entnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten, in diesem Fall vier Stunden und eine Woche nach HNK-Administration, erfolgten, um erstmals dynamische Veränderungen des CSF-Proteoms zu detektieren. Dies ist somit die erste Studie, die einen umfassenden Einblick in die akuten und länger anhaltenden Auswirkungen des potenziell neuen, schnell-wirksamen und somit vielversprechenden Antidepressivums HNK auf das CSF-Proteom von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglicht. Es wurde dabei durch Verwendung von DBA/2J-Mäusen, die ein angeborenes erhöhtes Angstlevel haben, auf zusätzliche Depressions-Modelle verzichtet, um äußere Einflüsse zu minimieren. Zum Zeitpunkt 4h nach Injektion von HNK bzw. Kochsalzlösung waren 21 Proteine signifikant unterschiedlich abundant und eine größere Anzahl von 57 Proteinen zum Zeitpunkt 1w. Auffällig waren vor allem die zu beiden Zeitpunkten herunterregulierten Proteine des GR-Signalwegs, was durch die Funktions- und Signalweganalyse aufgedeckt werden konnte.

GRs sind überwiegend intrazelluläre Hormonrezeptoren, die nach Bindung von Glukokortikoiden, wie z.B. des Stresshormons Kortisol, aktiviert werden. Der aktivierte GR übermittelt über Transaktivierung und Transrepression die vielfältige Wirkung der Glukokortikoide wie Beeinflussung des Stoffwechsels, des Nervensystems und des Immunsystems. Die Wirkung ist auf Ebene des Immunsystems entzündungshemmend und immunsuppressiv. GRs sind nahezu ubiquitär exprimiert. Im Zentralnervensystem sind GRs von außerordentlicher Bedeutung bei der Übermittlung der Stressantwort: sie regulieren die kurzfristige und längerfristige Anpassung auf einen Stressor und beeinflussen die Neuroplastizität [147]. Hierbei scheinen GRs in der Pathophysiologie psychischer Erkrankungen wie der Depression oder der Posttraumatischen Belastungsstörung eine zentrale Rolle zu spielen [148]. Als Reaktion des Körpers auf einen Stressor werden über den Weg der HPA-Achse Glukokortikoide wie Kortisol ausgeschüttet, wie bereits in 2.2 detailliert beschrieben. Psychische Störungen wie die Depression können mit einer Dysregulation der HPA-Achse einhergehen [11, 12]. Eine verminderte Sensitivität des zentralen GR unter chronischem Stress ist dabei vermutlich entscheidend [13, 125]. Studien konnten zeigen, dass eine erfolgreiche antidepressive Therapie mit klassischen Antidepressiva mit einer Normalisierung der HPA-Achsenregulation einhergeht [14]. Jedoch konnten Wang *et al.* nachweisen, dass auch die antidepressive Wirkung von Ketamin durch eine Normalisierung der HPA-Achse und GR-Dysbalance in Mäusen gekennzeichnet ist [149]. Somit gibt es zuverlässige Evidenz für die Schlüsselrolle der HPA-Achsenaktivität und des GR-Signalwegs für die

Wirkung von klassischen Antidepressiva und auch für die schnell einsetzende antidepressive Wirkung von Ketamin und dessen Metabolit HNK. Die in dieser Studie signifikant unterschiedlich regulierten CSF-Proteine des GR-Signalwegs, zu beiden Zeitpunkten nach HNK-Administration, bestätigen diese Hypothese.

Die Mehrheit der signifikant unterschiedlich regulierten GR-Signalweg-Proteine sind Keratine, wie in Abbildung 24 zu sehen ist. Übereinstimmend zu beiden Zeitpunkten waren dabei drei Keratine (KTR1, KTR9, KTR10) herunterreguliert. Keratine sind in erster Linie Bestandteil der Intermediärfilamente von Epithelien und damit normalerweise vor allem mit Hautpathologien assoziiert [150]. Eine Verunreinigung der Proben mit Keratinen der Haut ist aber ausgeschlossen, da in einem zusammenfassenden, umfangreichen Datensatz von massenspektrometrischen CSF-Studien von Pan *et al.* alle drei zu beiden Zeitpunkten regulierten Keratine dieser Studie auch in humanem CSF nachgewiesen wurden, was die Existenz von Keratinen in CSF eindeutig bestätigt [71]. In jüngster Zeit gibt es außerdem wachsende Evidenz für die Rolle von Keratinen bei neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei der Alzheimer Erkrankung oder der Multiplen Sklerose [151, 152].

Neben Keratinen waren Hitzeschockproteine (HSPs) zum Zeitpunkt 1w herunterreguliert. Sie sind ebenso involviert im GR-Signalweg. Das Hitzeschockprotein der Familie A Mitglied 5 (HSPA5) ist ein Chaperon-Protein des Endoplasmatischen Retikulums (ER), dessen Funktion die Proteinfaltung und Aggregation im ER ist. HSPA5 wurde in einer Studie mit ER-Dysfunktion und Neurodegeneration in Verbindung gebracht [153]. Die Funktions- und Signalweganalyse mittels IPA-Software ergab ebenso im HNK Experiment zum Zeitpunkt 1w, eine Verbindung zwischen progredienten neurologischen Erkrankungen (*Progressive neurological disorder*) und HSPA5 und HSPA9, wie in Abbildung 28 zu sehen. Auch in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Erkrankung ist die Beteiligung von ER-Stress allgemein anerkannt [154]. Übereinstimmend damit werden HSPA5 und HSPA9 in Abbildung 28 mit der Alzheimer Erkrankung assoziiert. Basierend auf unseren Ergebnissen scheinen Hitzeschockproteine bei HNK-vermittelten längerfristigen Veränderungen involviert zu sein.

Interessanterweise wurde in dieser Studie gezeigt, dass ein Protein aus der Familie der Rho-GTPasen, RhoA, das am signifikantesten vermehrt abundante Protein zum Zeitpunkt 4h war, wie im PPI-Netzwerk in Abbildung 21 zu sehen. Rho-GTPasen spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, indem sie Signale vom Rezeptor zum

Effektor weiterleiten. Sie regulieren so eine Vielzahl von Zellfunktionen [155]. Die RhoA wird dabei vorwiegend mit Zytoskelett-Neuorganisation und Aktin-Dynamik in Verbindung gebracht und scheint eine Rolle bei der Neuroplastizität und beim synaptischem Umbau zu spielen [156]. Jüngste Forschungsergebnissen bestätigen die Rolle des Zytoskeletts bei der Pathogenese stressbedingter psychischer Störungen wie der Depression [139]. Die Autoren bringen vor allem Störungen der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts mit der Entwicklung psychischer Störungen in Verbindung [139]. RhoA ist dabei besonders in den Aktin-Umbau in dendritischen Fortsätzen im ZNS involviert [157]. Aktuelle Erkenntnisse von Fox *et al.* zur Rolle von RhoA bei Depression weisen darauf hin, dass die Aktivierung dieses Proteins im Nucleus Accumbens zu depressions-ähnlichem Verhalten beiträgt [157]. Hierbei konnte die pharmakologische und genetische Reduktion der aktivierten RhoA die depressions-ähnlichen Folgen von CSD bei Mäusen verhindern. Es ist allgemein anerkannt, dass Depression mit strukturellem und molekularem Umbau und Untergang von Dendriten und Dornenfortsätzen in bestimmten Gehirnregionen einhergeht [158, 159]. In Depressionsmodellen mit Tieren konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Antidepressiva, einschließlich Ketamin, bemerkenswerterweise zu einer Umkehrung dieses Depressions-bedingten Untergangs der Dornenfortsätze führt [159]. In diese Umkehrung könnte möglicherweise das hochregulierte RhoA-Level 4 Stunden nach HNK-Administration, wie in dieser Studie berichtet, involviert sein. Offen bleibt die Frage, wie genau RhoA in CSF detektierbar ist. Erhöhte RhoA-Level in CSF der HNK-Gruppe könnten möglicherweise die Freisetzung von RhoA durch bestimmte Zellen des Gehirns als Folge der antidepressiven Therapie reflektieren. Diese Hypothese stützt die Publikation von Al-Shweiki *et al.* in der berichtet wird, dass Apolipoprotein E (ApoE) in CSF herunterreguliert wurde, jedoch im Brodmann Areal 9 von Patienten mit Depression hochreguliert war [160]. Übereinstimmend wurden in dieser Studie hochregulierte ApoE-Level in Maus-CSF nach HNK-Administration gefunden, was darauf hinweist, dass HNK die Depressions-auslösenden Effekte reduziert, indem es die Konzentration bestimmter Proteine in bestimmten Gehirnzellen möglicherweise durch klassische Sekretion senkt [161].

