

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

Validierung einer Methode der intraventrikulären Kanülierung zur Liquorabnahme in
der Maus

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

Vorgelegt von

Jens Nadig
aus Bergisch Gladbach

Mainz, 2024

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

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Marianne B. Müller

Tag der Promotion: 27. Juni 2024

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Depression	1
1.2	Neurobiologische Grundlagen der Depression	2
1.3	Antidepressiva.....	4
1.3.1	<i>Klassische Antidepressiva</i>	5
1.3.2	<i>Ketamin und Hydroxynorketamin</i>	6
1.3.3	<i>Forschungsaussichten</i>	8
1.4	Biomarker.....	9
1.4.1	<i>Liquordiagnostik</i>	11
1.5	Ziel der Arbeit.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Material	13
2.2	Versuchstiere	13
2.3	Implantation einer intraventrikulären Kanüle	13
2.4	Handling der Versuchstiere	17
2.5	Behandlung mit HNK oder Kochsalzlösung	18
2.6	Liquorabnahme	18
2.7	Blutabnahme	19

2.8	ELISA.....	20
2.9	Timeline des Experiments.....	21
2.10	Statistik.....	22
3	ERGEBNISSE.....	22
4	DISKUSSION.....	24
4.1	Mausmodelle auf dem Prüfstand: geeignetes Modell für die Erforschung depressiver Erkrankungen.....	29
4.2	Corticosteron: ein valider Biomarker im Tiermodell?.....	31
4.3	HNK und seine antidepressiven Eigenschaften.....	35
4.4	Fazit und Vorstellung der gesamten Studienergebnisse.....	37
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	38
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	40
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	45
8	TABELLENVERZEICHNIS.....	46
9	ANHANG.....	47
9.1	Danksagung.....	47
9.2	Lebenslauf.....	48
9.3	Paper.....	50

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
v. Chr.	vor Christus
s.	siehe
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent-assay
HNK	(2R,6R)-Hydroxynorketaminhydrochlorid
SDR	steroid displacement reagent
CSF	cerebrospinales Fluid
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th ed.
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
NRI	noradrenaline reuptake inhibitor
SNRI	selective noradrenaline reuptake inhibitor
SSNRI	selective serotonin and noradrenalin reuptake inhibitor
mTOR	mammalian target of rapamycin
NMDA	N-methyl-D-aspartate
AMPA	a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazole propionic acid
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CRF	Corticotropin-Releasing-Factor
ACTH	adrenocorticotropen Hormons
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
CREB	cAMP-responsive-element-binding-protein
ICD-11	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems -11
rTMS	repetitive transkranielle Magnetstimulation
MDD	Major depressive disorder
ZNS	zentrales Nervensystem
OF-Test	Open-Field-Test

1 Einleitung

1.1 Depression

Die Depression ist eine der häufigsten Erkrankungen weltweit, mit einer Lebenszeitprävalenz von 11,6 % bei Erwachsenen in Deutschland [4]. Frauen weisen dabei mit 15,4 % eine um fast das Zweifache erhöhte Lebenszeitprävalenz im Vergleich zu Männern mit nur 7,8 % auf [4]. Darüber hinaus spielt bei Frauen bei der Erkrankungswahrscheinlichkeit der sozioökonomische Status eine entscheidende Rolle [4]. Frauen mit niedrigem sozioökonomischem Status haben im Vergleich zu Frauen mit hohem sozioökonomischem Status eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit innerhalb von 12 Monaten an einer Depression zu erkranken (12-Monats-Prävalenz 12,9 %) [4]. Bei Männern hingegen lässt sich kein Unterschied in der Erkrankungswahrscheinlichkeit über das soziale Gefälle hinweg erkennen [4]. Die Depression ist dabei mit vielseitigen Komorbiditäten, wie zum Beispiel Angststörungen, vergesellschaftet und stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung der koronaren Herzkrankheit und Diabetes mellitus Typ 2 dar [2, 24, 26]. Des Weiteren ist der berufswirtschaftliche Sektor stark durch die Erkrankung belastet. So stellt die Depression weltweit den häufigsten Grund für eine Arbeitsunfähigkeit dar und hat im Jahr 2000 zu einer wirtschaftlichen Belastung von schätzungsweise 83,1 Milliarden USD in den USA geführt [24]. Die medikamentöse Behandlung sowie deren Erfolg zeigen sich dabei leider bis dato inkonsistent. So weisen aktuell gängige Antidepressiva bei nur 50 % der Patienten mit Depressionen eine Wirkung auf [24]. Die Diagnosestellung der unipolaren Depression nach ICD-11 beruht dabei auf der Erfassung von Symptomen. Dabei müssen mindestens zwei Symptome des affektiven Clusters (gedrückte, depressive Stimmung; Interessenverlust; Freudlosigkeit) sowie mindestens vier Symptome des kognitiven (verminderte Konzentration und Aufmerksamkeit; vermindertes Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen; Gefühle von Schuld und Wertlosigkeit; Hoffnungslosigkeit; wiederkehrende Gedanken an den Tod; Suizidgedanken/ -handlungen) und neurovegetativen Clusters (Schlafstörungen; signifikant verminderter oder erhöhter Appetit; psychomotorische Unruhe; Verlangsamung; Antriebsmangel; erhöhte

Ermüdbarkeit) über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen vorliegen [24]. Anhand der Ausprägung der Symptome sowie der Funktionsfähigkeit in zum Beispiel familiären oder beruflichen Bereichen erfolgt die Einteilung in den Schweregrad (leicht, mittelgradig, schwer) [24]. Hierbei wird die Vielseitigkeit der Erkrankung im Vergleich zu anderen somatischen Erkrankungen deutlich, die in der Regel mit einer spezifischen Symptomatik einhergehen. Schließlich kann die Depression bei zwei unterschiedlichen Menschen eine völlig unterschiedliche Symptomatik aufweisen. Dies macht ebenfalls deutlich, wie kompliziert sich die Behandlung der Depression sowie die Erforschung des zugrundeliegenden Pathomechanismus gestaltet. So ist der Pathomechanismus der Depression, obwohl intensiv beforscht, weiterhin nicht komplett verstanden.

1.2 Neurobiologische Grundlagen der Depression

Die Depression ist eine multifaktorielle Erkrankung. Dabei macht einen Teil der individuellen Prädisposition die genetische Grundlage aus (40 - 50 %), wobei eine Vielzahl an Genen und nicht ein oder wenige einzelne Gene eine Rolle spielen. Somit ist zumindest ein Teil der Veranlagung zur Entwicklung einer Depression vererbbar [3]. Die Epigenetik scheint ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen. So wird der restliche Teil der Krankheitsentstehung maßgeblich durch nicht genetische Umweltfaktoren wie zum Beispiel Stress als wichtigsten Faktor, aber auch emotionale Traumata oder Virusinfektionen beeinflusst [3]. Zudem dient die Epigenetik als möglicher Erklärungsansatz für Diskordanzen bei eineiigen Zwillingen und Differenzen bei Inzuchtnagern [2]. Auch stellt sie einen möglichen Erklärungsansatz für die erhöhte Prävalenz bei Frauen dar [2]. Somit spielen nicht nur endogene, sondern auch exogene Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Pathogenese einer Depression. In diesem Zusammenhang wurde erstmalig schon im Jahr 1977 durch Zubin und Spring das Vulnerabilitäts-Stress-Modell beschrieben [37]. Ursprünglich als Modell für die Schizophrenie entworfen, besagt dieses, dass Stress eine Diathese oder Vulnerabilität aktivieren kann, wodurch das Potenzial einer Prädisposition in die Realität der Psychopathologie umgewandelt wird [38]. So beschreibt das Modell einen direkten Zusammenhang zwischen der Vulnerabilität eines Menschen und dem auf den Menschen einwirkenden äußeren Stress. Vielmehr noch beschreibt

es eine Korrelation zwischen den beiden: Je geringer die Vulnerabilität des Menschen, desto mehr Stress hält er stand und umso geringer ist das Risiko, an einer Depression zu erkranken.

Es gibt dabei mehrere gängige Hypothesen zur Entstehung einer Depression: Einen möglichen Ansatz stellt dabei die Monoaminmangelhypothese dar. Anhand klinischer Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass Patienten mit einer Depression einen Monoaminmangel aufweisen [2]. Gestärkt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass Monoaminwiederaufnahmehemmer (z.B. SSRI: Citalopram) eine antidepressive Wirkung zeigen [5]. Ebenso konnten bei einem alten Antihypertensivum namens Resperin, das einen fördernden Einfluss auf die Monoaminwiederaufnahme ausübt, depressive Symptome als Nebenwirkung beobachtet werden [2]. Eine Problematik bei monoaminbasierten Antidepressiva stellt jedoch eine lange Wirklatenz und ein geringes Ansprechen von nur 30 % dar [2]. Dies legt die These nah, dass es sich bei der Depression nicht ausschließlich um einen Monoaminmangel handeln kann [2]. Aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse vermuten, dass akute Erhöhungen der synaptischen Monoamine, die durch Antidepressiva induziert werden, sekundäre neuroplastische Veränderungen hervorrufen, die länger anhalten und transkriptionelle und translationale Veränderungen umfassen, die die molekulare und zelluläre Plastizität vermitteln [2].

Weitere Hypothesen beschreiben die Beteiligung von Gehirnregionen wie Hippocampus, Hypothalamus, Nukleus Acumbens und Amygdala, welche maßgeblich für Emotionen verantwortlich sind [3]. So ist die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse von entscheidender Bedeutung. Dabei wird unter dem Einfluss von Stress der Corticotropin-Releasing-Factor (CRF) aus dem Hypothalamus freigesetzt, welcher im nächsten Schritt die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) in der Hypophyse stimuliert, welches wiederum die Freisetzung von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde stimuliert [12]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Funktionsstörung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse mit einem Anstieg der Glukokortikoide im Serum bei Patienten mit Depression zu beobachten ist [2]. Dabei kann eine Erhöhung der Glukokortikoidkonzentration im Serum unter anderem bei Stress beobachtet werden, welche jedoch nicht unbedingt bei

jedem Patienten eine Depression auslöst [3]. Andererseits wurde hierbei deutlich, dass bei den meisten Patienten mit Depression eine Überfunktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse vorliegt. Dies äußert sich durch eine erhöhte CRF-Ausschüttung sowie einem verminderten negativen Feedback durch CRF und die Glukokortikoide [6]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Depressionen das Volumen des Hippocampus verringert ist. Über die Aktivierung der HPA-Achse sowie die Stimulation des Glukokortikoidrezeptors scheint Stress zudem die Neurogenese negativ zu beeinflussen [12].

Weitere Hypothesen beschreiben die Abnahme neurotropher Faktoren im Gehirn, insbesondere die Beteiligung des brain-derived neurotrophic factor (BDNF), der vorrangig in den limbischen Gehirnstrukturen zu finden ist [2]. Diese Hypothese wird zum einen durch Studien an depressiven Patienten untermauert, bei denen ein Atrophie im Hippocampus und anderen Vorderhirnregionen zu beobachten war [2]. Zum anderen konnte anhand von Studien an Nagetieren gezeigt werden, dass Stress maßgeblich die Transkription des brain-derived neurotrophic factor beeinflusst [6]. Es zeigte sich unter dem Einfluss von akutem oder chronischem Stress eine Verminderung der Transkription von BDNF im Hippocampus [6, 12]. Auch scheint die Aktivierung des cAMP-Signalwegs und der Transkriptionsfaktor CREB bei der Regulation der neurotrophen Faktoren eine entscheidende Rolle zu spielen [6, 17]. So kommt es bei einer Aktivierung von CREB zu einer Induktion des BDNF-Gens [17]. Während dies in Regionen wie dem Hippocampus antidepressive Effekte hervorruft, scheint die Aktivierung von CREB in Regionen wie dem Nucleus accumbens prodepressiv zu wirken [6, 2]. Dass der gleiche Signalweg dabei in zwei unterschiedlichen Gehirnregionen jeweils unterschiedliche Wirkungen hervorruft, macht erneut die extremen Herausforderungen beim Verständnis und der Erforschung des Pathomechanismus der Depression deutlich.

1.3 Antidepressiva

Depressionen können prinzipiell mit Psychotherapie, Pharmakotherapie und sogenannten „biologischen“ Therapieverfahren (Elektrokonvulsionstherapie, repetitive transkranielle Magnetstimulation (rTMS), etc.) behandelt werden.

Grundsätzlich richtet sich das therapeutische Vorgehen nach dem Schweregrad der Depression: Bei leichten Depressionen können psychotherapeutische Verfahren in Betracht gezogen werden, während bei schwereren Formen der Depression psychotherapeutische Verfahren in Kombination mit Antidepressiva zum Einsatz kommen [6]. Den sehr schweren Formen der Depression ist die Elektrokonvulsionstherapie vorbehalten, die eine der wirksamsten Behandlungsformen der Depression darstellt [6].

1.3.1 klassische Antidepressiva

Die heutige pharmakologische antidepressive Therapie basiert noch immer auf den Entdeckungen von vor 50 Jahren als zwei potente Gruppen an Pharmaka gefunden wurden: die trizyklischen Antidepressiva sowie die Monoaminoxidase-Inhibitoren [3].

Trizyklische Antidepressiva stellen heute noch einen wichtigen Bestandteil der Behandlung dar. Dabei beruht ihr Wirkmechanismus auf dem Prinzip einer Inhibition eines Plasmamembrantransporters für Serotonin und Noradrenalin [6]. Weiterentwicklungen stellen dabei die SSRIs sowie die SSNRIs dar [6]. Diese beruhen auf dem Prinzip, dass die neuronale Wiederaufnahme von Neurotransmittern, bei SSRI zum Beispiel die des Serotonins, selektiv inhibiert wird [2]. Ein SSRI und sehr häufig eingesetztes Medikament zur Behandlung der Depression stellt dabei Citalopram dar [5]. Die Vorteile der aktuell gängigen Antidepressiva bestehen vor allem in einer nachweislich sicheren und nebenwirkungsarmen Anwendung [2]. Ein wesentlicher Nachteil der Behandlung ist, dass zunächst einige Wochen gewartet werden muss, bis sich ein antidepressiver Effekt einstellt. Selbst bei optimaler Einstellung erreichen nur weniger als 50 % der behandelten Patienten eine vollständige Remission [6]. So zeigt sich zwar unmittelbar nach dem Beginn der Behandlung ein Anstieg der Monoamine im synaptischen Spalt, jedoch dauert es Wochen, bis sich der psychische Zustand bessert [2]. Die Tatsache, dass Patienten einige Wochen warten müssen, bevor sich eine antidepressive Wirkung durch die Medikation einstellt, ist zudem mit einem erhöhten Risiko für Suizid assoziiert [19]. Eine exakte Erklärung für den verzögerten Wirkungseintritt sowie die geringe Ansprechrate gibt es noch nicht. Eine Möglichkeit für die Variabilität im

Ansprechen der Medikation könnte darin liegen, dass die SSRIs wie Citalopram Substrate des P-Glykoproteins sind, welches einen wesentlichen Teil der Blut-Hirn-Schranke darstellt und einem genetischen Polymorphismus unterliegt [2]. Der verzögerte Wirkungseintritt lässt darauf schließen, dass die Neurotransmittermodulation von Serotonin und Noradrenalin nicht alleinig für die antidepressive Wirkung verantwortlich gemacht werden kann [3]. Einige Antidepressiva scheinen die Neurogenese und den Transkriptionsfaktor CREB im Hippocampus zu stimulieren [2]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Monoaminmodulatoren die Transkription von BDNF erhöht [6, 12]. In postmortalen Untersuchungen am Gehirn von Menschen mit Depressionen konnte dies ebenfalls beobachtet werden. So zeigte sich im Gegensatz zu Probanden, die nicht mit Antidepressiva behandelt wurden, eine erhöhte BDNF-Expression im Gyrus dentatus, Hilus und in den supragranulären Regionen [16]. Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass BDNF in anderen Gehirnregionen gegenteilige Effekte zeigt und somit prodepressiv wirkt [2]. Diese therapeutischen Probleme haben dazu geführt, dass die Suche nach neueren, schnelleren und sichereren wirkenden Antidepressiva entstanden ist. Dabei hat sich die Suche in der Vergangenheit vor allem auf Medikamente mit bekanntem gleichem monoaminbasierten Wirkmechanismus fokussiert, die jedoch ihre Wirkung selektiver und schneller entfalten sollten, bis dato jedoch ohne grundlegenden Erfolg [6]. Einen neuen vielversprechenden Ansatz stellen daher die nicht-monoaminbasierten Antidepressiva dar.

1.3.2 Ketamin und Hydroxynorketamin

Bei Ketamin handelt es sich um ein dissoziatives Anästhetikum und nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor Antagonisten [7]. Ketamin wird dabei seit mehr als 50 Jahren als Anästhetikum eingesetzt [22]. Insbesondere bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen oder hämodynamisch instabilen Patienten wird Ketamin aufgrund seiner bronchodilatatorischen und sympathikotonen Wirkung vorrangig eingesetzt [22]. Es findet zudem Anwendung bei Kaiserschnitten sowie Verbrennungsoptionen und findet ebenfalls bevorzugt bei Kindern Anwendung [22]. In der Neuzeit hat sich Ketamin mittlerweile als potentes Analgetikum etabliert [22]. Neuere Erkenntnisse legen die Vermutung

nahe, dass Ketamin ebenfalls eine entzündungshemmende Wirkung hat. Dies konnte im Rahmen einer Studie nachgewiesen werden, bei der Ketamin eine entzündungshemmende Wirkung bei intraoperativer Applikation zeigte [22]. Im Jahr 2000 wurde Ketamin erstmals im Rahmen einer Studie bei intravenöser Applikation subanästhetischer Dosen eine antidepressive Wirkung zugeschrieben [19]. Die antidepressive Wirkung setzte dabei bereits nach nur vier Stunden ein und könnte damit eines der wesentlichen Probleme, den stark verzögerten Wirkungseintritt der aktuellen Antidepressiva, beheben [19]. Schließlich korreliert der verzögerte Wirkungseintritt aktuell gängiger Antidepressiva maßgeblich mit einem erhöhten Risiko für Suizidalität [19]. Ketamin konnte dahingegen in Studien eine schnelle Besserung dieser Symptomatik erzielen [19]. In Tiermodellen konnte Ketamin ebenfalls eine schnelle und darüber hinaus vergleichsweise langanhaltende antidepressive Wirkung über die Aktivierung des mTOR sowie eine verstärkte Expression synaptischer Proteine nachgewiesen werden. Zudem bewirkt Ketamin die vermehrte Synaptogenese im präfrontalen Kortex und moduliert die Freisetzung von BDNF im Gehirn [7, 18]. Im Menschen ist die Benutzung von Ketamin als Antidepressivum jedoch limitiert. Zum einen durch sein starkes Suchtpotential, zum anderen durch seine starken Nebenwirkungen wie beispielsweise dissoziative Effekte [8]. Bei der Verstoffwechslung von Ketamin entsteht der Ketamin-Metabolit (2S;6S;2R;6R)-Hydroxynorketamin (HNK) [8]. Es konnte im Tier gezeigt werden, dass HNK eine starke antidepressive und NMDA-Rezeptor unabhängige Wirkung hat [8]. Des Weiteren führt HNK zu einer schnellen und langanhaltenden Aktivierung des AMPA-Rezeptors [8] sowie zu einer Steigerung der Plastizität dopaminergener Neurone [7]. Die bis dato limitierenden Nebenwirkungen bei der Behandlung einer Depression mit Ketamin konnten bei HNK, das anders als Ketamin nicht die NMDA-Rezeptoren inhibiert, nicht nachgewiesen werden. Somit besteht mit HNK eine vielversprechende neue Behandlungsoption [7]. Die zugrundeliegenden molekularen Signalmechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden [18].

1.3.3 Forschungsaussichten

Auf der Suche nach neuen medikamentösen nicht-monoaminbasierten Behandlungsansätzen und Zielstrukturen für eine medikamentöse Behandlung konnten in unterschiedlichen Bereichen Erfolge erzielt werden. Dabei erlangten die Glucocorticoide, CRF, BDNF und Phosphodiesteraseinhibitoren einen großen Teil der Aufmerksamkeit.

CRF- und Glucocorticoidrezeptorantagonisten

Die HPA-Achse wird, wie bereits erwähnt, entscheidend durch Stress beeinflusst und spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Depression. Sowohl CRF als auch die Glucocorticoide stellen somit einen möglichen Ansatzpunkt für nicht monoaminbasierte Antidepressiva dar. Somit sind CRF- als auch Glucocorticoidrezeptorantagonisten aktueller Gegenstand der Forschung [2]. Aufgrund einer nicht stabilen Wirkung und zusätzlichen Problemen mit der Pharmakokinetik sowie Hepatotoxizität konnten CRF-Antagonisten bis dato jedoch keine Erfolge erzielen [6]. Neuere Studien an Patienten mit psychotischer Depression oder Depressionen im Rahmen eines Cushing-Syndroms konnten jedoch eine Besserung unter der Behandlung mit Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten erzielen [6]. Einen wesentlichen Einfluss hat dabei der Schweregrad der Depression: So legen neuere Erkenntnisse nahe, dass ein Hypercortisolismus in der Regel nur bei schweren Depressionen zu finden ist [2].

BDNF

Auch stellt BDNF die Möglichkeit eines Angriffspunktes für eine antidepressive Behandlung dar. Es gibt allerdings noch einige Hindernisse, die zu überwinden sind: Zum einen ist BDNF ein sehr kleines Protein, welches an einen TrkB-Tyrosinkinase-Rezeptor bindet, was die Schwierigkeit mit sich bringt, kleine TrkB-Agonisten zu entwickeln [6]. Zum anderen zeigte sich in anderen Studien eine gegenteilige Wirkung in anderen neuronalen Schaltkreisen. So erhöhte chronischer Stress beispielsweise die BDNF-Expression im dopaminergen Belohnungskreislauf und es zeigten sich antidepressive Effekte bei einer Blockade der BDNF-Funktion [6].

Phosphodiesteraseinhibitoren

Phosphodiesteraseinhibitoren sind ebenfalls in den Forschungsmittelpunkt geraten. Phosphodiesterasen sind Enzyme, die unter anderem den Abbau von cAMP und cGMP katalysieren [6]. Phosphodiesteraseinhibitoren hemmen hingegen den Abbau und steigern über die Aktivierung des cAMP-Signalwegs die BDNF-Expression im Hippocampus [6]. Dabei kommt es im Zellkern zu einer Aktivierung von cAMP-responsiv-element-binding-protein (CREB), einem Transkriptionsfaktor, der wiederum zu einer Induktion des BDNF-Gens führt. Die antidepressive Wirkung entsteht dabei durch die Induktion von CREB im Hippocampus [17]. In früheren Studien zeigte sich jedoch starke Übelkeit und Erbrechen als Nebenwirkung [6]. Zudem legen neuere Studien nahe, dass durch die Aktivierung des cAMP-Signalwegs eine depressive Wirkung gefördert werden könnte [6].

So stellen diese Forschungsschwerpunkte interessante und mögliche Ansätze für neuartige Antidepressiva dar. Es bedarf jedoch noch weitere Jahre der Forschung, bis es gegebenenfalls zur klinischen Anwendung kommt.

1.4 Biomarker

Biomarker im Allgemeinen können definiert werden als ein Merkmal, das objektiv gemessen und bewertet wird sowie als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogenetische Prozesse oder pharmakologische Reaktionen auf eine therapeutische Intervention [23]. Durch die objektive Messung solcher Prozesse und Reaktionen können sich Biomarker für ganz unterschiedliche Zwecke einsetzen lassen: Sie können der Diagnose, dem Staging, als auch der Prognose einer Erkrankung dienen [23]. Doch noch viel mehr lassen sie sich bei der Behandlung einer Erkrankung als Monitoring nutzen, um die Wirkung und das Ansprechverhalten der Behandlung zu beurteilen [23]. Ein erfolgreiches Beispiel für die Nutzung von Biomarkern, das zur Abschätzung des Risikos von Herzerkrankungen dient, ist der Blutcholesterinwert [15, 23]. Im Gegensatz dazu gibt es bis dato noch keinerlei klinisch verwendbare Biomarker - weder bei der Diagnostik noch bei der Behandlung einer Depression [9]. Das Ansprechverhalten einer pharmakologischen Therapie beruht dabei im

Wesentlichen auf einem „Trial- und Error“-Prinzip, was zur Folge hat, dass Patienten über einen langen Zeitraum mit unterschiedlichen Medikamenten behandelt werden, bevor das passende gefunden wird [9]. Daraus ergeben sich diverse Folgeprobleme, wie beispielsweise eine verminderte Compliance des Patienten, erhöhter Leidensdruck sowie ein erhöhtes suizidales Risiko [13]. Des Weiteren können eine negative Stimmung als auch getrübe Erwartungen beim Patienten entstehen, die maßgeblich das Outcome der Therapie beeinflussen [13]. Diese therapeutischen Probleme machen einmal mehr die Dringlichkeit der Entwicklung von Biomarkern für die Diagnostik und Behandlung der Depression deutlich. Biomarker würden dabei nicht nur eine Rolle in der Überwachung der Behandlung spielen, sondern könnten auch dabei behilflich sein, das frühzeitige Ansprechen einer Therapie zu überprüfen [9]. Dies würde dazu führen, dass nicht jeder Patient nach dem „Trial- und Error“-Prinzip behandelt wird, sondern eine personalisierte pharmakologische Therapie für jeden Patienten auf der Basis von Biomarkern entsteht. Damit Biomarker jedoch effektiv genutzt werden können, müssen sie zunächst validiert werden [15]. Die Tatsache, dass es sich bei der Depression um eine komplexe Erkrankung handelt, die nicht nur ein bestimmtes Kompartiment betrifft und durch das Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Abläufe und Systeme entsteht, macht die Möglichkeit der Nutzung eines einzigen Biomarkers unwahrscheinlich [11]. Zudem zeigen sich Hindernisse bei der Materialgewinnung für Biomarker. Biomarker aus dem peripheren Blut haben sich bis dato als nicht zielführend erwiesen, da sich ihre Änderungen im Blut erheblich von denen im zentralen Nervensystem unterscheiden [18]. Der Zugang zum Gehirn ist zudem nur eingeschränkt möglich, sodass ein neuerer vielversprechender Ansatz die Diagnostik des Liquor cerebrospinalis, des Hirnwassers, darstellt. Liquor stellt aufgrund der Tatsache, dass es sich um eine Flüssigkeit mit direktem Bezug zum Gehirn handelt, ein interessantes Untersuchungsmedium dar [18]. Im Liquor bilden sich dabei aufgrund seiner unmittelbaren Nähe zum Gehirn sowohl metabolische als auch biochemische Änderungen ab. Das Proteom, ein Abbild aller Proteine, die aus dem Genom generiert werden, stellt bei dem Verständnis der Komplexität der Depression einen der wichtigsten Bereiche dar, sodass zwischen Gesunden und Kranken die Analyse des CSF-Proteoms wegweisend sein könnte [11].

