

**Bioinformatische Analyse eines proteomischen
Datensatzes im Verlauf der Epileptogenese**

von

Michael Thomas Keck

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Bioinformatische Analyse eines proteomischen
Datensatzes im Verlauf der Epileptogenese**

von Michael Thomas Keck
aus Isny im Allgäu

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Mitbetreuung durch: Dr. Eva-Lotta von Rüden, PhD

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg
Univ.-Prof. Dr. Rolf Mansfeld
Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter
Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Epilepsien	3
1.1.	Definition und Bedeutung	3
1.2.	Klassifizierung	4
1.3.	Epileptogenese.....	6
1.4.	Tiermodelle der Epileptogenese	7
1.4.1.	SE-BLA-Modell.....	8
1.5.	Biomarker der Epileptogenese.....	8
1.6.	Antiepileptogene Strategien.....	9
2.	Proteomik.....	9
2.1.	Definition	9
2.2.	Neuroproteomik.....	13
2.3.	Massenspektrometrie	14
3.	Netzwerkanalyse	16
3.1.	Einführung.....	16
3.2.	Ko-Expressionsnetzwerke	17
3.3.	Gewichtetes Ko-Expressionsnetzwerk.....	18
4.	Extrazelluläre Matrix und Zelltod.....	23
4.1.	Extrazelluläre Matrix	23
4.2.	Bedeutung der extrazellulären Matrix im Kontext der Epileptogenese	24
4.3.	Mechanismen des Zelltodes	26
4.4.	Zelltod im Kontext der Epileptogenese.....	27
III.	ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG	28
IV.	MATERIAL UND METHODEN.....	30
1.	Differentielle Proteomanalyse	30
1.1.	Versuchsdesign	30
1.2.	Durchführung der differentiellen Proteomanalyse	31
1.3.	<i>Pathway-Enrichment</i> -Analyse.....	32
1.4.	Paraffinfixierung und Aufbereitung der Proben	33
2.	Nicht-hypothesengestützte Datenanalyse	34
2.1.	Aufbereitung des Datensatzes.....	34
2.2.	<i>Principal-Component</i> -Analyse	35

2.3.	Gewichtete Netzwerkanalyse.....	35
2.3.1.	Netzwerkkonstruktion und Moduldetektion.....	36
2.3.2.	Identifizierung von Epileptogenese assoziierten Modulen.....	36
2.3.3.	Intramodulare Konnektivität und funktionelle Annotation.....	37
2.3.4.	Validierung der Ergebnisse.....	37
3.	Hypothesengestützte Datenanalyse.....	38
3.1.	Auswertung der <i>Pathway-Enrichment</i> -Analyse.....	38
3.2.	Immunhistochemie.....	39
3.2.1.	<i>Integrin subunit alpha 5</i>	39
3.2.2.	<i>Fermitin family number 2</i>	40
V.	ERGEBNISSE.....	42
1.	Resultate der differentiellen Proteomanalyse.....	42
2.	Resultate der nicht-hypothesengestützten Datenanalyse.....	42
2.1.	Ergebnisse der <i>Principal-Component</i> -Analyse.....	45
2.2.	Ergebnisse der gewichteten Netzwerkanalyse.....	49
2.2.1.	Netzwerkkonstruktion.....	49
2.2.2.	Modulidentifikation und Visualisierung.....	51
2.2.3.	Epileptogenese assoziierte Module.....	53
2.2.4.	Funktionelle Annotation.....	56
2.2.5.	Intramodulare <i>Hub</i> -Proteine.....	58
2.2.6.	Validierung.....	61
3.	Resultate der hypothesengestützten Datenanalyse.....	65
3.1.	Ergebnisse der <i>Pathway-Enrichment</i> -Analyse.....	65
3.1.1.	Extrazelluläre Matrix assoziierte <i>pathways</i>	65
3.1.2.	Zellstress und Zelltod assoziierte <i>pathways</i>	72
3.2.	Ergebnisse der Immunhistochemie.....	80
3.2.1.	<i>Integrin subunit alpha 5</i>	80
3.2.2.	<i>Fermitin family number 2</i>	82
VI.	DISKUSSION.....	84
1.	Nicht-hypothesengestützte Datenanalyse.....	85
2.	Hypothesengestützte Datenanalyse.....	92
VII.	ZUSAMMENFASSUNG.....	97
VIII.	SUMMARY.....	99
IX.	LITERATURVERZEICHNIS.....	101

X.	ANHANG	123
1.	Geräte und Software	123
2.	Lösungen und Substanzen.....	124
3.	Protokoll Immunhistochemie.....	126
4.	<i>R</i>-Skripte	127
4.1.	Nicht-hypothesengestützte Datenanalyse.....	127
4.1.1.	Konfiguration	127
4.1.2.	Datenanalyse und Netzwerkkonstruktion	128
4.1.3.	Anwendung auf den vorliegenden Datensatz.....	139
4.2.	Hypothesengestützte Datenanalyse	141
XI.	DANKSAGUNG	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2dpSE	two days post SE
10dpSE	ten days post SE
8wpSE	eight weeks post SE
3dpi	three days post injection
10dpi	ten days post injection
30dpi	30 days post injection
ACADL	Acyl-CoA dehydrogenase, long chain
ACTN1	Actinin alpha 1
ADAMTS	a-disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AGRN	Agrin
ANKHD1	Ankyrin repeat and KH domain containing 1
ANXA2	Annexin A2
ANXA3	Annexin A3
ANXA4	Annexin A4
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP5J2	ATP synthase H ⁺ transporting mitochondrial Fo complex, subunit F2
BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31
BSA	bovines Serumalbumin
BSN	Bassoon (presynaptic cytomatrix protein)
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CD151	CD151 molecule
CD44	CD44 molecule
CLU	Clusterin
CTTN	Cortactin

DAG1	Dystroglycan 1
EEG	Elektroenzephalogramm
ENTPD1	Ectonucleosid triphosphate diphosphohydrolase 1
ERZ	Ezrin
FASP	filter aided sample preparation
FERMT2	Fermitin family number 2
FERMT3	Fermitin family number 3
FLNA	Filamin A
GLIPR2	GLI pathogenesis-related 2
GMFB	Glia maturation factor, beta
GSTA1	Glutathione S-transferase alpha 1
H2AFY	H2A histone family, member Y
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HC	Hippocampus
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Comitee
HSPB1	Heat shock protein family B (small) member 1
HUGO	Human Genom Organisation
IBE	International Bureau for Epilepsy
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie
IPA	Ingenuity® Pathways Analysis
ITGA1	Integrin subunit alpha 1
ITGA5	Integrin subunit alpha 5
ITGA6	Integrin subunit alpha 6
ITGAM	Integrin subunit alpha M
ITGAV	Integrin subunit alpha V
ITGB1	Integrin subunit beta 1

ITGB2	Integrin subunit beta 2
ITGB8	Integrin subunit beta 8
IVETF	International Veterinary Epilepsy Task Force
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LMNA	Lamin A/C
LMNB1	Lamin B1
LMNB2	Lamin B2
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
log	Logarithmus
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation
ME	Moduleigengen
min	Minute
MMP-9	Matrixmetalloproteinase 9
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MPDU1	Mannose-P-dolichol utilization defect 1
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NEGR1	Neuronal growth regulator 1
NNT	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase
OPCML	Opiod binding protein/cell adhesion molecule-like
PAK2	P21 (Rac1) activated kinase 2
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
pH	potentia Hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration)
PHC	parahippocampaler Cortex

PLXNB2	Plexin B2
PNP	Purine nucleoside phosphorylase
PSMB3	Proteasome subunit beta 3
RGD	Rat Genome Database
SE	Status epilepticus
SE-BLA	Status-epilepticus-basolaterale-Amygdala
SEC23A	Sec23 homolog A, coat complex II component
SYNGAP1	Synaptic Ras GTPase activating protein 1
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	TBS mit 0,05 % Tween [®] 20
TGM2	Transglutaminase 2
TLN1	Talin 1
TNC	Tenascin C
TRIO	Trio Rho guanine nucleotide exchange factor
UK	United Kingdom
uPAR	Urokinase-type plasminogen activator receptor
USA	United States of America
VCL	Vinculin
VIM	Vimentin
WGCNA	Weighted Gene Co-expression Network Analysis
WHO	World Health Organization

I. EINLEITUNG

Epilepsien gehören bei Hund und Katze zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen (CHANDLER 2006; SMITH BAILEY u. DEWEY 2009). Weiterhin sind gemäß Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization, WHO*) aktuell weltweit circa 50 Millionen Menschen von Epilepsien betroffen, wobei von diesen circa 80 % in Ländern mit niedrigem und mittlerem Entwicklungsstand leben (WHO 2016). Jedoch treten Epilepsien schon seit Menschengedenken auf. Bereits im alten Babylon war diese Erkrankung bekannt und man vermutete damals als Ursache ein Werk der Götter und Dämonen, die vom Betroffenen Besitz ergriffen (WILSON u. REYNOLDS 1990). Auch sollen bekannte Personen der Weltgeschichte, wie zum Beispiel der römische Herrscher Caesar, von dieser Krankheit betroffen gewesen sein (MAGIORKINIS et al. 2010; BRUSCHI 2011). Erst durch Hippocrates und seine Abhandlung *On the Sacred Disease* wurde der göttliche Ursprung der Epilepsieerkrankung in Frage gestellt und eine Dysfunktion des Gehirns als mögliche Ursache erachtet (MAGIORKINIS et al. 2010). Dennoch hielten sich die Mythen um diese Krankheit und die damit einhergehende Stigmatisierung der Betroffenen hartnäckig. Erst durch den Fortschritt der medizinischen Forschung, insbesondere durch die Entwicklung der Ableitung der Gehirnströme (Elektroenzephalographie, EEG), konnte das Gehirn als Ausgangspunkt epileptischer Anfälle lokalisiert werden (MAGIORKINIS et al. 2010).

In heutiger Zeit gelten Epilepsien als eine Erkrankung des Gehirns, die sich im Auftreten von epileptischen Anfällen manifestiert (FISHER et al. 2014). Derartige Anfälle, die eine synchrone oder abnormal gesteigerte Entladung von Neuronen darstellen, haben ihren Ursprung in einem veränderten neuronalen Netzwerk (GOLDBERG u. COULTER 2013). Dieses entsteht häufig nach Auftreten von Gehirninsulten, wie zum Beispiel einem Schädel-Hirn-Trauma. Die Ursachen hierfür und die zugrunde liegenden molekularen und zellulären Veränderungen sind bislang jedoch noch nicht vollständig verstanden (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009). Demnach steht als medikamentöse Therapiemöglichkeit aktuell nur eine symptomatische Behandlung zur Verfügung, wenn bereits spontane epileptische Anfälle aufgetreten sind. Nach POTSCHKA und BRODIE (2012) entwickeln jedoch bis zu 30 % der Patienten eine Pharmakoresistenz gegenüber Antiepileptika. Ein präventives Eingreifen, um die Epilepsieentstehung (Epileptogenese) im Ansatz zu verhindern, ist bislang nicht möglich (SCHMIDT u. SILLANPÄÄ 2016). Klinisch einsetzbare Biomarker zur Identifizierung von Patienten, die nach einem Gehirninsult ein Risiko zur Epilepsieentwicklung aufweisen, sind aktuell ebenfalls nicht verfügbar (PITKÄNEN u. ENGEL 2014).

Um entsprechende präventive Zielstrukturen, wie zum Beispiel biochemische Reaktionswege oder einzelne Proteine, identifizieren zu können, sind Studien nötig, die ein besseres Verständnis der während der Epileptogenese auftretenden Veränderungen und der damit verbundenen Umbauvorgänge im Gehirn ermöglichen (LUKASIUK et al. 2003). Hierzu könnten umfassende Globalanalysen, wie zum Beispiel Transkriptom- oder Proteomuntersuchungen, einen wichtigen Beitrag liefern.

Im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens wird ein proteomischer Datensatz, der im Verlauf der Epilepsieentstehung und -manifestation generiert wurde, mittels bioinformatischer Auswertmethoden näher analysiert. Hierdurch werden neue Einblicke in das Zusammenspiel der Veränderungen während der Epileptogenese auf molekularer Ebene ermöglicht und Hinweise auf denkbare Ansätze zur therapeutischen Beeinflussung der Epilepsieentstehung geliefert. Weiterhin wird der Datensatz im Hinblick auf mögliche Kandidaten als Biomarker der Epileptogenese untersucht.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Epilepsien

1.1. Definition und Bedeutung

Die Internationale Liga gegen Epilepsie (*International League Against Epilepsy*, ILAE) hat 2005 zusammen mit dem Internationalen Büro für Epilepsie (*International Bureau for Epilepsy*, IBE) für den humanmedizinischen Bereich folgende Eingrenzung festgelegt: Epilepsie wird als Störung des zentralen Nervensystems definiert (FISHER et al. 2005). Weiterhin versteht man unter einem epileptischen Anfall das vorübergehende Auftreten von Symptomen, deren Ursache in einer synchronen oder abnormal gesteigerten Entladung von Neuronen liegt (FISHER et al. 2005; FISHER et al. 2014). Eine andauernde Prädisposition für derartige epileptische Anfälle und deren soziale, psychologische, kognitive und neurobiologische Folgen kennzeichnen diese Störung (FISHER et al. 2005). Neue Forschungsergebnisse und auftretende Schwierigkeiten beim Gebrauch der Definition im klinischen Alltag veranlassten 2014 die ILAE, ihre Definitionen aus dem Jahr 2005 zu überarbeiten. Demnach wird Epilepsie nicht mehr als Störung (*disorder*), sondern als Krankheit (*disease*) angesehen (FISHER et al. 2014). Zur Diagnosestellung muss eine von drei Voraussetzungen erfüllt sein: (i) es sind zwei spontane Anfälle oder Reflexanfälle mit einem zeitlichen Abstand von über 24 Stunden aufgetreten; (ii) es ist ein spontaner oder ein Reflexanfall aufgetreten und das Risiko für weitere Anfälle entspricht dem nach zwei aufgetretenen Anfällen (mindestens 60 %); (iii) es wird ein Epilepsiesyndrom festgestellt (FISHER et al. 2014). Des Weiteren gilt Epilepsie als überstanden (*resolved*), wenn zehn anfallsfreie Jahre und fünf Jahre ohne medikamentöse Therapie vorliegen (FISHER et al. 2014). Demnach gilt der Patient zu diesem Zeitpunkt als frei von Epilepsie, diese kann aber jederzeit wieder auftreten (FISHER et al. 2014).