Via Funktions- und Signalweganalyse wurde zum Zeitpunkt 1w *Organisation of filaments* als relevanter biologischer Prozess identifiziert. Vimentin (VIM), Moesin (MSN), *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und Tubulin beta chain (Tubb) sind zum Zeitpunkt 1w signifikant hochregulierte Proteine, die alle in Verbindung mit diesem biologischen Prozess stehen, wie in Abbildung 28 sichtbar wird. Wie bereits erwähnt, deuten

aktuelle Forschungsergebnisse darauf hin, dass vor allem das Aktin-Zytoskelett bei der Pathogenese stressbedingter psychischer Störungen wie der Depression eine entscheidende Rolle spielt [139]. VIM und GFAP sind beides Typ-3 Intermediärfilamente. GFAP kommt als Intermediärfilament im Zytoplasma von Gliazellen, vor allem Astrozyten, des ZNS vor. Die antidepressive Wirkung von HNK scheint mit einer Hochregulierung von GFAP und VIM einher zu gehen. Somit spielen möglicherweise neben dem Aktin-Zytoskelett auch Intermediärfilamente eine wichtige Rolle bei stressbedingten psychischen Störungen sowie deren Therapie. Außerdem gibt es Hinweise, dass der antidepressive Effekt von Ketamin, der Muttersubstanz von HNK, auf einer Steigerung der Synaptogenese beruht [162]. Die gesteigerte Synaptogenese könnte dabei möglicherweise auf eine Aktivierung von mTOR zurückgeführt werden [162, 163]. Cavalleri *et al.* konnten zudem durch HNK dieselben Effekte wie durch Ketamin erzielen [162]. Ebenso konnte in dieser Studie eine Aktivierung von mTOR als vorgeschalteter Regulator einiger signifikant regulierter CSF-Proteine eine Woche nach Ketamin Administration identifiziert werden. Zum Zeitpunkt 4h wurde allerdings eine Inhibierung von mTOR prognostiziert. Trotzdem könnte mTOR möglicherweise als entscheidender Regulator der HNK-Wirkung fungieren, ähnlich wie bei Ketamin. Erstaunlicherweise könnten Glukokortikoide womöglich übergeordnet für eine Regulation des mTOR-Signalwegs verantwortlich sein [164]. Dies würde die Hypothese der HPA-Achsen Dysregulation bei stressbedingten psychischen Störungen kräftigen. Weiterhin führen Cavalleri *et al.* die Wirkung von Ketamin neben mTOR auch auf BDNF zurück [162]. Auch in weiteren Studien konnte eine Aktivierung von BDNF nach Ketamin-Gabe nachgewiesen werden, und eine Blockade von BDNF führte zu einer verminderten Ketamin-Wirkung bei Mäusen [165, 166]. In dieser Studie wurde eine Aktivierung des vorgeschalteten Regulators BDNF zum Zeitpunkt 1w nach HNK-Administration prognostiziert, wodurch HNK auch eine BDNF-Aktivierung zu bewirken scheint. Diese Studie bekräftigt somit bisherige Forschungsergebnisse in denen mTOR und BDNF Schlüsselrollen in der antidepressiven Wirkung von Ketamin bzw. HNK zukommen.

Weitere signifikant unterschiedlich regulierte Signalwege in CSF von HNK-therapierten Mäusen in dieser Studie waren der Farnesoid X Rezeptor (FXR) und der Leber X Rezeptor (LXR) Signalweg. FXR und LXR sind Rezeptoren des Zellkerns, die an der DNA entweder als Monomer oder mit Retinoid X Rezeptor (RXR) als Heterodimer als Transkriptionsfaktoren agieren [167, 168]. Beide Signalwege regulieren dabei den Fett- und Glukosestoffwechsel [167]. Vor kurzem konnten Yang *et al.* in einer Studie mit

chronischem, unvorhersehbarem mildem Stress bei Mäusen durch eine proteomische Untersuchung von Plasma eine signifikante Veränderung von LXR/RXR und FXR/RXR Signalwegen detektieren [168]. Zwei Proteine, die mit diesen Signalwegen assoziiert sind, waren in dieser Studie zum Zeitpunkt 4h signifikant unterschiedlich abundant in CSF der HNK-Gruppe: Retinol bindendes Protein 4 (RBP4) und ApoE. Diese Proteine des Extrazellularraums waren beide hochreguliert. Interessanterweise war auch in der Studie von Dietzen *et al.* ApoE in CSF von Patienten mit Depression hochreguliert [63]. In Bezug auf den FXR- und LXR- Signalweg sowie ApoE decken sich somit die Erkenntnisse dieser Studie mit bestehender Literatur.

Zum Zeitpunkt 1w nach HNK-Injektion waren drei Proteine aus der Familie der Serin-Proteinase-Inhibitoren (Serpine) signifikant unterschiedlich abundant: Alpha-2-Antiplasmin (SERPINF2), Alpha-1-Antichymotrypsin (SERPINA3), Alpha-1-Antitrypsin (SERPINA1). Eine Studie von Swan und Kollegen konnte eindrucksvoll zeigen, dass die Familie der Serpine eine große Mehrheit der Proteine in CSF und Perilymphe von Mäusen ausmacht [169]. Hierbei ist es von außerordentlicher Bedeutung, dass SERPINA1 in einer Studie als einer der hoch sensitiven und spezifischen Biomarker für Patienten mit Depression identifiziert werden konnte [170]. In einer Studie von Bot *et al.* wurde überzeugend nachgewiesen, dass SERPINA1 außerdem ein Marker für einen aktuell depressiven Status ist, mit dessen Hilfe vom Status der Remission unterschieden werden konnte [171]. Die in dieser Studie detektierten, signifikant veränderten Serpin-Level nach HNK-Administration bestätigen bestehende Forschungsergebnisse über die Beteiligung von Serpinen in pathophysiologischen Prozessen bei der Depression. Die Funktions- und Signalweganalyse liefert Rückschlüsse über eine komplexe und vielseitige Rolle von Serpinen nach HNK-Administration. Serpine werden hier, wie in Abbildung 28 zu sehen ist, mit vielen relevanten Erkrankungen und biologischen Prozessen wie zum Beispiel Alzheimer Erkrankung, Apoptose und Synthese reaktiver Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht.

Zwei weitere Proteine, die beide mit Myelinisierung in Verbindung gebracht werden, waren zudem zum Zeitpunkt 4h nach HNK-Administration herunterreguliert sowie zum Zeitpunkt 1w hochreguliert: basisches Myelinprotein (MBP) und Proteolipid-Protein 1 (PLP1). Die PPI-Netzwerke, in Abbildung 21 und 22, der signifikant unterschiedlich abundanten Proteine, zeigen zu beiden Zeitpunkten eine Interaktion von PLP1 und MBP. MBP und PLP1 sind beide essenzielle Bestandteile der Myelinscheide von Nervenzellfortsätzen [172, 173]. Die Myelinscheide ist eine lipidreiche Schicht, die die

Nervenzellfortsätze umgibt, von Oligodendrozyten im ZNS gebildet wird und für die saltatorische Erregungsleitung verantwortlich ist [172]. Vor allem MBP scheint bei der Pathophysiologie der Multiplen Sklerose eine entscheidende Rolle zu spielen [173]. In einer Studie von Horner *et al.* wurde in einem bestimmten Gehirnareal von depressiven Patienten, die Suizid begangen hatten, eine verminderte Immunreaktivität von MBP nachgewiesen, was die Autoren auf eine gestörte Interaktion von neuronalen und oligodendroglialen Mechanismen zurückführen, die mit einer Dysregulation der neuronalen Konnektivität einhergehen [174]. Die signifikant unterschiedlich regulierten MBP- und PLP1-Level dieser Studie untermauern diese Hypothese. Eine unterschiedliche Beeinflussung von Expressions-Leveln von MBP und PLP1 in bestimmten Gehirnregionen und somit auch in CSF könnte mit einer Dysregulation der neuronalen Konnektivität bei Depression in Verbindung stehen.