1.4.1 Liquordiagnostik

Die erste Lumbalpunktion beim Menschen wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts durch Heinrich Iraneus Quincke beschrieben [25]. Heutzutage ist die diagnostische Lumbalpunktion beim Menschen das Mittel der Wahl zur Abklärung entzündlicher als auch infektiöser Erkrankungen des zentralen Nervensystems [25]. Des Weiteren spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Abklärung und Diagnosestellung der Demenzerkrankungen einschließlich der Alzheimer-Krankheit und verwandten Erkrankungen [42]. Zudem findet sie Anwendung bei der Abklärung akuter Kopfschmerzen und dient zur Messung des intrakraniellen Drucks [25]. Bei der Lumbalpunktion handelt es sich um ein aseptisches Verfahren, bei dem mittels einer speziellen Nadel der Subarachnoidalraum im Bereich der Lendenwirbelkörper zwischen L3/4 punktiert wird und somit CSF gewonnen werden kann. Die Lumbalpunktion stellt dabei in geübten Händen ein komplikationsarmes Verfahren dar [25].

Mausmodelle sind wesentliche Bestandteile in der Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen von neuropsychiatrischen Störungen. So können in Tiermodellen Medikamente in das zentrale Nervensystem appliziert werden, ihre Wirkung überwacht und Pathomechanismen entschlüsselt werden [1]. Die Entnahme von Liquor gestaltet sich bei der Maus jedoch um einiges komplizierter als beim Menschen. Eine Möglichkeit stellt beispielsweise die operative Punktion der Cisterna magna dar. Dabei erfolgt zuerst die Anästhesie der Mäuse und im Anschluss die operative Eröffnung des Gewebes von der Dura mater bis hin zur Cisterna Magna, die dann punktiert werden kann [27]. Eine serielle Entnahme von Liquor ist somit nur erschwert möglich und mit hohem Aufwand verbunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode angewandt, die erstmals durch die Kollegen Onaivi et al. beschrieben wurde und durch Implantation einer intraventrikulären Kanüle eine vereinfachte serielle in vivo Liquorentnahme bei Mäusen ermöglicht [1, 18].

1.5 Ziel der Arbeit

Die Bestimmung von Biomarkern im Liquor könnte beim Menschen eine wesentliche Rolle in der Diagnostik von psychischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems spielen. Um diese Erkrankungen sowie deren Behandlung besser zu untersuchen, werden Tiermodelle herangezogen. Dabei ist es entscheidend, eine validierte Methode zur longitudinalen Liquorabnahme zu haben, um Einflussfaktoren wie Stress zu minimieren und möglichst fehlerfreie und von anderen Variablen unabhängige Ergebnisse zu erzielen. Die intraventrikuläre Kanülierung stellt dabei eine neue effizientere Methode der in vivo Liquorabnahme dar, bisher jedoch ohne evidenzbasierte Bewertung und Validierung bei der longitudinalen Messung, der mehrmaligen Messung im gleichen Tier. Das Ziel dieser Arbeit ist daher, die Methode zu validieren und Aufschluss über die Stressantwort des HPA-Systems bei der Liquorabnahme zu geben. Dazu erfolgte die intraventrikuläre Kanülierung der Maus sowie anschließend die in vivo Liquorextraktion und die Kontrolle der Stressantwort über das Messen des Corticosteronspiegels im Blut basal, 15 Min und 90 Min nach Liquorextraktion. Als Tiermodell wurden männliche DBA/2J-Mäuse gewählt, da dieser Stamm durch eine starke angeborene Ängstlichkeit determiniert ist, die sich mit Antidepressiva gut behandeln lässt [18]. Im Rahmen einer weiteren Studie wurde der zuvor abgenommene Liquor auf zeitliche Veränderung des Liquorproteoms nach intraperitonealer Applikation von HNK in antidepressiv wirkender Dosis mittels Massenspektrometrie untersucht [18].

2 Material und Methoden

2.1 Material

Corticosteron-ELISA-Kit (Kat.-Nr. ADI-900-0979; Enzo Life Sciences, USA)	Enzo Life Sciences Inc.
Spritzen zur Liquorextraktion	10- μ l-Hamilton-Spritze Modell 701N (Kat.-Nr. 80365; Hamilton, USA)
Narkosegas	Isofluran®
Analgetikum	Metacam (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Deutschland)
Paladur Dental Zement	Kulzer, Deutschland
Intraventrikuläre Kanüle	Plastics One, USA

2.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um männliche adulte acht Wochen alte DBA/2J-Mäuse von Charles River aus Frankreich. Nach Ankunft in der Versuchstiereinrichtung werden alle Mäuse einzeln untergebracht (Temperatur = 22 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit = 50 ± 5 %), sodass sich keine Hierarchien ausbilden können. Vor den Experimenten werden sie mindestens eine Woche lang an die neue Umgebung gewöhnt. Zudem wird ein normaler Tag-Nacht-Zyklus etabliert (8 bis 20 Uhr hell, 20 bis 8 Uhr dunkel). Die Mäuse haben unbegrenzten Zugang zu Wasser und Futter. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit den europäischen Tierschutzgesetzen durchgeführt und von der örtlichen Tierschutzbehörde (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz, Deutschland) genehmigt.

2.3 Implantation einer intraventrikulären Kanüle

Bei der Maus ist die in vivo Liquorextraktion ein wichtiges Verfahren zur Bestimmung und Erforschung von Biomarkern. Hierzu wird der Maus zunächst eine intraventrikuläre Kanüle implantiert. Die CSF-Kanülenimplantation wird dabei auf eine modifizierte Weise nach Onaivi et al. durchgeführt [1]. Die Mäuse

werden mittels Inhalationsnarkose (Isofluran® 3,5 Vol. %) anästhesiert und erhalten perioperativ das Analgetikum Metacam (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Deutschland) subkutan (0,5 mg / kg KG). Nach der Fixierung der Maus in der Stolting-Apparatur erfolgt die Überprüfung der Narkosetiefe mittels Zwischenzehenreflex. Nach steriler Desinfektion des Kraniums erfolgt ein median-sagittaler Hautschnitt. Auf die nun freigelegte Schädelkalotte werden drei Tropfen Wasserstoffperoxid für drei Sekunden aufgebracht und danach mit einigen Tropfen NaCl 0.9 % gespült. Die Behandlung dient der Eradikation der Unterhaut auf der Schädelkalotte. Im nächsten Schritt wird der freigelegte Schädelknochen mit einem Skalpell aufgeraut, um eine bessere Haftung des später darauf anzubringenden Zements zu gewährleisten (siehe Abb. 3.1).

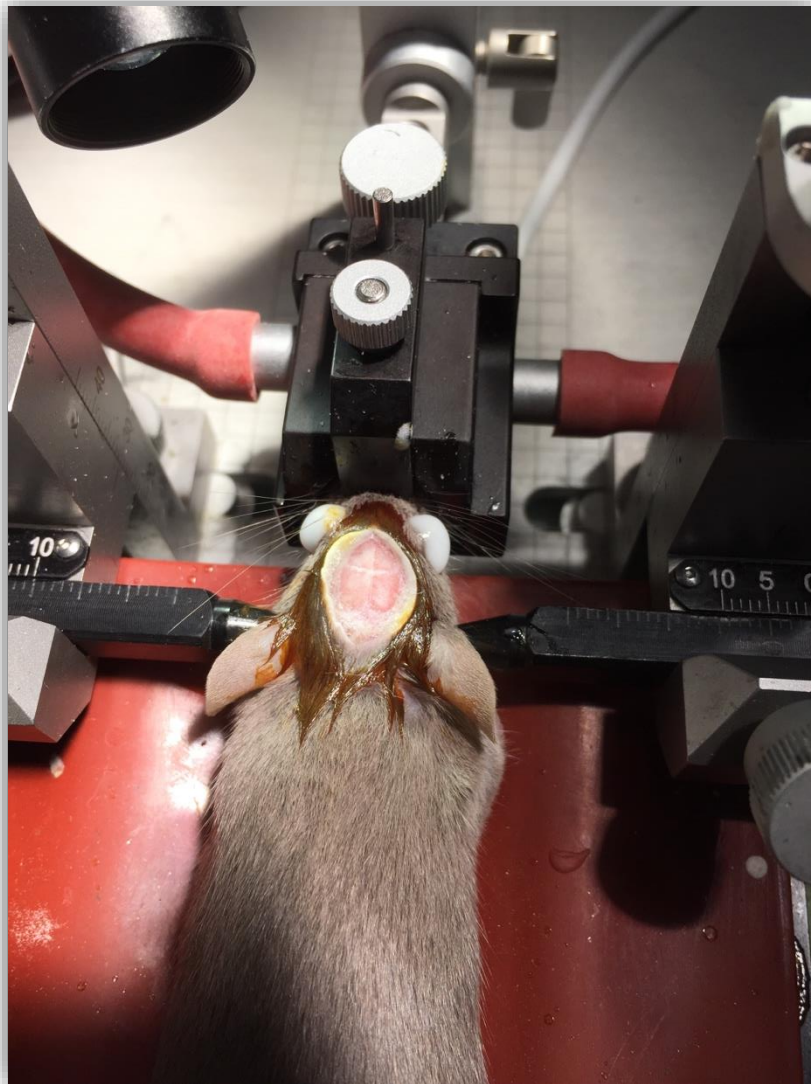


Abb. 3.1: Darstellung der vier Schädelquadranten sowie des Bregmas bei Sicht auf die Schädelkalotte

Im Anschluss werden zwei kleine Löcher auf der linken Seite in den Schädel gebohrt. In diese werden zwei Schrauben eingesetzt. Das Anbringen der Schrauben, die später mit einzementiert werden, dient dabei der Stabilität der intraventrikulären Kanüle. Im nächsten Schritt erfolgt das Einspannen der intraventrikulären Kanüle auf die Sonde der Stolting-Apparatur. Ein drittes Loch wird gebohrt und die intraventrikuläre Kanüle (interne Kanüle; Plastics One, USA) wird an den Bregmakoordinaten 0,0 AP / 0,8 ML / -0,9 VD implantiert (siehe Abb. 3.2).

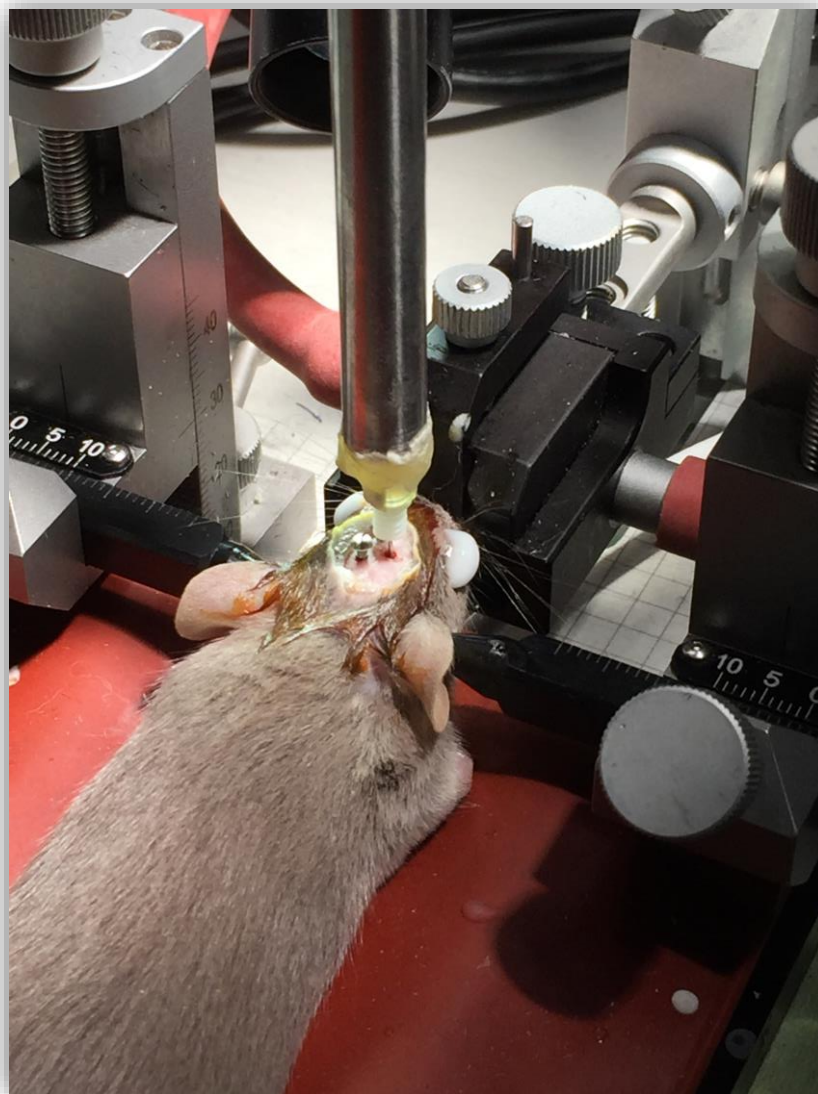


Abb. 3.2: Implantation der intraventrikulären Kanüle mittels Sonde

Paladur Dental Zement (Kulzer, Deutschland) wird zubereitet und auf die Schädelkalotte aufgetragen. Er fixiert die innere Kanüle an den Schrauben und dem Schädel. Die Hautläsion wird inkomplett mittels Naht geschlossen und eine Blindkanüle (Plastics One, USA) zum Verschluss der inneren Kanüle genutzt.

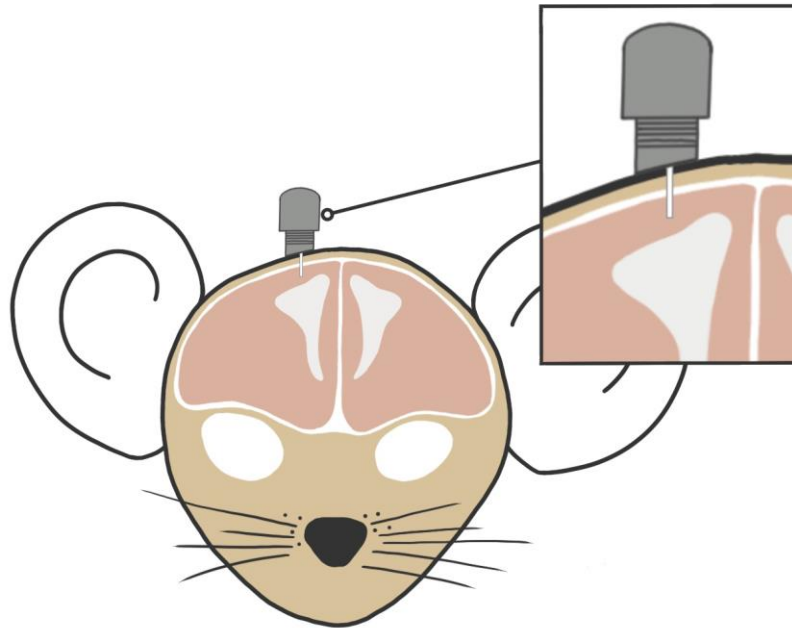


Abb. 3.3: Darstellung der intracerebralen Lage der Blindkanüle

Die innere Kanüle liegt nach der Implantation intracerebral, jedoch nicht intraventrikulär (siehe Abb. 3.3). Erst der Austausch der Blindkanüle durch die Kanüle zur Liquorabnahme ermöglicht die Verbindung zum Ventrikel und somit die Liquorabnahme.

Zur postoperativen Lokalanalgesie werden 1-2 Hübe Lidocainspray aufgetragen und zur weiteren Analgesie im Käfig über die Trinkflasche 250 µl Metacam für eine Woche zugeführt. Nach der Genesung von der Operation erhalten die Mäuse neue Wasserflaschen ohne Analgetikum.

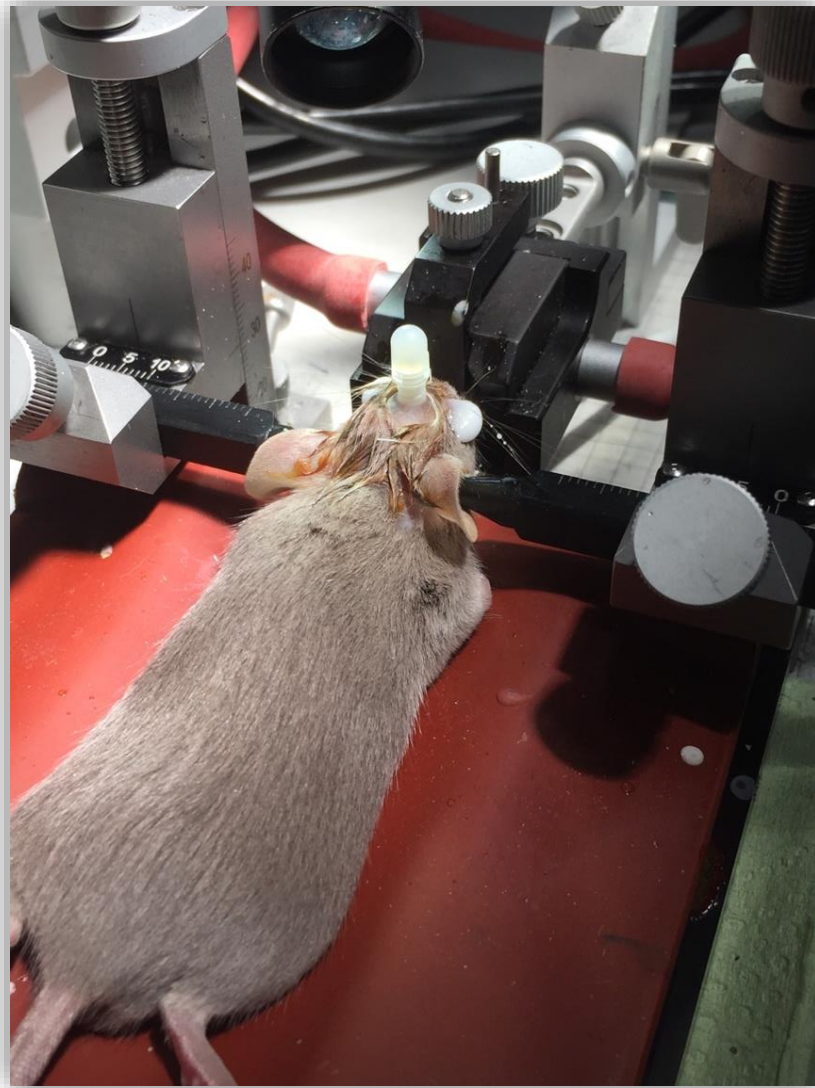


Abb. 3.4: Postoperativer Zustand in der Stolting-Apparatur

2.4 Handling der Versuchstiere

Zwei Wochen nach der Implantation der intraventrikulären Kanülen beginnt das Handling der Mäuse. Dazu werden die Mäuse eine Woche lang einzeln morgens zwischen 8 Uhr bis 13 Uhr für jeweils zwei Minuten aus ihrem Käfig genommen und vorsichtig unter der Hohlhand des Untersuchers fixiert. Das Handling imitiert die im eigentlichen Versuch stattfindende Liquorabnahme. Dabei wird das Ziel verfolgt, dass die Maus bei der Montage der intraventrikulären Kanüle an die Prozedur gewöhnt ist und somit mit weniger Angst und Stress darauf reagiert. Eine solche Reaktion würde zu einer Erhöhung der Corticosteronausschüttung führen, was wiederum zu einer Verfälschung der Versuchsmessung führen kann.

2.5 Behandlung mit HNK oder Kochsalzlösung

Die Versuchstiere werden in eine HNK- und NaCl-Gruppe randomisiert. Das Körpergewicht der Maus wird 24 Stunden vor der Arzneimittelverabreichung gemessen. Die Mäuse erhalten intraperitoneal (2R,6R)-Hydroxynorketaminhydrochlorid (Tocris, Deutschland; 10 mg / kg KG, 2,5 mg / ml) oder als Kontrolle Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, Braun, Deutschland). Die Dosierung für (2R,6R)-HNK erfolgt nach Zanos et al. [8]. Vier Stunden nach der Injektion werden CSF-Proben entnommen.

2.6 Liquorabnahme

Die Versuchstiere werden einzeln nacheinander in zeitlichem Versatz unter Minimierung von optischen oder akustischen Störquellen behandelt. Die Blindkanüle wird entfernt und ein Schlauch (5-10 cm lang, Plastics One, USA) wird an einem Ende mit einer externen Kanüle (zusätzlich -1,0 VD (Endtiefe -1,9 VD), Plastics One, USA) und am anderen Ende mit einer 10- μ l-Hamilton-Spritze Modell 701N (Kat. -Nr. 80365; Hamilton, USA) verbunden. Durch vorsichtiges Ziehen des Kolbens (1 μ l/1 Minute) wird Liquor entnommen. Nachdem 10 μ l entnommen sind, wird die Liquorprobe in ein Röhrchen umgefüllt. Diese werden visuell auf Blutverunreinigungen untersucht und bei Bedarf ausgeschlossen. Direkt im Anschluss werden die Röhrchen auf Trockeneis gelagert. Nach Ende des Experiments bis zur weiteren Analyse erfolgt die Lagerung der Proben bei -80 °C.