Auch in der Veterinärmedizin gibt es Bemühungen, die in der Praxis und Wissenschaft verwendete Nomenklatur zu vereinheitlichen. Im Jahr 2015 veröffentlichte eine internationale Gruppe bestehend aus Klinikern und Wissenschaftlern, die *International Veterinary Epilepsy Task Force* (IVETF), Leitlinien für die Diagnose, Behandlung und auch für die Erforschung von Epilepsie bei Hund und Katze. Darin wird Epilepsie, ähnlich zur Festlegung der ILAE und IBE, als Krankheit des Gehirns definiert, bei der ein andauernder Hang zu epileptischen Anfällen besteht (BERENDT et al. 2015). In der Praxis wird dies in der Regel mit dem Auftreten von mindestens zwei spontanen

epileptischen Anfällen mit mehr als 24 Stunden Abstand gleichgesetzt (FISHER et al. 2014). Als Ursache für einen epileptischen Anfall wird eine gesteigerte gleichzeitige elektrische Aktivität von Neuronen im Gehirn angegeben (BERENDT et al. 2015).

In Europa wird für den Menschen eine Prävalenz für Epilepsien von circa 0,52 % festgestellt (FORSGREN et al. 2005). Somit ist circa jeder sechste von tausend Europäern erkrankt, was bezogen auf die Bevölkerungszahl von 2004 einer absoluten Anzahl von rund 3,1 Millionen entspricht (FORSGREN et al. 2005). Im veterinärmedizinischen Bereich stellten HESKE et al. (2014) für die Hundepopulation eine Prävalenz von 0,75 % fest. KEARSLEY-FLEET et al. (2013) untersuchten die Häufigkeit von caninen Epilepsien in Großbritannien, wobei sie mit 0,62 % etwas tiefer liegt. Jedoch ist bekannt, dass es große rassespezifische Unterschiede gibt (POTSCHKA et al. 2013).

1.2. Klassifizierung

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden verschiedene Schemata zur Einteilung der humanen Epilepsien erstellt und wieder überarbeitet. Die aktuelle Klassifizierung der ILAE stammt aus dem Jahr 2010. Damals wurde in einem Überarbeitungsprozess die ätiologische Einteilung neu festgelegt. Die Begriffe idiopathische, symptomatische und kryptogene Epilepsien wurden ersetzt durch genetische, strukturell/metabolische und unbekannte Epilepsien (BERG et al. 2010). Die genetischen Epilepsien entstehen direkt in Folge eines genetischen Defekts (BERG et al. 2010). Bei der zweiten Form liegt eine strukturelle Störung vor, zum Beispiel eine Infektion oder eine metabolische Störung, die dann wiederum zur Epilepsieentstehung führt (BERG et al. 2010). Dagegen ist bei letzterer Form, den unbekanntem Epilepsien, die Ursache nicht bzw. noch nicht bekannt (BERG et al. 2010).

Neben der ätiologischen Einteilung wird auch eine Klassifikation der epileptischen Anfälle selbst vorgenommen. Diese ist in Tabelle 1 dargestellt. So erfolgt hier die Unterscheidung in generalisierte Anfälle, fokale Anfälle und Anfälle mit unbekannter Ursache (BERG et al. 2010). Erstreckt sich das neuronale Ursprungsnetzwerk auf beide Großhirnhemisphären und ist nicht von Anfall zu Anfall konstant, spricht man von einem generalisierten Anfall (BERG et al. 2010). Fokale Anfälle hingegen charakterisiert der für den jeweiligen Typ gleiche Anfangsort, der auf eine Hemisphäre eng begrenzt ist (BERG et al. 2010). Diese Einteilung der ILAE und insbesondere die überarbeitete Fassung von 2010 werden jedoch kritisch beurteilt (PANAYIOTOPOULOS 2011). So gibt es alternative Vorschläge zur Einteilung und Klassifikation von Epilepsien. Zum Beispiel empfiehlt SHORVON (2011) eine stärkere Fokussierung auf die den Epilepsien zugrunde liegenden Ursachen und schlägt ein Einteilungsschema nach Ätiologie in vier Hauptgruppen (idiopathische, symptomatische, provozierte und kryptogene Epilepsien) vor.

Tabelle 1: Klassifikation von Anfällen

<ul style="list-style-type: none"> • generalisierte Anfälle <ul style="list-style-type: none"> ▪ tonisch-klonisch (in jeder Kombination) ▪ klonisch ▪ tonisch ▪ atonisch ▪ myoklonisch <ul style="list-style-type: none"> myoklonisch myoklonisch-atonisch myoklonisch-tonisch ▪ Absence <ul style="list-style-type: none"> typische atypische Absence mit besonderen Eigenschaften <ul style="list-style-type: none"> myoklonische Absence Lidmyoklonien mit Absence • fokale Anfälle • Anfälle mit unbekannter Ursache, zum Beispiel epileptische Spasmen
<p>Können Anfälle nicht eindeutig in obige Kategorien eingeteilt werden, sollten diese als „nichtklassifizierbar“ eingestuft werden, bis weitere Informationen vorliegen.</p>

Tabelle modifiziert nach BERG et al. (2010), mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Für den veterinärmedizinischen Bereich hat die IVETF in ihren Leitlinien aus dem Jahr 2015 ebenfalls ein Klassifikationsschema veröffentlicht. Demnach wird eine Einteilung der Epilepsien nach Ätiologie in idiopathisch und strukturell vorgeschlagen, wobei ersterer Begriff in drei weitere Unterklassen (genetische Epilepsien, Epilepsien mit vermutlich genetischer Ursache und Epilepsien mit unbekannter Ursache) aufgeteilt werden kann (BERENDT et al. 2015). Kann als Anfallsursache eine intracraniale oder cerebrale Störung, wie zum Beispiel ein Tumor oder eine degenerative Krankheit, diagnostiziert werden, liegt eine strukturelle Epilepsie vor (BERENDT et al. 2015). Epileptische Anfälle werden unterteilt in fokale und generalisierte Anfälle. Erstere haben ihren konstant bleibenden Ursprung in einer bestimmten Neuronengruppe oder in einem neuronalen Netzwerk in einer Hemisphäre (BERENDT et al. 2015). Fokale Anfälle können anhand der klinischen Symptome weiter eingeteilt werden in motorische Anfälle, autonome Anfälle und Anfälle mit Verhaltensänderung (BERENDT et al. 2015). Finden in beiden Großhirnhemisphären unkontrollierte neuronale Entladungen statt, liegt ein generalisierter epileptischer Anfall vor, der beide Körperhälften betrifft. Ein derartiger Anfall manifestiert sich bei Hund und Katze in der Regel als tonisch, klonisch oder tonisch-klonisch und geht mit einem Bewusstseinsverlust einher (BERENDT et al. 2015). Bei der Diagnosestellung ist zu beachten, dass beim Hund häufig zunächst ein kurzer fokaler Anfall auftritt, der dann sekundär generalisiert (BERENDT et al. 2015).

1.3. Epileptogenese

Die Erforschung der Epilepsieentstehung rückte erst mit der Verwendung von Tiermodellen, mit denen chronische Epilepsien nachvollzogen werden können, in den Fokus der Wissenschaft (PITKÄNEN u. ENGEL 2014). Der Begriff Epileptogenese beschreibt die Ausbildung eines gestörten neuronalen Netzwerkes in einem zunächst gesunden und normal funktionierenden Gehirn, das dann zur Entstehung von epileptischen Anfällen neigt (GOLDBERG u. COULTER 2013). Dieser Prozess wird in der Regel in drei Phasen eingeteilt: (i) frühe Post-Insult-Phase, (ii) Latenzperiode und (iii) chronische Epilepsie mit spontanen Anfällen (GOLDBERG u. COULTER 2013). Als auslösendes Ereignis kommen zum Beispiel ein Schädel-Hirn-Trauma, eine Infektion oder ein Schlaganfall in Frage (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009). Die Phase der Latenz wird definiert als Zeitabstand zwischen dem auslösenden Insult und dem ersten klinischen Anfall (LÖSCHER et al. 2015; PITKÄNEN et al. 2015). Da neuere Studien darauf schließen, dass die neuronalen Umbauvorgänge mit Auftreten des ersten Anfalls nicht abgeschlossen sind, wird diskutiert, ob der Begriff Epileptogenese auch das Fortschreiten der Krankheit nach der Diagnose miteinschließen sollte (PITKÄNEN 2010). Deswegen sollten die Bezeichnungen Epileptogenese und Latenzperiode, die zunächst als gleichbedeutend und austauschbar verwendet wurden (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011a), eindeutig getrennt werden. Nach LÖSCHER et al. (2015) beschreibt ersterer Begriff die pathophysiologischen Vorgänge im Gehirn und letzterer nur den Zeitabstand. Epileptogenese wird demnach aktuell definiert als Entwicklung und Ausweitung von zur Auslösung von spontanen Anfällen fähigen Gewebes (PITKÄNEN 2010; PITKÄNEN et al. 2015). Dies führt zu einem epileptischen Zustand des Gehirns und/oder zum Voranschreiten der Epilepsie nach Manifestation (PITKÄNEN 2010; PITKÄNEN et al. 2015).

Außerdem rückt die Latenzperiode weiter in den Forschungsmittelpunkt, da dieser Zeitraum entscheidend für eine medikamentöse Beeinflussung der pathophysiologischen Vorgänge nach einem Gehirninsult sein könnte (LÖSCHER u. BRANDT 2010; PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011a). Das Ziel dieses therapeutischen Eingreifens ist es, die Epilepsieentstehung im Ansatz zu verhindern oder nach Epilepsiemanifestation eine Heilung zu erreichen (PITKÄNEN et al. 2015). Ein weiteres Ziel stellt die Modifikation von auftretenden Begleiterkrankungen dar (PITKÄNEN et al. 2015). Da es bislang keine gesicherten Hinweise auf die Länge der Latenzperiode gibt, sollte mit einer potentiellen Intervention so früh wie möglich nach einem Gehirninsult begonnen werden (LÖSCHER et al. 2015).

1.4. Tiermodelle der Epileptogenese

Tiermodelle werden in der Epilepsieforschung oft eingesetzt. Sie haben viel zum Erkenntnisgewinn über die Epilepsieentstehung beigetragen (AUVIN u. DUPUIS 2014). Durch die Verwendung von Tiermodellen können neue Einblicke in die grundlegenden zellulären und molekularen Mechanismen der Anfallsinduktion, Epilepsieentstehung und Epilepsiemanifestation gewonnen werden (WHITE 2002; LUKASIUK et al. 2011). Zusätzlich kann mit Hilfe von Tiermodellen die Entwicklung antiepileptischer Medikamente vorangetrieben werden (LÖSCHER 2011). Es steht eine Vielzahl an unterschiedlichen Modellen zur Verfügung, aus denen das für die jeweilige Fragestellung geeignete ausgewählt werden kann (LUKASIUK et al. 2011). Grundsätzlich ist zwischen Modellen für epileptische Anfälle und Modellen für Epilepsie zu differenzieren (LÖSCHER 2011). Weitergehend kann eine Einteilung in genetische Modelle und Modelle, bei denen die Induktion von Anfällen in gesunden Tieren erfolgt, vorgenommen werden (LÖSCHER 2011). Bei letzteren können die Anfälle elektrisch oder pharmakologisch induziert werden (GORTER et al. 2016). Hierzu werden entweder Elektroden in ausgewählte Gehirnregionen implantiert (LOTHMAN et al. 1989) oder chemische Substanzen wie Pilocarpin oder Kainsäure lokal oder systemisch appliziert (BEN-ARI et al. 1979; TURSKI et al. 1989). Bei diesen Modellen wird zur Auslösung von chronischen Epilepsien jeweils ein andauernder, sich selbsterhaltender epileptischer Anfall (*Status epilepticus* (SE)) induziert. Dieser SE setzt molekulare und zelluläre Veränderungen in Gang und kann nach einer Latenzperiode von Tagen oder Wochen zum Auftreten von spontanen epileptischen Anfällen führen (LUKASIUK et al. 2011; GORTER et al. 2016). Demgegenüber können mit Hilfe des Kindling-Modells die grundlegenden Mechanismen induzierter Epileptogenese und das Fortschreiten der Anfallsschwere untersucht werden (GORTER et al. 2016). In diesem Modell werden wiederholte elektrische Stimulationen ausgewählter Gehirnbereiche durchgeführt, wodurch eine Progression der Anfallsschwere und der Anfälligkeit für induzierte Anfälle erreicht wird (LUKASIUK et al. 2011).

Zur Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Tierversuchen geben neuere Studien Antworten. So lieferten nach LÖSCHER (2016) drei Tiermodelle neue Ansatzpunkte für antiepileptische Medikamente, die auch im klinischen Einsatz am Menschen Wirkung zeigten.

Der dem vorliegenden Dissertationsvorhaben zugrunde liegende proteomische Datensatz wurde unter Verwendung des SE-basolaterale-Amygdala-(SE-BLA)-Modells generiert. Im Folgenden wird auf dieses Modell näher eingegangen.

1.4.1. SE-BLA-Modell

MCINTYRE et al. (1982) zeigten, dass durch eine kontinuierliche elektrische Stimulation der basolateralen Amygdala in Ratten ein sich selbsterhaltender fokaler SE hervorgerufen werden kann. Es wurde hier jedoch noch nicht untersucht, ob nach Induktion des SE spontane epileptische Anfälle auftraten. Auch NISSINEN et al. (2000) beschrieben ein Stimulationsprotokoll zur Induktion eines sich selbsterhaltenden SE in Ratten durch Stimulation des lateralen Nucleus der Amygdala. Ein weiteres Verfahren wurde von BRANDT et al. (2003) etabliert. Hierbei wurde in Ratten durch 25-minütige Stimulation über eine in die basolaterale Amygdala implantierte Elektrode ein sich selbsterhaltender SE induziert, der nach vier Stunden durch die Gabe von Diazepam beendet wurde (BRANDT et al. 2003). Es werden drei verschiedene Arten des sich selbsterhaltenden SE unterschieden:

Typ 1: fokaler, nicht konvulsiver SE

Typ 2: wie Typ 1, nur zusätzlich unterbrochen durch generalisierte Anfälle

Typ 3: generalisierter, konvulsiver SE.