Generell scheint die Mehrheit der CSF-Proteine aus diesem Experiment überlappend mit Proteinen zu sein, die in Gehirngewebe nachgewiesen wurden und dabei in die Pathophysiologie der Depression involviert waren [157, 160, 174]. Deshalb eignet sich CSF als relativ non-invasiv gewinnbare Körperflüssigkeit im lebendigen Organismus, um den pathophysiologischen Status des Gehirns wiederzugeben. Durch zusätzliche proteomische Untersuchung von Gewebe bestimmter Gehirnregionen von Mäusen, nach Administration von HNK, könnten die Ergebnisse dieser Studie in Zukunft zusätzlich validiert werden.

Zusammenfassend scheint die Administration von HNK die Proteinzusammensetzung in CSF unterschiedlich zu beeinflussen. Manche Proteine sind nur im akuten oder im länger anhaltenden Stadium nach HNK-Administration verändert. Andere liegen zu beiden Zeitpunkten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, verändert vor. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass verändert regulierte CSF-Proteine, die wahrscheinlich verantwortlich für den Antidepressiva-ähnlichen Effekt von HNK sind, auf unterschiedliche Arten beeinflusst werden: zu Beginn setzt HNK eine Kaskade in Gang, die bestimmte Proteine zu einem frühen Zeitpunkt ändert, wobei manche dieser Proteine längerfristig verändert bleiben. Andere Proteine werden erst später betroffen oder liegen nur zu einem frühen Zeitpunkt verändert vor. Diese Studie gibt einen ersten Einblick in die akuten und länger anhaltenden Folgen der HNK-Administration auf die CSF-Proteinzusammensetzung und liefert damit wichtige Hinweise auf Signalwege, die bei der Antidepressiva-ähnlichen Wirkung von HNK eine Rolle spielen. Damit konnte gezeigt werden, dass zum einen das CSF-Proteom von Mäusen akut und langanhaltend nach

Administration von HNK verändert wird und zum anderen, dass der GR Signalweg möglicherweise bei dem Antidepressiva-ähnlichem Effekt von HNK eine entscheidende Rolle spielt. Es ist wichtig in Bezug auf die Entwicklung von HNK als potenziell neuem, schnell-einsetzendem Antidepressivum, diese Ergebnisse in weiteren Studien zu replizieren und zu validieren, sowie durch weitere massenspektrometrische Studien involvierte Signalwege in bestimmten Gehirnregionen genauer zu beleuchten, um das Gesamtbild der Wirkweise von HNK weiter zu ergänzen.

6 Zusammenfassung

Stressbezogene psychische Erkrankungen wie die Depression stellen eine erhebliche Gesundheitsgefahr für unsere Gesellschaft dar. Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Depression sind nach wie vor unvollständig und klassische Therapieoptionen mit einer langen Latenzzeit und teilweise erheblichen Nebenwirkungen verbunden [25, 26]. Stressmodelle mit Mäusen sind zur Erforschung involvierter pathophysiologischer Mechanismen und bei der Entwicklung neuer Therapieverfahren von zentraler Bedeutung. CSF ist als Körperflüssigkeit besonders bei neuropsychiatrischen Erkrankungen interessant, da die Physiologie des ZNS gut wiedergespiegelt wird und CSF im lebenden Organismus gewonnen werden kann [56]. Proteine sind zentrale Effektoren und geben Aufschluss über den physiologischen Status eines Organismus. In der vorliegenden Studie wurde mittels „Discovery Proteomics“-Strategie und MS-Verfahren das gesamte CSF-Proteom der Maus in einem Stressmodell und nach HNK-Gabe umfassend charakterisiert. Insgesamt konnte mittels MS-Methoden eine Gesamtzahl von 462 Proteinen in Maus-CSF beider Mausmodelle identifiziert werden (FDR 1%). Es handelt sich damit um eine der bislang größten Listen identifizierter Proteine in Maus-CSF von lebendigen Mäusen durch MS-Methoden.

Allein im CSD-Modell konnten dabei 254 Proteine (FDR 1%) in Maus-CSF identifiziert werden. Hiervon waren 24 CSF-Proteine durch CSD signifikant unterschiedlich reguliert. Die Funktions- und Signalweganalyse der signifikant unterschiedlich regulierten CSF-Proteine ergab interessanterweise, dass Proteine der mitochondrialen Dysfunktion und des GR-Signalwegs signifikant unterschiedlich reguliert waren, und somit bei der Stressantwort potenziell eine entscheidende Rolle spielen. Außerdem zeigte die Funktions- und Signalweganalyse, dass zu den relevantesten Erkrankungen und biologischen Funktionen, die signifikant durch CSD reguliert wurden, Apoptose und Entzündungsreaktion zählen.

Im HNK-Experiment wurden im Rahmen der „Discovery-Proteomics“-Strategie insgesamt 387 CSF-Proteine (FDR 1%) identifiziert. Vier Stunden nach Injektion von HNK- bzw. Kochsalzlösung waren 21 Proteine signifikant unterschiedlich abundant sowie 57 CSF-Proteine eine Woche nach Injektion. Zu beiden Zeitpunkten konnte gezeigt werden, dass Proteine des GR-Signalwegs durch HNK-Administration herunterreguliert waren, wodurch bisherige wissenschaftliche Annahmen bestätigt werden, dass der GR-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Stressantwort sowie Therapie

stressbezogener psychischer Störungen spielt. Zu den am signifikantesten regulierten Signalwegen zählen außerdem die Signalwege LXR/RXR- und FXR/RXR-Aktivierung. Zu den relevantesten Erkrankungen und biologischen Funktionen im HNK-Experiment zählen zum Zeitpunkt 4h Myelinisierung und zum Zeitpunkt 1w progrediente neurologische Erkrankungen, Alzheimer Erkrankung, Synthese reaktiver Sauerstoffspezies, Apoptose und Filament-Organisation. In der Funktions- und Signalweganalyse konnten zudem eine Woche nach HNK-Administration eine Aktivierung der vorgeschalteten Regulatoren mTOR und BDNF prognostiziert werden, weswegen ihnen bei der Übermittlung der antidepressiven Wirkung von HNK eine entscheidende Rolle zukommen könnte.

Zusammenfassend konnte eindrücklich gezeigt werden, dass sich CSF als Körperflüssigkeit ideal eignet, um physiologische oder pathophysiologische Prozesse des ZNS zu untersuchen. Beide Maus-Modelle liefern umfassende Belege dafür, dass der GR-Signalweg eine Schlüsselrolle sowohl in der Entstehung stressbezogener Störungen darstellt als auch bei der antidepressiven Therapie von zentraler Bedeutung ist. Die vorliegende Studie ist, nach Wissen der Autorin, die erste longitudinale Studie, die CSF von lebendigen Mäusen nach Administration von HNK untersucht, um Proteinveränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten zu detektieren. Diese Studie gibt somit erstmals einen umfassenden Einblick in die akuten und länger anhaltenden Auswirkungen des potenziell neuen, schnell-wirksamen Antidepressivums HNK auf das CSF-Proteom von lebendigen Mäusen. Die Ergebnisse können zum Verständnis der Pathophysiologie stressbezogener psychischer Störungen wie der Depression beitragen und außerdem die Erkenntnisse über die Wirkweise von HNK ausweiten.