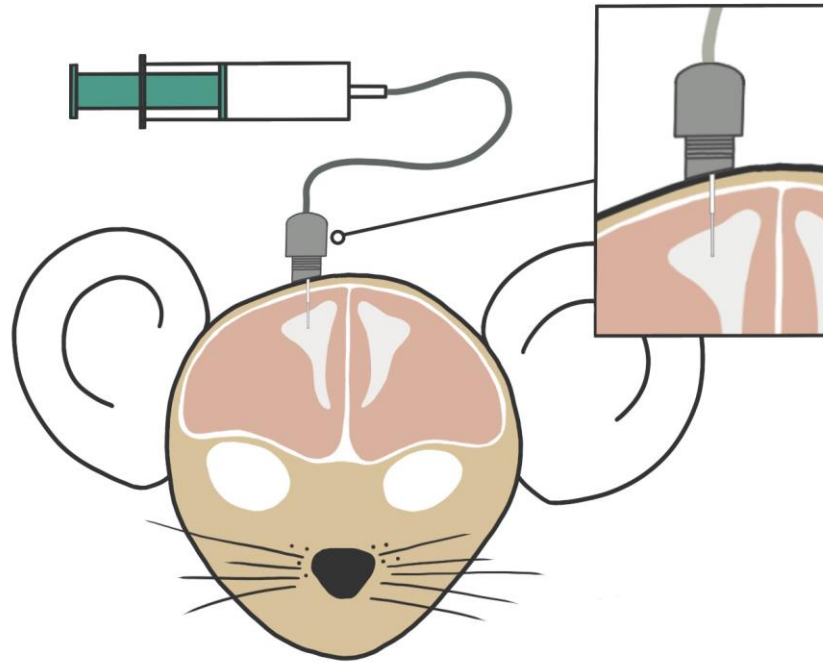


Abb. 3.5: Darstellung der Lage der intraventrikulären Kanüle zur Liquorabnahme

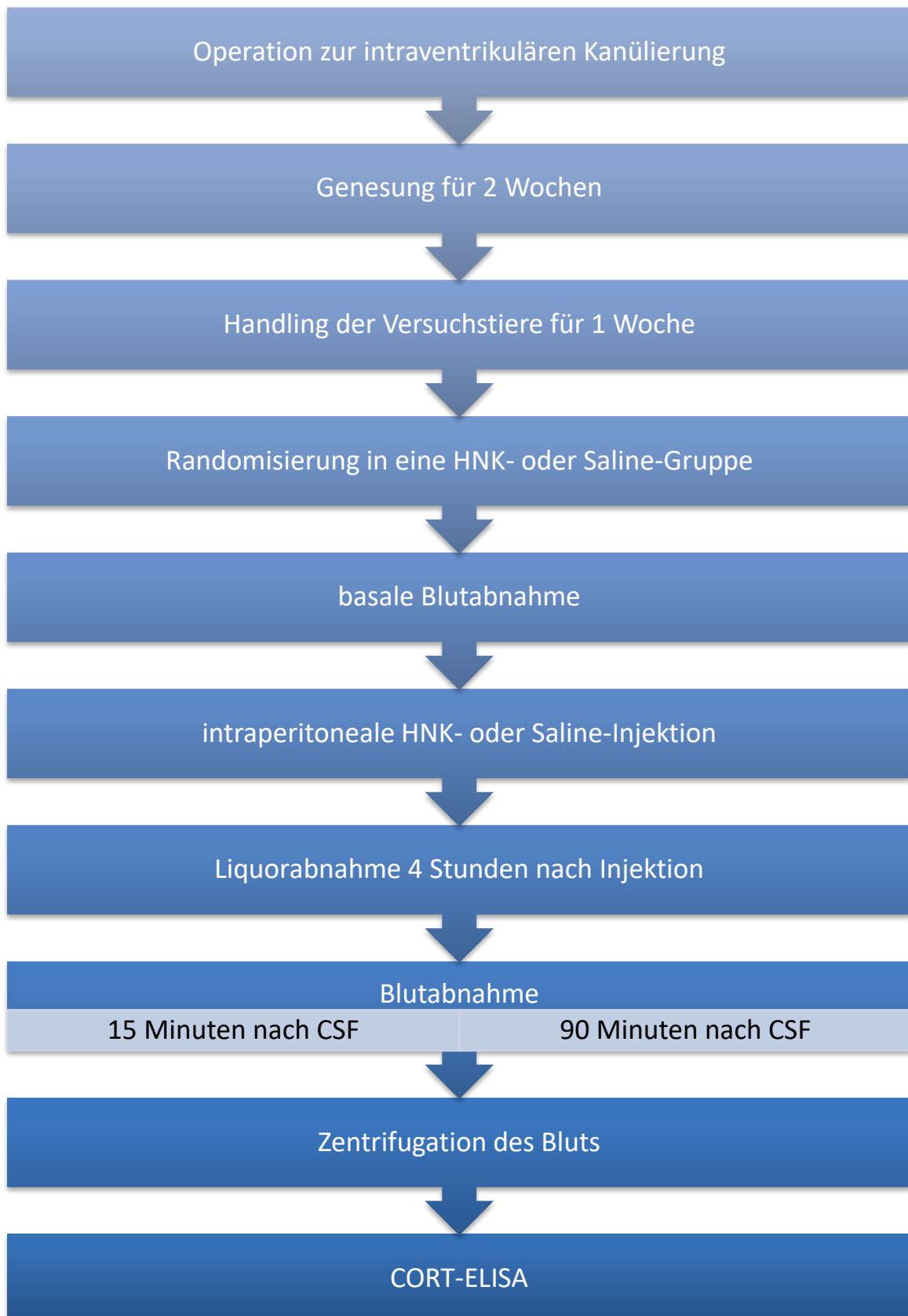
2.7 Blutabnahme

Der Corticosteronspiegel im Blut der Maus unterliegt einer zirkadianen Rhythmik und ist, da es sich um nachtaktive Tiere handelt, am Morgen am niedrigsten und steigt zum Abend hin wieder an. Daher wird den Versuchstieren zwischen 8:00 und 12:00 Uhr Blut aus den venösen Schwanzgefäßen abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt stressarm durch einen seitlichen Schwanzschnitt. Zur longitudinalen Messung des Corticosteronspiegels erfolgt die Abnahme zu mehreren Zeitpunkten in derselben Maus (basal, 15 Minuten und 90 Minuten nach der Liquorabnahme). Das Blut wird in EDTA beschichteten Röhrchen aufgefangen und im Anschluss für 10 Minuten bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wird bei -80 °C gelagert.

2.8 ELISA

Die Corticosteronkonzentration im extrahierten Plasma der Versuchstiere wird mit dem Corticosteron-ELISA-Kit (Kat.- Nr. ADI-900-0979; Enzo Life Sciences, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers als Duplikat gemessen. Es wird nach dem „small volume protocol“ für Serum und Plasma vorgegangen. Hierbei werden 10 µl der Plasmaproben in Mikrozentrifugenröhrchen pepitiert und mit 10 µl 1:100 verdünntem SDR mittels VortexGenie gemischt. Nach anschließenden fünf Minuten Ruhezeit werden 380 µl ELISA Assay Buffer hinzugefügt und erneut gemischt. Das finale Mischverhältnis beträgt 1:40. Es werden 100 µl jeder Probe in die entsprechenden Mikroplattenvertiefungen des ELISAs pipettiert und jeweils 50 µl blaues Konjugat und 50 µl gelber Antikörper hinzugefügt. Die Platte wird für zwei Stunden bei 250 rpm auf einem Plattenshaker inkubiert. Nach der Inkubation werden die Vertiefungen dreimal mittels Wash Buffer gewaschen. Darauffolgend wird die chemische Reaktion gestartet, indem 200 µl pNpp Substrat in jede Vertiefung pipettiert werden. Es wird erneut für eine Stunde inkubiert, sodass eine Gelbfärbung entsteht. Die chemische Reaktion wird beendet durch Zugabe von 50 µl Stop Solution. Die optische Dichte der einzelnen Proben wird mittels eines Mikroplattenlesegeräts ermittelt bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Korrektur zwischen 570 nm und 590 nm. Dabei gilt, dass die Intensität der Gelbfärbung der einzelnen Proben proportional zur enthaltenen Corticosteronkonzentration der einzelnen Proben ist. Zum Schluss erfolgt die Umrechnung in eine Konzentrationsangabe in ng/ml.

2.9 Timeline des Experiments



2.10 Statistik

Die Probengrößen sind in den Legenden der Abbildungen angegeben. Die Werte werden als Mittelwert \pm Standardfehler angezeigt. Mittels deskriptiver Statistik (D'Agostino & Pearson Omnibus-Normalitätstest) werden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Die Daten werden mit einer two-way ANOVA analysiert, gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur. Alpha wird auf 5 % festgelegt, wobei p-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen werden. Die Daten werden mit der Prism 5-Software (GraphPad, USA) analysiert.

3 Ergebnisse

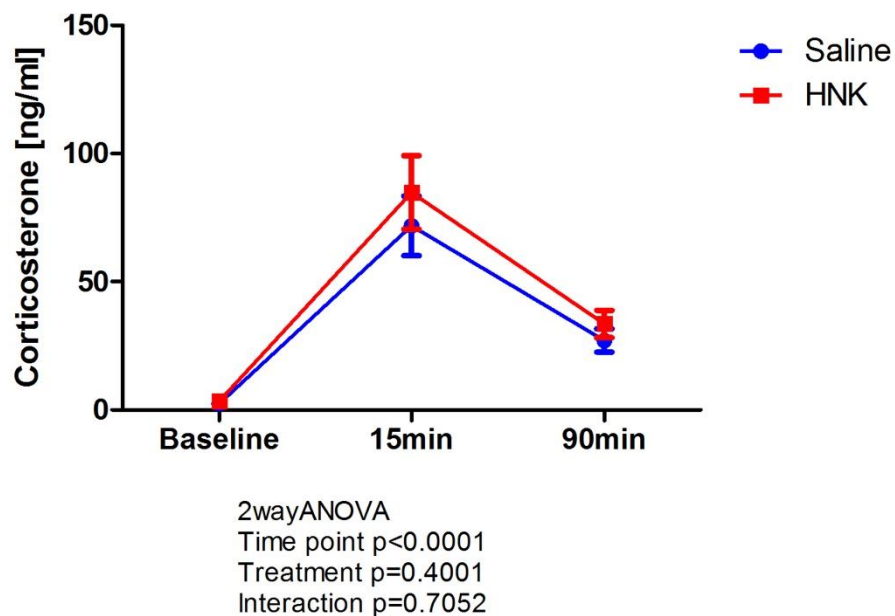


Abb. 4.1: Messung des Corticosteronspiegels im Blut der Mäuse mittels ELISA zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (basal, 15 Minuten und 90 Minuten nach Liquorextraktion). 2way ANOVA & Bonferroni Multiple Comparison Test: Zeitpunkt $p < 0,0001$, Behandlung $p = 0,4001$, Interaktion $p = 0,7052$, HNK(2R,6R)-Hydroxynorketamin, Balken dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $n = 20$.

Die Ergebnisse zeigen die Messung des Corticosteronspiegels im Blut der Mäuse mittels ELISA zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten: basal, 15 Minuten

und 90 Minuten nach Liquorextraktion. Dabei zeigt sich, dass der Corticosteronspiegel 15 Minuten nach der Liquorabnahme ansteigt und nach 90 Minuten wieder abfällt. Der basale Wert wird nach 90 Minuten jedoch noch nicht wieder erreicht. Des Weiteren zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit HNK und Saline (siehe Abb. 4.1).

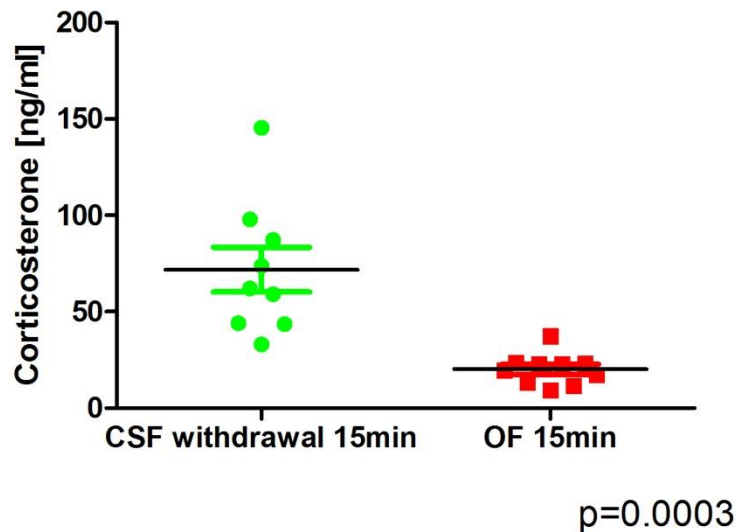


Abb. 4.2: Messung der Corticosteronspiegel im Blut der Mäuse mittels ELISA 15 Minuten nach Ende des CSF-Abnehmens bzw. nach Ende des OF (=Open-Field-Test). T Test, $p < 0.001$, $T = 4.581$, $df = 17$, $n = 20$

Die Ergebnisse zeigen die Messung des Corticosteronspiegels im Blut der Mäuse nach Ende der CSF-Abnahme (Mittelwert 71,80 ng/ml) sowie nach Ende des Open-Field-Tests (Mittelwert 20,17 ng/ml). Es zeigt sich ein statistisch signifikant höherer Corticosteronspiegel 15 Minuten nach CSF-Abnahme im Vergleich zum Open-Field-Test.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit dient der Validierung einer Methode der intraventrikulären Kanülierung zur longitudinalen Liquorabnahme in der Maus. Das Stresslevel der Versuchstiere beziehungsweise ein erhöhter Corticosteronspiegel hat maßgeblich Einfluss auf die molekularen Mechanismen im Liquor und könnte somit die Ergebnisse anderer Liquoruntersuchungen beeinflussen und gegebenenfalls verfälschen. Daher verfolgt diese Arbeit als Ziel, die Stressantwort der Versuchstiere während der in vivo Liquorextraktion zu messen und Aufschluss darüber zu geben, wie stressvoll die Methode für die Tiere ist. Im Rahmen dieser Studie wurde daher das Stresslevel der Versuchstiere gemessen und diese Werte in einem weiteren Schritt mit einem Open-Field-Test verglichen. Hierbei konnten erstmalig Belege dafür gefunden werden, dass die Methode der Liquorabnahme eine Stressantwort hervorruft, die sich nicht wesentlich beziehungsweise nur geringfügig von einer üblichen Verhaltenstestung, in diesem Versuch von einem Open-Field-Test, unterscheidet. Zudem wurde deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied bei der Behandlung mit HNK oder Saline bezüglich der Stressantwort der Versuchstiere bei der Liquorabnahme gibt. Die hohe epidemiologische Relevanz der Studie ergibt sich daraus, dass bis dato keinerlei Daten zur longitudinalen Liquorentnahme in derselben Maus und der damit verbundenen Stressantwort verfügbar sind.

Durch Onavi et al. wurde 2014 erstmals eine tierexperimentelle Methode zur seriellen Liquorabnahme bei Mäusen, die bei Bewusstsein sind, mittels intraventrikulärer Kanülierung beschrieben. Onavi et al. nutzten dabei die Methode zur Untersuchung der Proteinstruktur im extrazellulären Raum und deren zeitlichen Veränderung. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sich bei der Liquorentnahme der Liquorproteingehalt über die Zeit nicht verändert [1]. Die Untersuchung der Proteinstruktur und Dynamik stellt eine wesentliche Grundlage bei der Erforschung, dem Verständnis und der Pathologie neuropsychiatrischer Erkrankungen dar. Die Tatsache, dass sich der Liquorgehalt bei der Entnahme von Liquor nicht verändert, ist dabei eine fundamentale Voraussetzung. Auch wenn sich die Liquordiagnostik bei der Depressionsforschung am Anfang befindet, konnte hiermit eine neue, effiziente

und zukunftssträchtige Methode der in vivo Liquorentnahme eingeführt werden. Die zuvor beschriebene operative Methode der intraventrikulären Kanülierung wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt sowie modifiziert, um erstmalig eine serielle Liquorabnahme bei ein und derselben Maus durchzuführen und die daraus resultierende Stressantwort in Form von Corticosteron im Blut der Mäuse zu messen. Das Besondere an dieser im Vergleich zu anderen aktuell gängigen Methoden der Liquorentnahme ist, dass es sich um eine nicht invasive Methode handelt, die während der Entnahme keinen weiteren chirurgischen Eingriff erfordert. Nach einmaliger chirurgischer Anlage der intraventrikulären Kanüle ist eine Liquorentnahme zu jedem Zeitpunkt komplikationslos am wachen Tier möglich. Im Gegensatz zu der durch Onavi et al. beschriebenen Methode wurden im Rahmen dieser Studie keine C57BL/6-Mäuse, sondern DBA/2J-Mäuse gewählt, die eine angeborene Ängstlichkeit mit sich bringen und sich somit gut als Tiermodell für die Erforschung depressiver Erkrankungen eignen [18]. Zudem wurden die Versuchstiere vor Beginn des eigentlichen Experiments eine Woche lang mithilfe eines entsprechenden Handlings an das Prozedere der Liquorentnahme gewöhnt, um die Stressantwort im Wesentlichen auf die Liquorentnahme zu beschränken. Des Weiteren erfolgte eine Randomisierung in eine HNK- und eine Salinegruppe, um den Einfluss von HNK auf die Stressantwort zu messen. Hierbei wurde deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der HNK- und der Saline-Gruppe in Bezug auf die Stressantwort gibt. Beide Gruppen reagierten mit einem Anstieg des Corticosteronspiegels nach 15 Minuten und zeigten einen Rückgang nach 90 Minuten (siehe Abbildung 4.1). Der Verlauf der Stressantwort entspricht dabei einer normalen Stressreaktion. So kommt es im Rahmen einer Stressreaktion hauptsächlich unter dem Einfluss des aus dem Hypothalamus freigesetzten CRH zu einer Aktivierung der HPA-Achse, der gesteigerten Ausschüttung von ACTH aus der Hypophyse und der gesteigerten Freisetzung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde [6, 10, 29]. Da es einige Zeit in Anspruch nimmt, bis der Körper der Versuchstiere unter Stresseinwirkung (Liquorextraktion) mit einem Anstieg des Corticosteronspiegels reagiert, kommt es erst mit einer Verzögerung zu einem prägnanten Anstieg des Corticosterons. Über einen negativen Feedbackmechanismus beenden die Glucocorticoide selbst wieder die

Stressreaktion [10]. Dabei gibt es zwei an dieser Reaktion beteiligte Rezeptortypen: Zum einen den Mineralcorticoidrezeptor, der im Hippocampus zu finden ist und vornehmlich für die Regulation der zirkadianen Rhythmik verantwortlich zu sein scheint und zum anderen den ubiquitär im Gehirn vorkommenden Glucocorticoidrezeptor, der im Rahmen von Stressreaktionen das negative Feedback auf die HPA-Achse zu vermitteln scheint [10].

Dass es zu einem signifikanten Unterschied zwischen der HNK- und der Saline Gruppe in Bezug auf die Stressantwort kommen könnte, war dabei nicht zwingend zu erwarten. Zur Validierung erfolgte die Messung sowie der Vergleich der beiden Injektionen bezüglich der Stressantwort. Mögliche Erklärungsansätze dafür, dass es zu keinem signifikanten Unterschied in der Stressantwort gekommen ist, wären zum einen, dass HNK keinen Einfluss auf die Stressachse hat. Zum anderen könnte dies durch die Wirklatenz von HNK erklärt werden. Aufgrund einer noch nicht ausreichenden Datenlage zur Wirklatenz von HNK kann zur Erläuterung die Datenlage von Ketamin herangezogen werden. Die Datenlage zur Wirklatenz von Ketamin am Tier ist dabei bis dato noch nicht ausreichend erforscht. Betrachtet man jedoch klinische Studien am Menschen, in denen Ketamin in subanästhetischer Dosis zur Behandlung einer Depression eingesetzt wurde, legt dies nahe, dass es aufgrund der Wirklatenz von HNK zu keinem signifikanten Unterschied in der Stressantwort gekommen ist [19, 39, 40]. Eine antidepressive Wirkung von Ketamin beim Menschen wurde erstmalig durch Berman et al. im Rahmen einer randomisierten, doppelt verblindeten Studie berichtet [40]. Dabei erhielten die Teilnehmer über 40 Minuten entweder Ketaminhydrochlorid in subanästhetischer Dosis (0,5 mg/kg) oder ein Placebo [40]. Bereits nach vier Stunden zeigte sich eine antidepressive Wirkung bei den Teilnehmern und über die nächsten drei Tage ein kontinuierlicher Rückgang der depressiven Symptome [19, 40]. Weiterhin konnte im Rahmen der Studie gezeigt werden, dass es sich nicht um den initialen Rausch nach Gabe von Ketamin handelt, sondern um eine über drei Tage anhaltende Wirkung und Linderung der depressiven Symptome [40]. Eine andere klinische Studie, die sich demselben Thema widmet, kam zu ähnlichen Ergebnissen. In dieser Studie erhielten die Teilnehmer ebenfalls intravenös Ketamin Hydrochlorid in subanästhetische Dosis (0,5 mg/kg) und zeigten innerhalb von 110 Minuten

antidepressive Effekte, die bei einem Teil der Teilnehmer bis zu einer Woche anhielten [39]. So machen diese Studien zum einen die raschen antidepressiven Effekte von Ketamin deutlich. Zum anderen wird hierbei deutlich, dass diese Effekte erst nach ungefähr vier Stunden beziehungsweise nach 110 Minuten auftreten [39, 40]. Dies legt in Bezug auf die Messwerte dieser Studie die zuvor genannte These nahe, dass die Wirklatenz von HNK mit vier Stunden beziehungsweise 110 Minuten zu lang ist, um bereits nach 15 Minuten einen Effekt zu zeigen.

Im Weiteren wurde zur Überprüfung des Stresslevels bei Abnahme von CSF, der Corticosteronspiegel im Blut nach 15 Minuten mit dem Corticosteronspiegel eines Standard Open-Field-Tests nach 15 Minuten verglichen. Die Ergebnisse der Messung des Corticosteronspiegels im Blut der Mäuse zeigen einen statistisch signifikant höheren Corticosteronspiegel 15 Minuten nach CSF-Abnahme, im Vergleich zum Open-Field-Test an (siehe Abbildung 4.2). Der mittlere Corticosteronspitzenwert der Mäuse lag 15 Minuten nach CSF-Abnahme bei 71,80 ng/ml (siehe Abbildung 4.1). Dabei ist es wichtig, sich die Unterschiede der beiden miteinander verglichenen Verfahren zu verdeutlichen: Im Falle eines OF-Tests sind die Versuchstiere über einen kurzen Zeitraum in einer OF-Arena ungestört ausgesetzt und werden dabei lediglich anhand ihres Verhaltens beobachtet. Im Falle der hier praktizierten zehnmütigen Liquorentnahme erfolgt durch Entnahme aus dem Käfig, Montage der Kanüle, Liquorentnahme, Demontage der Kanüle, Zurücksetzen in den Käfig und Gespräche sowie Geräusche im Raum eine ständige Manipulation der Tiere. Hieraus lässt sich möglicherweise auch die höhere Stressantwort der Liquorentnahme gegenüber einem OF-Test erklären. Im Vergleich zu Referenzwerten von Open-Field-Tests aus der Literatur zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Werten [41]. So konnten Gentsch et al. bereits im Jahr 1981 in einer Studie an männlichen Ratten zeigen, dass Plasmacorticosteronspiegel von bis zu 129 ng/ml (+- 3.3) im Rahmen eines Open-Field-Tests auftreten können [41]. Die Ratten wurden dabei zwischen 13:00 und 17:00 Uhr einem zehnmütigen Open-Field-Test unterzogen, unmittelbar danach getötet und der Corticosteronspiegel im Blut gemessen [41]. Eine interessante Tatsache ist dabei, dass Gentsch et al. acht genetisch oder im Aufzuchtverhalten

unterschiedliche Rattenstämme nutzten [41]. So kamen neben Ratten mit hohem und niedrigem Vermeidungsverhalten leicht und schwer erregbare Ratten sowie Ratten mit Hypertension und Normotension zum Einsatz [41]. Die Ergebnisse zeigen jeweils unterschiedliche Corticosteronspiegel für die verschiedenen Stämme an; sowohl basal als auch nach dem Open-Field-Test [41]. Die Varianz in den gemessenen Corticosteronspiegeln zwischen den verschiedenen Stämmen macht den Einfluss des Tierstammes deutlich. So zeigen bestimmte Stämme einen stärkeren Anstieg von Corticosteron auf einen Stressstimulus als andere [41]. Dies lässt sich auf das hier vorliegende Modell übertragen, bei dem DBA/2J-Mäuse genutzt wurden, die sich durch eine starke angeborene Ängstlichkeit auszeichnen. Es wäre daher denkbar, dass diese Mäuse aufgrund der Tatsache, dass sie ein besonders ängstliches Verhalten aufweisen, mit einem starken Corticosteronanstieg unter Stress reagieren. Dabei ist es entscheidend, auch wenn Unterschiede in den gemessenen Corticosteronspiegeln beobachtet werden (siehe oben 84,84 ng/ml, 129 ng/ml), dass all diese Stressantwort-Ergebnisse einer normalen Neugierde-Reaktion der Tiere auf einen Verhaltenstest entsprechen und nicht einer massiven Stressbelastung. So können unter massiver Stressbelastung beispielweise im Rahmen eines Forced Swim Test Plasmacorticosteronwerte von über 450 ng/ml beobachtet werden. Bei einem Restraint-Test steigen die Plasmacorticosteronwerte sogar auf bis zu 500 ng/ml [33].

Im Rahmen dieser Studie konnte somit gezeigt werden, dass sich bei der operativen Anlage einer intraventrikulären Kanüle und der folgenden Liquorextraktion die Stressantwort zwischen der Behandlung mit HNK und Saline nicht signifikant unterscheidet. Des Weiteren wurde hierbei deutlich, dass die hervorgerufene Stressreaktion nicht oder nur geringfügig höher ist als bei einem Open-Field-Test. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob diese Ergebnisse valide sind. Weiterhin sind in diesem Zusammenhang verschiedene Aspekte zu diskutieren: Zum einen muss das Mausmodell an sich zur Erforschung depressiver Erkrankungen hinterfragt werden. Zum anderen stellt sich die Frage, ob Corticosteron ein geeigneter Biomarker in der Maus ist, um die Stressantwort valide zu messen. Insbesondere in Bezug auf in Experimenten häufig unterschiedlich genutzten Mausstämmen, zirkadianen Schwankungen

sowie geschlechtsspezifischen Beeinflussungen und damit möglichen Unterschieden in den Ergebnissen. Ebenso ist zu diskutieren, welchen Einfluss die Behandlung mit HNK hat und welche Rolle dieser neue Metabolit bei der Behandlung depressiver Erkrankungen spielen kann.