BRANDT et al. (2003) zeigten weiter, dass der Typ des sich selbsterhaltenden SE entscheidend für das spätere Auftreten von spontanen epileptischen Anfällen ist. Demnach zeigten Ratten mit Typ 1 nur zu 33 % spontane epileptische Anfälle, Ratten mit Typ 2 und 3 jedoch zu über 90 %.

Für die Generierung des proteomischen Datensatzes wurde das von BRANDT et al. (2003) beschriebene Stimulationsprotokoll benutzt.

1.5. Biomarker der Epileptogenese

Biomarker im Allgemeinen charakterisieren als objektive messbare Kennzeichen normale biologische Vorgänge, pathologische Vorgänge oder das Ansprechen auf eine pharmakologische Therapie (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP 2001). Biomarker der Epileptogenese beschreiben die Entwicklung, das Vorhandensein, die Schwere, das Voranschreiten oder die Lokalisation einer epileptogenen Abnormalität (ENGEL 2011; SIMONATO et al. 2012; ENGEL et al. 2013). PITKÄNEN et al. (2016) schlugen eine Unterscheidung zwischen diagnostischen Biomarkern, prognostischen Biomarkern und Biomarkern, die das Auftreten von Begleiterkrankungen vorhersagen können, vor. Erstere Kategorie trägt zur Bestimmung des klinischen Zustandes eines Patienten bei, indem zum Beispiel die Lokalisation des epileptischen Gebietes näher bestimmt werden kann (PITKÄNEN et al. 2016). Prognostische Biomarker liefern Hinweise auf den weiteren Verlauf von Epilepsien, zum Beispiel eine Einschätzung, wie schnell es zu einem Fortschreiten kommen kann (PITKÄNEN et al. 2016). Somit können Biomarker der Epileptogenese bei der Identifizierung von Patienten helfen, die nach

einem epileptogenen Insult ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von chronischen, spontanen epileptischen Anfällen aufweisen (LUKASIUK u. BECKER 2014; TERRONE et al. 2016). Außerdem können sie zur Kostenreduktion und Verbesserung von entsprechenden klinischen Studien zur Validierung von antiepileptogenen Medikamenten beitragen (ENGEL et al. 2013; PITKÄNEN u. ENGEL 2014). Die Identifikation von geeigneten Biomarkern gestaltet sich jedoch schwierig und wird unter anderem durch die Komplexität und Heterogenität der Epilepsien erschwert (PITKÄNEN et al. 2016). So ist bis jetzt kein verlässlicher Epileptogenese-Biomarker verfügbar (PITKÄNEN u. ENGEL 2014). Bisherige mögliche Kandidaten für Biomarker wurden vor allem mit Hilfe von Tiermodellen, die in der Regel eine bestimmte Art von Epilepsie nachbilden, identifiziert und können somit auch nur begrenzt auf Epilepsien allgemein übertragen werden (PITKÄNEN et al. 2016). Weiterhin werden mehrere Biomarker, die die unterschiedlichen Stadien der Epilepsieentstehung und die jeweils vorherrschenden molekularen Vorgänge abdecken, in Kombination benötigt, um die Entwicklung von epileptischen Anfällen vorhersagen zu können (LUKASIUK u. BECKER 2014). Nach PITKÄNEN und LUKASIUK (2011b) könnten Gen-Expressions-Studien bei der Identifikation von Biomarkern der Epileptogenese hilfreich sein.

2. Proteomik

2.1. Antiepileptogene Strategien

Der Begriff Antiepileptogenese vereint drei Strategien, um die Vorgänge im Gehirn während der Epileptogenese zu beeinflussen: (i) Prävention, (ii) Anfallsmodifikation und (iii) Heilung (PITKÄNEN 2010). Hierbei schließt die Präventionsstrategie auch eine verzögerte oder in der Schwere verringerte Epileptogenese ebenso wie eine reduzierte Progression nach Epilepsiemanifestation mit ein (PITKÄNEN 2010). Als mögliches Zeitfenster für eine therapeutische Behandlung wird die Latenzperiode angesehen (LÖSCHER u. BRANDT 2010; PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011a; SCHMIDT u. SILLANPÄÄ 2016), die sich an den epileptogenen Insult anschließt und mit dem Auftreten von spontanen epileptischen Anfällen endet (LÖSCHER et al. 2015). Da es noch keine gesicherten Ergebnisse über die Dauer dieser Latenzphase gibt und auch die Existenz einer anfallsfreien Phase nach epileptogenen Insult zunehmend kritisch beurteilt wird (SLOVITER u. BUMANGLAG 2013; LÖSCHER et al. 2015), wird geschlossen, dass ein therapeutisches Eingreifen nur sehr zeitnah nach Auftreten des Insults erfolgversprechend ist (LÖSCHER et al. 2015; SCHMIDT u. SILLANPÄÄ 2016). Durch den Einsatz von Antiepileptika, die zur Anfallsreduktion entwickelt wurden, konnte bislang keine positive Beeinflussung der Epilepsieentstehung festgestellt werden (TEMKIN 2009;

LÖSCHER u. BRANDT 2010). Gemäß SLOVITER und BUMANGLAG (2013) sollte die Erforschung antiepileptogener Strategien auch die Entwicklung präziser Tiermodelle einschließen, bei denen das zeitliche Auftreten von spontanen epileptischen Anfällen ausgehend von einer bestimmten Gehirnregion genau bestimmt werden kann. Des Weiteren wird zunehmend diskutiert, ob eher spezifische Targets als Zielstrukturen anvisiert werden sollen (Monotherapie) oder ob eine Kombination aus mehreren Medikamenten mit verschiedenen Ansatzpunkten (Polytherapie) angesichts der Komplexität der Epilepsieentstehung besser geeignet ist (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011a; WHITE u. LÖSCHER 2014; TERRONE et al. 2016). Für letzteren Ansatz wurde der Begriff „Netzwerk-Pharmakologie“ vorgeschlagen (LÖSCHER et al. 2013; WHITE u. LÖSCHER 2014).

Zur Auffindung geeigneter therapeutischer antiepileptogener Zielstrukturen können Hochdurchsatzverfahren wie genomische oder proteomische Studien eingesetzt werden. Wenn die Limitierungen solcher Vorgehensweisen, wie zum Beispiel eine begrenzte Übertragbarkeit von Daten aus Tiermodellen auf die humanen Bedingungen, beachtet werden, können hierdurch differentiell exprimierte Gene und *pathways* identifiziert werden, die mit der Entstehung von Epilepsien assoziiert sind (LOEB 2011).

2.2. Definition

Das Proteom stellt das Komplement zum Genom dar. Dieses ist definiert als Gesamtheit der von einer Zelle oder einem Gewebe exprimierten Gene (WILSON et al. 2004). Die Expression der Proteine stellt das Ausführen des im Genom verankerten Plans dar (ANDERSON u. ANDERSON 1998). WILKINS et al. (1996), die den Begriff Proteom als Zusammensetzung aus den Begriffen Protein und Genom einführten, stellten fest, dass die Zahl der Proteine die Zahl der Gene übersteigen kann. Dies geschieht zum einen durch unterschiedliche Spleißvarianten der Gene, da die Gensequenz auf verschiedene Arten abgelesen werden kann (WILKINS et al. 1996). Zum anderen können Proteine auch nach Translation in ihrer Zusammensetzung durch biochemische Reaktionen verändert werden (posttranslationale Modifikationen) (WILKINS et al. 1996). Das Proteom kann in verschiedenen Geweben eines Organismus unterschiedlich sein und ist im Gegensatz zum Genom nicht statisch, sondern es kann sich an eine veränderte (Zell-)Umgebung anpassen (WILKINS et al. 1996). Wird durch quantitative Proteinbestimmung die Genexpression beschrieben, spricht man von Proteomik (ANDERSON u. ANDERSON 1998). Die Proteomik versucht biologische Vorgänge auf Proteinebene und die der Genexpressionsregulation zugrunde liegenden Mechanismen zu charakterisieren (ANDERSON u. ANDERSON 1998). Der Fokus liegt demnach auf der dynamischen Beschreibung der Genregulation (ANDERSON u. ANDERSON 1998). Der entscheidende Unterschied der Proteomik zu bereits etablierten Methoden der Proteinanalyse, bei denen die Proteine separat nacheinander nachgewiesen werden, ist der Ansatz eines möglichst automatisierten, umfassenden Verfahrens (FOUNTOULAKIS 2004). Diese Vorgehensweise wurde durch die Entwicklung geeigneter Analysemethoden, wie der Massenspektrometrie, und durch den Einsatz von Computer und Software basierten Auswertmethoden möglich (FOUNTOULAKIS 2004).

Grundsätzlich werden bei einer Proteomanalyse zuerst die Proteine mit einem geeigneten Verfahren, wie zum Beispiel der zweidimensionalen Gelelektrophorese, aufgetrennt und dann mit Hilfe einer Auswertmethode identifiziert (FOUNTOULAKIS 2004). PENNINGTON et al. (1997) unterscheiden zwei Phasen der Proteomanalyse. In der ersten Phase werden alle Proteine analysiert, die unter Normalbedingungen von einer bestimmten Zelle oder einem bestimmten Gewebe exprimiert werden. Dies führt zur Bestimmung des konstitutiven Proteoms (PENNINGTON et al. 1997), also zur Gesamtheit der Proteine, die im physiologischen Zustand der Zelle oder des Gewebes vorhanden sind. Damit können Referenzlisten für die untersuchte Zelle oder das untersuchte Gewebe generiert werden. In einer weiteren Phase werden die Verschiebungen im Proteom bei veränderten Bedingungen bestimmt (PENNINGTON et al. 1997). Damit werden neben den quantitativen Veränderungen und den posttranslationalen Modifikationen auch Veränderungen in der subzellulären Verteilung der Proteine berücksichtigt

(PENNINGTON et al. 1997). Eine alternativ gewichtete Unterteilung der Proteomik sieht die zwei Bereiche Profilerstellung und funktionelle Betrachtung vor (CHOUDHARY u. GRANT 2004; BECKER et al. 2006). Dabei umfasst erstere die Erfassung des Proteoms inklusive der Betrachtung von unterschiedlichen Zuständen und dem Vergleich von verschiedenen Zellen oder Geweben (CHOUDHARY u. GRANT 2004). Bei der funktionellen Betrachtung des Proteoms steht die Proteinaktivität und die Erfassung möglicher Proteininteraktionen im Vordergrund (CHOUDHARY u. GRANT 2004).

Das Ziel der Proteomik ist eine komplette Erfassung der vorliegenden Proteine (ANDERSON u. ANDERSON 1998). Das Erreichen dieses Zieles wird durch die oben erwähnten posttranslationalen Modifikationen erschwert, von denen mehrere hundert Möglichkeiten bekannt sind (BECKER et al. 2006). Zu den wichtigsten Modifikationen zählen die Phosphorylierung, die Glykosylierung und die Deamidierung (FOUNTOULAKIS 2004). Posttranslationale Modifikationen können die funktionelle Aktivität, die zelluläre Verteilung und die Stabilität von Proteinen beeinflussen (CHOUDHARY u. GRANT 2004). Als weiterer erschwerender Faktor ist die große Bandbreite der Proteinabundanz zu nennen (BECKER et al. 2006). Abundanz ist definiert als Menge, in der ein Protein in der jeweiligen Probe vorliegt. Diese Bandbreite kann eine Größenordnung von 10^7 oder 10^8 umfassen (ANDERSON u. ANDERSON 1998). Dadurch können Proteine, die nur in geringer Abundanz im Probenvolumen vorliegen, nicht problemlos detektiert werden (FOUNTOULAKIS 2004). Derartige Proteine sind aber mögliche Zielstrukturen für neue medikamentöse Behandlungsstrategien (FOUNTOULAKIS 2004). Die Proteingröße kann ebenfalls eine eindeutige Identifikation erschweren (FOUNTOULAKIS 2004). Eine Teilung des zu untersuchenden Gewebes in kleinere Proben in Verbindung mit einer Fraktionierung in verschiedene Zellbereiche kann die Ergebnisse verbessern (WILSON et al. 2004). So kann durch Zentrifugation der Proben eine Aufteilung in mehrere Zellkompartimente, wie zum Beispiel Membran-, Kern- und Zytoplasmakompartiment, erreicht werden (WILSON et al. 2004).

Ebenfalls eine große Herausforderung im Bereich der Proteomik stellt die adäquate Analyse der Proteinlisten dar (ANDERSON u. ANDERSON 1998; CHOUDHARY u. GRANT 2004). Technische Weiterentwicklungen, die die Generierung immer größerer und komplexerer Datensätze ermöglichen, machen den Einsatz globaler Analysemethoden erforderlich (KUMAR u. MANN 2009). Der Einsatz mathematisch geprägter Analyseansätze, wie das Aufstellen eines Netzwerkes, verspricht weitere Erkenntnisgewinne über das Zusammenspiel der einzelnen Proteine (CHOUDHARY u. GRANT 2004).

2.3. Neuroproteomik

Neuroproteomik ist ein Teilbereich der Proteomik, der sich mit der Untersuchung des Proteoms des Nervensystems befasst (BAYES u. GRANT 2009). Es können vier Hauptbereiche der Neuroproteomik definiert werden: (i) Expressionsneuroproteomik, (ii) funktionelle Neuroproteomik, (iii) klinische Neuroproteomik und (iv) neuroproteomische Informatik (BAYES u. GRANT 2009). Die Expressionsneuroproteomik begann zunächst mit der reinen Erfassung vorhandener Proteine in einer bestimmten Probe, bis die Quantifizierung des Proteingehalts in den Vordergrund rückte (BAYES u. GRANT 2009). Hierzu zählen differentielle Expressionsanalysen, die das Neuroproteom zwischen verschiedenen Spezies oder zwischen verschiedenen Zuständen (physiologischer Normalzustand versus pathologischer Zustand) vergleichen (BAYES u. GRANT 2009). Die funktionelle Neuroproteomik legt den Fokus auf die Erforschung der funktionellen Eigenschaften einzelner Proteine und ihr Zusammenspiel in Komplexen (BAYES u. GRANT 2009). Die Entdeckung neuer Biomarker und das bessere Verständnis der ursächlichen Mechanismen neurodegenerativer Erkrankungen und anderer pathologischer Zustände im Nervensystem ist das Ziel der klinischen Neuroproteomik (BAYES u. GRANT 2009). Der vierte Bereich, die neuroproteomische Informatik, befasst sich mit der Verarbeitung und Auswertung der generierten Datensätze sowie dem Aufbau entsprechender Datenbanken (BAYES u. GRANT 2009).