7 Literaturverzeichnis

1. Franzkowiak, P. and A. Franke, *Stress und Stressbewältigung*. Leitbegriffe der Gesundheitsförderung und Prävention. Glossar zu Konzepten, Strategien und Methoden, 2011: p. 543-550.
2. Plaumann, M., A. Busse, and U. Walter, *Grundlagen zu Stress*, in *Weißbuch Prävention 2005/2006*. 2006, Springer. p. 3-12.
3. Pressemitteilung zum DGPPN Kongress, N., *Psyche unter Druck: wie die modernen Lebensumstände unsere Gesundheit beeinflussen*. 2016
4. Tennant, C., *Life events, stress and depression: a review of recent findings*. Australian & New Zealand Journal of Psychiatry, 2002. **36**(2): p. 173-182.
5. Kessler, R.C., *The effects of stressful life events on depression*. Annual review of psychology, 1997. **48**(1): p. 191-214.
6. Monroe, S.M. and K. Hadjiyannakis, *The social environment and depression: Focusing on severe life stress*. 2002.
7. Organization, W.H., *Depression and other common mental disorders: global health estimates*. 2017, World Health Organization.
8. Busch, M.A., et al., *Prävalenz von depressiver Symptomatik und diagnostizierter Depression bei Erwachsenen in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 733-739.
9. Investigators, E.M., et al., *Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project*. Acta psychiatrica scandinavica, 2004. **109**: p. 21-27.
10. Pariante, C.M. and S.L. Lightman, *The HPA axis in major depression: classical theories and new developments*. Trends in neurosciences, 2008. **31**(9): p. 464-468.
11. Ising, M., *Stresshormonregulation und Depressionsrisiko-Perspektiven für die antidepressive Behandlung*, in *Jahrbuch. Forschungsberichte und Publikationen 2011/12*. 2012, Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften.
12. De Kloet, E.R., M. Joëls, and F. Holsboer, *Stress and the brain: from adaptation to disease*. Nature reviews neuroscience, 2005. **6**(6): p. 463.
13. 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.
14. Anacker, C., et al., *The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?* Psychoneuroendocrinology, 2011. **36**(3): p. 415-425.
15. Morava, É. and T. Kozicz, *Mitochondria and the economy of stress (mal) adaptation*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2013. **37**(4): p. 668-680.
16. Rezin, G.T., et al., *Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders*. Neurochemical research, 2009. **34**(6): p. 1021.
17. Nestler, E.J. and S.E. Hyman, *Animal models of neuropsychiatric disorders*. Nature neuroscience, 2010. **13**(10): p. 1161.
18. Franklin, T.B., B.J. Saab, and I.M. Mansuy, *Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability*. Neuron, 2012. **75**(5): p. 747-761.
19. Bartolomucci, A., et al., *Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2005. **29**(1): p. 67-81.
20. Golden, S.A., et al., *A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice*. Nature protocols, 2011. **6**(8): p. 1183.

21. Hollis, F. and M. Kabbaj, *Social defeat as an animal model for depression*. ILAR journal, 2014. **55**(2): p. 221-232.
22. Iñiguez, S.D., et al., *Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice*. Stress, 2014. **17**(3): p. 247-255.
23. 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.
24. 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.
25. Venzala, E., et al., *Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors*. Psychopharmacology, 2012. **224**(2): p. 313-325.
26. Zarate, C.A., et al., *A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression*. Archives of general psychiatry, 2006. **63**(8): p. 856-864.
27. Dodd, S., et al., *Monitoring for antidepressant-associated adverse events in the treatment of patients with major depressive disorder: An international consensus statement*. The World Journal of Biological Psychiatry, 2018. **19**(5): p. 330-348.
28. Kishimoto, T., et al., *Single-dose infusion ketamine and non-ketamine N-methyl-d-aspartate receptor antagonists for unipolar and bipolar depression: a meta-analysis of efficacy, safety and time trajectories*. Psychological medicine, 2016. **46**(7): p. 1459-1472.
29. McGirr, A., et al., *A systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials of ketamine in the rapid treatment of major depressive episodes*. Psychological medicine, 2015. **45**(4): p. 693-704.
30. Diazgranados, N., et al., *A randomized add-on trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression*. Archives of general psychiatry, 2010. **67**(8): p. 793-802.
31. Kryst, J., P. Kawalec, and A. Pilc, *Efficacy and safety of intranasal esketamine for the treatment of major depressive disorder*. Expert opinion on pharmacotherapy, 2020. **21**(1): p. 9-20.
32. Short, B., et al., *Side-effects associated with ketamine use in depression: a systematic review*. The Lancet Psychiatry, 2018. **5**(1): p. 65-78.
33. Gilles, M., A. Sartorius, and M. Deuschle, *Ketamin in der Behandlung affektiver Störungen*. In Fo Neurologie & Psychiatrie, 2019. **21**(5): p. 28-34.
34. Zanos, P., et al., *NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites*. Nature, 2016. **533**(7604): p. 481.
35. 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.
36. 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.
37. Highland, J.N., et al., *Mouse, rat, and dog bioavailability and mouse oral antidepressant efficacy of (2R, 6R)-hydroxynorketamine*. Journal of Psychopharmacology, 2019. **33**(1): p. 12-24.
38. 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.

39. 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, 2017. **21**(1): p. 84-88.
40. 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.
41. 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.
42. Brown, P., et al., *Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 955-968.
43. Sakka, L., G. Coll, and J. Chazal, *Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid*. European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases, 2011. **128**(6): p. 309-316.
44. Johanson, C.E., et al., *Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease*. Cerebrospinal fluid research, 2008. **5**(1): p. 10.
45. Jerrard, D.A., J.R. Hanna, and G.L. Schindelheim, *Cerebrospinal fluid*. The Journal of emergency medicine, 2001. **21**(2): p. 171-178.
46. Reiber, H., *Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid*. Clinica Chimica Acta, 2001. **310**(2): p. 173-186.
47. Yuan, X., et al., *Analysis of the human lumbar cerebrospinal fluid proteome*. Electrophoresis, 2002. **23**(7-8): p. 1185-1196.
48. Green, A., *Cerebrospinal fluid brain-derived proteins in the diagnosis of Alzheimer's disease and Creutzfeldt–Jakob disease*. Neuropathology and applied neurobiology, 2002. **28**(6): p. 427-440.
49. Reiber, H. and J.B. Peter, *Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs*. Journal of the neurological sciences, 2001. **184**(2): p. 101-122.
50. Brownlee, W.J., et al., *Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges*. The Lancet, 2017. **389**(10076): p. 1336-1346.
51. Abrey, L.E., et al., *Report of an international workshop to standardize baseline evaluation and response criteria for primary CNS lymphoma*. Journal of clinical oncology, 2005. **23**(22): p. 5034-5043.
52. Tamune, H., et al., *Cerebrospinal fluid/blood glucose ratio as an indicator for bacterial meningitis*. The American journal of emergency medicine, 2014. **32**(3): p. 263-266.
53. Bezov, D., R.B. Lipton, and S. Ashina, *Post-dural puncture headache: part I diagnosis, epidemiology, etiology, and pathophysiology*. Headache: The Journal of Head and Face Pain, 2010. **50**(7): p. 1144-1152.
54. Evans, R.W., *Complications of lumbar puncture*. Neurologic clinics, 1998. **16**(1): p. 83-105.
55. Group, B.D.W., et al., *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clinical pharmacology & therapeutics, 2001. **69**(3): p. 89-95.
56. Kroksveen, A., et al., *Proteomics of human cerebrospinal fluid: discovery and verification of biomarker candidates in neurodegenerative diseases using quantitative proteomics*. Journal of proteomics, 2011. **74**(4): p. 371-388.
57. You, J.S., et al., *The impact of blood contamination on the proteome of cerebrospinal fluid*. Proteomics, 2005. **5**(1): p. 290-296.