4.1 Mausmodelle auf dem Prüfstand: geeignetes Modell für die Erforschung depressiver Erkrankungen

Die Tatsache, dass es sich bei der Depression um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, deren Pathomechanismus noch nicht gänzlich verstanden ist, erschwert nicht nur die Entwicklung sowie die Erforschung entsprechender Medikamente, sondern auch die folgende Behandlung. Darüber hinaus ist die Depression mit vielen Komorbiditäten vergesellschaftet und weist eine starke Heterogenität in ihrem Krankheitsbild auf, was die Forschung vor weitere Herausforderungen stellt [36]. Obwohl in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte in der Depressionsforschung erzielt werden konnten, ist der genaue Pathomechanismus der Depression weiterhin nicht gänzlich verstanden. Zudem blieben echte grundlegende Innovationen bei der Entwicklung neuer Medikamente aus. So ist es bis dato nicht gelungen, ein adäquates Medikament für die Behandlung der Depression zu entwickeln. Umso wichtiger ist es, ein geeignetes Modell zu entwickeln, das der Erforschung des zugrunde liegenden Pathomechanismus, der Identifizierung von Zielstrukturen für die Behandlung sowie der Wirksamkeitsprüfung einer solchen dient. Die Forschung am Menschen ist dabei begrenzt. Zum einen ist dies aus ethischen Gründen schwierig, sodass Studien am Gehirn nur post mortem erfolgen können. Zum anderen bieten bildgebende Verfahren am Lebenden nur eingeschränkte Möglichkeiten, um komplexe Funktionskreisläufe wie bei der Depression abzubilden. In diesem Zusammenhang bietet die Forschung an Tiermodellen entscheidende Vorteile: Im Tiermodell können standardisierte Kohorten erstellt werden, die dazu beitragen können, sowohl die Heterogenität der Symptome der Depression als auch die Heterogenität im Ansprechen auf Antidepressiva besser zu erforschen beziehungsweise diese zu minimieren [28]. Ein weiterer Vorteil im Rahmen der Forschung an Tiermodellen, im Gegensatz zum Menschen, besteht darin, dass ein direkter Zugang zum zentralen Nervensystem möglich ist, was

die Untersuchung unmittelbar am betreffenden Organ erlaubt [28]. Tiermodelle bieten jedoch auch diverse Herausforderungen: So muss zum einen ein depressives Verhalten im Tier erzeugt sowie klar zu erkennen sein [28]. Zum anderen muss das Versuchstier vergleichbare körperliche Eigenschaften wie der Mensch aufweisen. Im Weiteren muss sich die therapeutische Wirkung von Antidepressiva auf den Menschen übertragen lassen [28]. Dies ist besonders herausfordernd, da die Depression die menschliche Psyche in all ihrer Komplexität betrifft und diese Umstände in einem Tier nur unzureichend abbildbar sind. Dabei bedient sich die aktuelle Wissenschaft vorrangig an Versuchstieren wie dem Zebrafisch, Nagern und Primaten [36]. Es wird dabei versucht, ein depressives Verhalten im Tier zu erzeugen, indem man diese beispielsweise akutem oder auch chronischem Stress aussetzt [36]. So stehen bei Nagetieren eine Reihe von Verhaltensaufgaben zur Verfügung, um die Mechanismen zu untersuchen, die den stressbedingten, motivationalen, affektiven, kognitiven und sozialen Defiziten im Zusammenhang mit Depression zugrunde liegen [36]. Des Weiteren gibt es zur Erforschung der Depression Mausstämme wie den hier eingesetzten DBA/2J-Mausstamm, der sich durch eine starke angeborene Ängstlichkeit auszeichnet und daher kein zusätzliches Stressmodell benötigt.

Aufgrund der Tatsache, dass die Genetik bei der Entstehung der Depression ungefähr zu 40 % eine Rolle spielt, lag in den letzten Jahren ein Hauptfokus auf der Erforschung der Genomik und der Suche nach ursächlichen Genen [36]. Nichtsdestotrotz ist es bis dato nicht gelungen, ein genetisch valides Modell einer Depression mit all seiner Komplexität im Tier zu erzeugen [36]. Um den Effekt der Heterogenität im Ansprechverhalten auf eine medikamentöse Behandlung zu minimieren und die zugrunde liegenden Pathomechanismen besser zu entschlüsseln, schlugen Herzog et al. 2018 einen tierexperimentellen Ansatz vor, bei dem eine Gruppe genetisch homogener Inzuchtmäuse eine antidepressive Behandlung erhielt und anschließend anhand ihres Ansprechverhaltens eine Stratifizierung in weitere Subpopulationen durchliefen [28]. Mithilfe dieser neuen Subpopulationen ist es möglich, noch homogenere Gruppen bezüglich bestimmter Eigenschaften wie beispielsweise dem Ansprechverhalten auf Antidepressiva zu erschaffen. Diese Methode stellt einen

interessanten Ansatz für die zukünftige tierexperimentelle Forschung dar. Zwar werden in diesem Ansatz vorerst nur die Tiere und ihre neurobiologischen Mechanismen erforscht, die bereits ein Ansprechen auf die Therapie gezeigt haben, jedoch ließen sich auch die Non-Responder und ihre zugrunde liegenden Mechanismen für ein Nichtansprechen erforschen. So könnte diese Methode womöglich Aufschluss oder neue Erkenntnisse über die starke Heterogenität der Erkrankung sowie Pathomechanismen bringen. In der Tat konnten Carrillo-Roa et al. im Rahmen einer Studie zeigen, dass es bestimmte genetische Zielstrukturen für das Ansprechverhalten gibt und dies in einem weiteren Schritt erfolgreich auf den Menschen übertragen [43].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es sich auch in Zukunft schwierig gestalten wird, in einem Tiermodell die Komplexität einer solchen Erkrankung, die Heterogenität und die affektiven Konstrukte wie beim Menschen widerzuspiegeln. Es gibt jedoch vielversprechende Ansätze wie die zuvor vorgestellte Stratifizierung in Subpopulationen, die dabei helfen können, spezifische Strukturen und Mechanismen zu entschlüsseln und die Erkenntnisse über die Erkrankung voranzutreiben.

4.2 Corticosteron: ein valider Biomarker im Tiermodell?

Um die Frage zu beantworten, ob Corticosteron ein valider Biomarker im Tiermodell ist, muss man sich mit seiner Rolle bei der Stressantwort, seinem Mitwirken sowie seiner Beeinflussung durch die zirkadiane Rhythmik und den geschlechtsspezifischen Unterschieden beschäftigen.

Es ist bekannt, dass die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse maßgeblich dem Einfluss durch Stress unterliegt [6]. So zeigt sich bei Menschen, die an Depressionen leiden, eine Dysregulation der HPA-Achse in Form von erhöhten CRF-Spiegeln, einem aus dem Hypothalamus freigesetzten Hormon, das seinerseits wiederum die ACTH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen stimuliert [6]. Es kommt zudem zu einer verminderten negativen Rückkopplung durch CRF und die aus der Nebennierenrinde ausgeschütteten Glucocorticoide selbst [6]. Durch Stress und die daraus resultierende Aktivierung der HPA-Achse kommt es letztendlich zur gesteigerten Freisetzung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde [29]. Die Wirkung

der Glucocorticoide erfolgt dabei auf zwei Ebenen. Zum einen entfalten Glucocorticoide eine schnelle und unmittelbare Wirkung auf zellulärer Ebene. Zum anderen beeinflussen sie die Genexpression und erzielen damit eine langsame, aber anhaltende Wirkung [30]. Es ist daher naheliegend, dass Glucocorticoide gerne als Biomarker für Stress verwendet werden. Das wichtigste Glucocorticoid in Nagetieren stellt dabei das Corticosteron dar [29]. Im Rahmen dieses Experiments wurde daher Corticosteron als Biomarker eingesetzt, um die Stressantwort der Maus zu messen. Schließlich konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Corticosteron ein valider Biomarker für die Stressreaktion im Nagetier ist. So wurde beispielsweise 2014 durch Shuai Gong et al. der Frage nachgegangen, ob Cortisol in Nagetieren ebenfalls vorhanden ist, ob es sich dabei um einen besseren Biomarker für Stress handelt und wie sich das Verhalten von Cortisol und Corticosteron unter bestimmten äußeren Einflüssen (Stress, Einfluss des Östrogenzyklus und der zirkadianen Rhythmik) verändert [29]. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich Cortisol auch in Nagetieren, hier im Besonderen in Mäusen, findet [29]. Shuai et al. konnten zudem aufzeigen, dass sich Cortisol und Corticosteron ähnlich in ihrer Reaktion auf zugeführten Stress verhalten [29]. Allerdings konnte auch ein Unterschied in der Dynamik von Cortisol und Corticosteron nachgewiesen werden: So unterliegt Cortisol stärker dem Einfluss von akutem Stress, während Corticosteron stärker durch chronischen Stress beeinflusst wird [29]. Die Rolle von Corticosteron als wesentlicher Biomarker im Nagetier bei chronischem Stress konnte in weiteren Studien bestätigt werden. Wu et al. führten ein Experiment durch, bei dem Mäuse chronischem Stress über 30 Tage ausgesetzt wurden. Diese reagierten darunter mit einer gesteigerten Aktivität der HPA-Achse und einer erhöhten Sekretion von Corticosteron [32]. Des Weiteren führten Ide et al. 2010 ein Experiment durch, bei dem sie den Einfluss von μ -Opioidrezeptoren an der Stressantwort bei MOP-KO-Mäusen untersuchten. Hierzu wurde eine Gruppe Knockout-Mäuse sowie eine Vergleichsgruppe Wildtyp-Mäuse verschiedenen Verhaltenstests (tail-suspension-test, forced-swim-test, restraint-test) unterzogen und die Stressantwort in Form von Corticosteron gemessen. Dabei konnte auch im Rahmen dieser Studie ein deutlicher Anstieg des Corticosterons sowohl bei den MOP-KO-Mäusen als auch bei den Wildtyp-Mäusen beobachtet werden [33].

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Corticosteron ein valider Biomarker für das Messen der Stressantwort sowohl bei akutem als auch bei chronischem Stress in der Maus ist.

Zu beachten ist jedoch, dass der Corticosteronspiegel in diesem Experiment nicht nur durch Stress, sondern auch maßgeblich durch die zirkadiane Rhythmik der Versuchstiere beeinflusst ist. Diese Rhythmik wird durch einen endogenen, das heißt einen körpereigenen Schrittmacher gesteuert, der einer Beeinflussung der Umwelt durch Licht oder auch Temperaturschwankungen unterliegt [34]. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse spielt bei der Regulierung der zirkadianen Rhythmik eine entscheidende Rolle [34]. Dabei entfalten Glucocorticoide ihre zirkadiane Wirkung über einen negativen Feedbackmechanismus, bei dem sie die Freisetzung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen inhibieren [34]. Der Corticosteronspiegel folgt dabei einem Aktivitätsmuster: Er erreicht seine Höchstwerte jeweils zum Aufwachvorgang, zum Beginn der Aktivität der Versuchstiere [29]. Dass Glucocorticoide dabei einer tageszeitlichen Schwankung unterliegen, liegt vor allem daran, dass sich die physiologischen Bedürfnisse der Versuchstiere zwischen Tag und Nacht verändern [34]. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass sich das Aktivitätsmuster bei Mäusen entgegengesetzt dem des Menschen verhält, da es sich um nachtaktive Tiere handelt. Der Spiegel ist somit bei Mäusen am Morgen am niedrigsten und steigt zum Abend hin an [34]. Die Tatsache, dass Glucocorticoide hier insbesondere Corticosteron einer tageszeitlichen Schwankung unterliegen und sich der basale Corticosteronwerte durch die zirkadiane Rhythmik stets ändert, ist daher entscheidend bei der Beurteilung der Ergebnisse. Zum einen ist es entscheidend, den Zeitpunkt der Messung bei der Beurteilung der Stressreaktion mit zu berücksichtigen, da sich die Corticosteronwerte wie zuvor beschrieben zu unterschiedlichen Uhrzeiten divergent verhalten. Zum anderen ist es wesentlich, beim Vergleich der Werte darauf zu achten, zu welchen Tageszeiten die Vergleichstests durchgeführt wurden, da ein valider Vergleich sonst nicht möglich ist. So wurde im Rahmen dieser Studie die CSF-Abnahme und die darauffolgende Blutentnahme morgens zwischen 10:00 Uhr und 12:40 Uhr durchgeführt, wo der Corticosteronspiegel aufgrund der Nachtaktivität am niedrigsten ist. Zudem wurde dem Effekt der

zirkadianen Rhythmik durch Verwendung einer Kontrollgruppe Rechnung getragen.

Ein weiterer wesentlicher Punkt ist die geschlechtsspezifische Beeinflussung des Corticosteronspiegels. Die Corticosteronkonzentration unterliegt dabei in weiblichen Tieren maßgeblich dem Sexualzyklus und schwankt je nach Phase des Sexualzyklus deutlich [35]. So konnte in Studien an Ratten gezeigt werden, dass es zu einer gesteigerten Freisetzung von Corticosteron aus den Nebennierenrinden unter dem hormonellen Einfluss von Östradiol kommt [29]. Auch die Genexpression von CRH unterliegt dem positiven Stimulus durch Östrogen [35]. Dabei konnte eine Korrelation zwischen den Östrogen- und Corticosteronspiegeln über den weiblichen Sexualzyklus hinweg mit einem Höhepunkt beider im Proöstrus nachgewiesen werden [35]. Helen Atkinson et al. zeigten, dass es während der Östrusphase im Sexualzyklus keinen Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Versuchstieren gibt. In der Phase des Proöstrus hingegen lässt sich ein deutlicher Unterschied beobachten [35]. Im Unterschied dazu konnten Shuai Gong et al. keinen signifikanten Unterschied in den Corticosteronspiegel über den weiblichen Sexualzyklus hinweg feststellen [29]. Einig sind sich jedoch beide darin, dass Östrogen die Freisetzung von Corticosteron stimuliert [29, 35]. Es sind daher weitere Untersuchungen nötig, um eindeutig zu klären, ob es zu statistisch signifikanten Corticosteronschwankungen im weiblichen Sexualzyklus kommt. Nichtsdestotrotz ist es entscheidend, die geschlechtsspezifischen Merkmale bei der Messung der Stressantwort zu berücksichtigen. Auch hier könnte ein falsch hoher Basalwert zu einem falschen Ergebnis führen. Um diesem Effekt vorzubeugen, wurden im Rahmen dieser Studie männliche adulte DBA/2J-Mäuse von Charles River aus Frankreich genutzt. Dies ist aus Standardisierungsgründen von entscheidendem Vorteil. Insgesamt stellt dies jedoch einen Nachteil sowie eine Schwäche in diesem Experiment dar, da somit keine Aussage für das weibliche Geschlecht möglich ist.

4.3 HNK und seine antidepressiven Eigenschaften

Die lange Wirklatenz klassischer Antidepressiva von bis zu vier Wochen, die damit verbunden hohen sozioökonomischen Kosten und die Korrelation zwischen verzögertem Wirkungseintritt und erhöhtem Risiko für Suizid machen die Erforschung neuer medikamentöser Therapieoptionen bedeutend [7, 19]. Hier kommt die Entwicklung neuer, schnell wirkender Antidepressiva zum Tragen. Diese könnten durch einen anderen, schnelleren Wirkmechanismus die aktuellen Probleme (Wirklatenz, Suizidrisiko) reduzieren und so zu einem erheblichen Fortschritt in der antidepressiven Behandlung beitragen. Eine besondere und vielversprechende Rolle spielen hierbei Ketamin und seine Stoffwechselmetaboliten.

Trotz der Tatsache, dass Ketamin, ein kompetitiver NMDA-Rezeptor Antagonist, bereits seit mehr als 50 Jahren als Anästhetikum Anwendung findet, wurde erstmalig 30 Jahre später, im Jahr 2000, über eine antidepressive Wirkung berichtet [7, 22, 40]. Diverse Studien konnten bei der intravenösen Applikation von Ketamin in subanästhetischen Dosen einen raschen Wirkungseintritt sowie über mehrere Tage anhaltende antidepressive Eigenschaften nachweisen [39, 40]. Limitiert wird die Anwendung von Ketamin als Antidepressivum jedoch durch sein Suchtpotenzial sowie seinem Nebenwirkungsprofil mit beispielsweise dissoziativen Effekten [8]. Die antidepressiven Effekte von Ketamin wurden dabei bis dato auf die Hemmung des NMDA-Rezeptors zurückgeführt [8]. Im Jahr 2016 konnten die Kollegen Zanos et al. erstmalig eine NMDA-Rezeptor unabhängige antidepressive Wirkung von Ketamin und seinen Metaboliten im Tier nachweisen [8]. Dabei konnten sie zeigen, dass der Stoffwechselmetabolit (2R,6R)-Hydroxynorketamin die gleichen antidepressiven Effekte wie Ketamin im Tiermodell hervorruft, jedoch ohne das Nebenwirkungsprofil von Ketamin zu erzeugen [8, 19]. Damit würde (2R,6R)-Hydroxynorketamin einen neuen vielversprechenden Ansatz in der medikamentösen Therapie der Depression darstellen. Im Jahr 2017 wurden im Rahmen einer weiteren Tierstudie die antidepressiven Eigenschaften von den beiden Enantiomeren (R)-Ketamin und (S)-Ketamin sowie dem bereits erwähnten (R)-Ketamin Stoffwechselmetabolit (2R,6R)-HNK verglichen [46]. Hierbei zeigten die beiden Ketamin-Enantiomere eine schnelle und langanhaltende Wirkung von bis zu sieben Tagen [46].

(2R,6R)-Hydroxynorketamin hingegen zeigte in dieser Studie, im Gegensatz zu der zuvor berichteten Wirkung durch Zanos et al., keine antidepressiven Effekte [46]. Chou et al. konnten im Jahr 2018 im Tierversuch an Ratten jedoch wiederum zeigen, dass die systemische Applikation von (2R,6R)-Hydroxynorketamin eine schnelle und lang anhaltende antidepressive Wirkung von bis zu 21 Tagen hat [45]. Die Inkonsistenz der aktuellen Studien legt nahe, dass es noch weiterer Studien bedarf, um den genauen Wirkmechanismus zu entschlüsseln und die Rolle von (2R,6R)-Hydroxynorketamin zu bestimmen. Interessanterweise konnten Zanos et al. im Jahr 2016 nicht nur eine NMDA-Rezeptor unabhängige Wirkung von (2R,6R)-Hydroxynorketamin zeigen, sondern eruierten darüber hinaus eine bedeutende Rolle des AMPA-Rezeptors in Bezug auf die antidepressive Wirkung [8]. Des Weiteren konnten Chou et al. im Rahmen einer Studie durch die Injektion eines AMPA-Rezeptor-Antagonisten (CNQX) in die Neuronen des ventrolateralen periaquäduktalen Graus im Mittelhirn zeigen, dass die antidepressive Wirkung von (2R,6R)-Hydroxynorketamin aufgehoben wird. Dies verdeutlicht, welche entscheidende Rolle der AMPA-Rezeptor bei der antidepressiven Wirkung spielt [45]. Dabei scheint es so, dass (2R,6R)-HNK zu einem schnellen Anstieg der glutamatergen Signalübertragung führt [8]. Zusätzlich scheint es zu einem langfristigen Anstieg der synaptischen AMPA-Rezeptoren zu kommen [8]. Zudem bewirkt (2R,6R)-HNK eine Steigerung der strukturellen Plastizität bei dopaminergen Neuronen [7]. So zeigt (2R,6R)-HNK eine anhaltende antidepressive Wirkung, auch wenn es bereits nicht mehr im Gehirn nachweisbar ist, was auf eine Aufrechterhaltung der synaptischen Potenzierung hindeutet [8]. Die Aufrechterhaltung der synaptischen Potenzierung wird dabei am ehesten über AMPA-Rezeptoren vermittelt [8]. Gestützt wird die Rolle des AMPA-Rezeptors bei der Pathogenese der Depression durch eine Studie von Hui Ma et al., die eine Verringerung der synaptischen AMPA-Rezeptordichte bei Mäusen nachweisen konnten, die chronischem unvorhersehbaren Stress ausgesetzt waren [44].

Diese Ergebnisse legen nahe, dass (2R,6R)-HNK ein potenzieller und vielversprechender Kandidat für eine antidepressive Therapie sein könnte. Es sind jedoch noch weitere Studien nötig, um die bisherigen Ergebnisse zu validieren und die genauen Mechanismen dahinter zu entschlüsseln.

Nichtsdestotrotz gibt es bereits schnell wirksame Antidepressiva in Form von (S)-Ketamin als Nasenspray, die zur Behandlung der Depression zugelassen sind und Anwendung finden [46].

4.4 Fazit und Vorstellung der gesamten Studienergebnisse

Abschließend lässt sich festhalten, dass mithilfe der vorliegenden Studie eine Methode der intraventrikulären Kanülierung zur seriellen Liquorabnahme in der Maus validiert werden konnten. Die hohe epidemiologische Relevanz der Studie ergibt sich aus der Tatsache, dass es bis dato keine evidenzbasierte Validierung der Methode bei der longitudinalen Messung gab. In diesem Modell wurde deutlich, dass sich die Stressantwort der Versuchstiere während der Liquorextraktion nicht wesentlich von einer üblichen Verhaltenstestung unterscheidet. Dies stellt einen entscheidenden Fortschritt für die zukünftige tierexperimentelle Liquorforschung an neurodegenerativen beziehungsweise neuropsychiatrischen Erkrankungen dar. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass im verwendeten Tiermodell die HPA-Achse maßgeblich der Beeinflussung durch Stress unterliegt und Corticosteron ein geeigneter Biomarker für die Messung der Stressantwort ist. Jedoch bedarf es bei der Messung der Berücksichtigung diverser Einflussfaktoren wie dem Geschlecht oder auch der zirkadianen Rhythmik. Ein entscheidender Nachteil dieses Experiments ist die Tatsache, dass nur ein spezifischer Mausstamm sowie ausschließlich männliche Mäuse eingesetzt wurde, um geschlechtsspezifische Merkmale zu minimieren. Somit kann weder eine Aussage über das weibliche Geschlecht noch über andere Mausstämme gegeben werden. Es sind daher noch weitere Studien notwendig, um diese Variablen zu berücksichtigen. Dennoch konnte belegt werden, dass es sich bei der Maus um ein geeignetes Tiermodell zu Erforschung der Depression handelt. Lediglich bei der Abbildung der Komplexität der Erkrankung gibt es noch Schwierigkeiten. Dahingehend finden sich jedoch neue Ansätze, wie die vorgestellte Stratifizierung in Subpopulationen, die dabei helfen können, die Erkrankung besser zu verstehen und spezifischer zu untersuchen. Des Weiteren konnte zum einen dokumentiert werden, dass (2R,6R)-HNK ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung der Depression ist, welcher eine NMDA-Rezeptor unabhängige antidepressive Wirkung zu haben scheint. Zum

anderen konnte eine entscheidende Rolle der AMPA-Rezeptoren in seinem Wirkmechanismus aufgezeigt werden.

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse der gesamten Studie zu erwähnen: In dieser wurde deutlich, dass der DBA/2J-Mausstamm ein geeigneter Stamm zur Untersuchung des Wirkmechanismus und der molekularen Wege von HNK ist. Zudem konnte erstmalig aufgezeigt werden, dass eine einzige HNK-Dosis sowohl akute als auch anhaltende antidepressive Wirkungen hervorruft, die denen von Ketamin gleichwertig sind. Hierbei stellte sich heraus, dass sich das Nebenwirkungsprofil von Ketamin in Form von Bewegungsaktivitätsminderung bei der Applikation von HNK nicht wiederfinden lässt. In einem weiteren Schritt wurde der zuvor abgenommene Liquor auf zeitliche Veränderung des Liquorproteoms nach intraperitonealer Applikation von HNK in antidepressiv wirkender Dosis mittels Massenspektrometrie untersucht, um die Proteomveränderungen zu ermitteln. Dabei konnten nicht nur die Veränderungen im Liquorproteom durch HNK, sondern auch eine entscheidende Beteiligung der Zytoskelettproteine manifestiert werden. Zudem deuten die Ergebnisse auf eine Beteiligung von mTOR und BDNF als Mitspieler bei der Wirkung von HNK hin. Darüber hinaus konnte erstmalig eine Beteiligung des GR-Signalwegs und somit eine Verbindung zwischen HNK und der HPA-Achse dokumentiert werden. Eine Einschränkung der Studie ergibt sich aus der Tatsache, dass gepoolte Liquorproben verwendet wurden, um die interindividuellen Unterschiede zu minimieren. Nichtsdestotrotz tragen diese Daten maßgeblich zum genaueren Verständnis der zeitlichen Dynamik und der molekularen Ziele von HNK bei.