Neben den bereits oben erwähnten Limitationen der Proteomik muss sich die Neuroproteomik weiteren Herausforderungen stellen. Hierzu zählt die Komplexität und Heterogenität des zentralen Nervensystems (CHOUDHARY u. GRANT 2004; BECKER et al. 2006; SHEVCHENKO et al. 2015). Durch den Einsatz von Methoden, die schon bei der Gewinnung der Proben eine Reduktion auf eine bestimmte Gehirnregion oder auf eine bestimmte Zellart ermöglichen, kann die Genauigkeit der erzielten Ergebnisse verbessert werden (CHOUDHARY u. GRANT 2004; ALZATE 2010). Des Weiteren kann bei der Erforschung des humanen Neuroproteoms in der Regel nur auf post mortem gewonnene Proben zurückgegriffen werden. Derartige Proben können jedoch durch bereits begonnenen Proteinabbau Messartefakte liefern (CHOUDHARY u. GRANT 2004; FOUNTOULAKIS 2004). Eine Alternative zu post mortem Gewebe stellt die Benutzung von Cerebrospinalflüssigkeit dar (SHEVCHENKO et al. 2015). Das langfristige Ziel der Neuroproteomik ist es, Voraussagen über die Veränderungen im Proteom als Antwort auf spezifische Bedingungen treffen zu können (ALZATE 2010). Dieses Wissen kann dann für eine molekulare Manipulation als Behandlungsstrategie eingesetzt werden (ALZATE 2010).

2.4. Massenspektrometrie

Die Proteinidentifikation bei einer Proteomanalyse basiert in der Regel auf der Verwendung einer massenspektrometrischen Nachweismethode (WILSON et al. 2004). Hierbei wird das Verhältnis zwischen Masse und Ladung (m/z) von gasförmigen Ionen bestimmt (WILSON et al. 2004). Für die Probenaufbereitung besteht zum einen die Möglichkeit einer gelbasierten Auftrennung durch Verwendung einer zweidimensionalen Gelelektrophorese, zum anderen kann die Aufteilung mit Hilfe einer Chromatographie erfolgen (DERACINOIS et al. 2013). Die Proteinidentifikation erfolgt entweder durch eine einzelne Massenspektrometrie (MS) oder durch eine Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Bei ersterer werden die detektierten Peptide direkt zum Datenbankabgleich benutzt, wohingegen bei der zweiten Methode Ionenfragmente entstehen, die über eine Datenbanksuche Proteinen zugeordnet werden (HUNT et al. 1986; CHEN u. PRAMANIK 2009).

Grundsätzlich besteht ein Massenspektrometer aus drei Hauptkomponenten: (i) Ionenquelle, (ii) Massendetektor und (iii) Ionendetektor (WILSON et al. 2004). Als Ionisationsverfahren werden hauptsächlich die Elektrosprayionisation oder die matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) verwendet (SHEVCHENKO et al. 2015). Bei beiden Verfahren erfolgt die Ionisierung ohne Veränderung des ursprünglichen Proteins oder Peptides (weiche Ionisation), wodurch die Genauigkeit der Analyse gesteigert werden kann (WILSON et al. 2004). Das MALDI-Verfahren basiert auf einer Ko-Kristallisation zwischen Probe und Matrix und wird häufig mit Analysegeräten kombiniert, die die Messung der Flugzeit der Ionen zur Massenbestimmung benutzen (*time of flight*, TOF) (WILSON et al. 2004). Bei der Methode der Elektrosprayionisation wird die Probenlösung entlang eines hohen Potentialgradienten in die Messkammer eingebracht, wodurch ein feiner Nebel aus geladenen Tröpfchen entsteht (SHEVCHENKO et al. 2015). Dieses Verfahren eignet sich zur Kombination mit einer Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography*, LC) zur Probenseparation (WILSON et al. 2004). Durch die Verwendung von Mikro- oder Nanosprayionisation wird die Methode der Elektrosprayionisation verbessert (SHEVCHENKO et al. 2015).

Des Weiteren wird bei der massenspektrometrisch basierten Proteomik zwischen *bottom-up* und *top-down* Strategien unterschieden (DERACINOIS et al. 2013). Letztere Analyse wird auf Proteinebene durchgeführt und dient vor allem der Generierung von Informationen über vorhandene posttranslationale Modifikationen oder Proteinisoformen (DERACINOIS et al. 2013; LANUCARA u. EYERS 2013). Für *bottom-up* Ansätze werden die Proteine zunächst durch enzymatischen oder chemischen Verdau in Peptide aufgespalten und dann die weiteren Analyseschritte auf Peptidebene durchgeführt (LANUCARA u. EYERS 2013). Ein hierfür häufig eingesetztes Enzym ist Trypsin

(LANUCARA u. EYERS 2013). Um eine Aussage über die Proteinquantität treffen zu können, stehen zwei Methoden zur Verfügung: (i) markierungsfreie Quantifizierung und (ii) Quantifizierung nach Isotopenmarkierung des Proteins oder der entsprechenden Peptide (DERACINOIS et al. 2013). Bei Einsatz der markierungsfreien Methode wird die Quantifizierung entweder durch Vergleich der Proteinabundanz zwischen mehreren LC-MS/MS Durchläufen oder durch Analyse der für jedes Peptid detektierten MS/MS-Spektren realisiert (SHEVCHENKO et al. 2015). Die Proteinzuzuordnung erfolgt durch Algorithmen, die mit den Messergebnissen für jedes Peptid entsprechende Datenbanken durchsuchen (BECKER et al. 2006).

3. Netzwerkanalyse

3.1. Einführung

Netzwerke können für sehr unterschiedliche Bereiche aufgestellt werden. So findet man netzwerkartige Strukturen beim Aufbau des Internets, im Bereich der Wirtschaft und auch im Zusammenspiel der Proteine innerhalb einer Zelle (BARABASI u. BONABEAU 2003). Netzwerke bestehen grundsätzlich aus einer Anzahl an Knoten (Eckpunkten) und ihren Verbindungen, wobei diese Verbindungen die Interaktionen zwischen zwei Knoten darstellen (BARABASI u. OLTVAI 2004; MA'AYAN 2009). Zur Beschreibung eines Knotens wird der Begriff Grad (*degree*) oder Konnektivität k benutzt (MA'AYAN 2009). Hierbei gibt k an, wie viele Verbindungen mit anderen Knoten ein bestimmter Knoten besitzt (XIAO FAN u. GUANRONG 2003; BARABASI u. OLTVAI 2004). Des Weiteren kann die Gradverteilung (*degree distribution*) mit Hilfe der Funktion $P(k)$ beschrieben werden. Diese Funktion gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein bestimmter Knoten genau k Verbindungen hat (BARABASI u. OLTVAI 2004). Der Clusterkoeffizient C gibt an, wie sehr die Knoten des Netzwerkes dazu tendieren, Gruppen (Cluster) zu bilden (BARABASI u. OLTVAI 2004).

Haben die Verbindungen zwischen den Knoten eine bestimmte Richtung, spricht man von einem gerichteten Netzwerk (*directed network*). Ist dies nicht der Fall, liegt ein ungerichtetes Netzwerk (*undirected network*) vor (NEWMAN 2003). In ersterer Art können für jeden Knoten zusätzlich die Anzahl der eingehenden (k^-) und ausgehenden (k^+) Verbindungen bestimmt werden (WILLIAMS u. DEL GENIO 2014). Grundsätzlich ist zwischen zufälligen Netzwerken (*random networks*) und skalenfreien Netzwerken (*scale-free networks*) zu unterscheiden. Abbildung 1 zeigt diese zwei Netzwerkarten. Zufällige Netzwerke wurden erstmals von ERDÖS und RÉNYI (1961) beschrieben. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass die meisten Knoten in etwa gleich viele Verbindungen besitzen, d.h. die Konnektivität folgt einer Poisson-Verteilung. Demzufolge gibt es in zufälligen Netzwerken nur sehr wenige Knoten, die signifikant mehr Verbindungen als ein durchschnittlicher Knoten besitzen (BARABASI u. OLTVAI 2004). Folgt die Gradverteilung einem Potenzgesetz (*power law*) $P(k) \sim k^{-\gamma}$, ergibt sich ein skalenfreies Netzwerk (BARABASI u. OLTVAI 2004). γ ist hierbei der Exponent des Grades und \sim bedeutet „proportional zu“ (BARABASI u. OLTVAI 2004). In derartigen Netzwerken gibt es relativ viele Knoten, die wenige Verbindungen zu anderen Knoten eingehen, und eine relativ kleine Anzahl an Knoten mit einer hohen Konnektivität (BARABASI u. BONABEAU 2003). Diese Knoten werden als *hubs* bezeichnet (BARABASI u. OLTVAI 2004). Ein typisches, real existierendes skalenfreies Netzwerk ist das World Wide Web, mit Webseiten als Knoten und URLs (*uniform resource locator*) als Verbindungen (BARABASI u.

BONABEAU 2003). Auch das Zusammenspiel der verschiedenen Proteine innerhalb einer Zelle kann als skalenfreies Netzwerk verstanden werden (BARABASI u. OLTVAI 2004). Als weitere, komplexere Art von Netzwerk ist das hierarchische Netzwerk (*hierarchical network*) zu nennen, das sowohl die Eigenschaft der Skalenfreiheit als auch gleichzeitig einen großen Clusterkoeffizienten C besitzt, der unabhängig von der Größe des Netzwerkes ist (RAVASZ u. BARABÁSI 2003).

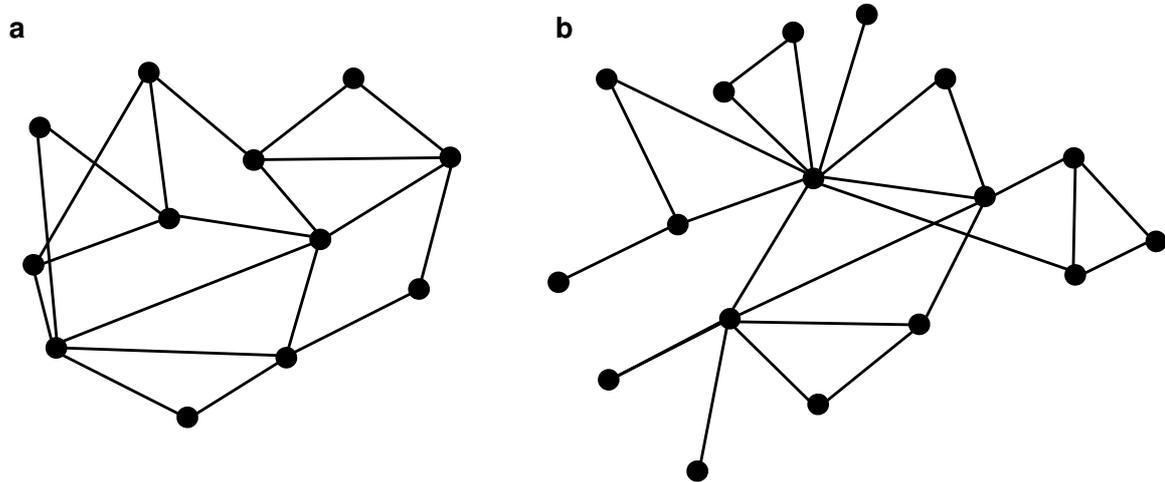


Abbildung 1

Es können zufällige Netzwerke (a) und skalenfreie Netzwerke (b) unterschieden werden. Sie differieren im strukturellen Aufbau. Abbildung modifiziert nach BARABASI und OLTVAI (2004), mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Typische Netzwerkarten zur Beschreibung von biologischen Vorgängen sind Protein-Protein-Interaktions-Netzwerke, Signalgebungsnetzwerke, metabolische Netzwerke und Gen-Ko-Expressionsnetzwerke (YANG et al. 2014).

3.2. Ko-Expressionsnetzwerke

EISEN et al. (1998) stellten fest, dass die Korrelationsmessung als Maß für die Ko-Expression von Genen dienen kann. Da Gene, die zusammen exprimiert werden, interagierende Proteine codieren, können durch Betrachtung der Ko-Expression auch Kenntnisse über die zugrunde liegenden zellulären Vorgänge gewonnen werden (EISEN et al. 1998). Durch Wahl eines entsprechenden Grenzwertes kann aus den errechneten Korrelationskoeffizienten ein Netzwerk (*relevance network*) aufgestellt werden (BUTTE u. KOHANE 2000; DAVIDSON et al. 2003; CARTER et al. 2004). In diesen Netzwerken repräsentiert jeder Knoten ein Gen und eine Verbindung wird erstellt, wenn zwischen zwei Genen eine signifikante Ko-Expressionsbeziehung besteht (ZHANG u. HORVATH 2005). Für die Wahl des Grenzwertes gibt es mehrere Vorgehensweisen. Eine Möglichkeit stellt die Festlegung eines strikten Grenzwertes (*hard threshold*) dar. Dadurch erhalten zwei Gene nur dann eine Verbindung, wenn ihr Korrelationskoeffizient über dem gewählten

Grenzwert liegt (BORATE et al. 2009). Diese Art der Grenzwertfestlegung kann aber zu Informationsverlust führen (CARTER et al. 2004). Zusätzlich können durch Wahl eines willkürlichen Grenzwertes selten biologische Beziehungen zwischen Genen gefunden werden (BORATE et al. 2009). Auch ZHANG und HORVATH (2005) sehen die Wahl eines strikten Grenzwertes im biologischen Sinne kritisch und präferieren hingegen einen weichen Grenzwert (*soft threshold*). Hierbei wird jede Verbindung zwischen zwei Genen kontinuierlich mit einer Zahl zwischen 0 und 1 gewichtet (ZHANG u. HORVATH 2005). Somit bleibt also die Information über die Stärke der Verbindungen erhalten.

3.3. Gewichtetes Ko-Expressionsnetzwerk

Für das vorliegende Dissertationsvorhaben wurde eine Netzwerkanalyse mit weichem Grenzwert nach dem von ZHANG und HORVATH (2005) beschriebenen Vorgehen durchgeführt, das im Folgenden näher dargestellt wird. Die Definition der verwendeten Begriffe ist in Tabelle 2 dargelegt.