58. Housley, W.J., D. Pitt, and D.A. Hafler, *Biomarkers in multiple sclerosis*. Clinical immunology, 2015. **161**(1): p. 51-58.
59. Herukka, S.-K., et al., *Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment*. Alzheimer's & Dementia, 2017. **13**(3): p. 285-295.
60. Parnetti, L., et al., *Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease*. Nature Reviews Neurology, 2013. **9**(3): p. 131.
61. Zheng, W., et al., *Cerebrospinal fluid proteins identification facilitates the differential diagnosis of central nervous system diffuse large B cell lymphoma*. Journal of Cancer, 2017. **8**(17): p. 3631.
62. Woods, A.G., D.V. Iosifescu, and C.C. Darie, *Biomarkers in major depressive disorder: the role of mass spectrometry*, in *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*. 2014, Springer. p. 545-560.
63. Ditzen, C., et al., *Cerebrospinal fluid biomarkers for major depression confirm relevance of associated pathophysiology*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(4): p. 1013.
64. Kalia, M. and J.C. e Silva, *Biomarkers of psychiatric diseases: current status and future prospects*. Metabolism, 2015. **64**(3): p. S11-S15.
65. Sokolowska, I., et al., *The potential of biomarkers in psychiatry: focus on proteomics*. Journal of Neural Transmission, 2015. **122**(1): p. 9-18.
66. Labermaier, C., M. Masana, and M.B. Müller, *Biomarkers predicting antidepressant treatment response: how can we advance the field?* Disease markers, 2013. **35**(1): p. 23-31.
67. Lottspeich, F., *Proteomanalyse—ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen*. Angewandte Chemie, 1999. **111**(17): p. 2630-2647.
68. Aebersold, R. and D.R. Goodlett, *Mass spectrometry in proteomics*. Chemical reviews, 2001. **101**(2): p. 269-296.
69. Schutzer, S.E., et al., *Establishing the proteome of normal human cerebrospinal fluid*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e10980.
70. Begcevic, I., et al., *Identification of brain-enriched proteins in the cerebrospinal fluid proteome by LC-MS/MS profiling and mining of the Human Protein Atlas*. Clinical proteomics, 2016. **13**(1): p. 11.
71. Pan, S., et al., *A combined dataset of human cerebrospinal fluid proteins identified by multi-dimensional chromatography and tandem mass spectrometry*. Proteomics, 2007. **7**(3): p. 469-473.
72. Yuan, X. and D.M. Desiderio, *Proteomics analysis of human cerebrospinal fluid*. Journal of Chromatography B, 2005. **815**(1-2): p. 179-189.
73. Onaivi, E., N. Schanz, and Z. Lin, *Psychiatric disturbances regulate the innate immune system in CSF of conscious mice*. Translational psychiatry, 2014. **4**(3): p. e367.
74. Smith, J.S., et al., *Characterization of individual mouse cerebrospinal fluid proteomes*. Proteomics, 2014. **14**(9): p. 1102-1106.
75. Cunningham, R., et al., *Protein changes in immunodepleted cerebrospinal fluid from a transgenic mouse model of Alexander disease detected using mass spectrometry*. Journal of proteome research, 2013. **12**(2): p. 719-728.
76. Dislich, B., et al., *Label-free quantitative proteomics of mouse cerebrospinal fluid detects β -site APP cleaving enzyme (BACE1) protease substrates in vivo*. Molecular & Cellular Proteomics, 2015. **14**(10): p. 2550-2563.
77. Granger, J., et al., *Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines*. Proteomics, 2005. **5**(18): p. 4713-4718.

78. Günther, R., et al., *Removal of albumin and immunoglobulins from canine cerebrospinal fluid using depletion kits: a feasibility study*. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2014. **11**(1): p. 14.
79. Badock, V., et al., *Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(14): p. 2856-2864.
80. Edelman, M.J., *Strong cation exchange chromatography in analysis of posttranslational modifications: innovations and perspectives*. BioMed Research International, 2011. **2011**.
81. Sanvitto, G.L., N.A. Azambuja, and M. Marques, *A technique for collecting cerebrospinal fluid using an intraventricular cannula in rats*. *Physiology & behavior*, 1987. **41**(5): p. 523-524.
82. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. *Nature*, 2003. **422**(6928): p. 198.
83. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. *Science*, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
84. Makarov, A. and M. Scigelova, *Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(25): p. 3938-3945.
85. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. *Journal of mass spectrometry*, 2005. **40**(4): p. 430-443.
86. München, H.Z. *DDA – Data dependent acquisition*. 2020; Available from: <https://www.helmholtz-muenchen.de/proteomics/research/technology/quantitative-proteomics/label-free-dda-dia/index.html>.
87. Pappireddi, N., L. Martin, and M. Wühr, *A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics*. *ChemBioChem*, 2019. **20**(10): p. 1210-1224.
88. 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.
89. Kaur, C., W. Foulds, and E. Ling, *Blood–retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management*. *Progress in retinal and eye research*, 2008. **27**(6): p. 622-647.
90. Guo, L., et al., *Targeting amyloid- β in glaucoma treatment*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(33): p. 13444-13449.
91. Querques, G., et al., *Functional and morphological changes of the retinal vessels in Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment*. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 63.
92. Wostyn, P., K. Audenaert, and P.P. De Deyn, *Alzheimer’s disease: Cerebral glaucoma? Medical hypotheses*, 2010. **74**(6): p. 973-977.
93. Bateman, R.J., et al., *Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer’s disease*. *N Engl J Med*, 2012. **367**: p. 795-804.
94. Salvisberg, C., et al., *Exploring the human tear fluid: Discovery of new biomarkers in multiple sclerosis*. *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 2014. **8**(3-4): p. 185-194.
95. Wan, K., L. Chen, and A. Young, *Depression and anxiety in dry eye disease: a systematic review and meta-analysis*. *Eye*, 2016. **30**(12): p. 1558.
96. Van Der Vaart, R., et al., *The association between dry eye disease and depression and anxiety in a large population-based study*. *American journal of ophthalmology*, 2015. **159**(3): p. 470-474.

97. Labbé, A., et al., *Dry eye disease, dry eye symptoms and depression: the Beijing Eye Study*. British Journal of Ophthalmology, 2013. **97**(11): p. 1399-1403.
98. 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.
99. Carrillo-Roa, T., et al., *Common genes associated with antidepressant response in mouse and man identify key role of glucocorticoid receptor sensitivity*. PLoS biology, 2017. **15**(12): p. e2002690.
100. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nature protocols, 2006. **1**(6): p. 2856.
101. Perumal, N., et al., *Characterization of lacrimal proline-rich protein 4 (PRR 4) in human tear proteome*. Proteomics, 2014. **14**(13-14): p. 1698-1709.
102. 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: p. 101597.
103. Perumal, N., et al., *Proteomics analysis of human tears from aqueous-deficient and evaporative dry eye patients*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 29629.
104. 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.
105. Tyanova, S., T. Temu, and J. Cox, *The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics*. Nature protocols, 2016. **11**(12): p. 2301.
106. Tyanova, S., et al., *The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data*. Nature methods, 2016. **13**(9): p. 731.
107. Krämer, A., et al., *Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis*. Bioinformatics, 2013. **30**(4): p. 523-530.
108. Teunissen, C., et al., *A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking*. Neurology, 2009. **73**(22): p. 1914-1922.
109. Cicognola, C., D. Chiasserini, and L. Parnetti, *Preanalytical confounding factors in the analysis of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: the issue of diurnal variation*. Frontiers in neurology, 2015. **6**: p. 143.
110. Sharief, M., *Lumbar puncture and CSF examination*. Medicine, 2004. **32**(9): p. 44-46.
111. Norwitz, E.R., et al., *Discriminatory proteomic biomarker analysis identifies free hemoglobin in the cerebrospinal fluid of women with severe preeclampsia*. American journal of obstetrics and gynecology, 2005. **193**(3): p. 957-964.
112. Zhang, Y., et al., *Data for a comprehensive map and functional annotation of the human cerebrospinal fluid proteome*. Data in brief, 2015. **3**: p. 103-107.
113. Glaser, R., *Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology*. Brain, behavior, and immunity, 2005. **19**(1): p. 3-11.
114. Kronfol, Z., *Immune dysregulation in major depression: a critical review of existing evidence*. International Journal of Neuropsychopharmacology, 2002. **5**(4): p. 333-343.
115. Gouin, J.-P., *Chronic stress, immune dysregulation, and health*. American Journal of Lifestyle Medicine, 2011. **5**(6): p. 476-485.
116. Godbout, J.P. and R. Glaser, *Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer*. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2006. **1**(4): p. 421-427.