5 Zusammenfassung

Obwohl es sich bei der Depression um eine der weltweit häufigsten Erkrankungen handelt, fehlt es an entsprechenden Biomarkern für die Diagnosestellung sowie den Therapieerfolg. Bahnbrechende Fortschritte in der Entwicklung neuer medikamentöser Therapien blieben bis dato ohne großen Erfolg. Die lange Latenz bis zum Ansprechen der klassischen Antidepressiva, die damit verbundenen sozioökonomischen Kosten und die erhöhte Gefahr für

Suizidalität verdeutlichen die Dringlichkeit der Entwicklung neuer medikamentöser Behandlungsansätze. Die Liquordiagnostik spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle, zum einen zur Suche nach entsprechenden Biomarkern, zum anderen zur Erforschung medikamentöser Behandlungsansätze. Daher ist ein valides Modell zur Liquordiagnostik von entscheidender Bedeutung. Diese Arbeit dient der Validierung einer Methode der intraventrikulären Kanülierung der Maus zur in vivo Liquorentnahme. Hierzu erfolgte eine Operation der Versuchstiere und die Implantation einer intraventrikulären Kanüle. Es erfolgte ein zweiwöchiges Handling und daraufhin die serielle Entnahme von Liquor. Zuvor wurden die Tiere randomisiert mit HNK oder Saline behandelt. Im Anschluss wurde das Stressniveau der Tiere über das Plasmacorticosteron gemessen. Zwischen der Behandlung mit HNK und Saline konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Stressantwort festgestellt werden. Das Stresslevel zeigte sich im Vergleich zu einem Open-Field-Test signifikant erhöht, verhielt sich jedoch im Rahmen einer normalen Neugierde-Reaktion und zeigte keine übermäßige Stressantwort. Versuchstiere stellen dabei einen wesentlichen Bestandteil der Forschung dar, da hier ein ungehinderter Zugang zum ZNS besteht. Zu berücksichtigen bleibt im Rahmen dieses Experiments jedoch, dass nur ein spezifischer Mausstamm untersucht wurde und ausschließlich männliche Versuchstiere gewählt wurden. Daher ist keine Aussage über das weibliche Geschlecht oder geschlechtsspezifische Eigenschaften möglich. Nicht zu vernachlässigen ist zudem die zirkadiane Rhythmik, die maßgeblich den Corticosteronspiegel beeinflusst. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Rahmen dieser Studie eine Methode der seriellen Liquorentnahme durch intraventrikuläre Kanülierung validiert werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich bei HNK um einen interessanten und vielversprechenden neuen medikamentösen Behandlungsansatz handelt, der bei Versuchstieren eine schnelle (innerhalb von Stunden) und langanhaltende (über Tage) Wirkung erzielte. Studien am Tier sind somit bereits erfolgsversprechend, humane Studien stehen jedoch noch aus. Nichtsdestotrotz zeigt sich mit HNK eine außerordentliche Möglichkeit der neuartigen Behandlung der Depression.

6 Literaturverzeichnis

1. Onaivi ES, Schanz N, Lin ZC. Psychiatric disturbances regulate the innate immune system in CSF of conscious mice. *Translational psychiatry*. 2014; 4, e367; doi: 10.1038/tp.2014.5
2. Vaishnav Krishnan & Eric J. Nestler. The molecular neurobiology of depression. *NATURE*, Vol. 455, 16 October 2008, doi: 10.1038/nature07455
3. Eric J. Nestler, Michel Barrot, Ralph J. DiLeone, Amelia J. Eisch, Stephen J. Gold, and Lisa M. Monteggia. Neurobiology of Depression. *Neuron*, Vol. 34, 13–25, March 28, 2002
4. M.A. Busch, U.E. Maske, L. Ryl, R. Schlack, U. Hapke. Prävalenz von depressiver Symptomatik und diagnostizierter Depression bei Erwachsenen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt* 2013, 56:733–739; doi: 10.1007/s00103-013-1688-3, Online publiziert: 27. Mai 2013
5. Trivedi, M. H. et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *The American Journal of Psychiatry* 163, 28–40 January 2006
6. Olivier Berton & Eric J. Nestler. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Neuroscience*, Vol. 7, February 2006
7. David P. Herzog, Gregers Wegener, Klaus Lieb, Marianne B. Müller and Giulia Treccani. Decoding the Mechanism of Action of Rapid-Acting Antidepressant Treatment Strategies: Does Gender Matter? *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20, 949; doi: 10.3390/ijms20040949
8. Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, Elmer GI, Alkondon M, Yuan P, Pribut HJ, Singh NS, Dossou KS, Fang Y, Huang XP, Mayo CL, Wainer IW, Albuquerque EX, Thompson SM, Thomas CJ, Zarate CA Jr, Gould TD. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*. 2016 May 26;533(7604):481-6. doi: 10.1038/nature17998. Epub 2016 May 4. PMID: 27144355; PMCID: PMC4922311.
9. Labermaier C, Masana M, Müller MB. Biomarkers predicting antidepressant treatment response: how can we advance the field? *Dis Markers*. 2013;35(1):23-31. doi: 10.1155/2013/984845. Epub 2013 Jul 21. PMID: 24167346; PMCID: PMC3774965.
10. Barden N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathophysiology of depression. *J Psychiatry Neurosci*. 2004 May;29(3):185-93. PMID: 15173895; PMCID: PMC400688.
11. Ditzen C, Tang N, Jastorff AM, Teplytska L, Yassouridis A, Maccarrone G, Uhr M, Bronisch T, Miller CA, Holsboer F, Turck CW. Cerebrospinal fluid biomarkers for major depression confirm relevance of associated pathophysiology. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Mar;37(4):1013-25. doi: 10.1038/npp.2011.285. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22169944; PMCID: PMC3280652.

12. Dranovsky A, Hen R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry*. 2006 Jun 15;59(12):1136-43. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.082. PMID: 16797263; PMCID: PMC7537828.
13. Leuchter AF, Cook IA, Hamilton SP, Narr KL, Toga A, Hunter AM, Faull K, Whitelegge J, Andrews AM, Loo J, Way B, Nelson SF, Horvath S, Lebowitz BD. Biomarkers to predict antidepressant response. *Curr Psychiatry Rep*. 2010 Dec;12(6):553-62. doi: 10.1007/s11920-010-0160-4. PMID: 20963521; PMCID: PMC2965366.
14. Paré D, Quirk GJ, Ledoux JE. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol*. 2004 Jul;92(1):1-9. doi: 10.1152/jn.00153.2004. PMID: 15212433.
15. Wagner JA. Overview of biomarkers and surrogate endpoints in drug development. *Dis Markers*. 2002;18(2):41-6. doi: 10.1155/2002/929274. PMID: 12364809; PMCID: PMC3851644.
16. Chen, B. et al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol. Psychiatry* 50, 260–265 (2001).
17. Wang H, Xu J, Lazarovici P, Quirion R, Zheng W. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Front Mol Neurosci*. 2018 Aug 30;11:255. doi: 10.3389/fnmol.2018.00255. PMID: 30214393; PMCID: PMC6125665.
18. Herzog DP, Perumal N, Manicam C, Treccani G, Nadig J, Rossmanith M, Engelmann J, Jene T, Hasch A, van der Kooij MA, Lieb K, Gassen NC, Grus FH, Müller MB. Longitudinal CSF proteome profiling in mice to uncover the acute and sustained mechanisms of action of rapid acting antidepressant (2R,6R)-hydroxynorketamine (HNK). *Neurobiol Stress*. 2021 Sep 29;15:100404. doi: 10.1016/j.ynstr.2021.100404. PMID: 34632008; PMCID: PMC8488754.
19. Zanos P, Gould TD. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry*. 2018 Apr;23(4):801-811. doi: 10.1038/mp.2017.255. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29532791; PMCID: PMC5999402.
20. Biomarkers Definitions Working Group.. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989. PMID: 11240971.
21. Ménard C, Hodes GE, Russo SJ. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience*. 2016 May 3;321:138-162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.053. Epub 2015 May 30. PMID: 26037806; PMCID: PMC4664582.
22. Gao M, Rejaei D, Liu H. Ketamine use in current clinical practice. *Acta Pharmacol Sin*. 2016 Jul;37(7):865-72. doi: 10.1038/aps.2016.5. Epub 2016 Mar 28. PMID: 27018176; PMCID: PMC4933765.
23. Carney RM, Freedland KE. Depression and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017 Mar;14(3):145-155. doi: 10.1038/nrcardio.2016.181. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27853162.

24. AWMF, S3-Leitlinie Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression, Version: 3.1, Stand: 29.09.2022, Gültig bis: 28.09.2027
25. Doherty CM, Forbes RB. Diagnostic Lumbar Puncture. *Ulster Med J.* 2014 May;83(2):93-102. PMID: 25075138; PMCID: PMC4113153.
26. Carney RM, Freedland KE. Depression and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2017 Mar;14(3):145-155. doi: 10.1038/nrcardio.2016.181. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27853162.
27. Liu L, Duff K. A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *J Vis Exp.* 2008 Nov 10;(21):960. doi: 10.3791/960. PMID: 19066529; PMCID: PMC2762909.
28. Herzog DP, Beckmann H, Lieb K, Ryu S, Müller MB. Understanding and Predicting Antidepressant Response: Using Animal Models to Move Toward Precision Psychiatry. *Front Psychiatry.* 2018 Oct 22;9:512. doi: 10.3389/fpsy.2018.00512. PMID: 30405454; PMCID: PMC6204461.
29. Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, Luo MJ, Tan JH. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One.* 2015 Feb 20;10(2):e0117503. doi: 10.1371/journal.pone.0117503. PMID: 25699675; PMCID: PMC4336318.
30. Kinlein SA, Phillips DJ, Keller CR, Karatsoreos IN. Role of corticosterone in altered neurobehavioral responses to acute stress in a model of compromised hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Psychoneuroendocrinology.* 2019 Apr;102:248-255. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.12.010. Epub 2018 Dec 11. PMID: 30594817; PMCID: PMC7649055.
31. Brachman RA, McGowan JC, Perusini JN, Lim SC, Pham TH, Faye C, Gardier AM, Mendez-David I, David DJ, Hen R, Denny CA. Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. *Biol Psychiatry.* 2016 May 1;79(9):776-786. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.04.022. Epub 2015 May 4. PMID: 26037911; PMCID: PMC4633406.
32. Wu LM, Hu MH, Tong XH, Han H, Shen N, Jin RT, Wang W, Zhou GX, He GP, Liu YS. Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential. *PLoS One.* 2012;7(12):e52331. doi: 10.1371/journal.pone.0052331. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23284991; PMCID: PMC3527516.
33. Ide S, Sora I, Ikeda K, Minami M, Uhl GR, Ishihara K. Reduced emotional and corticosterone responses to stress in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropharmacology.* 2010 Jan;58(1):241-7. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.07.005. Epub 2009 Jul 14. PMID: 19596019; PMCID: PMC4103702.
34. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol.* 2009 Jan;200(1):3-22. doi: 10.1677/JOE-08-0415. Epub 2008 Oct 29. PMID: 18971218.

35. Atkinson HC, Waddell BJ. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology*. 1997 Sep;138(9):3842-8. doi: 10.1210/endo.138.9.5395. PMID: 9275073.
36. Berton O, Hahn CG, Thase ME. Are we getting closer to valid translational models for major depression? *Science*. 2012 Oct 5;338(6103):75-9. doi: 10.1126/science.1222940. PMID: 23042886.
37. Demke E. The Vulnerability-Stress-Model-Holding Up the Construct of the Faulty Individual in the Light of Challenges to the Medical Model of Mental Distress. *Front Sociol*. 2022 May 23;7:833987. doi: 10.3389/fsoc.2022.833987. PMID: 35677188; PMCID: PMC9168073.
38. Colodro-Conde L, Couvy-Duchesne B, Zhu G, Coventry WL, Byrne EM, Gordon S, Wright MJ, Montgomery GW, Madden PAF; Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium; Ripke S, Eaves LJ, Heath AC, Wray NR, Medland SE, Martin NG. A direct test of the diathesis-stress model for depression. *Mol Psychiatry*. 2018 Jul;23(7):1590-1596. doi: 10.1038/mp.2017.130. Epub 2017 Jul 11. PMID: 28696435; PMCID: PMC5764823.
39. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Aug;63(8):856-64. doi: 10.1001/archpsyc.63.8.856. PMID: 16894061.
40. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000 Feb 15;47(4):351-4. doi: 10.1016/s0006-3223(99)00230-9. PMID: 10686270.
41. Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer H. Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. *Physiol Behav*. 1981 Jul;27(1):183-6. doi: 10.1016/0031-9384(81)90320-6. PMID: 7196593.
42. Bjerke M, Engelborghs S. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Early and Differential Alzheimer's Disease Diagnosis. *J Alzheimers Dis*. 2018;62(3):1199-1209. doi: 10.3233/JAD-170680. PMID: 29562530; PMCID: PMC5870045.
43. Carrillo-Roa T, Labermaier C, Weber P, Herzog DP, Lareau C, Santarelli S, Wagner KV, Rex-Haffner M, Harbich D, Scharf SH, Nemeroff CB, Dunlop BW, Craighead WE, Mayberg HS, Schmidt MV, Uhr M, Holsboer F, Sillaber I, Binder EB, Müller MB. Common genes associated with antidepressant response in mouse and man identify key role of glucocorticoid receptor sensitivity. *PLoS Biol*. 2017 Dec 28;15(12):e2002690. doi: 10.1371/journal.pbio.2002690. PMID: 29283992; PMCID: PMC5746203.
44. Ma H, Li C, Wang J, Zhang X, Li M, Zhang R, Huang Z, Zhang Y. Amygdala-hippocampal innervation modulates stress-induced depressive-like behaviors through AMPA

- receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Feb 9;118(6):e2019409118. doi: 10.1073/pnas.2019409118. PMID: 33526688; PMCID: PMC8017726.
45. Chou D, Peng HY, Lin TB, Lai CY, Hsieh MC, Wen YC, Lee AS, Wang HH, Yang PS, Chen GD, Ho YC. (2R,6R)-hydroxynorketamine rescues chronic stress-induced depression-like behavior through its actions in the midbrain periaqueductal gray. *Neuropharmacology*. 2018 Sep 1;139:1-12. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.06.033. Epub 2018 Jun 25. PMID: 29953886.
46. Yang C, Qu Y, Abe M, Nozawa D, Chaki S, Hashimoto K. (R)-Ketamine Shows Greater Potency and Longer Lasting Antidepressant Effects Than Its Metabolite (2R,6R)-Hydroxynorketamine. *Biol Psychiatry*. 2017 Sep 1;82(5):e43-e44. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.12.020. Epub 2016 Dec 23. PMID: 28104224.

7 Abbildungsverzeichnis

1. Abbildung 3.1: Darstellung der vier Schädelquadranten sowie des Bregmas bei Sicht auf die Schädelkalotte
2. Abbildung 3.2: Implantation der intraventrikulären Kanüle mittels Sonde
3. Abbildung 3.3: Darstellung der intracerebralen Lage der Blindkanüle
4. Abbildung 3.4: Postoperativer Zustand in der Stolting-Apparatur
5. Abbildung 3.5: Darstellung der Lage der intraventrikulären Kanüle zur Liquorabnahme
6. Abbildung 4.1: Messung des Corticosteronspiegels im Blut der Mäuse mittels ELISA zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten
7. Abbildung 4.2: Messung der Corticosteronspiegel im Blut der Mäuse mittels ELISA 15 Minuten nach Ende des CSF-Abnehmens bzw. nach Ende des Open- Field- Test

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Material

9 Anhang

9.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meiner Frau für Ihre Inspiration, stetige Unterstützung und Ermutigung während der Arbeit an dieser Dissertation.

Ebenfalls möchte ich meinen besonderen Dank PhD Dr. med. David Herzog für seine außerordentliche Betreuung aussprechen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. Marianne Müller für die Möglichkeit dieser Dissertation bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern für Ihre Zusprüche und Unterstützung bedanken.

9.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jens Nadig
Geburtsdatum	04.12.1989
Geburtsort	Bergisch Gladbach
Staatsangehörigkeit	Deutschland

Schulbildung

Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife	2009,
	Nicolaus-Cusanus-Gymnasium	in
	Bergisch Gladbach	

Zivildienst

Krankentransport und Hausnotruf	Johanniter Unfall Hilfe Bergisch Gladbach (2009 - 2010)
---------------------------------	--

Ausbildung

Rettungssanitäter	Medakademie Köln 2010
Rettungsassistentenausbildung	Medakademie Köln 2010 - 2011
Rettungsassistent im Praktikum	Malteser Hilfsdienst Köln 2011 - 2012

Studium

Humanmedizin	Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz 2014 – 2022
--------------	--

Beruf

Rettungsassistent	2012 – 2014
Assistenzarzt	UKGM Marburg Pädiatrie seit 01.07.2022

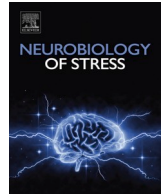
Publikationen

Herzog DP, Perumal N, Manicam C, Treccani G, Nadig J, Rossmanith M, Engelmann J, Jene T, Hasch A, van der

Kooij MA, Lieb K, Gassen NC, Grus FH, Müller MB. Longitudinal CSF proteome profiling in mice to uncover the acute and sustained mechanisms of action of rapid acting antidepressant (2R,6R)-hydroxynorketamine (HNK). *Neurobiol Stress*. 2021 Sep 29;15:100404. doi: 10.1016/j.ynstr.2021.100404. PMID: 34632008; PMCID: PMC8488754.

Ebsdorfergrund, den 27.Juni 2024

9.3 Paper



Longitudinal CSF proteome profiling in mice to uncover the acute and sustained mechanisms of action of rapid acting antidepressant (2R,6R)-hydroxynorketamine (HNK)

David P. Herzog^{a,*},¹, Natarajan Perumal^{b,1}, Caroline Manicam^b, Giulia Treccani^{a,c,d}, Jens Nadig^a, Milena Rossmann^b, Jan Engelmann^a, Tanja Jene^a, Annika Hasch^a, Michael A. van der Kooij^{a,e}, Klaus Lieb^{a,e}, Nils C. Gassen^f, Franz H. Grus^b, Marianne B. Müller^{a,e,**}

^a Department of Psychiatry and Psychotherapy and Focus Program Translational Neurosciences, Johannes Gutenberg University Medical Center Mainz, Mainz, Germany

^b Experimental and Translational Ophthalmology, Department of Ophthalmology, Johannes Gutenberg University Medical Center, Mainz, Germany

^c Institute for Microscopic Anatomy and Neurobiology, Johannes Gutenberg University Medical Center, Mainz, Germany

^d Translational Neuropsychiatry Unit, Department of Clinical Medicine, Aarhus University, Risskov, Denmark

^e Leibniz Institute for Resilience Research, Mainz, Germany

^f Neurohomeostasis Research Group, Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Bonn, Bonn, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Antidepressant
CSF
Ketamine
(2R,6R)-Hydroxynorketamine
Proteomics
Glucocorticoid receptor signaling

ABSTRACT

Delayed onset of antidepressant action is a shortcoming in depression treatment. Ketamine and its metabolite (2R,6R)-hydroxynorketamine (HNK) have emerged as promising rapid-acting antidepressants. However, their mechanism of action remains unknown. In this study, we first described the anxious and depression-prone inbred mouse strain, DBA/2J, as an animal model to assess the antidepressant-like effects of ketamine and HNK *in vivo*. To decode the molecular mechanisms mediating HNK's rapid antidepressant effects, a longitudinal cerebrospinal fluid (CSF) proteome profiling of its acute and sustained effects was conducted using an unbiased, hypothesis-free mass spectrometry-based proteomics approach. A total of 387 proteins were identified, with a major implication of significantly differentially expressed proteins in the glucocorticoid receptor (GR) signaling pathway, providing evidence for a link between HNK and regulation of the stress hormone system. Mechanistically, we identified HNK to repress GR-mediated transcription and reduce hormonal sensitivity of GR *in vitro*. In addition, mammalian target of rapamycin (mTOR) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were predicted to be important upstream regulators of HNK treatment. Our results contribute to precise understanding of the temporal dynamics and molecular targets underlying HNK's rapid antidepressant-like effects, which can be used as a benchmark for improved treatment strategies for depression in future.

1. Introduction

A well-recognized shortcoming of currently available pharmacological agents in the treatment of major depressive disorder (MDD) is that significant difference from placebo can only be reliably identified 4–6 weeks after treatment onset (Johnston et al., 2019). This therapeutic

delay of classical antidepressants is potentially dangerous since suicide risk is the highest in the early treatment period when the disease severity is at its greatest (Dong et al., 2019). The absence of rapid positive feedback also encourages non-compliance, thus increasing duration of the depressive episode and the overall costs for treating this disease (Sobocki et al., 2006). In addition, the lack of biomarkers for disease

* Corresponding author. Laboratory of Translational Psychiatry, Department of Psychiatry and Psychotherapy, Johannes Gutenberg University Medical Center Mainz, Hanns-Dieter-Hüsch-Weg 19, 55128, Mainz, Germany.

** Corresponding author. Laboratory of Translational Psychiatry, Department of Psychiatry and Psychotherapy, Johannes Gutenberg University Medical Center Mainz, Hanns-Dieter-Hüsch-Weg 19, 55128, Mainz, Germany.

E-mail addresses: daherzog@uni-mainz.de (D.P. Herzog), marianne.mueller@uni-mainz.de (M.B. Müller).

¹ Shared first authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100404>

Received 16 July 2021; Received in revised form 16 September 2021; Accepted 26 September 2021

Available online 29 September 2021

2352-2895/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

monitoring or drug choice in the clinical setting is a major drawback in depression treatment (Labermaier et al., 2013).

In search for putative targets mediating a more rapid antidepressant response, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists, with ketamine as a prototypical agent, have gained increasing interest during the last years (Lener et al., 2017). Sub-anesthetic doses of the narcotic agent ketamine have been shown to produce both rapid (within hours) and sustained (up to 1 week) antidepressant effects in patients (Berman et al., 2000) and rodents (Browne and Lucki, 2013). In addition, there is convincing evidence from clinical trials that ketamine is also effective in patients with treatment-resistant depression (Schwartz et al., 2016). Besides its activity at the NMDA receptor, several putative molecular mechanisms through which the antidepressant-like effects of ketamine are mediated have been discovered, including the involvement of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling and acute modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release (Cavalleri et al., 2018).

Despite its proven antidepressant efficacy even in difficult-to-treat patients, a broad range of side effects, including strong sedation, dissociation, nausea, and the risk of addiction have prevented ketamine to be widely used so far (Short et al., 2018). Recent preclinical studies indicate that a ketamine metabolite, (2*R*,6*R*)-hydroxynorketamine (HNK), retains the rapid and sustained antidepressant-like effects in rodents, but lacks its dissociative-like properties and abuse potential (Chou et al., 2018; Pham et al., 2018; Zanos et al., 2016). Therefore, HNK is a potential prototypical candidate to be further tested and developed as a rapid-acting antidepressant agent. However, for HNK, which does not block NMDA receptors like ketamine (Lumsden et al., 2019), the molecular signaling mechanisms still remain largely unknown (Zanos et al., 2018). In addition, the antidepressant-like effects of HNK could not always be reproduced by research groups around the world. We summarized the evidence in a recent review (Herzog et al., 2019). To date, systematic studies aiming at the hypothesis-free identification of proteins and signaling pathways involved in HNK's rapid onset of action are yet to be reported.

Despite considerable efforts, biomarker candidates to support clinical diagnosis or treatment response that could finally support decision-making within MDD diagnosis and therapy guidelines are still lacking (NICE, 2018). Access to the organ of interest as source for biomaterial, i. e. the brain, is restricted, if not impossible. Data on peripheral blood-based biomarkers and molecular candidates have been relatively inconclusive so far, and peripheral changes are remarkably different from the molecular changes that are observed within the central nervous system (e.g. (Carrillo-Roa et al., 2017)). Cerebrospinal fluid (CSF) is an accessible biological fluid in both humans and rodents that is circulating in close vicinity to the brain. In the past decade, technological advancement and the increasing quality of unbiased "omics" approaches have facilitated the use of CSF for biomarker research and investigations into disease-related pathophysiological processes. However, in contrast to other mental diseases such as neurodegenerative disorders where CSF is traditionally an established source for biomarker research, only very few investigations have used CSF to monitor the changes in the context of antidepressant treatment.

In 2014, Onaivi et al. described an animal experimental approach using intraventricular cannulation to enable serial CSF withdrawal in conscious mice (Onaivi et al., 2014). The suitability of this approach was validated by revealing specific proteomic signatures in murine CSF samples following acute stress and acute cocaine administration (Onaivi et al., 2014). In the current study, we adopted this method to focus on temporal changes of the CSF proteome induced by systemic administration of an antidepressant-like dosage of HNK. As animal model system, we chose male DBA/2J mice. This inbred mouse strain is characterized by high innate anxiety, which turns them in an ideal translational model for depression with anxious distress, a diagnostic specifier of DSM-5. The mouse model can be successfully "treated" by commonly used antidepressants (Carrillo-Roa et al., 2017; Sillaber et al.,

2008; Sugimoto et al., 2011). Moreover, DBA/2J mice display a reduced inhibitory HPA axis feedback (Thoeringer et al., 2007) closely mimicking this impairment in patients suffering from MDD. Choosing an antidepressant-responsive strain enables experiments to be performed under baseline conditions i.e. without the need to apply additional and potentially confounding stressors to shift the behavioral phenotype of the animals to a depressive-like state to model disease-like conditions (Carrillo-Roa et al., 2017). Here, we performed serial CSF sample collection from conscious and freely moving mice in a longitudinal study design to identify the proteome changes closely associated with changes in brain states following administration of HNK over time. Changes in the CSF proteome and differential expression of proteins associated with the acute (4 h after injection) and sustained (1 week after injection) antidepressant-like effects of a single injection of HNK or saline were further investigated employing a hypothesis-free, unbiased mass spectrometry-based proteomics approach.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male, adult (8 weeks) DBA/2J mice were purchased from Charles River, France. After arrival at our animal facility, we single-housed all the mice (temperature = 22 ± 2 °C, relative humidity = 50 ± 5 %) and allowed them to habituate to the new environment for at least one week prior to any experiments. We applied a standard 12h dark/light cycle (8am – 8pm light, 8pm – 8am dark). Mice had *ad libitum* access to water and food. All experiments were conducted in accordance with European animal welfare laws and approved by the local animal welfare authority (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz, Germany).