Tabelle 2: Definitionen

Begriff	Definition
ungerichtetes Netzwerk	Grundsätzlich besteht ein ungerichtetes Netzwerk aus Knoten, die verbunden sein können. Die Stärke einer Verbindung ist bekannt und entweder als ja oder nein (die Knoten sind verbunden oder nicht) oder kontinuierlich („0“: keine Verbindung, „1“: sehr starke Verbindung) definiert.
Adjazenzmatrix	Diese symmetrische Matrix enthält die Werte der Verbindungsstärken zwischen den Knoten eines ungerichteten Netzwerkes. Die Werte liegen zwischen 0 und 1. Jedes Element a_{ij} beschreibt die Stärke der Verbindung zwischen dem Knoten i und dem Knoten j .
Korrelationsnetzwerk	Grundlage für diese Art von Netzwerk sind die numerischen Daten X_{bi} , die den Wert der Variable i in Messung b darstellen. Die Adjazenz a_{ij} wird durch Korrelation zwischen den Knotenprofilen X_i und X_j berechnet.
Gen-Ko-Expressionsnetzwerk	In dieser Art von Netzwerk entspricht jeder Knoten einem Gen und Verbindungen zwischen Knoten stellen die Stärke der Ko-Expression dar. Wird für die Bestimmung der Ko-Expression eine Korrelationsberechnung gewählt, ist das entstehende Netzwerk auch ein Korrelationsnetzwerk.
Sub-Netzwerk	In einem Netzwerk können sich Sub-Netzwerke bilden. Diese bestehen aus einer Anzahl an Knoten und deren Adjazenzen und stellen ein eigenes, kleineres Netzwerk dar.

Modul	Ein Modul beinhaltet eine Anzahl an Knoten, die ein Sub-Netzwerk in einem größeren Netzwerk bilden. Ein Modul kann einem Knotencluster entsprechen.
Knotencluster	Knoten, die stark miteinander verknüpft sind, bilden ein Knotencluster. Zur Bestimmung von Clustern gibt es verschiedene Berechnungsgrundlagen.
Netzwerkdichte	Die mittlere Adjazenz aller Knoten eines Netzwerkes wird als Netzwerkdichte definiert.
Konnektivität	Die Summe der Adjazenzen eines Genes mit den anderen Genen eines Netzwerkes wird als Konnektivität k definiert: $k_i = \sum_{u \neq i} a_{ui}$. Bei Ko-Expressionsnetzwerken spiegelt k die Stärke der Korrelation eines Genes mit allen anderen Genen dieses Netzwerkes wider.
intramodulare Konnektivität	Die intramodulare Konnektivität eines bestimmten Genes gibt an, wie stark dieses Gen mit den anderen Genen eines bestimmten Moduls verknüpft ist. In einem Ko-Expressionsnetzwerk ist die intramodulare Konnektivität auch ein Maß für die Ko-Expression.
Moduleigenen (ME)	Die Expressionsprofile der Gene eines Moduls können als erste Hauptkomponente (<i>first principal component</i> , ME) zusammengefasst werden.
Hub-Gen	Die am stärksten verknüpften Gene eines Netzwerkes werden als <i>Hub</i> -Gene bezeichnet. Erfolgt die Betrachtung auf Modulebene, spricht man von intramodularen <i>Hub</i> -Genen.
Gen-Signifikanz	Mit Bestimmung der Gen-Signifikanz können weitere Parameter des Datensatzes verarbeitet werden. Zum Beispiel kann hierdurch die Korrelation der Zugehörigkeit zur Versuchs- oder zur Kontrollgruppe bestimmt werden.
Modul-Signifikanz	Der Durchschnitt der absoluten Gen-Signifikanz aller Gene eines Moduls wird definiert als Modul-Signifikanz.
Eigenen-Signifikanz (module-trait relationship)	Sind weitere Informationen zu den verwendeten Proben wie zum Beispiel klinische Parameter oder Zugehörigkeit zur Versuchs- oder Kontrollgruppe vorhanden, kann die Korrelation der ME zu dieser Information berechnet werden. Der Korrelationskoeffizient wird dann als Eigenen-Signifikanz bezeichnet.

Tabelle modifiziert nach LANGFELDER et al. (2011).

Das Aufstellen eines Netzwerkes gliedert sich in verschiedene Schritte. Zunächst wird ein Maß für die Ähnlichkeit s_{ij} der Expressionsprofile definiert, die dann für jedes Genpaar i und j des Datensatzes bestimmt wird. Eine Möglichkeit stellt der absolute Wert einer Korrelationsbestimmung (Pearson oder Spearman) zwischen den Profilen der Knoten i und j dar:

$$s_{ij} = |\text{cor}(i, j)|.$$

Falls die Richtung der Korrelation, das Vorzeichen, beibehalten und berücksichtigt werden soll, kann dies auf folgende Weise geschehen:

$$s_{ij} = \frac{1 + \text{cor}(i, j)}{2}.$$

Die entstehende Ähnlichkeitsmatrix

$$S = [s_{ij}]$$

enthält Werte zwischen 0 und 1. Um diese in eine Adjazenzmatrix a_{ij} zu überführen, muss eine entsprechende Adjazenzfunktion definiert werden. Wird an dieser Stelle ein strikter Grenzwert gewählt, entsteht ein ungewichtetes Netzwerk. Durch die Wahl eines weichen Grenzwertes wird hingegen ein gewichtetes Netzwerk aufgestellt. Diese zwei Netzwerkarten sind zusammen mit einer entsprechenden Adjazenzmatrix in Abbildung 2 dargestellt.

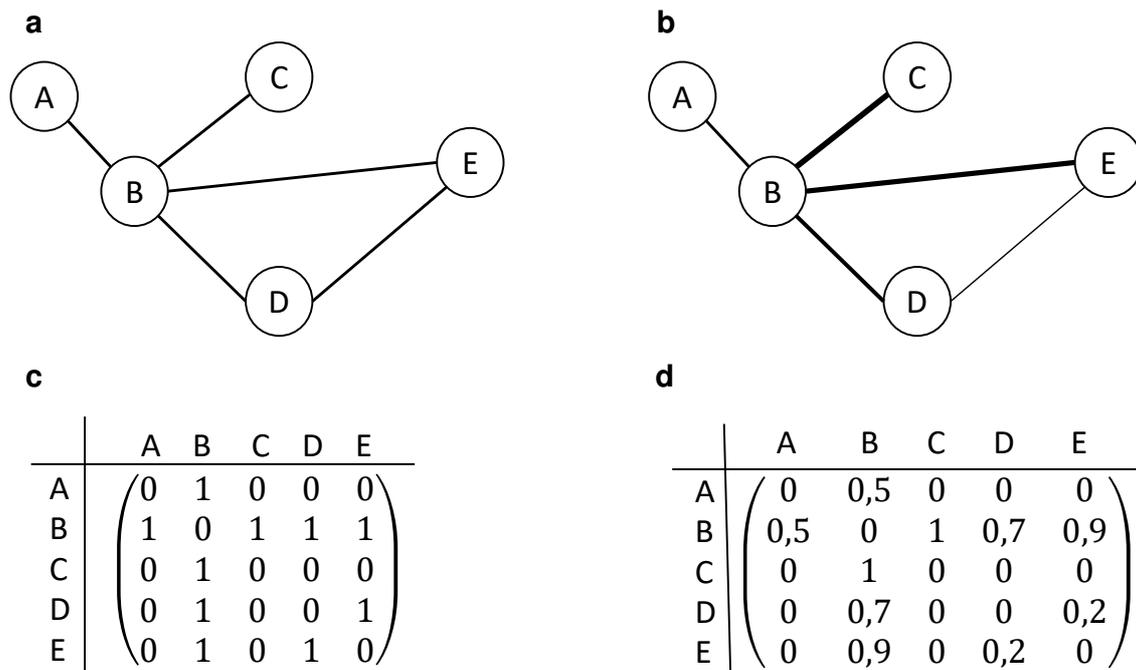


Abbildung 2

Bei einem ungewichteten Netzwerk (a) wird die Stärke einer Verbindung zwischen zwei Knoten nicht berücksichtigt. Dahingegen wird bei einem gewichteten Netzwerk (b) diese Information beibehalten und verarbeitet. Die entsprechenden Adjazenzmatrizen sind in (c) für das ungewichtete und in (d) für das gewichtete Netzwerk dargestellt.

Falls ein ungewichtetes Netzwerk konstruiert werden soll, wird die Signumfunktion

$$a_{ij} = \text{signum}(s_{ij}, \tau) \equiv \begin{cases} 1 & \text{wenn } s_{ij} \geq \tau \\ 0 & \text{wenn } s_{ij} < \tau \end{cases}$$

als Adjazenzfunktion gewählt. Für ein gewichtetes Netzwerk gibt es zwei mögliche Adjazenzfunktionen. Mit den Parametern α und τ_0 kann die Sigmoidfunktion

$$a_{ij} = \text{sigmoid}(s_{ij}, \alpha, \tau_0) = \frac{1}{1 + e^{-\alpha(s_{ij} - \tau_0)}}$$

aufgestellt werden. Für die Potenzadjazenzfunktion

$$a_{ij} = \text{power}(s_{ij}, \beta) = |s_{ij}|^\beta$$

muss der Parameter β festgelegt werden. Da s_{ij} in die Beiträge der Knoten i und j mit

$$s_{ij} = s_i s_j$$

zerlegt werden kann, lässt sich die Potenzadjazenzfunktion in

$$a_{ij} = a_i a_j$$

faktorisieren.

Hierbei gilt

$$a_i = (s_i)^\beta.$$

In der Adjazenzmatrix a_{ij} ist jetzt die Information enthalten, ob und wenn ja, wie zwei Gene miteinander verknüpft sind. Hiermit kann das Netzwerk aufgestellt werden. Um im Netzwerk Gruppen von stark verknüpften Genen aufzufinden, schlagen ZHANG und HORVATH (2005) die Bestimmung der Unähnlichkeit der topologischen Überlappung (*topological overlap dissimilarity measure*) nach RAVASZ et al. (2002) vor. Hierbei wird überprüft, ob zwei Gene Verbindungen zu denselben anderen Genen besitzen. Zunächst wird die Matrix der topologischen Überlappung Ω mit

$$\Omega = \omega_{ij}$$

bestimmt. Es gilt

$$\omega = \frac{l_{ij} + a_{ij}}{\min\{k_i, k_j\} + 1 - a_{ij}}$$

mit

$$l_{ij} = \sum_u a_{iu} a_{uj} \text{ und } k_i = \sum_u a_{iu}$$

zur Bestimmung der Konnektivität eines Knotens. Um die Unähnlichkeit der topologischen Überlappung zu berechnen, gilt

$$d_{ij}^\omega = 1 - \omega_{ij}.$$

Als nächster Schritt können Module, die nach ZHANG und HORVATH (2005) als Gruppen von Knoten mit großer topologischer Überlappung definiert sind, detektiert werden. Hierzu wird d_{ij}^ω mit einer bestimmten Art der hierarchischen Clusteranalyse, dem *average linkage hierarchical clustering*, kombiniert. Im entstehenden Dendrogramm entsprechen die Äste den detektierbaren Clustern. Durch Festlegung eines horizontalen Höhengrenzwertes (*cut-off*) können Cluster zu Modulen zusammengefasst und dadurch definiert werden. Durch Einbeziehung weiterer Informationen des Datensatzes, wie klinische Parameter oder die Zugehörigkeit zur Versuchs- oder Kontrollgruppe, können für die jeweilige Fragestellung relevante Module gefiltert werden. So kann zum Beispiel die Korrelation zwischen einem Modul, zusammengefasst als ME, und einem klinischem Parameter wie dem Gewicht bestimmt werden. Damit können mit der jeweiligen Fragestellung signifikant korrelierende Module aufgefunden werden. Als letzter Schritt folgt die funktionelle Analyse der identifizierten Module.

4. Extrazelluläre Matrix und Zelltod

4.1. Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix füllt im zentralen Nervensystem den Raum zwischen Neuronen und Gliazellen aus (SOLEMAN et al. 2013). Dieser Raum wird extrazelluläre Lücke genannt und nimmt im sich entwickelnden Gehirn circa 40 %, im adulten Gehirn hingegen nur circa 20 % des Gehirnvolumens ein (NICHOLSON u. SYKOVA 1998). Die extrazelluläre Matrix baut sich grundsätzlich neben Verbindungsproteinen und Wachstumsfaktoren aus drei Hauptkomponenten auf: (i) Glykosaminoglykane, (ii) Faserproteine wie Kollagen und Elastin und (iii) adhäsive Glykoproteine wie Laminin und Tenascin (GALTREY u. FAWCETT 2007). Die Glykosaminoglykane können entweder proteingebunden als Proteoglykane oder ungebunden in Form von Hyaluronsäure vorliegen (GALTREY u. FAWCETT 2007). Im zentralen Nervensystem besteht die extrazelluläre Matrix vor allem aus Hyaluronsäure, Chondroitinsulfatproteoglykanen, Verbindungsproteinen (*hyaluronan and proteoglycan binding link proteins*, HAPLNs) und Tenascin (GALTREY u. FAWCETT 2007). Der Anteil an Chondroitinsulfatproteoglykanen wird hauptsächlich von Lecticanen gebildet (Aggrecan, Brevican, Neurocan und Versican) (BANDTLOW u. ZIMMERMANN 2000; YAMAGUCHI 2000; MATSUI u. OOHIRA 2004; GALTREY u. FAWCETT 2007). Des Weiteren können vier Grundformen der extrazellulären Matrix im zentralen Nervensystem unterschieden werden: (i) perineuronale Netze (*perineuronal nets*), (ii) perisynaptische extrazelluläre Matrix im Neuropil, (iii) Basallamina und (iv) Bereiche in den Wänden des lateralen Ventrikels, die für die neurale Stammzellnische von Bedeutung sind (DITYATEV 2010). Die perineuronalen Netze umgeben geflechtartig die Synapsen auf den Zellkörpern, den proximalen Dendriten und den initialen Axonsegmenten von bestimmten Neuronen (DITYATEV 2010). Im Bereich des cerebralen Cortex und des Hippocampus sind die perineuronalen Netze vor allem mit GABAergen (*γ-aminobutyric acid*) Interneuronen assoziiert (DITYATEV 2010).