117. Adlerova, L., A. Bartoskova, and M. Faldyna, *Lactoferrin: a review*. Veterinarni Medicina, 2008. **53**(9): p. 457-468.
118. Kiank, C., et al., *Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice*. Brain, behavior, and immunity, 2006. **20**(4): p. 359-368.
119. Schuster, N. and K. Krieglstein, *Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis*. Cell and tissue research, 2002. **307**(1): p. 1-14.
120. Grammas, P. and R. Obase, *Cerebrovascular transforming growth factor- β contributes to inflammation in the Alzheimer's disease brain*. The American journal of pathology, 2002. **160**(5): p. 1583-1587.
121. Buckwalter, M.S. and T. Wyss-Coray, *Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo*. Journal of neuroinflammation, 2004. **1**(1): p. 1-12.
122. Bauer, M.E., et al., *Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution?* Life sciences, 2001. **69**(10): p. 1167-1179.
123. Greeson, J.M., et al., *Stress-induced changes in the expression of monocytic β 2-integrins: The impact of arousal of negative affect and adrenergic responses to the Anger Recall Interview*. Brain, behavior, and immunity, 2009. **23**(2): p. 251-256.
124. Brown, E.S., F.P. Varghese, and B.S. McEwen, *Association of depression with medical illness: does cortisol play a role?* Biological psychiatry, 2004. **55**(1): p. 1-9.
125. Raison, C.L. and A.H. Miller, *When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders*. American Journal of Psychiatry, 2003. **160**(9): p. 1554-1565.
126. Martins-de-Souza, D., et al., *Identification of proteomic signatures associated with depression and psychotic depression in post-mortem brains from major depression patients*. Translational psychiatry, 2012. **2**(3): p. e87-e87.
127. Beasley, C.L., et al., *Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: evidence for disease-associated changes*. Proteomics, 2006. **6**(11): p. 3414-3425.
128. Chaban, Y., E.J. Boekema, and N.V. Dudkina, *Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2014. **1837**(4): p. 418-426.
129. Jou, S.-H., N.-Y. Chiu, and C.-S. Liu, *Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders*. Chang Gung Med J, 2009. **32**(4): p. 370-379.
130. Patki, G., et al., *Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress*. Brain research, 2013. **1539**: p. 73-86.
131. Guo, C., et al., *Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases*. Neural regeneration research, 2013. **8**(21): p. 2003.
132. Menard, C., et al., *Social stress induces neurovascular pathology promoting depression*. Nature neuroscience, 2017. **20**(12): p. 1752-1760.
133. Gervasi, F., et al., *nm23 influences proliferation and differentiation of PC12 cells in response to nerve growth factor*. Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research, 1996. **7**(12): p. 1689-1696.
134. Kim, S.H., et al., *Human brain nucleoside diphosphate kinase activity is decreased in Alzheimer's disease and Down syndrome*. Biochemical and biophysical research communications, 2002. **296**(4): p. 970-975.
135. Arnaud-Dabernat, S., et al., *Nm23-M2/NDP kinase B induces endogenous c-myc and nm23-M1/NDP kinase A overexpression in BAF3 cells. Both NDP*

- kinases protect the cells from oxidative stress-induced death*. Experimental cell research, 2004. **301**(2): p. 293-304.
136. Bachur, N.R., *Cytoplasmic aldo-keto reductases: a class of drug metabolizing enzymes*. Science, 1976. **193**(4253): p. 595-597.
137. Ramirez, V.P., I. Gurevich, and B.J. Aneskievich, *Emerging roles for TNIP1 in regulating post-receptor signaling*. Cytokine & growth factor reviews, 2012. **23**(3): p. 109-118.
138. Azzinnari, D., et al., *Mouse social stress induces increased fear conditioning, helplessness and fatigue to physical challenge together with markers of altered immune and dopamine function*. Neuropharmacology, 2014. **85**: p. 328-341.
139. van der Kooij, M.A., et al., *The stressed cytoskeleton: How actin dynamics can shape stress-related consequences on synaptic plasticity and complex behavior*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2016. **62**: p. 69-75.
140. Pittenger, C. and R.S. Duman, *Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(1): p. 88-109.
141. Serafini, G., *Neuroplasticity and major depression, the role of modern antidepressant drugs*. World journal of psychiatry, 2012. **2**(3): p. 49.
142. Yang, C., et al., *Cytoskeletal alterations in rat hippocampus following chronic unpredictable mild stress and re-exposure to acute and chronic unpredictable mild stress*. Behavioural brain research, 2009. **205**(2): p. 518-524.
143. Wong, G.T.-H., R.C.-C. Chang, and A.C.-K. Law, *A breach in the scaffold: the possible role of cytoskeleton dysfunction in the pathogenesis of major depression*. Ageing research reviews, 2013. **12**(1): p. 67-75.
144. Bondar, N., et al., *Molecular adaptations to social defeat stress and induced depression in mice*. Molecular neurobiology, 2018. **55**(4): p. 3394-3407.
145. 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.
146. Perumal, N., et al., *Characterization of human reflex tear proteome reveals high expression of lacrimal proline-rich protein 4 (PRR4)*. Proteomics, 2015. **15**(19): p. 3370-3381.
147. 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**.
148. Maletic, V., et al., *Neurobiology of depression: an integrated view of key findings*. International journal of clinical practice, 2007. **61**(12): p. 2030-2040.
149. Wang, W., et al., *Ketamine improved depressive-like behaviors via hippocampal glucocorticoid receptor in chronic stress induced-susceptible mice*. Behavioural brain research, 2019. **364**: p. 75-84.
150. Karantza, V., *Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers*. Oncogene, 2011. **30**(2): p. 127-138.
151. Richens, J.L., et al., *Rationalising the role of Keratin 9 as a biomarker for Alzheimer's disease*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-12.
152. Jiang, S., et al., *Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis and neuromyelitis optica patients*. Molecular medicine reports, 2012. **6**(5): p. 1081-1086.
153. Zhao, L., et al., *Protein accumulation and neurodegeneration in the wozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP*. Nature genetics, 2005. **37**(9): p. 974-979.
154. Lin, J.H., P. Walter, and T.B. Yen, *Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis*. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2008. **3**: p. 399-425.

155. Moon, S.Y. and Y. Zheng, *Rho GTPase-activating proteins in cell regulation*. Trends in cell biology, 2003. **13**(1): p. 13-22.
156. Olenik, C., et al., *Gene expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Rac1, and Cdc42 in adult rat brain*. Molecular brain research, 1997. **52**(2): p. 263-269.
157. Fox, M.E., et al., *Dendritic remodeling of D1 neurons by RhoA/Rho-kinase mediates depression-like behavior*. Molecular psychiatry, 2018: p. 1-13.
158. Qiao, H., et al., *Dendritic spines in depression: what we learned from animal models*. Neural plasticity, 2016. **2016**.
159. Duman, C.H. and R.S. Duman, *Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression*. Neuroscience letters, 2015. **601**: p. 20-29.
160. Al Shweiki, M.R., et al., *Major depressive disorder: insight into candidate cerebrospinal fluid protein biomarkers from proteomics studies*. Expert review of proteomics, 2017. **14**(6): p. 499-514.
161. Waldera-Lupa, D.M., et al., *Proteomic changes in cerebrospinal fluid from primary central nervous system lymphoma patients are associated with protein ectodomain shedding*. Oncotarget, 2017. **8**(66): p. 110118.
162. Cavalleri, L., et al., *Ketamine enhances structural plasticity in mouse mesencephalic and human iPSC-derived dopaminergic neurons via AMPAR-driven BDNF and mTOR signaling*. Molecular psychiatry, 2018. **23**(4): p. 812-823.
163. Li, N., et al., *mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists*. Science, 2010. **329**(5994): p. 959-964.
164. Polman, J.A.E., et al., *Glucocorticoids modulate the mTOR pathway in the hippocampus: differential effects depending on stress history*. Endocrinology, 2012. **153**(9): p. 4317-4327.
165. Lepack, A.E., et al., *BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine*. International Journal of Neuropsychopharmacology, 2015. **18**(1): p. pyu033.
166. Zhou, W., et al., *Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex*. European Psychiatry, 2014. **29**(7): p. 419-423.
167. Kalaany, N.Y. and D.J. Mangelsdorf, *LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism*. Annu. Rev. Physiol., 2006. **68**: p. 159-191.
168. Yang, C., et al., *Quantitative proteomic study of the plasma reveals acute phase response and LXR/RXR and FXR/RXR activation in the chronic unpredictable mild stress mouse model of depression*. Molecular medicine reports, 2018. **17**(1): p. 93-102.
169. Leary Swan, E.E., et al., *Proteomics analysis of perilymph and cerebrospinal fluid in mouse*. The Laryngoscope, 2009. **119**(5): p. 953-958.
170. Papakostas, G., et al., *Assessment of a multi-assay, serum-based biological diagnostic test for major depressive disorder: a pilot and replication study*. Molecular psychiatry, 2013. **18**(3): p. 332-339.
171. Bot, M., et al., *Serum proteomic profiling of major depressive disorder*. Translational psychiatry, 2015. **5**(7): p. e599-e599.
172. Simons, M. and K.-A. Nave, *Oligodendrocytes: myelination and axonal support*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2016. **8**(1): p. a020479.