2.2. Drug administration

Murine body weight (BW) was measured 24 h before drug administration. Mice received ketamine hydrochloride (Inresa Arzneimittel GmbH, Germany; 30 mg/kg BW, based on (Browne and Lucki, 2013)), (2*R*,6*R*)-hydroxynorketaminehydrochloride (Tocris, Germany; 10 mg/kg BW, based on (Zanos et al., 2016)), or saline control (0.9% NaCl, Braun, Germany) intraperitoneally.

2.3. Behavioral assessment

2.3.1. Forced swim test (FST)

Mice ($n = 30$) were handled for 2 min daily for three consecutive days. We then injected them once with either ketamine or HNK or saline. We performed the FST to assess depressive-like behavior 4 h and 1 week after injection. Mice were introduced into a 2-L glass beaker (diameter 13 cm, height 24 cm) filled with tap water (21 ± 1 °C) to a height of 15 cm. We videotaped the mice for 5 min and floating, swimming, and struggling behavior was scored by an experienced, observer blinded towards the treatment.

2.3.2. Open field test (OF)

In a new and independent experiment, mice ($n = 30$) were handled for 2 min daily for three consecutive days. We then injected them once with either ketamine or HNK or saline and immediately placed them into the OF arena ($45 \times 45 \times 41$ cm). We performed the OF to assess locomotor activity. Mice could move freely and without disturbance for 30 min, during which they were videotaped from above. Distanced moved was automatically scored with the tracking software Observer XT12 (Noldus, The Netherlands).

2.4. Blood plasma extraction

We withdrew blood *via* tail nicks into EDTA-coated tubes, as previously described (van der Kooij et al., 2018). We centrifuged all tubes for

10 min at 10 000 g at 4 °C and stored the plasma at –80 °C until further use.

2.5. Corticosterone (CORT) plasma concentration

We measured CORT plasma levels using the Corticosterone ELISA Kit (cat.no. ADI-900-0979; Enzo Life Sciences, USA) according to the manufacturer's protocol in duplicates.

2.6. Statistics of behavioral experiments and neuroendocrine measurements

Data was plotted and descriptive statistics were applied to check for normal distribution of the data (D'Agostino & Pearson omnibus normality test). We analyzed data with a 1- or 2-way ANOVA followed by Bonferroni correction. Alpha was set at 5%, with p values < 0.05 considered statistically significant. Data was analyzed using Prism 5 software (GraphPad, USA). Sample sizes are indicated in the figure legends. The values are displayed as mean ± SEM.

2.7. CSF cannula surgery

Ketamine and HNK were equally effective with respect to their antidepressant-like efficacy. Due to the improved side-effect profile of HNK and the gap of knowledge about the neurobiological mechanisms mediating its antidepressant-like activity, we exclusively focused on HNK with respect to the proteome profiling of the CSF.

CSF cannula implantation was conducted in a modified way based on the method by Onaivi and colleagues (Onaivi et al., 2014). In brief, mice were anesthetized with Isoflurane (Forene®, AbbVie Deutschland GmbH, Germany) and received the analgesic drug Metacam (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Germany) subcutaneously (0.5 mg/kg BW). The skin was opened and two small holes were drilled into the skull, followed by applying two screws. A third hole was drilled and the intraventricular cannula (internal cannula; Plastics One, USA) was implanted at bregma coordinates 0.0 AP/0.8 ML/–0.9 VD. Paladur dental cement (Kulzer, Germany) was used to secure the internal cannula to the screws and the skull. The skin lesion was closed and a dummy cannula (Plastics One, USA) closed the internal cannula. Subsequently, the mice received Metacam in the drinking water for one week. After recovery from surgery, mice received new water bottles without the analgesic drug.

2.8. CSF withdrawal and protocol of the main experiment

Mice (n = 60) were handled carefully for 2 min per day for 1 week. CSF was withdrawn from all mice and the first sample was discarded to exclude contamination with blood. After three days, mice were randomized into an HNK or saline arm (Data file S1). They received an intraperitoneal injection of either HNK or saline and CSF samples were taken 4 h and 1 week after injection.

CSF withdrawals were conducted as follows: Dummy cannula was removed and tubing (5–10 cm in length; Plastics One, USA) with external cannula (additional –1.0 VD (final depth –1.9 VD); Plastics One, USA) was connected to the internal of the cannula at one end and to a 10 µl Model 701 N Hamilton syringe (cat.no. 80365; Hamilton, USA) at the other end. By gently pulling the plunger in steps of 1 µl for each 1 min, CSF was withdrawn. After the plunger reached 10 µl, CSF was collected and directly put on dry ice and later stored at –80 °C until further analyses. CSF-containing tubes were visually inspected for any blood contamination and excluded if necessary.

2.9. Proteomics sample preparation

The average volume obtained from all CSF samples was generally very low (5.7 ± 1.7 µl). Hence, the samples were pooled equally to a

total of 40 µl per biological replicate for the proteomics analysis, as described in data file S1. The designated samples were then subjected to one-dimensional gel electrophoresis (1DE) employing precast NuPAGE 4–12% Bis-Tris 10-well mini protein gels (Invitrogen, Germany) with 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MOPS) running buffer under reducing conditions at a constant voltage of 150V in 4 °C. Pre-stained protein standard, SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, Germany), was used as a molecular mass marker and the gels were stained with Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen, Germany), as per manufacturer's instructions. The bands in each stained gel were sliced into 14 gel slices per lane with the aim to reduce the complexity and masking effect of the abundant proteins during the MS analysis (Fig. S2). Protein bands were excised (14 bands per replicate) Subsequently, all the excised protein bands were destained, reduced and alkylated prior to in-gel trypsin digestion employing sequence grade-modified trypsin (Promega, USA), as described in detail elsewhere (Manicam et al., 2018; Perumal et al., 2019, 2020). Peptides extracted from trypsin digestion were purified with ZipTip C18 pipette tips (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The resulting combined peptide eluate was concentrated to dryness in a centrifugal vacuum evaporator (SpeedVac) and dissolved in 10 µl of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) for liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) analysis.

2.10. Discovery proteomics strategy

Peptide fractionation was conducted in the LC system, which consisted of a Rheos Allegro pump (Thermo Scientific, USA) and an HTS PAL autosampler (CTC Analytics AG, Switzerland) equipped with a BioBasic C18, 30 × 0.5 mm precolumn (Thermo Scientific, USA) connected to a BioBasic C18, 150 × 0.5 mm analytical column (Thermo Scientific, USA). Solvent A consisted of LC-MS grade water with 0.1% (v/v) formic acid and solvent B was LC-MS grade acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid. The gradient was run for 60 min per sample as follows: 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.

The continuum MS data were obtained on an ESI-LTQ Orbitrap XL-MS system (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The general parameters of the instrument were set as follows: positive ion electrospray ionization mode, a spray voltage of 2.15 KV and a heated capillary temperature of 220 °C. Data was acquired in an automatic dependent mode whereby, there was automatic acquisition switching between Orbitrap-MS and LTQ MS/MS. The Orbitrap resolution was 30000 at m/z 400 with survey full scan MS spectra ranging from an m/z of 300–1600. Target automatic gain control (AGC) was set at 1.0×10^6 ion. Internal recalibration employed polydimethylcyclosiloxane (PCM) at m/z 445.120025 ions in real time and the lock mass option was enabled in MS mode (Olsen et al., 2005). Tandem data was obtained by selecting top five most intense precursor ions and subjected them for further fragmentation by collision-induced dissociation (CID). The normalized collision energy (NCE) was set to 35% with activation time of 30 ms with repeat count of three and dynamic exclusion duration of 600 s. The resulting fragmented ions were recorded in the LTQ. The acquired continuum MS spectra were analyzed by MaxQuant computational proteomics platform version 1.6.3.3 and its built-in Andromeda search engine for peptide and protein identification (Cox et al., 2011, 2014; Cox and Mann, 2008; Luber et al., 2010; Tyanova et al., 2016). The tandem MS spectra were searched against UniProt *Homo sapiens* (Date, Oct 17, 2018; 20 410 proteins listed) and *Mus musculus* (Date, Oct 17, 2018; 17 001 proteins listed) databases, using standard settings with peptide mass tolerance of ±30 ppm, fragment mass tolerance of ±0.5 Da, with ≥6 amino acid residues and only “unique plus razor peptides” that belong to a protein were chosen (Cox and Mann, 2008). Both the *Mus musculus* and *Homo sapiens* databases were utilized with the aim to maximize the protein identification due to limited availability of annotated mouse proteins in a specific database (Perumal et al., 2020). A

target-decoy-based false discovery rate (FDR) for peptide and protein identification was set to 0.01. Carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification, while protein N-terminal acetylation and oxidation of methionine were defined as variable modifications, enzyme: trypsin and maximum number of missed cleavages: 2. The generated MaxQuant output data table “proteingroups.txt” was filtered for reverse hits prior to statistical analysis and, subsequent functional annotation and pathway analyses. The summary of MaxQuant parameters employed in the current analyses is tabulated in data file S2.

2.11. Bioinformatics and functional annotation and pathways analyses

The output of the generated “proteingroups.txt” data from the MaxQuant analysis was utilized for subsequent statistical analysis with Perseus software (version 1.6.1.3). First, all raw intensities were \log_2 -transformed and the data were filtered with minimum of three valid values in at least one group and the missing values were imputed by replacing from normal distribution (width: 0.3; down shift: 1.8)), enabling statistical analysis (Tyanova et al., 2016). For statistical evaluation, a two-sided Student’s t-test was used for the group comparison with p-values < 0.05 to identify the significantly differentially abundant proteins. Unsupervised hierarchical clustering analysis of the differentially expressed proteins was conducted with \log_2 fold ratio of the protein intensities according to Euclidean distance (linkage = average; preprocess with k-means) and elucidated in a heat map. The overlaps of the statistically differentially expressed proteins between the databases utilized were manually curated based on the highest significance values. The list of the identified proteins was tabulated in Excel and their gene names were used for subsequent functional annotation and pathways analyses employing Ingenuity Pathway Analysis (v01-04, IPA; Ingenuity QIAGEN Redwood City, CA) (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>) (Kramer et al., 2014). IPA analyses unraveled the protein-protein interaction (PPI) networks, identified the significantly affected canonical pathways, top disease and functions, and predicted upstream regulators associated with the proteins identified to be differentially expressed. Top canonical pathways of the differentially expressed proteins were presented with p-value calculated using Benjamini-Hochberg (B-H) multiple testing correction ($-\log B-H > 1.3$) and a cut-off of ≥ 3 affected proteins per pathway. In PPI networks, proteins molecules are represented by their corresponding gene names and, only PPIs that were experimentally observed and had direct and indirect interactions were used.

2.12. In vitro GR activity and gene reporter assays

HT-22 mouse hippocampal neuronal cell line was used as an *in vitro* model to analyze the molecular effects of HNK on GR transcriptional activity and GR sensitivity to glucocorticoids. Experiments were conducted as described before (Schulke et al., 2010; Touma et al., 2011). Briefly, cells were cultivated, transfected with MMTV-Luc and Gaussia-Luc expression constructs using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) and treated with HNK in concentrations of 0.1 μM , 1.0 μM , 10.0 μM , and 30.0 μM ($n = 3$ per group). Two conditions using culture medium (DMEM, Gibco) supplemented with either standard fetal bovine serum as or with charcoal stripped serum as steroid-free condition were examined to observe HNK effects on the GR-driven transcriptional activity. For evaluating the GR response to hormonal activation, GR-agonist dexamethasone (0.1 nM, 0.3 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM) was added and cells were treated with either HNK (5 μM) or vehicle. Data were analyzed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni correction. Alpha was set at 5%, with $p < 0.05$ considered statistically significant. Data was analyzed using Prism 5 software (GraphPad, USA).

3. Results

3.1. Behavioral profiling of ketamine and HNK in DBA/2J mice

With this behavioral experiment, we wanted to first validate that DBA/2J inbred mice are a suitable strain and model organism to investigate the antidepressant-like effects of ketamine and HNK. DBA/2J mice displayed a depression-like phenotype under control conditions with high immobility scores in the FST (Fig. 1A and B at 4h and 1w, respectively; saline-treated animals). At both *acute* and *sustained* time points, ketamine and HNK induced significant antidepressant-like effects by reducing immobility time (Fig. 1A and B). We detected no statistically significant differences between the effects of HNK and ketamine at both time points (Fig. 1A and B).

Locomotor activity is known to be impaired by ketamine treatment and constitutes an important side-effect of ketamine (Short et al., 2018). Indeed, an acute, ketamine-induced reduction in general locomotor activity could be visualized by an altered tracking profile in the OF test during 30 min of post-injection recording (Fig. 1C). Furthermore, ketamine reduced the total distance travelled, compared to HNK and saline injection (Fig. 1D).

3.2. Acute and sustained effects of HNK on CSF proteome

CSF is in close vicinity to the brain, and there is a continuous exchange and molecular crosstalk between brain tissue and CSF. Because of the clear behavioral effects of HNK and the fact that so far, data about its mechanism of action remain fragmentary, we decided to exclusively focus on HNK and analyze the CSF samples obtained from conscious DBA/2J mice treated with HNK or saline. As part of the method validation, we investigated whether the CSF withdrawal procedure was stressful for the animal by measurement of plasma CORT concentrations in an independent experiment. The mean peak level of CORT from mice which underwent the CSF withdrawal procedure was 84.84 ng/ml (Fig. S1), not exceeding average plasma CORT concentrations reached following exposure to a novel environment, such as a commonly used OF test (Gentsch et al., 1981).

In the main experiment, CSF samples were pooled (Data file S1), processed, and subjected to first dimensional gel electrophoresis (1DE; Fig. S2). In total, 387 proteins were identified from both *Mus musculus* (309 proteins) and *Homo sapiens* (229 proteins) databases by label-free quantification at a false discovery rate (FDR) of 1% (Fig. 2A; full data in data files S3–S5). As many as 151 proteins were found to be overlapping in both databases, as shown in the Venn diagram (Fig. 2A). The use of both mouse and human UniProt databases maximized protein identification due to limited annotations in the mouse database (17 001 proteins) compared to the human database (20 410 proteins).

Among these murine CSF proteins, 25 and 65 proteins were found to be differentially expressed at 4 h (Fig. 2B) and 1 week (Fig. 2C) after HNK treatment compared to saline (for comprehensive list see data file S6 and Fig. S3). Nine proteins were upregulated following 4 h HNK administration namely cytoskeletal structural protein dynein light chain 2, cytoplasmic (Dylnl2), proteasome subunit beta type 2 (Psm2), apolipoprotein (ApoE), and spine growth modulator protein transforming protein RhoA (RhoA). Sixteen proteins were downregulated following 4 h HNK versus saline injection (Fig. 2C), mainly cytoskeletal keratins consisting of keratin type II cytoskeletal 1, 2 peridermal, 2 oral, 9, 10 (KRT1, KRT2, KRT76, KRT9, KRT10), myelin proteins composed of myelin basic protein (Mbp) and myelin proteolipid protein (Plp1), signaling protein 14-3-3 protein sigma (Sfn), and myelinotrophic and neurotrophic factor prosaposin (Psap). One week following HNK injection, we found 41 proteins to be upregulated (Fig. 2C). Examples of these proteins were Mbp, Plp1, glial fibrillary acidic protein (Gfap), amino acid transporters ADP/ATP translocase 2 (SLC25A5) and 1 (Slc25a4), cytoskeletal proteins actin-related protein 2/3 complex subunit 4 (Arpc4), vimentin (Vim), tubulin beta-5 chain (Tubb5), plasma

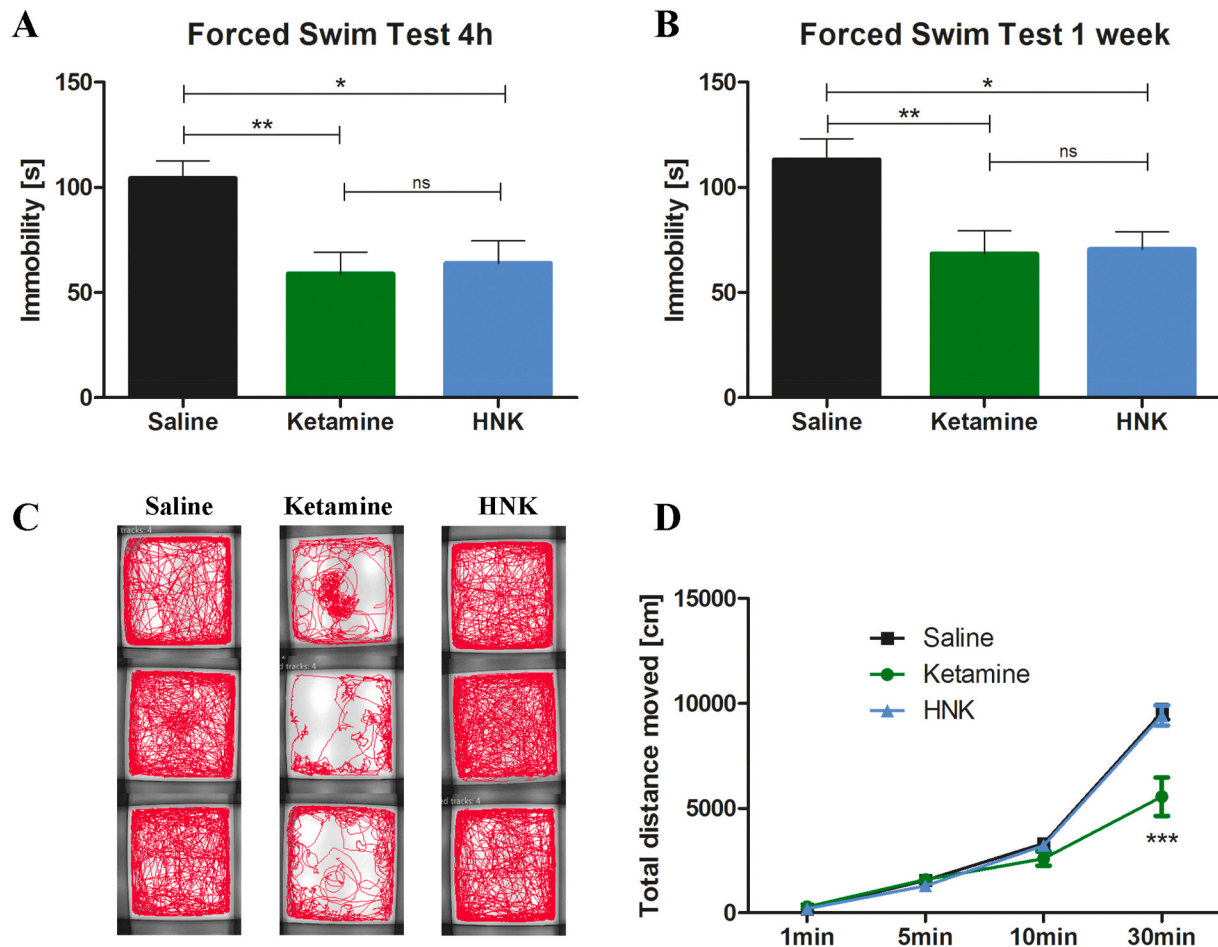


Fig. 1. Antidepressant-like effects and side-effects of ketamine and HNK. (A) 4 h after injection, ketamine [$t = 3.32$, $p < 0.01$] and HNK [$t = 2.96$, $p < 0.05$] reduced immobility time in the FST [$F = 7.44$, $p = 0.0019$, $n = 10$ per group]. (B) 1 week after injection, ketamine [$t = 3.24$, $p < 0.01$] and HNK [$t = 3.08$, $p < 0.05$] reduced immobility time in the FST [$F = 6.67$, $p = 0.0044$, $n = 10$ per group]. (C + D) Ketamine affected locomotor activity [$n = 10$ per group]. (C) Ketamine-treated mice show an altered tracking profile [3 examples per group]. (D) Ketamine decreased locomotor activity [Interaction: $F = 13.32$, $p < 0.001$; time: $F = 388.8$, $p < 0.001$; treatment: $F = 7.65$, $p < 0.01$] compared to HNK [$t = 7.79$, $p < 0.001$] and saline [$t = 8.10$, $p < 0.001$] [$n = 10$ per group]. ns not statistically significant, HNK (2R,6R)-hydroxynorketamine, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, bars are depicted as mean \pm SEM, one-way ANOVA with Bonferroni posttest in A + B, two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni posttest in D.

kallikrein (Klkb1), moesin (Msn), and transcription factor putative elongation factor 1-alpha-like 3 (EEF1A1P5). A total of 24 proteins were downregulated comprising mainly cytoskeletal keratins (KRT1, 9, 6A, 10), mitochondrial proteins electron transfer flavoprotein subunit alpha (ETFA), malate dehydrogenase (Mdh2), stress-70 protein (HSPA9), 4-aminobutyrate aminotransferase (Abat), aconitate hydratase (Aco2), pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta (PDHB), Na/K-transporting ATPase subunit alpha-1 (ATP1A1), cholinergic neuron ATP-binding protein in neurons phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (Pebp1), and chaperone heat shock protein a5 (HSPA5). Further clustering of these differentially expressed CSF proteins depicted as heat maps with unsupervised hierarchical clustering demonstrated the segregation of identified proteins into two major clusters according to the respective time points (Fig. 2D). Three distinct protein expression profiles were observed. First, the expression of a cluster of proteins remained the same at both 4h and 1w composed of down-regulation of KRT1, KRT9, and KRT10, and the up-regulation of Rbp4. The second cluster consisted of proteins that were upregulated following 1w of HNK administration comprising Mbp and PLP1. The third cluster was characterized by expression of proteins that were only regulated exclusively at either time point. Conducting a protein-protein interaction network (PPI) analysis, we could show the localization in particular cellular compartments and molecular types (Fig. S3). Interestingly, the protein

group observed to have the highest interaction partners consisted of keratins (Fig. S3).

In an attempt to further explore the functional relevance of the proteins identified to be differentially expressed, canonical pathway enrichment was determined employing the IPA tool using a cut-off of $p < 0.05$. The 21 proteins following 4 h HNK injection were significantly associated with the glucocorticoid receptor (GR) signaling ($p = 1.52E-03$; Fig. 3A). On the other hand, 9 top canonical pathways were found to be differentially regulated by the 57 differentially expressed proteins following 1 week HNK treatment (Fig. 3A). Among these, the acute phase response signaling ($p = 5.30E-11$; Fig. 3B) was the most significantly implicated pathway, followed by GR signaling ($p = 2.35E-03$; Fig. 3C), unfolded protein response ($p = 3.07E-04$; Fig. 3D), glycolysis I ($p = 1.21E-02$; Figs. 3E), and 14-3-3 mediated signaling ($p = 3.68E-03$; Fig. 3F). Noteworthy, the GR signaling-associated proteins at both time points comprised mainly a cluster of keratins and heat shock proteins. Among the keratins, KRT1, KRT9, and KRT 10 were consistently downregulated at both time points, whereas KRT76 and KRT2 were exclusively downregulated at 4 h and KRT6A at 1 week after HNK treatment (Fig. 3B; Data file S7).