Im adulten Gehirn verhindert die extrazelluläre Matrix strukturelle Umbauvorgänge der neuronalen Netzwerke (strukturelle Plastizität), zum Beispiel durch Hemmung der Axonregeneration (DITYATEV 2010). RAUCH (2004) stellte insgesamt beim Erwachsenen eine reduzierte Plastizität fest und führt diese Tatsache vor allem auf die veränderte Form der Hyaluronsäure zurück. Während der Gehirnentwicklung ist die Hyaluronsäure relativ löslich und kann dadurch einen großen Teil Wasser binden, sodass ein optimales Milieu für Zellmobilität und Axonwachstum geschaffen wird (MCRAE u. PORTER 2012). Im adulten zentralen Nervensystem wird zum einen weniger Hyaluronsäure produziert und zum anderen ist diese durch Interaktion mit anderen Proteinen unlöslicher (MCRAE u. PORTER 2012). Die extrazelluläre Matrix ist in den

letzten Jahren als Zielstruktur für die Behandlung neurologischer Erkrankungen in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Einerseits können Mutationen in Genen, die für Moleküle der extrazellulären Matrix codieren, direkt Erkrankungen des zentralen Nervensystems verursachen, andererseits kann ein durch Gehirnsulte verändertes Milieu in der extrazellulären Matrix die Regeneration beeinflussen (SOLEMAN et al. 2013).

4.2. Bedeutung der extrazellulären Matrix im Kontext der Epileptogenese

Neben der Tatsache, dass Mutationen in Bestandteilen der extrazellulären Matrix bestimmte Formen von Epilepsie verursachen können (DITYATEV et al. 2010), wird der extrazellulären Matrix auch eine Rolle in der Epileptogenese nach einem Gehirnsult zugeschrieben (WONG 2012). Eine mögliche Abfolge der Prozesse ist in Abbildung 3 dargestellt.

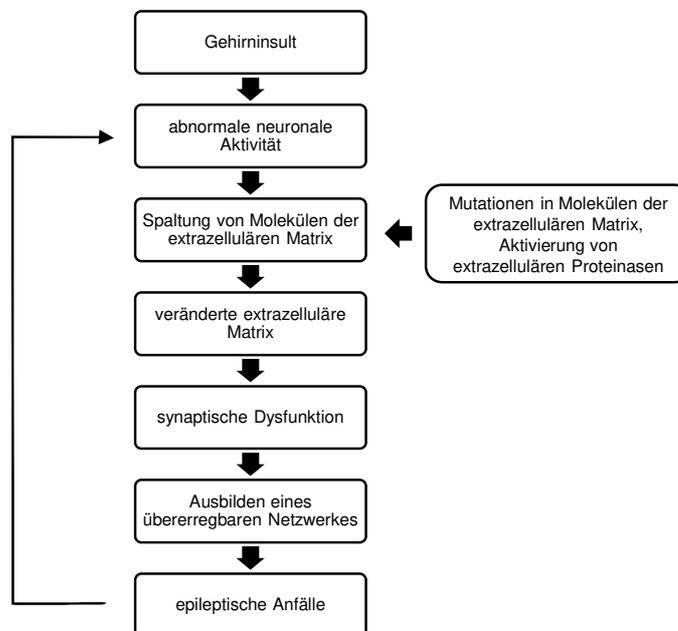


Abbildung 3

Veränderungen in der extrazellulären Matrix können die Anfälligkeit für epileptische Anfälle erhöhen und zum Prozess der Epileptogenese beitragen. Abbildung modifiziert nach SOLEMAN et al. (2013), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

MCRAE und PORTER (2012) vermuteten, dass durch Insulte im adulten zentralen Nervensystem Mechanismen der Entwicklung reaktiviert werden und so eine für Umbauvorgänge förderliche Zellumgebung entsteht. Epileptische Anfälle können durch Modulierung der Expression von Molekülen der extrazellulären Matrix und von extrazellulären Proteasen das Milieu der extrazellulären Matrix pathologisch verändern und durch strukturelle Veränderungen im Gehirn zum Fortschreiten der Epileptogenese beitragen (SOLEMAN et al. 2013). So kann nach epileptischen Anfällen eine veränderte Zusammensetzung der perineuronalen Netze festgestellt werden (DITYATEV 2010). Nach

LUKASIUK et al. (2011) können extrazelluläre Proteasen durch Degradation von extrazellulären Strukturelementen und durch Signalgebungsmoleküle physiologische und pathophysiologische Auswirkungen der Beschaffenheit der extrazellulären Matrix beeinflussen. Weiterhin untersuchten MCRAE et al. (2012) die Auswirkungen eines durch intraperitoneale Gabe von Pilocarpin induzierten SE auf die extrazelluläre Matrix. Demnach kann nach Auftreten eines SE im gesamten dorsalen Hippocampus eine veränderte Struktur der perineuronalen Netze mit einer deutlichen Expressionsreduktion von Aggrecan beobachtet werden (MCRAE et al. 2012). Außerdem traten nach SE vermehrt perineuronale Netze mit einer reduzierten Kompaktheit und mit verminderten strukturellen Eigenschaften auf (MCRAE et al. 2012). Diese perineuronalen Netze von schlechterer Qualität können aufgrund von Degradation durch Metalloproteinasen mit Thrombospondin-Motiven (*α-disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*, ADAMTS) und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) entstehen (MCRAE u. PORTER 2012). Zum Beispiel besitzen die Proteinasen ADAMTS4 und ADAMTS5 die Eigenschaft, verschiedene Lektine im zentralen Nervensystem spalten zu können (MCRAE u. PORTER 2012). Hierdurch wird lokal die Trennung und Neubildung von Synapsen ermöglicht (SOLEMAN et al. 2013). Von der Familie der MMPs, die ebenfalls Strukturproteine und Signalgebungsmoleküle spalten können, wird vor allem für MMP-9 eine Beteiligung bei der Epileptogenese diskutiert (LUKASIUK et al. 2011). WILCZYNSKI et al. (2008) zeigten, dass die Expression von MMP-9 im Bereich von Synapsen im Hippocampus nach SE-Induktion mit Kainsäure aufreguliert war. Beim Menschen wurden nach epileptischen Anfällen erhöhte MMP-9 Level im Serum festgestellt (SUENAGA et al. 2008). Ferner gibt es Hinweise für die Beteiligung des Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator-Rezeptor-Systems bei den Umbauvorgängen im zentralen Nervensystem während der Epileptogenese (LUKASIUK et al. 2011). Durch verschiedene Interaktionspartner kann dieser Rezeptor die Proteolyse der extrazellulären Matrix, Interaktionen von Zellen mit der extrazellulären Matrix und Signalwege beeinflussen (LUKASIUK et al. 2011). Eine veränderte Expression des Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator-Rezeptors konnte sowohl beim Menschen mit Epilepsien als auch in entsprechenden Tiermodellen beobachtet werden (LUKASIUK et al. 2011).

Insgesamt führen die Veränderungen in der extrazellulären Matrix nach SE zu mehr Hyaluronsäure in freier Form, die das Neuritenwachstum und die synaptische Plastizität fördert (MCRAE u. PORTER 2012). Als therapeutische Ansätze kommen nach DITYATEV (2010) Hyaluronidase, Inhibitoren der Hyaluronsäure produzierenden Enzyme sowie Inhibitoren von MMPs infrage. Hierdurch könnten die durch epileptogene Insulte oder epileptische Anfälle induzierten Veränderungen in der extrazellulären Matrix modifiziert werden, um ein Entstehen oder Fortschreiten der Epilepsie zu verhindern (DITYATEV 2010). SOLEMAN et al. (2013) empfehlen zusätzlich einen differenzierten Einsatz

abhängig vom Stadium der Epileptogenese. Im frühen Stadium könnte eine Inhibition der Umbauvorgänge in der extrazellulären Matrix die Neuverknüpfung des neuronalen Netzwerkes verhindern (SOLEMAN et al. 2013). Dagegen könnte im fortgeschrittenen Stadium, wenn sich ein übererregbares Netzwerk bereits ausgebildet hat, die Gabe von die extrazelluläre Matrix degradierenden Therapeutika hilfreich sein, um den Ursprungszustand des neuronalen Netzwerkes wiederherzustellen (SOLEMAN et al. 2013).

4.3. Mechanismen des Zelltodes

Grundsätzlich können verschiedene Arten des Zelltodes unterschieden werden. Als grobe Einteilung kann zunächst eine Unterscheidung in nicht-entzündliche und entzündliche Prozesse vorgenommen werden (DINGLEDINE et al. 2014). Zur ersten Gruppe zählen die Apoptose, die Autophagozytose und die Phagozytose. Zur zweiten gehören die Nekrose, die Nekroptose und die Pyroptose (DINGLEDINE et al. 2014).

Unter Apoptose versteht man einen kontrollierten Abbau von Zellbestandteilen durch Phagozytose, währenddessen eine Kondensation von Chromatin und Zytoplasma auftritt (DINGLEDINE et al. 2014). Dieser Prozess läuft ohne Anregung des Immunsystems ab (BERGSBAKEN et al. 2009). Nötig hierfür sind aktivierte Cysteinproteasen (*cysteinylasspartate specific proteases*, Caspasen), die die Spaltung intrazellulärer Zellbestandteile vollziehen (DINGLEDINE et al. 2014). Zusätzlich präsentieren apoptotische Zellen Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche, um von phagozytierenden Zellen erkannt und abgebaut zu werden (RAVICHANDRAN 2011). Apoptose kann in der Regel im sich entwickelnden Gewebe beobachtet werden und dient allgemein der ständig auftretenden Zellerneuerung (KERR et al. 1972).

Die konstitutive Form der Autophagozytose ist relevant für die zelluläre Homöostase, um zum Beispiel beschädigte Mitochondrien beseitigen zu können (GREEN et al. 2011). Sie kann aber auch als universelle Reaktion auf Stress fungieren (KROEMER et al. 2010). Hierbei werden intrazelluläre Bestandteile durch autophagozytotische Enzyme in Vesikeln mit doppelter Membran (Autophagosome) abgebaut, die sich dann mit Lysosomen zur weiteren Degradation vereinigen (MA et al. 2013).

Der Vorgang der Phagozytose wurde zunächst nur als Folge von Zelluntergang angesehen (RAVICHANDRAN 2011). Nach BROWN und NEHER (2012) können aber phagozytierende Zellen, wie aktivierte Mikroglia, aktiv zum Tod weiterer, lebensfähiger Zellen beitragen, die ebenfalls entsprechende Signale transient auf ihrer Oberfläche tragen. Hierfür wurde der Begriff Phagozytose eingeführt (BROWN u. NEHER 2012). Nekrose tritt auf, wenn Zellen durch schweren Zellstress oder Trauma schnell untergehen (DINGLEDINE et al. 2014). Die Zellen schwellen an, nehmen an Größe zu, können platzen und geben intrazelluläre Bestandteile ins Interstitium ab, wodurch

inflammatorische Prozesse in Gang gesetzt werden (DINGLEDINE et al. 2014). Hierdurch kann sich der Zelluntergang durch Schädigung des umliegenden Gewebes ausbreiten (SCAFFIDI et al. 2002; SERRANO et al. 2011).

Der Vorgang der Nekroptose weist sowohl Eigenschaften eines programmierten Prozesses als auch Eigenschaften der Nekrose auf und stellt somit eine Art kontrollierte Nekrose dar (DINGLEDINE et al. 2014). Initiiert wird die Nekroptose durch Aktivierung entsprechender Rezeptoren, wie zum Beispiel des Tumor-Nekrose-Faktor α Rezeptors, kontrolliert wird der Prozess durch Proteinkinasen (VANDENABEELE et al. 2010).

Erfolgt ein Zelluntergang in Form einer Pyroptose, ist hiermit eine ausgedehnte entzündliche Reaktion verbunden (DINGLEDINE et al. 2014). Es wird ein Inflammasom ausgebildet, das als intrazellulärer Proteinkomplex zur Aktivierung pro-entzündlicher Caspasen (vor allem Caspase-1) dient (DINGLEDINE et al. 2014). Diese aktivieren inflammatorische Cytokine, hauptsächlich Interleukin-1 β und Interleukin-18 (BERGSBAKEN et al. 2009).

4.4. Zelltod im Kontext der Epileptogenese

Die Frage, inwieweit epileptische Anfälle den Untergang von Neuronen verursachen können und ob das Auftreten einer Neurodegeneration nötig ist, um Epilepsien hervorrufen zu können, wird kontrovers diskutiert (DINGLEDINE et al. 2014). Da zum Beispiel Gehirnsulte, die einen deutlichen Verlust von Neuronen bedingen, nicht zwangsläufig zur Entwicklung von Epilepsien führen, wurde eine definitive Schlussfolgerung bislang nicht getroffen (DINGLEDINE et al. 2014). Die Dauer eines epileptischen Anfalles ist relevant für das Ausmaß des Neuronenuntergangs. So kann nach kurz andauernden Anfällen meist kein offensichtlicher Verlust an Neuronen beobachtet werden (DINGLEDINE et al. 2014). Demgegenüber tritt nach einem SE ein ausgedehnter Untergang von Neuronen auf (CAVALHEIRO et al. 1991; POLLARD et al. 1994; BUCKMASTER u. DUDEK 1997).

Gemäß der *recapitulation of development* Hypothese führt ein Neuronenverlust zur Reaktivierung von Mechanismen der Gehirnentwicklung (GALANOPOULOU u. MOSHE 2014). Demnach kann die Neubildung von durch den Neuronentod gelösten Synapsen zur Ausbildung eines übererregbaren Netzwerkes beitragen (GALANOPOULOU u. MOSHE 2014). DINGLEDINE et al. (2014) sehen nicht den Neuronenuntergang an sich als relevant für die Epileptogenese an, sondern vielmehr die damit verbundenen biochemischen Reaktionswege. Sie formulierten diese Betrachtungsweise als *neuronal death pathway* Hypothese. Demnach können Signalmoleküle, die von frühen Stadien des beginnenden Neuronentodes generiert werden, zur Entwicklung von Epilepsien beitragen, unabhängig davon, ob die Neuronen untergehen oder nicht (DINGLEDINE et al. 2014).