173. Harauz, G., et al., *Myelin basic protein—diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis*. *Micron*, 2004. **35**(7): p. 503-542.
174. Honer, W., et al., *Synaptic and plasticity-associated proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness*. *Neuroscience*, 1999. **91**(4): p. 1247-1255.

8 Anhang

Tabelle 6: Liste aller identifizierten Maus CSF-Proteine des CSD- und HNK-Experiments.

	Gennamen	CSD		HNK	
		<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>
1	A2M	√	√	√	√
2	ACE	√		√	√
3	ACP1	√	√		√
4	ACTA1	√	√	√	√
5	ACTB	√	√	√	√
6	ACTBL2	√	√	√	√
7	ACTG1	√	√	√	√
8	ACTN1	√	√	√	√
9	AGT	√		√	
10	AHSG	√		√	
11	AKR1A1	√		√	√
12	ALB	√	√	√	√
13	ALDOA	√	√	√	√
14	ANXA1	√	√	√	√
15	ANXA11	√			
16	ANXA2	√	√	√	√
17	ANXA3	√	√	√	
18	ANXA5	√	√	√	√
19	APOA1	√		√	
20	APOA4	√		√	
21	APOE	√		√	
22	APOH	√		√	
23	APP	√	√		
24	ARF1	√	√	√	√
25	ARHGDIB	√		√	
26	ARMC9	√			
27	ATP1A1	√	√	√	√
28	ATP1A3	√	√	√	√
29	ATP1B1	√	√	√	√
30	ATP5B	√	√	√	√
31	ATP6V1A	√		√	√
32	BLVRB	√		√	
33	C3	√		√	√

34	C5	√			
35	CA1	√		√	
36	CA2	√	√	√	√
37	CADPS2	√			
38	CALML3	√			
39	CAMK2A	√	√	√	√
40	CAMP	√			
41	CCDC178	√			
42	CD177	√			
43	CES1C	√		√	
44	CFD	√			
45	CFL1	√	√	√	√
46	CHIL3	√		√	
47	CKB	√	√	√	√
48	CLCF1	√	√		√
49	CLTC	√	√	√	√
50	CLU	√		√	
51	CORO1A	√			
52	CP	√	√	√	√
53	CST3	√		√	
54	CTSB	√		√	
55	CUL5	√			
56	DSTN	√	√	√	
57	EEF1A1	√		√	
58	EGFR	√	√	√	√
59	ENO1	√	√	√	√
60	ENO2	√	√	√	√
61	ENPP2	√	√	√	√
62	EZR	√	√	√	√
63	FASTKD2	√			
64	FILIP1L	√		√	
65	FN1	√	√	√	
66	FTH1	√	√	√	√
67	FTL1	√		√	
68	GAPDH	√	√	√	√
69	GC	√		√	
70	GDA	√		√	
71	GDI2	√		√	√

72	GFPT2	√			
73	GLO1	√		√	√
74	GNAO1	√			
75	GON4L	√			
76	GOT1	√		√	√
77	GOT2	√	√	√	√
78	GPI	√		√	√
79	GSN	√	√	√	√
80	GSTM7	√			
81	H2AFV	√	√		
82	H2-Q10	√		√	
83	HBA	√		√	
84	HBB-B1	√		√	
85	HBB-B2	√		√	
86	HIST1H1C	√	√		
87	HIST1H2AH	√		√	
88	HIST1H2BP	√		√	
89	HIST1H3B	√		√	
90	HIST1H4A	√	√	√	√
91	HK1	√	√	√	√
92	HP	√	√	√	
93	HPCAL1	√			
94	HPS4	√			
95	HPX	√	√	√	√
96	HRG	√		√	
97	HSP90AA1	√	√	√	√
98	HSPA8	√	√	√	√
99	IGFBP2	√	√		
100	IGH-3	√			
101	IGHG1	√		√	√
102	IGHM	√			
103	ITGAM	√	√		
104	ITGB2	√			
105	KRT1	√	√		√
106	KRT10	√	√		√
107	KRT16	√	√		√
108	KRT17	√	√	√	√
109	KRT2	√	√		√

110	KRT31	√	√		
111	KRT42	√			
112	KRT6A	√			√
113	KRT79	√			
114	KRT81	√			
115	KRT85	√			
116	LCP1	√		√	√
117	LDHA	√		√	√
118	LDHB	√	√	√	√
119	LRPPRC	√			
120	LTF	√	√	√	√
121	LYZ1	√		√	
122	LYZ2	√			
123	MBP	√	√	√	√
124	MDH1	√	√	√	√
125	MDH2	√	√	√	√
126	MIF	√		√	
127	MNS1	√		√	
128	MPO	√	√	√	
129	MPRIP	√			
130	MUG1	√		√	
131	MUP9	√		√	
132	MYH9	√	√	√	
133	MYO15A	√			
134	NGP	√		√	
135	NME1	√		√	
136	ORM1	√		√	
137	OXR1	√			
138	PALB2	√			
139	PEBP1	√		√	
140	PFN1	√		√	
141	PGAM1	√		√	√
142	PGD	√	√	√	√
143	PGK1	√	√	√	√
144	PGLYRP1	√			
145	PKM	√	√	√	√
146	PLCXD3	√			
147	PLG	√		√	

148	PLP1	√	√	√	√
149	PNP	√	√	√	√
150	PPIA	√	√	√	√
151	PRDX1	√	√	√	√
152	PRDX2	√		√	
153	PRDX4	√	√	√	√
154	PRDX5	√	√	√	√
155	PRDX6	√		√	√
156	PTGDS	√		√	
157	RAB6B	√	√	√	√
158	RBP4	√		√	
159	RNF181	√			
160	RPS6KC1	√			
161	S100A11	√	√		
162	S100A8	√		√	√
163	S100A9	√		√	√
164	SERPINA1A	√		√	
165	SERPINA1B	√		√	
166	SERPINA1C	√		√	
167	SERPINA1D	√		√	
168	SERPINA1E	√			
169	SERPINA3K	√		√	
170	SERPINA3M	√		√	
171	SERPINB1A	√		√	
172	SERPINC1	√		√	√
173	SERPING1	√			
174	SLC12A2	√		√	√
175	SLC12A5	√			
176	SLC1A2	√		√	√
177	SLC1A3	√		√	
178	SLC25A5	√		√	√
179	SOD1	√		√	
180	TF	√	√	√	√
181	THY1	√		√	
182	TNIP1	√			
183	TPI1	√	√	√	√
184	TTR	√		√	
185	TUBA1A	√	√	√	√

186	TUBA1B	√	√	√	√
187	TUBA1C	√	√	√	√
188	TUBB2B	√	√		
189	UBA52	√	√		
190	VPS18	√			
191	YWHAE	√	√	√	√
192	YWHAG	√	√		
193	YWHAZ	√	√	√	√
194	ABAT			√	√
195	ABCE1			√	
196	ACADL			√	
197	ACO2			√	√
198	ACOT7			√	
199	ACTR1A				√
200	ACTR1B			√	
201	ADCY6				√
202	AFM			√	
203	AICDA				√
204	AKR1B1			√	
205	ALAD			√	
206	ALDH2			√	√
207	ALDOC		√	√	√
208	APCS			√	
209	APOC1			√	
210	AQP1			√	√
211	ARG1			√	
212	ARHGDI A			√	√
213	ARHGEF19				√
214	ARPC4		√	√	√
215	ATP5A1		√	√	√
216	ATP5F1			√	
217	ATP5I			√	√
218	ATP5J2			√	
219	ATP5L			√	
220	ATP5O			√	√
221	ATP6V1B2			√	√
222	AZGP1			√	
223	BPGM			√	

224	BSN				√
225	C1orf74				√
226	C4B			√	
227	C8G			√	
228	CAB39L			√	
229	CALM3		√		
230	CALR			√	√
231	CAP1			√	
232	CAT			√	
233	CCAR1		√		√
234	CCR7				√
235	CD47			√	
236	CDH2		√		
237	CEP112			√	
238	CES1		√		√
239	CFB			√	
240	CFI			√	
241	CHI3L1			√	
242	CHST11				√
243	CNP			√	
244	COTL1			√	
245	COX6B1			√	
246	COX7A2			√	
247	CPN2			√	
248	CRP			√	
249	CRTAC1				√
250	CS			√	√
251	CST4				√
252	CTSD			√	
253	DBI			√	
254	DDHD2		√		
255	DLD			√	
256	DLST			√	√
257	DMD		√		√
258	DNAH5				√
259	DOCK4			√	
260	DPP7			√	
261	DPYSL2			√	√