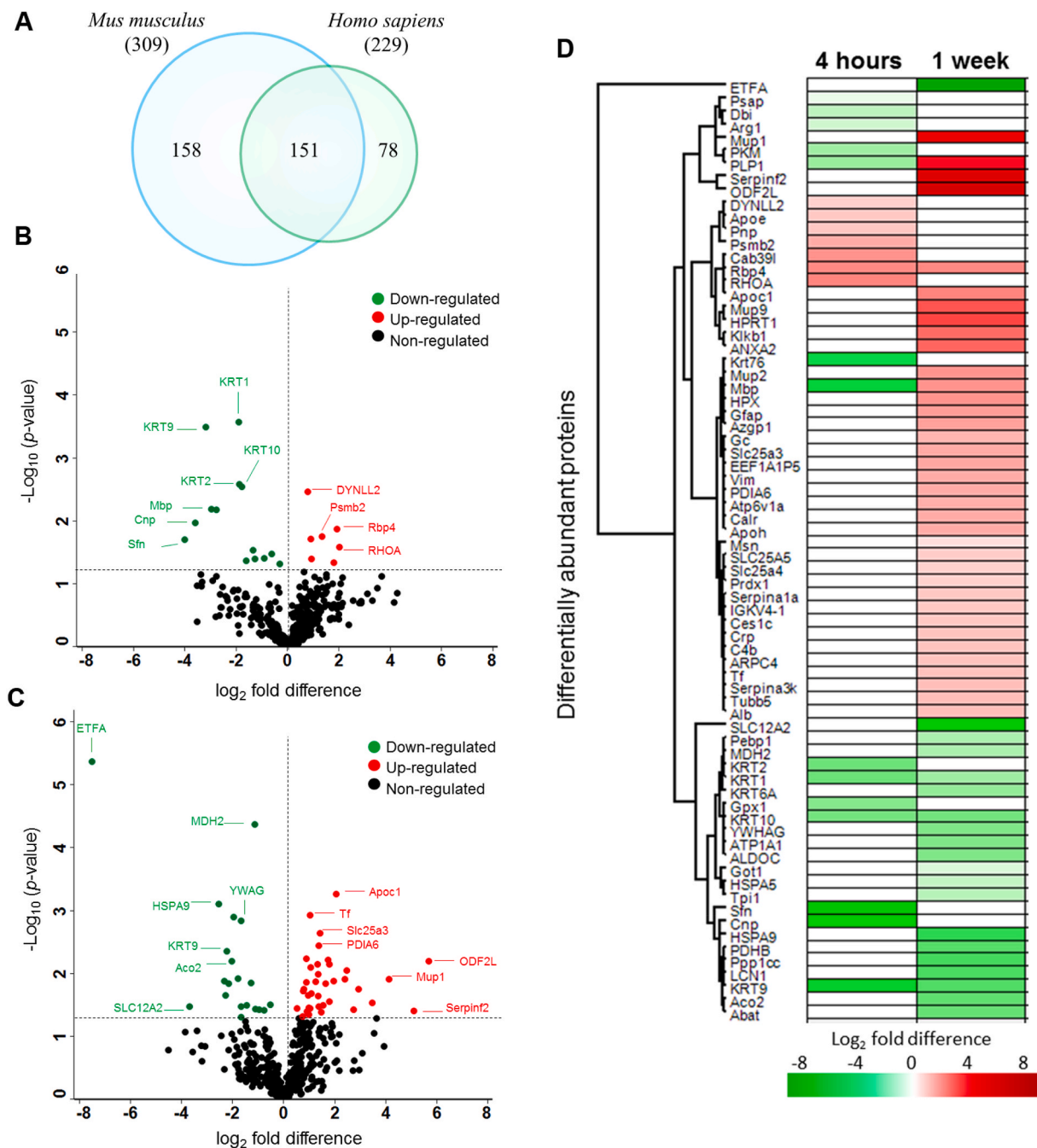


Fig. 2. Acute and sustained effects of HNK on CSF proteome. (A) Venn diagram depicts the total number of proteins identified in both mouse and human databases in the CSF samples. Volcano plot illustrates significantly differentially abundant CSF proteins after (B) 4 h and (C) 1 week HNK administration compared to saline. The negative log₁₀ (p-value) is plotted against the log₂ (fold change: HNK/saline). The non-axial horizontal line denotes $p = 0.05$, which is our significance threshold (prior to logarithmic transformation). Significantly upregulated proteins are plotted in red, while proteins that were downregulated by HNK are represented in green and non-regulated proteins are in black (D) The hierarchical clustering of the differentially expressed CSF proteins at 4 h and 1 week after HNK treatment displayed in a heat map. The upregulated proteins are shown in red and the downregulated proteins are in green, with log₂ fold difference of intensity displayed in color (green/red). $n = 60$ mice, after pooling $n = 3$ per group (for details of pooling see Data file S1). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

3.3. HNK represses GR-mediated transcription and reduces hormonal sensitivity of GR *in vitro*

We were interested how HNK affected GR translational activity and GR response to glucocorticoids in neuronal cells. We performed an *in vitro* gene reporter assay assessing GRE-driven transcriptional activity by transient transfection of MMTV-Luciferase construct into HT-22 mouse hippocampal neuronal cells and found that HNK represses GR-mediated

transcription in a glucocorticoid (DEX) dependent manner (Fig. S4). We detected no direct effect of HNK on GR-activity, when steroids were withdrawn from culture medium (Fig. S4). Moreover, we found a reduced hormonal sensitivity of GR when cells were co-treated with HNK compared to control condition (Fig. 3G).

A further analysis of the biological functions associated with the differentially expressed CSF proteins at both time points was conducted (Fig. 4A). At 4h after HNK treatment, organization of filaments ($p =$

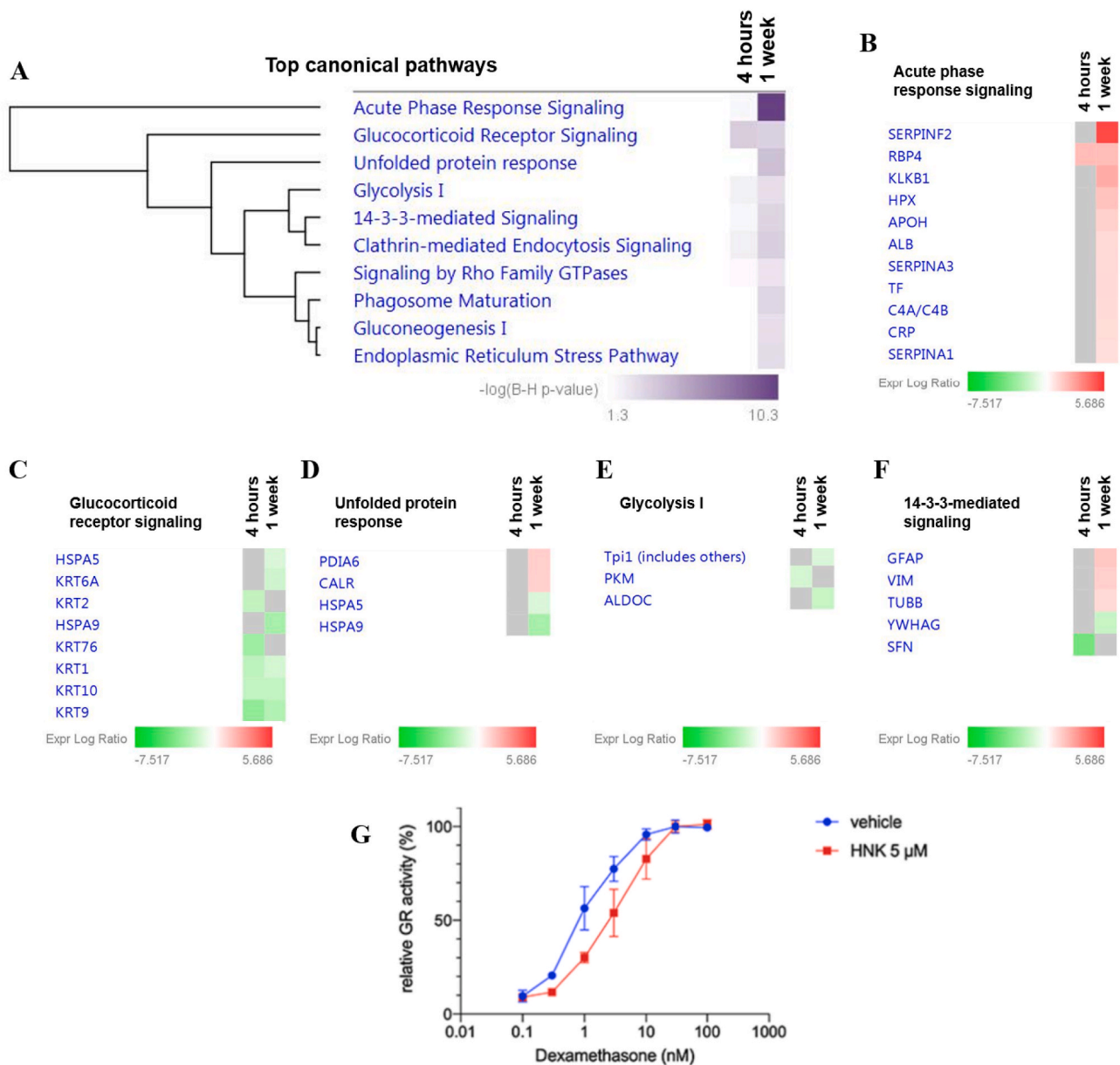


Fig. 3. Top enriched canonical pathways of the differentially expressed proteins significantly affected by HNK treatment. (A) The significantly enriched canonical pathways determined by IPA's default threshold [$-\log(B-H \text{ p-value}) > 1.3$] between the differentially expressed proteins identified in our datasets and the molecules in the respective pathways at 4h and 1w time-points following HNK treatment. Proteins associated with respective canonical pathways and their expression profiles at 4 h and 1 w are as follows; B) acute phase response signaling C) glucocorticoid receptor signaling, D) unfolded protein response, E) glycolysis I and F) 14-3-3-mediated signaling. The intensity of the color (green/red) indicates the degree of \log_2 fold ratio of each protein. G) Relative GR activity was reduced through HNK (5 μ M) treatment compared to vehicle control administration ($p < 0.05$ for 1.0 nM dexamethasone treatment). Relative receptor activity represents firefly luciferase activity (MMTV-promoter) normalized to Gaussia luciferase activity and is represented to the activity at saturating 30 nM dexamethasone. 2-way ANOVA followed by Bonferroni correction was applied. $n = 3$ per group. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

1.04E-02; Fig. 4B), myelination ($p = 2.43E-03$; Fig. 4C) and regeneration of neurons ($p = 4.32E-03$; Fig. 4D) were found to be significantly affected. The subacute effect of HNK administration after 1w demonstrated that the proteins found to be differentially expressed were significantly associated with top four networks involved in organization of filaments ($p = 6.36E-05$; Fig. 4B), gluconeogenesis ($p = 7.17E-04$; Fig. 4E), proliferation of neuroglia ($p = 2.01E-03$; Fig. 4F) and regeneration of neurons ($p = 1.75E-02$; Fig. 4D).

Finally, we analyzed the predicted upstream regulators to identify the molecules, including transcription factors, which were significantly involved in the downstream regulation of the differentially expressed proteins in both groups (Fig. 5A and Fig. 6A). The major regulators at the

4h time point were tumor necrosis factor (TNF) ($p = 1.6E-04$; Fig. 5B), mTOR ($p = 1.2E-05$; Fig. 5C) and insulin like growth factor 1 (IGF1) ($p = 7.7E-05$; Fig. 5D). Interestingly, the mechanistic network analysis of the aforementioned upstream regulators were predicted to be inhibited (IGF1, $z\text{-score} = -2.18$; TNF, $z\text{-score} = -0.743$; mTOR, $z\text{-score} = -0.475$) at the 4h time point, (Fig. 6A). Elucidation of the interaction networks of the mechanistic inhibition demonstrated that these upstream regulators were regulated based on the decreased expression of seven proteins, namely, SFN, CNP, PLP1 and Mbp (Fig. 6B). Meanwhile, the major regulators at the 1w time point were TNF ($p = 3.9E-03$; Fig. 5B), mTOR ($p = 1.2E-03$; Fig. 5C), IGF1 ($p = 1.7E-04$; Fig. 5D), BDNF ($p = 1.2E-04$; Fig. 5E) and interleukin 6 (IL6) ($p = 1.2E-05$;

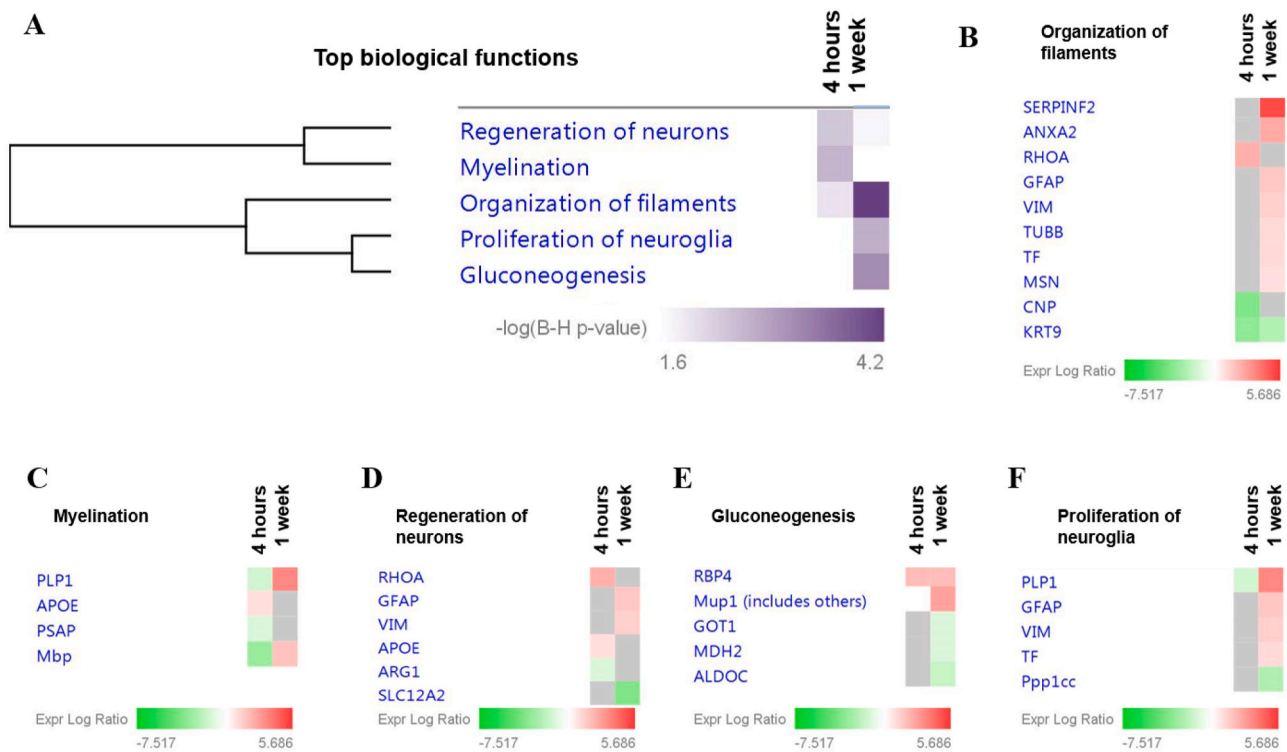


Fig. 4. Functional classification of the differentially expressed CSF proteins according to the enriched top diseases and biological functions. (A) Comparison analysis of the significantly affected diseases and biological functions between both time-points following HNK administration. The significance threshold $[-\log(B-H \text{ p-value}) > 1.6]$ was determined by IPA analysis. Proteins associated with respective biological functions and their expression profiles at 4 h and 1 w are as follows; (B) Organization of filaments, (C) proliferation of neuroglia, (D) gluconeogenesis, (E) myelination and (F) regeneration of neurons. The intensity of the color (green/red) indicates the degree of \log_2 fold ratio of each protein. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(Fig. 5F). Intriguingly, the mechanistic network analysis of the upstream regulators at 1w was predicted to be activated (TNF, z -score = 0.742; mTOR, z -score = 0.243; IGF1, z -score = 1.28; BDNF, z -score = 0.128; IL6, z -score = 1.337) (Fig. 6A). Elucidation of the interaction networks of the mechanistic activation demonstrated that these upstream regulators were regulator based on the increased expression of 11 regulated proteins, namely, CRP, SERPINA3, HPRT1 and GFAP, as shown in figure Fig. 6C.

4. Discussion

The present study provides first evidence that the DBA/2J mouse strain is a suitable animal model to assess the antidepressant-like effects of rapid-acting antidepressants such as ketamine and HNK. In a next step, we successfully used this model to decode the molecular mechanisms underlying HNK's rapid acting properties: we characterized the signature and longitudinal changes in the CSF proteome of conscious mice following systemic injection of HNK, which is the most promising metabolite of ketamine. Mechanistically, we identified GR signaling as a putative novel candidate mechanism through which both acute and sustained antidepressant-like effects of HNK might be mediated, thus revealing an intriguing functional link between HNK's antidepressant mechanism of action and targeted regulation of the stress hormone system.

4.1. Acute and sustained antidepressant-like properties of HNK: importance of experimental model system

In 2016, Zanos et al. first described the antidepressant-like properties of HNK (Zanos et al., 2016), which was then further investigated and developed as a putative rapid-acting antidepressant compound with a

more favorable side-effect profile than ketamine (Chou et al., 2018; Pham et al., 2018). However, while antidepressant-like effects of ketamine in rodents are relatively robust, the behavioral effects of HNK are more inconsistent and seem to depend on different parameters within the experimental conditions and the mouse strain used (Fitzgerald et al., 2019). Most of the recent studies on ketamine and HNK applied experimental depression models, such as stress or chronic inflammation (Herzog et al., 2019). For example, Chou et al. used a learned helplessness paradigm to induce a depressive-like phenotype in rats and demonstrated that HNK decreased depression-like behavior independent of gender (Chou et al., 2018). Another study using a lipopolysaccharide model of depression was not able to detect any antidepressant-like effects of HNK that were comparable to those of ketamine in male C57/BL6J mice (Yamaguchi et al., 2018). One plausible explanation for those inconsistencies of behavioral effects of HNK in rodents might be the use of different strains and experimental disease models and approaches to mimic clinically relevant conditions.

Adding to this, we could show for the first time, that a single dosage of HNK is equally effective as ketamine in inducing both acute and sustained antidepressant-like effects in DBA/2J mice. Saline-injected animals (i.e. vehicle controls) showed a depression-like behavioral phenotype, which could be attenuated by administration of ketamine and HNK. However, we acknowledge that reference data for the use of HNK and ketamine in the DBA/2J strain is still lacking. We analyzed only a single dose per agent based on published evidence (Browne and Lucki, 2013; Zanos et al., 2016), derived from studies with other mouse strains. The clear antidepressant-like effect of both compounds is probably due to the innate high anxiety-like behavior of this inbred mouse strain, which has proven its particular value in psychopharmacological research into antidepressant mechanisms of action (Carrillo-Roa et al., 2017). Therefore, it is surprising to see that for the

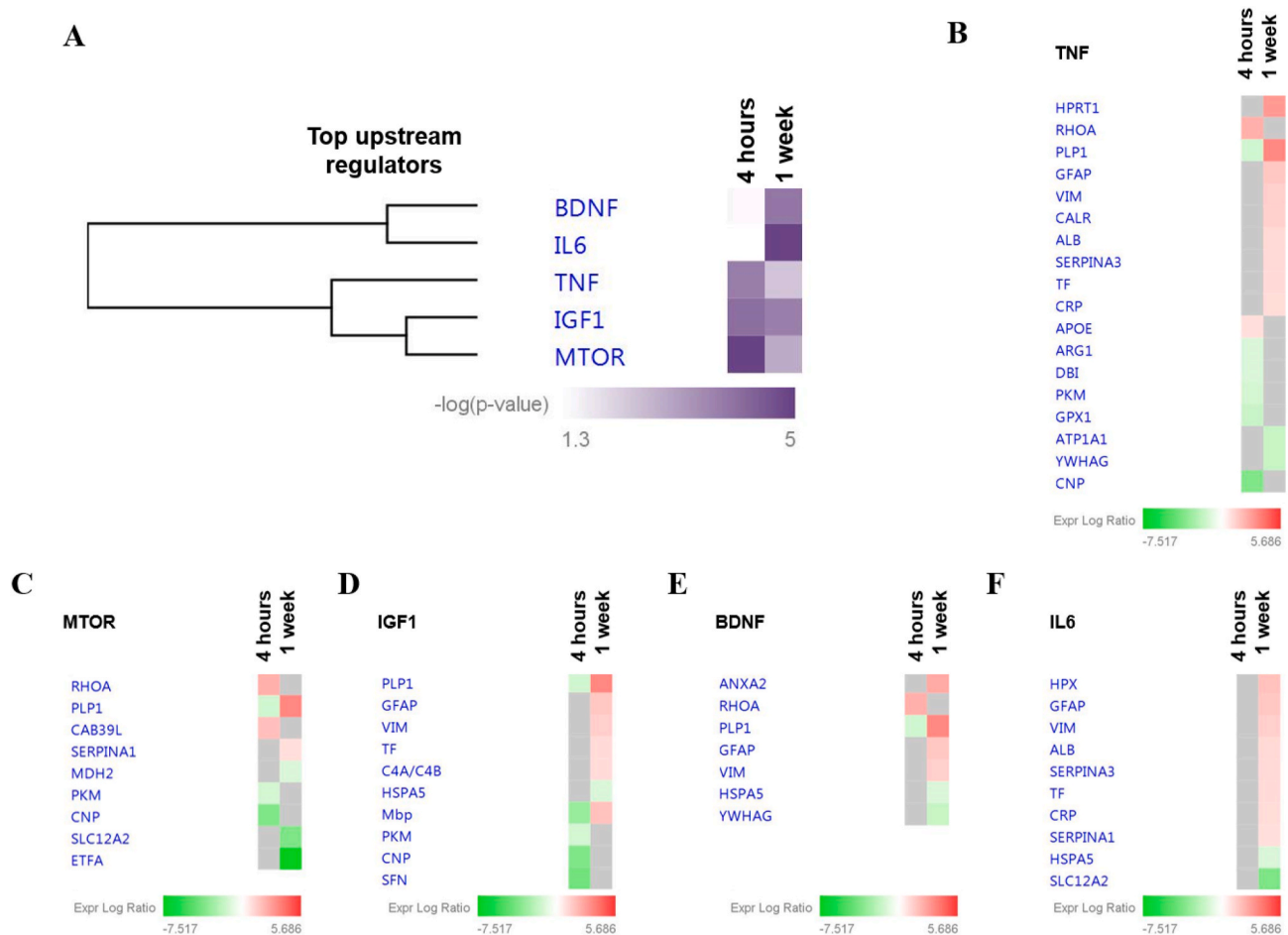


Fig. 5. Predicted top upstream regulators. (A) Hierarchical elucidation of the significantly affected potential upstream regulators observed to experimentally affect the differentially expressed CSF protein clusters at 4h and 1w. The significance threshold [$-\log(p\text{-value}) > 1.3$] was determined by IPA analysis. Proteins associated with the respective predicted upstream regulators and their expression profiles at 4 h and 1 w are as follows: (B) TNF, (C) mTOR, (D) IGF1, (E) BDNF and (F) IL6.

rapid-acting compound ketamine and its metabolite HNK, many studies published so far used the C57/BL6 strain, which, under baseline conditions, does not show a typical depression-like behavioral phenotype. Our data support that the DBA/2J strain is a suitable mouse model for studies into the neurobiology of rapid-acting antidepressant compounds. The majority of the published studies revealed antidepressant-like effects of ketamine 24 h after injection (Herzog et al., 2019). In addition, several studies have shown a sustained, lasting effect of ketamine up to two weeks (Brachman et al., 2016). This prompted us to analyze two different time points and we could indeed show that ketamine and HNK produced both acute (4 h) and sustained (1 week) antidepressant-like effect in male DBA/2J mice in the FST. Furthermore, ketamine administration significantly impaired locomotor activity, comparable to sedation and other related side-effects that can be prominently seen in patients (Short et al., 2018). HNK, in contrast, did not show an impact on locomotor activity in DBA/2J mice, supporting the fact that due to its favorable side-effects profile, HNK might be an ideal candidate to be further tested as rapid-acting antidepressant in clinical use. This prompted us to exclusively focus our in-depth proteomic analysis on HNK. However, an additional interpretation of the open field results might be that HNK at the dose used in this work might only acts as an antidepressant, whereas ketamine also might act as an anxiolytic agent reducing locomotor activity. Behavioral phenotypes observed in the open field test typically involve a mixture of emotional and anxiety-related components. In addition, we used a dose of 10 mg/kg BW for HNK and 30 mg/kg BW for ketamine. This might also be a reason

for the lack of impairment of locomotor activity of HNK.

4.2. Temporal CSF proteome profiles associated with antidepressant-like effects of HNK point to involvement of GR signaling as a putative mechanism of action

As CSF is an accessible biological fluid in both mice and humans that is circulating in close vicinity to the brain, this translational approach was intended to shed light on the molecular pathways underlying HNK's rapid and sustained antidepressant-like properties. Our results demonstrated that HNK induced time-dependent changes in the murine CSF proteome compared to vehicle-treated control mice.