III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Epilepsien gehören zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Sie bedürfen meist einer lebenslangen medikamentösen Therapie. Trotzdem kann bei circa 30 % der Patienten in der Human- und Veterinärmedizin durch Auftreten einer Pharmakoresistenz keine zufriedenstellende Anfallskontrolle erreicht werden (LANE u. BUNCH 1990; POTSCHKA u. BRODIE 2012). Des Weiteren konnten bis jetzt noch keine wirksamen Therapeutika identifiziert werden, um die Epileptogenese beeinflussen zu können (HOLTKAMP u. MEIERKORD 2007; LÖSCHER u. BRANDT 2010). Das Interesse an entsprechenden Behandlungsstrategien, um nach Gehirninsulten einer Epilepsieentstehung vorbeugen zu können, wächst (KOBOW et al. 2012). Damit könnten Risikopatienten durch rechtzeitiges, gezieltes Eingreifen vor einer Epilepsieerkrankung geschützt werden. Zur Identifizierung dieser Risikopatienten sind geeignete Biomarker nötig. Die Heterogenität und Komplexität der unterschiedlichen Epilepsien erschweren das Auffinden praktikabler und breit einsetzbarer Biomarker (KOBOW et al. 2012). So steht aktuell kein derartiger Biomarker für den klinischen Einsatz zur Verfügung (PITKÄNEN u. ENGEL 2014). Dies ist dem Umstand geschuldet, dass die molekularen und zellulären Veränderungen, die während der Epileptogenese auftreten, noch nicht gänzlich verstanden sind (PITKÄNEN 2010; WALKER et al. 2015). Hierzu könnten umfassende Proteomanalysen weitere Erkenntnisse liefern. Zu diesem Ziel wurde von Andreas Walker am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Deeg (Institut für Tierphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München) und Frau Dr. Hauck (*Research Unit Protein Science* am Helmholtz-Zentrum München) unter Verwendung eines chronischen Epilepsiemodells in Ratten ein proteomischer Datensatz generiert. Zu drei Zeitpunkten wurden im Verlauf der Epileptogenese Proben des Hippocampus (HC) und des parahippocampalen Cortex (PHC) gewonnen und für eine massenspektrometrische Analyse verwendet. Dieser Datensatz soll im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens mittels einem nicht-hypothesengestützten und einem hypothesengestütztem Ansatz näher untersucht werden.

Nicht-hypothesengestützte Datenanalyse

Bioinformatische Auswerteverfahren proteomischer Datensätze könnten dazu beitragen, Zielstrukturen für die Prävention von Epilepsien zu finden (LOEB 2011). Eine derartige Möglichkeit stellt die Durchführung einer gewichteten Netzwerkanalyse dar. Netzwerke sind bereits für Datensätze aus unterschiedlichen Krankheitsgebieten aufgestellt worden, um weitere Informationen über die jeweiligen molekularen und zellulären Veränderungen

zu erhalten. Des Weiteren können hiermit Hinweise auf regulatorische Schlüsselproteine erlangt werden. So wurden zum Beispiel Netzwerkanalysen für die Alzheimer-Krankheit (MILLER et al. 2010), die Huntington-Krankheit (SHIRASAKI et al. 2012) oder für Schizophrenie (DE JONG et al. 2012; REN et al. 2015) durchgeführt. Im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens wird aus den Daten des HC und des PHC je ein gewichtetes Netzwerk aufgestellt. Hierbei bleibt die Zugehörigkeit zur Versuchs- oder Kontrollgruppe zunächst unbeachtet und es werden alle drei Zeitpunkte gemeinsam analysiert. Benutzt wird eine Erweiterung für das Datenanalyseprogramm *R*, das *R*-Paket WGCNA, das von LANGFELDER und HORVATH (2008) entwickelt wurde. Ziel dieser unvoreingenommenen Herangehensweise ist es, Epileptogenese assoziierte Proteingruppen aufzufinden und dadurch neue Hinweise auf mögliche Kandidaten für therapeutische Ansätze zur Epilepsieprävention zu liefern. Des Weiteren wird für die Datensätze eine *Principal-Component-Analyse* durchgeführt, um Proteine zu identifizieren, deren Expressionsprofile sich zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe unterscheiden. Derartige Proteine könnten mögliche Kandidaten als Biomarker der Epileptogenese darstellen.

Hypothesengestützte Datenanalyse

Im zweiten Teil der Arbeit werden die Daten der von Andreas Walker durchgeführten *Pathway-Enrichment-Analyse* unter zwei Schwerpunktfokussierungen untersucht. Die Liste der detektierten biochemischen Reaktionswege wird zum einen auf *pathways* durchsucht, die in Zusammenhang mit der extrazellulären Matrix und deren Interaktion mit den eingebetteten Zellen stehen. Zum anderen werden Reaktionswege ausgewählt, die mit dem funktionellen Bereich Zellstress und Zelltod verknüpft sind. Die Wahl der beiden Schwerpunkte wurde aufgrund von zum Teil bereits bekannter oder vermuteter Beteiligung bei der Epilepsieentstehung getroffen (SOLEMAN et al. 2013; DINGLEDINE et al. 2014). Zusätzlich werden die Expressionsprofile ausgewählter Proteine der detektierten *pathways* mittels *heatmaps* visualisiert und analysiert. Ziel dieser Auswertung ist es, weitere biochemische Reaktionswege aufzufinden, die für die Epilepsieentstehung von Relevanz sein könnten. Hierdurch können tiefere Einblicke in das Zusammenspiel der Veränderungen in den verschiedenen funktionellen Bereichen im Gehirn nach einem epileptogenen Insult gewonnen werden.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Differentielle Proteomanalyse

Für die vorliegende Arbeit diente als Grundlage der proteomische Datensatz, der von Andreas Walker im Rahmen seiner Dissertation am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München generiert wurde. Andreas Walker untersuchte in Zusammenarbeit mit der von Frau Prof. Dr. Deeg geleiteten Arbeitsgruppe am Institut für Tierphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München und mit der von Frau Dr. Hauck geführten Arbeitsgruppe der *Research Unit Protein Science* am Helmholtz-Zentrum München die Veränderungen während der Epileptogenese auf Proteomebene im HC und im PHC. Der hierfür an Ratten durchgeführte Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen Gz. 55.2-1-54-2532-94-11 genehmigt. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden von Andreas Walker in Zusammenarbeit mit Joanna Goc am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München durchgeführt. Im Folgenden werden das Versuchsdesign, der Ablauf der differentiellen Proteomanalyse und der *Pathway-Enrichment-Analyse* kurz beschrieben. Eine ausführliche Darstellung findet sich in der Dissertation von Andreas Walker (WALKER 2016; WALKER et al. 2016). Die weitere von mir durchgeführte Datenauswertung unter dem Fokus extrazelluläre Matrix, Interaktionen von Zellen mit der extrazellulären Matrix und unter dem Schwerpunkt Zellstress und Zelltod, die damit verbundenen immunhistochemischen Färbungen und die Durchführung der Netzwerkanalyse des proteomischen Datensatzes werden umfassend dargelegt.

1.1. Versuchsdesign

Für den Versuch wurde das SE-BLA-Modell nach BRANDT et al. (2003) verwendet. Hierbei wird die Epileptogenese durch einen SE als epileptogenen Insult induziert. Zunächst wurde mittels stereotaktischer Operationstechnik eine Elektrode in die rechte basolaterale Amygdala von weiblichen *Sprague Dawley* Ratten implantiert. Die Elektrode diente sowohl zur Auslösung des SE als auch zur Ableitung des EEG. Nach einer Rekonvaleszenzzeit von sechs Wochen nach Operation wurde bei einem Teil der Tiere (= Post-SE-Tiere) durch 25-minütige Dauerstimulation der basolateralen Amygdala ein sich selbsterhaltender SE induziert. Nach vier Stunden wurde der SE durch die Gabe von Diazepam unterbrochen. Während dieser Zeit erfolgte zur Protokollierung der Anfallsaktivität und zur Typisierung des sich selbsterhaltenden SE eine kontinuierliche

Überwachung der Tiere. Eine Einteilung erfolgte nach BRANDT et al. (2003) in SE Typ I bis III. Die restlichen Tiere (= Kontrolltiere) wurden in gleicher Weise behandelt, erhielten aber nur eine Scheinstimulation. Um die unterschiedlichen Phasen der Epileptogenese abbilden zu können, wurden die Tiere zu drei Zeitpunkten nach Induktion des SE bzw. nach Scheinstimulation euthanasiert. Der erste Zeitpunkt zwei Tage nach SE (2dpSE) spiegelt die frühe Post-Insult-Phase wider. Die Latenzperiode, in der die molekularen und zellulären Veränderungen, ausgelöst durch den Insult, andauern und sich ausbreiten, wird durch den zweiten Zeitpunkt zehn Tage nach SE (10dpSE) abgebildet. Zum dritten Zeitpunkt acht Wochen nach SE (8wpSE) treten bereits spontane epileptische Anfälle auf, es liegt also die chronische Phase vor. Die Tiere des dritten Zeitpunktes wurden 19 Tage lang kontinuierlich Video- und EEG-überwacht, um spontane epileptische Anfälle zu detektieren. Nur Tiere mit mindestens einem spontanen generalisierten Anfall wurden für die weiteren Analysen verwendet. Eine Zusammenfassung des Ablaufs der Experimente ist in Abbildung 4 dargestellt.

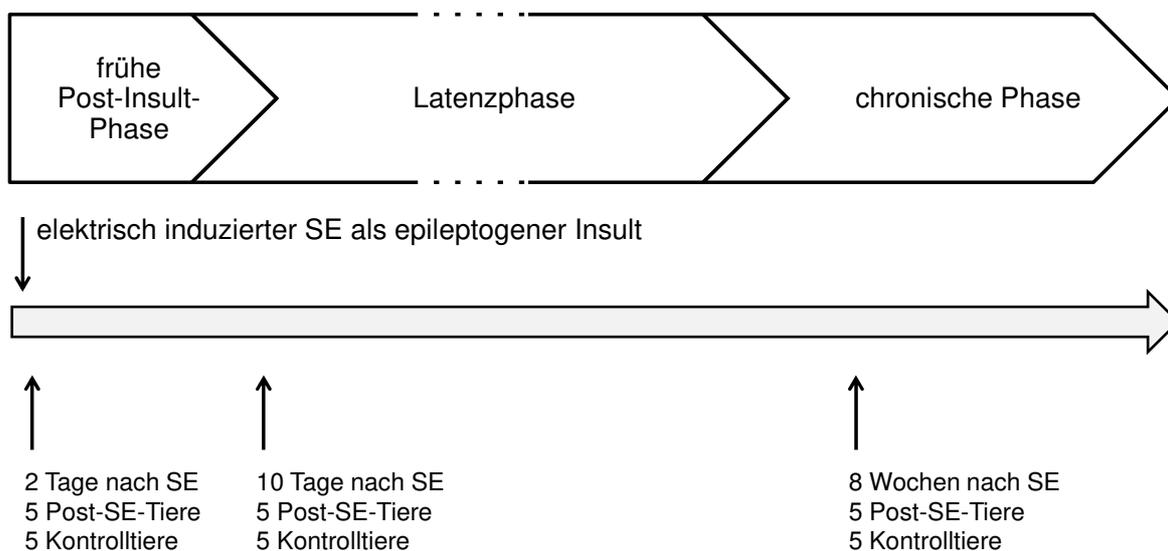


Abbildung 4

Für die massenspektrometrische Analyse wurde Gewebe des HC und des PHC von jeweils fünf Kontroll- und fünf Post-SE-Tieren zu drei Zeitpunkten im Verlauf der Epileptogenese nach Induktion des SE bzw. nach Scheinstimulation verwendet. Abbildung modifiziert nach WALKER (2016).

1.2. Durchführung der differentiellen Proteomanalyse

Die Euthanasie der Tiere und die Probennahme an den drei Zeitpunkten (2dpSE, 10dpSE und 8wpSE) erfolgte am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München. Hierzu wurden zunächst für jede Gehirnhälfte getrennt der HC und der PHC gewonnen. Für den PHC wurden durch Pinzettenschläge der *entorhinale*, *perirhinale* und *posterior-piriforme* Cortex präpariert. Anschließend

wurden die Proben beider Gehirnhälften eines Tieres gepoolt. Die weitere Probenaufbereitung inklusive subzellulärer Auftrennung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Deeg am Institut für Tierphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München. Die anschließende massenspektrometrische Analyse der Proben wurde von der Abteilung für Proteinanalytik des Helmholtz-Zentrums München durchgeführt und erfolgte in Kooperation mit der dort von Frau Dr. Hauck geleiteten Arbeitsgruppe. Es wurde eine LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie)-Analyse nach HAUCK et al. (HAUCK et al. 2010; HAUCK et al. 2012) durchgeführt. Hierbei erfolgte ein FASP-(*filter aided sample preparation*)-Proteinverdau gemäß WISNIEWSKI et al. (2009). Zur Ionisation der Peptide wurde das Nanosprayionisationsverfahren benutzt. Die Progenesis-Software (Version 2.5, Nonlinear Dynamics Limited, Newcastle upon Tyne, UK) diente zur markierungsfreien Quantifizierung der detektierten Peptide. Mit Hilfe des Programmes Mascot (Version 2.4, Matrix Science Ltd., London, UK) erfolgte anschließend die Identifizierung der Peptide durch Abgleich mit den Einträgen in der Datenbank *Ensemble* für *Rattus norvegicus* (http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/, Version 69, 32971 Sequenzen). Als posttranslationale Modifikationen wurden neben einer Carbamidomethylierung auch eine Methioninoxidation und eine Deamidierung von Asparagin und Glutamin berücksichtigt. Zur Quantifizierung eines identifizierten Proteins dienten die diesem Protein zugeordneten *unique peptides*. Die Summe der normalisierten Abundanz aller *unique peptides* eines Proteins ergab dessen kumulative normalisierte Abundanz. Für die weiteren Analysen wurden nur Proteine berücksichtigt, denen mindestens zwei *unique peptides* zugeordnet worden sind. Für den Fall, dass einem identifizierten Protein kein Gensymbol zugeordnet werden konnte, wurde von der Abteilung für Proteinanalytik des Helmholtz-Zentrums München ein Skript für eine ergänzende Gensymbolsuche entwickelt. Dieses umfasste neben *Rat Genome Database* (RGD) Symbolen auch humane Orthologe (HUGO *Gene Nomenclature Comittee*-(HGNC)-Symbole). Für Proteine, denen auch durch dieses Skript kein Gensymbol zugeordnet werden konnte, recherchierte Andreas Walker an Hand der spezifischen Proteinsequenz entsprechende Gensymbole. Alle folgenden Analysen basierten auf den entsprechend zugeordneten Gensymbolen.