262	DYNLL2			√	√
263	DYRK3			√	
264	ECI1			√	
265	EEF1A1P5		√		√
266	EEF1B			√	
267	EEF2			√	
268	ELK3				√
269	EML4				√
270	ENO3		√		√
271	ERVK-5				√
272	ETFA			√	√
273	FAM69A				√
274	FGA			√	
275	FGB			√	
276	FGG			√	√
277	GDI1			√	√
278	GFAP			√	√
279	GNAI3			√	
280	GNAT1		√		
281	GNB1			√	√
282	GPLD1			√	
283	GPM6A			√	
284	GPX1			√	
285	GSTA4			√	
286	GSTM1			√	
287	GSTM5		√		√
288	GSTP1			√	
289	HADHB			√	
290	HBA1		√		√
291	HBB		√		√
292	HBD		√		√
293	HIST1H2AJ		√		√
294	HIST1H2BL		√		√
295	HIST2H3A		√		√
296	HNRNPH2			√	√
297	HPRT1			√	√
298	HSD17B10			√	
299	HSP90AB1			√	√

300	HSP90AB2P				√
301	HSP90B1			√	√
302	HSPA4			√	√
303	HSPA5			√	√
304	HSPA6		√		√
305	HSPA9			√	√
306	HSPE1			√	√
307	ICA			√	
308	IDH1			√	
309	IDH2			√	√
310	IDH3A			√	√
311	IGHA1				√
312	IGHM			√	
313	IGKC		√		√
314	IGKV A18		√		
315	IGKV4-1				√
316	ISL1			√	√
317	KATNAL2			√	√
318	KLKB1			√	
319	KMT2A				√
320	KNG1			√	√
321	KRT12				√
322	KRT14		√		√
323	KRT3				√
324	KRT5		√		√
325	KRT6C		√		√
326	KRT75		√		
327	KRT76			√	
328	KRT8		√	√	√
329	KRT83		√		
330	KRT9		√		√
331	LACRT		√		√
332	LCA5L		√		
333	LCN1				√
334	LDHA		√		
335	LIG4				√
336	LPPR1				√
337	LRP1			√	√

338	LRRC74A				√
339	LUM			√	
340	LYZ		√		√
341	MCMDC2		√		
342	MSN			√	√
343	MTATP8			√	
344	MTPN			√	
345	MUC19				√
346	MUP1			√	
347	MUP2			√	
348	NDUFA4			√	√
349	NDUFB10			√	
350	NDUFS1			√	
351	NDUFS3			√	√
352	NEK11		√		
353	NME2				√
354	NME2P1		√		
355	NR2F6			√	
356	ODF2L		√		√
357	OGDH			√	√
358	OXCT1			√	
359	P4HB			√	√
360	PAFAH1B2				√
361	PCCA			√	
362	PCK1		√		
363	PDCD6			√	√
364	PDHA1			√	√
365	PDHB			√	√
366	PDIA3			√	√
367	PDIA6			√	√
368	PENK				√
369	PEPD			√	
370	PGAM2		√		
371	PIP		√		√
372	PLS3		√		
373	POLA1			√	
374	PON1			√	
375	PPP1CC			√	√

376	PPP2CA			√	√
377	PPP3R1		√		
378	PRDM16			√	
379	PRLH		√		
380	PRR4		√		√
381	PRSS3		√		
382	PSAP			√	
383	PSMA2				√
384	PSMA5			√	√
385	PSMB2		√	√	√
386	PSMB3			√	
387	PSME1			√	√
388	RAB11A			√	
389	RAB1A			√	
390	RAB1B				√
391	RAB3D		√		
392	RAB7A			√	√
393	RAC2		√		
394	RALGAPB			√	
395	RAN			√	
396	RAP1A				√
397	RAP1B			√	
398	RDX			√	√
399	RGL4		√		
400	RHOA			√	√
401	RPL12			√	
402	RPLP0			√	
403	RPLP0P6				√
404	RPLP1			√	
405	RPN2			√	
406	RPS16			√	√
407	RPS18				√
408	RPS28			√	√
409	S100A1			√	
410	SCGB1D1				√
411	SCGB2A1				√
412	SERPINA3		√		√
413	SERPINA3N			√	

414	SERPINA6			√	
415	SERPINB8		√		√
416	SERPINF2			√	
417	SFN			√	√
418	SHANK2			√	
419	SLC25A23				√
420	SLC25A3			√	√
421	SLC25A4			√	
422	SLC25A6		√		
423	SLC4A1			√	
424	SLCO2A1			√	
425	SMG1				√
426	SNRPE			√	
427	SOD2			√	√
428	SPTB			√	
429	SPTBN1		√	√	√
430	SURF4			√	
431	SWAP70				√
432	TADA2B		√		
433	TCTEX1D1				√
434	TGDS			√	
435	TKT			√	
436	TNRC18		√		
437	TPM2			√	
438	TTN				√
439	TUBA4A			√	√
440	TUBB				√
441	TUBB2A			√	√
442	TUBB4A			√	√
443	TUBB4B			√	√
444	TUBB5			√	
445	TXNDC16				√
446	UBA1		√		√
447	UBA52			√	√
448	UIMC1			√	
449	UQCR10			√	√
450	UQCRC1			√	
451	UQCRC2			√	

452	USMG5			√	√
453	USP9Y		√		
454	VCP		√	√	√
455	VDAC1			√	√
456	VIM			√	√
457	VPS13A				√
458	WDR19				√
459	YWHAB			√	
460	YWHAG			√	√
461	YWHAH			√	√
462	YWHAQ		√	√	√

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Großer Dank gebührt zunächst meinem Doktorvater für die Möglichkeit meine Dissertation unter seiner Leitung schreiben zu dürfen. Die Arbeit hat es mir ermöglicht wertvolle Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten in der experimentellen Forschung zu erlangen und ich bin sehr dankbar für die Überlassung des Promotionsthemas.

Ganz besonders möchte ich mich bei bedanken, ohne dessen wertvollen Rat und Unterstützung diese Arbeit nicht das geworden wäre, was sie heute ist. Vielen Dank für die beste Betreuung, die ich mir hätte vorstellen können. Danke für die Geduld, die Hilfsbereitschaft, wertvolle Anregungen und für die Durchsicht meiner Arbeit. Ebenso bedanken möchte ich mich bei für ihre zahlreiche kostbaren Ratschläge und anregende Gespräche, nicht nur über fachliche Themen, sondern auch über Gott und die Welt.

Von Herzen danken möchte ich meinem Verlobten. Du hast mich in jedem Hoch und Tief während der Arbeit an dieser Schrift begleitet und mich unermüdlich motiviert und aufgebaut. Danke, dass du mir immer ein Lächeln auf das Gesicht zauberst.

Zuletzt geht mein Dank an meine Eltern und meinen Bruder, für deren uneingeschränkte Unterstützung in jeder Lebenslage ich danken möchte. Ob durch Gespräche am Telefon oder durch ein gemeinsames Wochenende im Taubertal, bei euch finde ich immer wieder meine innere Balance. Meinem Vater möchte ich außerdem auch für die geduldige Durchsicht dieser Arbeit danken.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Milena Sabine Koc, geb. Rossmanith

Geboren am 20.09.1993 in Augsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Anschrift: Münsterstraße 17, 55116 Mainz

Schulischer Werdegang

09/1999-06/2003 Grundschule Markelsheim, Bad Mergentheim-Markelsheim

09/2003-06/2012 Gymnasium Weikersheim, Weikersheim

06/2012 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (1,4)

Universitärer und beruflicher Werdegang

09/2012-03/2013 Studium der Psychologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

04/2013- 07/2016 Studium der Zahnmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

03/2014 Naturwissenschaftliche Vorprüfung (sehr gut)

09/2015 Zahnärztliche Vorprüfung (sehr gut)

07/2016- 07/2019 Studium der Zahnmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

06/2019 Zahnärztliche Prüfung (sehr gut)

09/2019 Approbation als Zahnärztin

07/2019-04/2020 Fertigstellung der Dissertationsschrift

Seit 01/2020 Vorbereitungsassistentin, Zahnarztpraxis Dr. Kopera in Rüsselsheim