Our data point, for the first time, to an important role of the GR signaling pathway in the rapid and sustained antidepressant-like properties of HNK. There is convincing evidence in the literature, both from human studies and experimental models, that depression is linked to a dysfunction of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis, finally resulting in increased levels of circulating glucocorticoids (Anacker et al., 2011). In particular, impaired GR signaling was discussed to be a key mechanism in the pathogenesis of depression (Holsboer, 2000), which is in line with the hypothesis that antidepressants reduce depressive symptoms by restoring HPA axis function (Anacker et al., 2011). For example, a recent study by Arango-Lievano et al. showed that the disruption of GR signaling in rats induced depression-like symptoms and that GR signaling was involved in modulating antidepressant-induced neuronal plasticity needed for reversal of

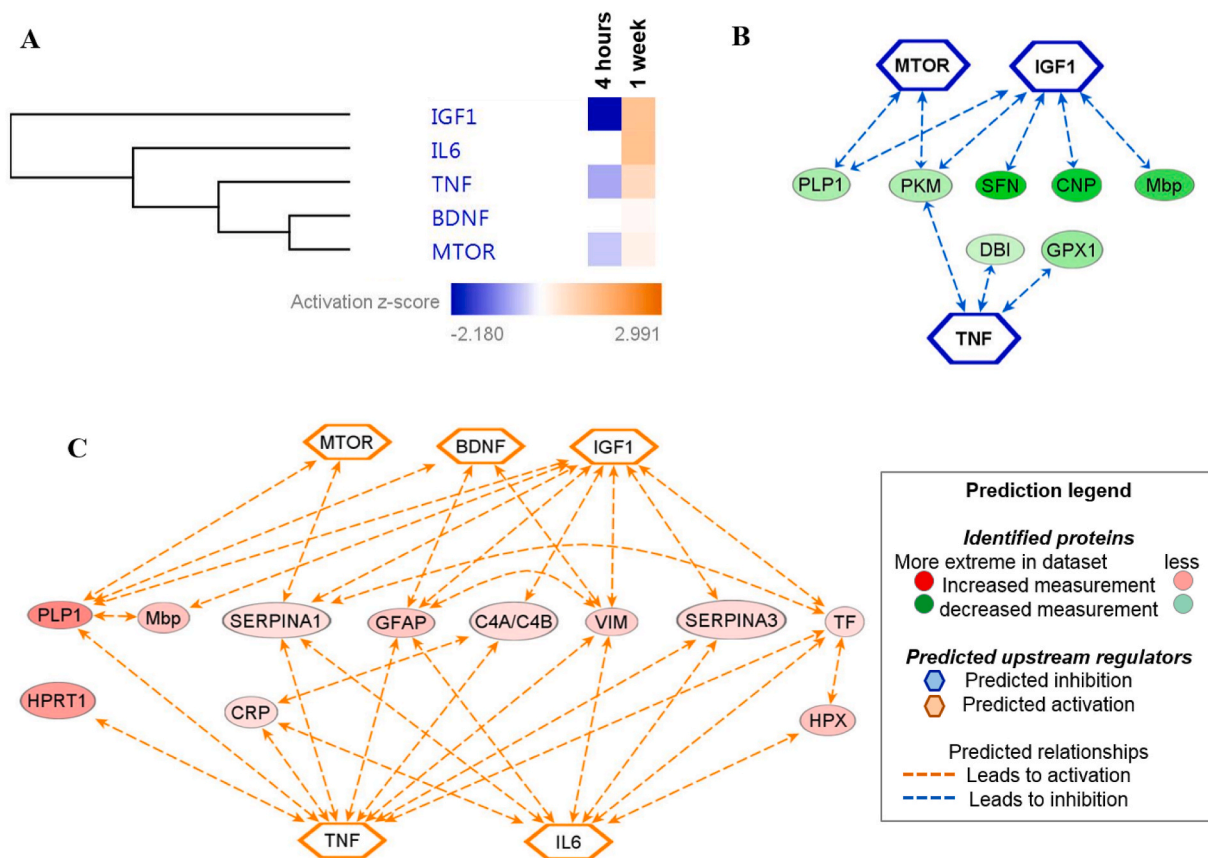


Fig. 6. Mechanistic network analysis of the predicted upstream regulators. (A) Hierarchical clustering of the significantly affected potential upstream regulators observed to experimentally affect the differentially expressed CSF protein clusters at 4h and 1w. The activation z-score of the regulators is depicted as orange (activated) and blue (inhibited), which was determined by IPA analysis. Elucidation of the interaction networks of the mechanistic activation/inhibition of the top significantly predicted upstream regulators and the associated regulated proteins at (B) 4h and (C) 1w.

depression-like symptoms (Arango-Lievano et al., 2015). While the close link between HPA axis activity and mechanism of action is well established for “classical” antidepressants such as tricyclic antidepressants or serotonin reuptake inhibitors, data on a putative involvement of the stress hormone system in mediating antidepressant-like effects of prototypical rapid acting compounds is sparse. For ketamine, it was described that in addition to its antidepressant-like properties, it was able to restore HPA axis function and to normalize peripheral CORT levels in a mouse chronic stress model (Wang et al., 2019). So far, data on a putative impact of HNK on modulating GR signaling was lacking. In addition to the proteomic profiling data pointing to an involvement of GR signaling, we here provide a first mechanistic insight into HNK’s effect on GR function: we could show, for the first time, that GR responsiveness *in vitro* was reduced following HNK treatment. Interestingly, a large majority of the proteins implicated in the GR signaling are composed of keratins and these structural proteins were found to be down-regulated following HNK treatment at both time points. Although keratins are traditionally associated with the skin (Toivola et al., 2015), their role in stress signaling has opened a new avenue in neurological disorders. This is supported by recent findings that provided compelling experimental evidence on the role of a specific keratin in CSF as a potential biomarker for Alzheimer’s disease (Richens et al., 2016). Furthermore, a study by Helenius et al. has lent support to the notion that the expression levels of different keratin subtypes are proportionate to stress in intestinal diseases (Helenius et al., 2016). Apart from keratins, heat shock proteins (HSPs) were also found to be similarly differentially expressed in stress conditions (Helenius et al., 2016). Correspondingly, our results have demonstrated that HSPA5 and HSPA9 were also downregulated in addition to the keratins at the 1w time point.

Therefore, based on these results, it is tempting to suggest that down-regulation of keratins and also HSPs in our mouse model reflect the HNK-mediated amelioration of stress and this effect lasted for as long as one week. Collectively, these results highlight the crucial effect of HNK in regulating the GR signaling in maintaining the homeostatic balance in the CSF proteome. Among the other differentially expressed candidate proteins, we found Dynll2 which plays a pivotal role in controlling cytoskeletal structures (Rapali et al., 2011) to be upregulated 4 h after HNK administration. The expression of several other cytoskeletal proteins like Arpc4, Vim, Tubb5, Klkb1, and Msn, which were associated with the organization of filaments, regeneration of neurons and proliferation of neuroglia, were also shown to be induced one week after HNK administration. These findings are in line with recent reports indicating the relevance of cytoskeletal dynamics in translating stressful environmental experiences into persistent changes of molecular and cellular function (Kretschmar et al., 2018; van der Kooij et al., 2016). The fact that we identified a considerable number of cytoskeletal proteins to be specifically regulated by HNK (i.e. putative targets of HNK) could point to their involvement in mediating rapid antidepressant-like effects, which is an intriguing hypothesis considering their crucial role in fine-tuning of synaptic plasticity and function (Cingolani and Goda, 2008). Moreover, we found proteins Mbp, Plp1, and Psap to be altered by HNK administration, with downregulation of Mbp and Plp1 at 4 h following HNK administration, and upregulation one week later. The latter are proteins playing important roles in myelination and myelin integrity (Campagnoni and Skoff, 2001). In fact, Weckmann and colleagues provided evidence that ketamine, the parent compound of HNK, increased Mbp protein levels in mice (Weckmann et al., 2019). Transcriptomics analysis of mouse choroid plexus have reported that the most

highly expressed genes in this tissue that secretes the CSF are involved mainly in energy metabolism (Sathyanesan et al., 2012). We have also identified several key proteins involved in glycolysis/gluconeogenesis, namely PKM, ALDOC, MDH2 to be associated with the treatment of HNK at 4h as well as at 1w.

In addition, the antidepressant-like effects of ketamine are known to take effect via enhancement of synaptogenesis: a single injection of ketamine triggered mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, which led to antidepressant-like effects by enhancing synaptogenesis in the medial prefrontal cortex of rodents (Casarotto et al., 2021; Li et al., 2010, 2011). The bidirectional amino acid transport with SLC transporter proteins is known to regulate mTOR activation (Nicklin et al., 2009). Indeed, we found that mTOR was one of the top predicted upstream regulators, which was activated one week after HNK administration. Correspondingly, transporter proteins Slc25a4 and SLC25A5 were also shown to be upregulated one week after HNK administration. Collectively, these results indicate that the activation of the mTOR pathway might play a pivotal mechanistic role in mediating HNK's rapid behavioral effects, comparable to what has been described for ketamine.

It is noteworthy that an extracellular protein, RhoA was associated with the TNF, mTOR and BDNF upstream regulators at 4h following HNK administration. A recent seminal observation by Fox and co-workers has shed light on the role of RhoA in depression by demonstrating that the activation of this protein in the nucleus accumbens contributes to depression-like behavior in the absence of stress (Fox et al., 2018). It is an intriguing finding as RhoA was also found to be up-regulated in the CSF in our study at the 4h time-point after HNK treatment. This phenomenon may be attributed to the secretion of RhoA by the neurons into CSF following HNK treatment, suggesting that HNK reduced the deleterious effects of depression-like phenotype on the neuronal cells by decreasing the expressions of RhoA. A cluster of proteins comprising of MBP, PLP1, GFAP and VIM related to myelin functions, regeneration of neurons and proliferation of neuroglia were also found to be significantly associated with the activation of BDNF, IGF1 and mTOR upstream regulators at 1w treatment of HNK. The protein-protein interaction networks of differentially expressed proteins at both time points (suppl Fig. S3) show the interaction between MBP and PLP1, and our results corroborated with previous finding that demonstrated the association between these proteins using different experimental approaches and both proteins were also shown to form a complex (Arvanitis et al., 2002). Recently, it has been elegantly demonstrated by Martinelli and colleagues that BDNF-modulated neuroplasticity is linked to that activation of GC (Martinelli et al., 2021). It is important to highlight here that BDNF levels are reduced in chronic stress and MDD patients (Martinelli et al., 2021); indicating that the significant regulation of the proteins associated with the activation of BDNF 1w after HNK treatment in our study further strengthens our findings that HNK prevents stress-induced decrease in BDNF levels.

The other top significant canonical pathway affected by HNK vs saline treatment was acute phase response signaling and upstream regulators of TNF and IL6, all of which are closely associated with conditions of enhanced inflammation. Interestingly, we exclusively found this pathway enrichment and the activation of these upstream regulators 1w after HNK administration, but not as early as 4h after injection. As both control animals and HNK-treated animals both underwent the same experimental conditions with surgery and cannula implantation, this induction of inflammatory processes is likely to be a specific effect of HNK. In line with this assumption, recent study by Ho and colleagues showed that both, ketamine and HNK, had a significant impact on inflammation by regulating the STAT3 and Type I Interferon pathway (Ho et al., 2019). Moreover, our mechanistic network analysis demonstrated that most of the proteins involved in mTOR, BDNF and IGF1 pathways are also associated with the TNF and IL6 pathway, namely PLP1, GFAP, VIM and SERPINA1 (Fig. 6C). Further studies on the direct and indirect effects of HNK on inflammatory processes and their contribution to the antidepressant-like effects are needed.

A limitation of this study is that pooled CSF samples were used for the MS-based proteomics analyses. We did not include validation experiments of protein candidates. Although it has been shown that mouse CSF samples can be analyzed individually (Smith et al., 2014), we deliberately chose the pooling paradigm to mitigate inter-individual variations. Moreover, since this is the first study to provide a comprehensive insight into the acute and sustained effects of HNK on murine CSF proteome, it was important to elucidate the overall proteome alterations associated with the use of HNK at the different time-points. Notwithstanding the sample pooling approach, based on the promising results emerging from the current study, the effects of HNK in individual mouse CSF proteome merit further investigation in our next study. Additionally, the alterations observed in the protein markers can be an important yardstick in future translational efforts using human CSF samples in a personalized manner.

In conclusion, our study substantially advances our knowledge about the molecular and cellular mechanisms through which HNK as a prototypical rapid acting antidepressant compound exerts its acute and sustained antidepressant-like effects. We could confirm the DBA/2J inbred mouse strain to be a suitable animal model for investigations into the neurobiological mechanisms underlying rapid-acting antidepressants. Our translationally relevant approach provides unprecedentedly detailed information on the temporal profile of CSF proteome changes in response to HNK. Finally, by a combination of the hypothesis-free mass spectrometry approach with candidate-driven *in vitro* experiments, we identified, for the first time, GR signaling to be a specific target of HNK. We are confident that those data can be a valuable resource for future studies investigating improved, rapid acting strategies to treat depression.

CRediT authorship contribution statement

David P. Herzog: Conceptualization, Methodology, Investigation, Analysis, Funding acquisition, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Natarajan Perumal:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Caroline Manicam:** Methodology, Investigation, Analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Giulia Treccani:** Investigation, Analysis, Writing – review & editing. **Jens Nadig:** Investigation, Analysis. **Milena Rossmann:** Investigation, Analysis. **Jan Engelmann:** Investigation, Analysis. **Tanja Jene:** Investigation, Analysis. **Annika Hasch:** Investigation, Analysis. **Michael A. van der Kooij:** Investigation, Analysis. **Klaus Lieb:** Writing – review & editing. **Nils C. Gassen:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Franz H. Grus:** Conceptualization, Methodology, Analysis. **Marianne B. Müller:** Conceptualization, Methodology, Analysis, Funding acquisition, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

Authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We are thankful for the technical support by Kathrin Kuna (Mainz, Germany). A portion of the work described herein was carried out by Jens Nadig and Milena Rossmann in partial fulfillment of the requirements for a medical doctoral degree at the Johannes Gutenberg University Medical Center Mainz, Germany.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100404>.

Funding

DH is supported by the Mainz Research School of Translational Biomedicine (TransMed) with a MD-PhD fellowship. NP is supported by the German Research Foundation (DFG), grant number PE 2531/4-1. CM is supported by the German Research Foundation (DFG), grant number MA 8006/1-1. TJ is supported by the Focus Program of Translational Neurosciences (FTN) in Mainz with a PhD fellowship. GT is supported by a 2014 NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation and the Danish Council for Independent Research, grant number DFF-5053-00103. MM and KL are supported by the German Research Foundation (DFG) within the Collaborative Research Center 1193 (CRC1193, <https://crc1193.de/>) and by the Boehringer Ingelheim Foundation.

Funding sources had no role in study design, data interpretation, and preparation of this paper.

References

- Anacker, C., Zunszain, P.A., et al., 2011. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology* 36 (3), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.03.007>.
- Arango-Lievano, M., Lambert, W.M., et al., 2015. Neurotrophic-priming of glucocorticoid receptor signaling is essential for neuronal plasticity to stress and antidepressant treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (51), 15737–15742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509045112>.
- Arvanitis, D.N., Yang, W., Boggs, J.M., 2002. Myelin proteolipid protein, basic protein, the small isoform of myelin-associated glycoprotein, and p42MAPK are associated in the Triton X-100 extract of central nervous system myelin. *J. Neurosci. Res.* 70 (1), 8–23. <https://doi.org/10.1002/jnr.10383>.
- Berman, R.M., Cappiello, A., et al., 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatr.* 47 (4), 351–354.
- Brachman, R.A., McGowan, J.C., et al., 2016. Ketamine as a prophylactic against stress-induced depressive-like behavior. *Biol. Psychiatr.* 79 (9), 776–786. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.04.022>.
- Browne, C.A., Lucki, I., 2013. Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. *Front. Pharmacol.* 4, 161. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00161>.
- Campagnoni, A.T., Skoff, R.P., 2001. The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes. *Brain Pathol.* 11 (1), 74–91.
- Carrillo-Roa, T., Labermaier, C., et al., 2017. Common genes associated with antidepressant response in mouse and man identify key role of glucocorticoid receptor sensitivity. *PLoS Biol.* 15 (12), e2002690 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002690>.
- Casarotto, P.C., Gyrych, M., et al., 2021. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell* 184 (5), 1299–1313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.034> e19.
- Cavalleri, L., Merlo Pich, E., et al., 2018. Ketamine enhances structural plasticity in mouse mesencephalic and human iPSC-derived dopaminergic neurons via AMPAR-driven BDNF and mTOR signaling. *Mol. Psychiatr.* 23 (4), 812–823. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.241>.
- Chou, D., Peng, H.Y., et al., 2018. 2R,6R)-hydroxynorketamine rescues chronic stress-induced depression-like behavior through its actions in the midbrain periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 139, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.06.033>.
- Cingolani, L.A., Goda, Y., 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (5), 344–356. <https://doi.org/10.1038/nrn2373>.
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26 (12), 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>.
- Cox, J., Neuhauser, N., et al., 2011. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* 10 (4), 1794–1805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>.
- Cox, J., Hein, M.Y., et al., 2014. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* 13 (9), 2513–2526. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>.
- Dong, M., Zeng, L.N., et al., 2019. Prevalence of suicide attempt in individuals with major depressive disorder: a meta-analysis of observational surveys. *Psychol. Med.* 49 (10), 1691–1704. <https://doi.org/10.1017/S0033291718002301>.
- Fitzgerald, P.J., Yen, J.Y., Watson, B.O., 2019. Stress-sensitive antidepressant-like effects of ketamine in the mouse forced swim test. *PLoS One* 14 (4), e0215554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215554>.
- Fox, M.E., Chandra, R., et al., 2018. Dendritic remodeling of D1 neurons by RhoA/Rho-kinase mediates depression-like behavior. *Mol. Psychiatr.* <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0211-5>.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Feer, H., 1981. Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. *Physiol. Behav.* 27 (1), 183–186.
- Helenius, T.O., Antman, C.A., et al., 2016. Keratins are altered in intestinal disease-related stress responses. *Cells* 5 (3). <https://doi.org/10.3390/cells5030035>.
- Herzog, D.P., Wegener, G., et al., 2019. Decoding the mechanism of action of rapid-acting antidepressant treatment strategies: does gender matter? *Int. J. Mol. Sci.* 20 (4) <https://doi.org/10.3390/ijms20040949>.
- Ho, M.F., Zhang, C., et al., 2019. Ketamine and active ketamine metabolites regulate STAT3 and the type I Interferon pathway in human microglia: molecular mechanisms linked to the antidepressant effects of ketamine. *Front. Pharmacol.* 10, 1302. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01302>.
- Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23 (5), 477–501. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00159-7).
- Johnston, K.M., Powell, L.C., et al., 2019. The burden of treatment-resistant depression: a systematic review of the economic and quality of life literature. *J. Affect. Disord.* 242, 195–210. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.06.045>.
- Kramer, A., Green, J., et al., 2014. Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis. *Bioinformatics* 30 (4), 523–530. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bt703>.
- Kretzschmar, A., Schulke, J.P., et al., 2018. The stress-inducible protein DRR1 exerts distinct effects on actin dynamics. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (12) <https://doi.org/10.3390/ijms19123993>.
- Labermaier, C., Masana, M., Muller, M.B., 2013. Biomarkers predicting antidepressant treatment response: how can we advance the field? *Dis. Markers* 35 (1), 23–31. <https://doi.org/10.1155/2013/984845>.
- Lener, M.S., Kadriu, B., Zarate Jr., C.A., 2017. Ketamine and beyond: investigations into the potential of glutamatergic agents to treat depression. *Drugs* 77 (4), 381–401. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0702-8>.
- Li, N., Lee, B., et al., 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329 (5994), 959–964. <https://doi.org/10.1126/science.1190287>.
- Li, N., Liu, R.J., et al., 2011. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol. Psychiatr.* 69 (8), 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.12.015>.
- Luber, C.A., Cox, J., et al., 2010. Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* 32 (2), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.01.013>.
- Lumsden, E.W., Troppoli, T.A., et al., 2019. Antidepressant-relevant concentrations of the ketamine metabolite (2R,6R)-hydroxynorketamine do not block NMDA receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (11), 5160–5169. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816071116>.
- Manicam, C., Perumal, N., et al., 2018. Proteomics unravels the regulatory mechanisms in human tears following acute renouncement of contact lens use: a comparison between hard and soft lenses. *Sci. Rep.* 8 (1), 11526 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30032-5>.
- Martinelli, S., Anderzhanova, E.A., et al., 2021. Stress-primed secretory autophagy promotes extracellular BDNF maturation by enhancing MMP9 secretion. *Nat. Commun.* 12 (1), 4643. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24810-5>.
- NICE, 2018. Depression in Adults: Recognition and Management - National Institute for Health and Care Excellence Guidelines [CG90]. National Institute for Health and Care Excellence. www.nice.org.uk/guidance/cg90. (Accessed 29 April 2021).
- Nicklin, P., Bergman, P., et al., 2009. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136 (3), 521–534. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044>.
- Olsen, J.V., de Godoy, L.M., et al., 2005. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol. Cell. Proteomics* 4 (12), 2010–2021. <https://doi.org/10.1074/mcp.T500030-MCP200>.
- Onaivi, E.S., Schanz, N., Lin, Z.C., 2014. Psychiatric disturbances regulate the innate immune system in CSF of conscious mice. *Transl. Psychiatry* 4, e367. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.5>.
- Perumal, N., Strassburger, L., et al., 2019. Sample preparation for mass-spectrometry-based proteomics analysis of ocular microvessels. *J. Vis. Exp.* 144. <https://doi.org/10.3791/59140>.
- Perumal, N., Strassburger, L., et al., 2020. Bioenergetic shift and actin cytoskeleton remodeling as acute vascular adaptive mechanisms to angiotensin II in murine retina and ophthalmic artery. *Redox Biol.* 101597. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101597>.
- Pham, T.H., Defaix, C., et al., 2018. Common neurotransmission recruited in (R,S)-Ketamine and (2R,6R)-hydroxynorketamine-induced sustained antidepressant-like effects. *Biol. Psychiatr.* 84 (1), e3–e6. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.020>.
- Rapali, P., Szenes, A., et al., 2011. DYNLL1/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J.* 278 (17), 2980–2996. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08254.x>.
- Richens, J.L., Spencer, H.L., et al., 2016. Rationalising the role of Keratin 9 as a biomarker for Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 6, 22962 <https://doi.org/10.1038/srep22962>.
- Sathyanesan, M., Girgenti, M.J., et al., 2012. A molecular characterization of the choroid plexus and stress-induced gene regulation. *Transl. Psychiatry* 2, e139. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.64>.
- Schulke, J.P., Wochnik, G.M., et al., 2010. Differential impact of tetratricopeptide repeat proteins on the steroid hormone receptors. *PLoS One* 5 (7), e11717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011717>.

- Schwartz, J., Murrough, J.W., Iosifescu, D.V., 2016. Ketamine for treatment-resistant depression: recent developments and clinical applications. *Evid. Base Ment. Health* 19 (2), 35–38. <https://doi.org/10.1136/eb-2016-102355>.
- Short, B., Fong, J., et al., 2018. Side-effects associated with ketamine use in depression: a systematic review. *Lancet Psychiatr.* 5 (1), 65–78. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(17\)30272-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(17)30272-9).
- Sillaber, I., Panhuysen, M., et al., 2008. Profiling of behavioral changes and hippocampal gene expression in mice chronically treated with the SSRI paroxetine. *Psychopharmacology (Berlin)* 200 (4), 557–572. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1232-6>.
- Smith, J.S., Angel, T.E., et al., 2014. Characterization of individual mouse cerebrospinal fluid proteomes. *Proteomics* 14 (9), 1102–1106. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300241>.
- Sobocki, P., Jonsson, B., et al., 2006. Cost of depression in Europe. *J. Ment. Health Pol. Econ.* 9 (2), 87–98.
- Sugimoto, Y., Yamamoto, M., et al., 2011. Differences between mice strains in response to paroxetine in the forced swimming test: involvement of serotonergic or noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* 672 (1–3), 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.002>.
- Thoeringer, C.K., Sillaber, I., et al., 2007. The temporal dynamics of intrahippocampal corticosterone in response to stress-related stimuli with different emotional and physical load: an in vivo microdialysis study in C57BL/6 and DBA/2 inbred mice. *Psychoneuroendocrinology* 32 (6), 746–757. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.05.005>.
- Toivola, D.M., Boor, P., et al., 2015. Keratins in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 32, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.008>.
- Touma, C., Gassen, N.C., et al., 2011. FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. *Biol. Psychiatr.* 70 (10), 928–936. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.023>.
- Tyanova, S., Temu, T., Cox, J., 2016. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* 11 (12), 2301–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>.
- van der Kooij, M.A., Masana, M., et al., 2016. The stressed cytoskeleton: how actin dynamics can shape stress-related consequences on synaptic plasticity and complex behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 62, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.12.001>.
- van der Kooij, M.A., Jene, T., et al., 2018. Chronic social stress-induced hyperglycemia in mice couples individual stress susceptibility to impaired spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (43), E10187–E10196. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804412115>.
- Wang, W., Liu, L., et al., 2019. Ketamine improved depressive-like behaviors via hippocampal glucocorticoid receptor in chronic stress induced-susceptible mice. *Behav. Brain Res.* 364, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.057>.
- Weckmann, K., Deery, M.J., et al., 2019. Ketamine's effects on the glutamatergic and GABAergic systems: a proteomics and metabolomics study in mice. *Mol. Neuropsychiatr.* 5 (1), 42–51. <https://doi.org/10.1159/000493425>.
- Yamaguchi, J.I., Toki, H., et al., 2018. 2R,6R-Hydroxynorketamine is not essential for the antidepressant actions of (R)-ketamine in mice. *Neuropsychopharmacology* 43 (9), 1900–1907. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0084-y>.
- Zanos, P., Moaddel, R., et al., 2016. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature* 533 (7604), 481–486. <https://doi.org/10.1038/nature17998>.
- Zanos, P., Thompson, S.M., et al., 2018. Convergent mechanisms underlying rapid antidepressant action. *CNS Drugs* 32 (3), 197–227. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0492-x>.