1.3. **Pathway-Enrichment-Analyse**

Ein *pathway* ist definiert als eine Anzahl an biochemischen Reaktionen (KARP 2001). Diese sind derart verknüpft, dass das Produkt der einen Reaktion ein Bestandteil der folgenden Reaktion ist (KARP 2001). Andreas Walker führte mittels zweier web-basierter Programme eine *Pathway-Enrichment-Analyse* durch, um während der Epileptogenese signifikant veränderte biochemische Reaktionswege zu detektieren. Folgende Programme

wurden für die Untersuchung benutzt: (i) *Genomatix* (Genomatix Software GmbH, München, Deutschland) und (ii) *ConsensusPathDB* (öffentlich zugängliche Meta-Datenbank (KAMBUROV et al. 2011)). Hierfür wurden zunächst die Expressionsdaten der identifizierten Proteine statistisch ausgewertet. Für jedes Protein wurde der *fold change* (Quotient aus dem Mittelwert der Abundanz der Post-SE-Tiere und dem Mittelwert der Abundanz der Kontrolltiere) berechnet, der das relative Verhältnis der durchschnittlichen Abundanz der Post-SE-Tiere und der Kontrolltiere widerspiegelt. Der *fold change* gibt demnach die Veränderung der Expression eines Proteins bei den Post-SE-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren an. Durch einen *Student's t-test* wurde ebenfalls für jedes Protein das Signifikanzniveau (p-Wert) dieser Veränderung berechnet. Für die *Pathway-Analyse* wurden alle Proteine verwendet, die einen *fold change* $\geq 1,5$ und einen p-Wert $< 0,05$ aufwiesen. Die Analyse wurde für alle drei Zeitpunkte getrennt jeweils für den HC und den PHC durchgeführt, nachdem alle Gensymbole in humane Orthologe überführt worden sind. Als Hintergrund diente die Liste aller identifizierten Proteine zum jeweiligen Zeitpunkt. Die weitere Betrachtung umfasste nur *pathways*, denen mindestens zwei Proteine zugeordnet werden konnten und für die die statistische Auswertung einen p-Wert $< 0,05$ ergab.

1.4. Paraffinfixierung und Aufbereitung der Proben

Zu jedem der drei Zeitpunkte (2dpSE, 10dpSE und 8wpSE) standen weitere Kontroll- und Post-SE-Tiere für immunhistochemische Färbungen zur Verfügung. Hierzu erfolgte eine Euthanasie dieser Tiere. Die Gehirne wurden nach Präparation und Fixation in 4%igem Paraformaldehyd für drei Tage jeweils in vier Blöcke zerteilt. Diese Blöcke wurden im Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München durch Paraffineinbettung nachhaltig fixiert.

Das Schneiden der Blöcke für die immunhistochemischen Färbungen erfolgte am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München. Hierzu wurden mit einem Rotationsmikrotom (1165/Rotocut, Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland) 2 μm dicke Schnitte angefertigt und anschließend im 40 °C warmen Wasserbad (Typ 24900, Medax Nagel GmbH & Co KG, Neumünster, Deutschland) auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Dann erfolgte eine Trocknungsphase für 24 Stunden bei 38 °C.

2. Nicht-hypothesengestützte Datenanalyse

Für alle bioinformatischen Berechnungen wurde das frei verfügbare Datenanalyseprogramm *R* (<https://www.r-project.org/>) verwendet. Für *R* können für die jeweilige Fragestellung entsprechende Erweiterungen (*R*-Pakete) ebenfalls frei verfügbar heruntergeladen werden.

2.1. Aufbereitung des Datensatzes

Die gewichtete Netzwerkanalyse wurde in Kooperation mit Frau Androsova aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Krause am *Bioinformatics Core* der Universität Luxemburg durchgeführt. Hierzu dienten als Grundlage die Originaldaten der von Andreas Walker durchgeführten Proteomstudie. Die Expressionsdaten der identifizierten Proteine wurden mittels einer Arkussinus-Transformation normalisiert und am Median zentriert, nachdem Proteine mit fehlenden Werten (*missing values*) entfernt worden waren. Durch diese Art der Normalisierung können im Gegensatz zu einer logarithmischen Transformierung auch 0-Werte (Abundanz = 0) beibehalten werden. Zur Bestimmung der differentiell exprimierten Proteine kam die empirische Bayes-Methode in der *R*-Erweiterung „limma“ zur Anwendung (SMYTH 2004). Proteine mit einem *fold change* $\geq 1,5$ (Aufregulation bei Post-SE-Tieren) oder mit einem *fold change* $\leq 0,67$ (Herunterregulation bei Post-SE-Tieren) und einem p-Wert $< 0,05$ wurden als differentiell exprimiert definiert. Zur visuellen Verdeutlichung der Verteilung der differentiell exprimierten Proteine wurden Barplots und Venn-Diagramme angefertigt. Für erstere wurde ein entsprechender *R*-Code (*barplot function*) benutzt, der im Anhang aufgeführt ist. Die Venn-Diagramme, die die Überlappungen der differentiell exprimierten Proteine zwischen den untersuchten Zeitpunkten darstellen, wurden mit Hilfe eines frei verfügbaren Online-Tools (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) erstellt.

Als Input für die gewichtete Netzwerkanalyse wurden die Proteine verwendet, die zu allen drei Zeitpunkten in einem Gewebe mit mindestens zwei *unique peptides* identifiziert wurden. Diese Proteine werden im Folgenden als *common proteins* bezeichnet. Die den identifizierten Proteinen zugeordneten Gensymbole dienten als Basis, um die *common proteins* aus den Originaldaten herausfiltern zu können. Da in den Originallisten einige Gensymbole auch doppelt oder dreifach zugeordnet wurden, mussten diese Fälle näher analysiert werden, um eine eindeutige Bestimmung der *common proteins* sicherzustellen. Grundsätzlich spiegeln mehrfach zugeordnete Gensymbole verschiedene Transkripte eines Gens oder Isoformen eines Proteins wider. Es wurde festgelegt, für die Netzwerkanalyse jedes Gen nur einmal zu berücksichtigen. Deswegen wurde im Falle einer Mehrfachnennung jeweils das Gensymbol mit der höchsten Anzahl an *unique peptides used for quantification* zur Bestimmung der *common proteins* ausgewählt. Die

weiteren Nennungen erhielten einen Zusatz zum Gensymbol (2dpSE und 10dpSE: „_2“ bzw. „_3“; 8wpSE: „_4“ bzw. „_5“), um eine eindeutige Filterung nach Gensymbol zu ermöglichen.

2.2. **Principal-Component-Analyse**

Nach Normalisierung der Expressionsdaten wurden die Datensätze des HC und des PHC mittels einer *Principal-Component-Analyse* genauer untersucht. Durch eine derartige Analyse kann die Dimension eines Datensatzes unter Beibehaltung der meisten Varianz reduziert werden (JOLLIFFE 2002). Hierzu werden im Datensatz Hauptkomponenten (*Principal Components*, Dimensionen) identifiziert, entlang derer die Varianz maximal ist (RINGNÉR 2008). Diese Hauptkomponenten stellen nicht miteinander korrelierende Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen dar (RINGNÉR 2008). Durch Projektion der Proben auf die ersten zwei (zweidimensionale Darstellung) oder die ersten drei (dreidimensionale Darstellung) Hauptkomponenten können auf grafische Weise Cluster im Datensatz erkannt werden (RINGNÉR 2008). Außerdem können die Beiträge (*loadings*) jeder Variablen zu einer Hauptkomponente bestimmt werden (IVOSEV et al. 2008).

Die *Principal-Component-Analyse* wurde für jeden Zeitpunkt sowohl für den HC als auch für den PHC mit allen zum jeweiligen Zeitpunkt identifizierten Proteinen durchgeführt. Es wurden die *R*-Pakete „FactoMineR“ (LÉ et al. 2008) und „factoextra“ (KASSAMBARA 2015) verwendet. Das entsprechende Skript ist im Anhang aufgelistet. Um Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen der Post-SE- und Kontrolltiere analysieren zu können, wurden jeweils die zehn Proteine mit den größten Beiträgen zur ersten Hauptkomponente (= *most contributing proteins*) näher untersucht. Als Maß hierfür gilt die Korrelation des Expressionsprofils eines Proteins mit der ersten Hauptkomponente.

2.3. **Gewichtete Netzwerkanalyse**

Zur Aufstellung der Netzwerke für den HC und PHC wurde die von LANGFELDER und HORVATH (2008) entwickelte *R*-Erweiterung, das *R*-Paket „WGCNA“ (*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*), verwendet. Dieses Paket umfasst alle nötigen Berechnungsschritte, um ein gewichtetes Netzwerk konstruieren zu können. Das verwendete Skript ist im Anhang aufgeführt. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, jeweils für den HC und den PHC durchgeführt.

2.3.1. Netzwerkkonstruktion und Moduldetektion

Als erster Schritt wurde der proteomische Datensatz in eine $n \times m$ Matrix überführt, in der die Reihen den Proteinen und die Spalten den Messungen pro Protein entsprechen. Pro Protein existieren 30 Messungen (15 von Kontrolltieren und 15 von Post-SE-Tieren), da alle drei Zeitpunkte gemeinsam betrachtet werden. Hiervon ausgehend wurde als Grundlage für das Netzwerk eine Korrelationsmatrix durch Berechnung der paarweisen Spearman-Korrelation zwischen den Expressionsprofilen aller *common proteins* bestimmt. Mittels einer Potenzadjazenzfunktion und einem weichen Grenzwert $\beta = 6$ wurde die Korrelationsmatrix in eine gewichtete Adjazenzmatrix transformiert. Diese Matrix enthält die Information, ob und wenn ja, wie zwei Proteine miteinander verknüpft sind, wodurch das Netzwerk aufgestellt werden konnte. Mit Hilfe der Funktion *fundamentalNetworkConcepts* wurden die topologischen Eigenschaften wie Dichte, Zentralisierung und Heterogenität des Netzwerkes bestimmt.

Als Maß zur Identifikation von Modulen im Netzwerk wurde die Unähnlichkeit der topologischen Überlappung (*topological overlap dissimilarity*) benutzt. Diese wurde mit einer hierarchischen Clustermethode (*dynamic branch cut*) kombiniert. Im entstehenden Netzwerk dendrogramm entsprechen die Äste den detektierbaren Clustern. Der horizontale Grenzwert zur Zusammenlegung von Clustern zu Modulen wurde mit den Parametern *minClusterSize* = 20 und *deepsplit* = 2 gewählt. Die topologische Überlappung gibt die relative Vernetzung von zwei Proteinen an, sodass die detektierten Module aus Proteinen mit ähnlichem Expressionsprofilen bestehen.

Zur Visualisierung des Netzwerkes wurden die Daten in das Programm *Cytoscape* (<http://www.cytoscape.org/>, SHANNON et al. (2003)) exportiert.

2.3.2. Identifizierung von Epileptogenese assoziierten Modulen

Um Module herauszufiltern, die signifikant mit der Epilepsieentstehung korrelieren, wurden zwei weitere Messungen durchgeführt. Zunächst wurde die *protein significance* bestimmt. Hierzu wurde die Korrelation zwischen den Expressionsprofilen jedes Proteins mit den Expressionsprofilen der Post-SE-Tiere errechnet. Die Zusammenrechnung der Korrelationen der Proteine eines Moduls ergab den Gesamtwert für das jeweilige Modul. Als weitere Messung erfolgte eine Regressionsanalyse, die *module-trait relationship* Berechnung. Zu diesem Zweck wurden die Messergebnisse in die von Kontrolltieren und in die von Post-SE-Tieren aufgetrennt und die Gruppenzugehörigkeit der Tiere in einer Matrix verarbeitet. Damit wurde die Spearman-Korrelation zwischen den Modulen, zusammengefasst als erste Hauptkomponente (Moduleigenen, ME), und dem Status „Post-SE-Tier“ zum jeweiligen Zeitpunkt berechnet. Für jede Korrelation wurde das Signifikanzniveau (p-Wert) bestimmt.

2.3.3. Intramodulare Konnektivität und funktionelle Annotation

Die einzelnen Module wurden hinsichtlich ihrer Konnektivität untersucht. Hierbei wurden die dem jeweiligen Modul zugeordneten Proteine nach ihrer intramodularen Konnektivität gereiht. So erhält das Protein, das im jeweiligen Modul die meisten Verbindungen zu anderen Proteinen besitzt, die Konnektivität 1. Alle anderen Proteine besitzen dann eine Konnektivität < 1 . Die am stärksten verknüpften Proteine in einem Modul werden im Folgenden als intramodulare *Hub*-Proteine bezeichnet. Diese *Hub*-Proteine können einen Hinweis auf die biologische Funktion eines Moduls geben (LANGFELDER et al. 2013). Die biologische Bedeutung der identifizierten *Hub*-Proteine wurde mittels einer Schlagwortsuche in der Online-Bibliothek *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) und durch Recherche in der Online-Proteindatenbank *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>) nachgeschlagen. Des Weiteren wurde eine *Pathway-Enrichment*-Analyse für jedes Modul mittels des Programmes *Ingenuity® Pathways Analysis* (IPA, RACINE et al. (2011)) durchgeführt, um die biologische Funktion der Module näher untersuchen zu können. Als Referenzliste (Hintergrund) wurden alle in IPA hinterlegten Gene benutzt (*Ingenuity Knowledge Base*). Für die weitere Analyse wurden jeweils die ersten fünf *pathways* eines Moduls mit den kleinsten p-Werten (Signifikanzniveau) betrachtet.

2.3.4. Validierung der Ergebnisse

Um die Ergebnisse der gewichteten Netzwerkanalyse einordnen und überprüfen zu können, wurde unter Verwendung eines öffentlich zugänglichen proteomischen Datensatzes ein weiteres gewichtetes Netzwerk aufgestellt. BITSIKA et al. (2016) generierten den Datensatz unter Verwendung eines chronischen Epilepsiemodells in der Maus. Es wurde ein chemisch induziertes SE-Modell benutzt. Hierzu wurde einem Teil der Tiere Kainsäure intrahippocampal injiziert (= Versuchstiere). Die anderen Tiere erhielten eine Injektion mit Kochsalzlösung (= Kontrolltiere). Um die verschiedenen Phasen der Epileptogenese abbilden zu können, wurden die Tiere zu drei Zeitpunkten nach Injektion euthanasiert: (i) ein Tag nach Injektion (1dpi), (ii) 3dpi und (iii) 30dpi. Anschließend wurde der injizierte HC jedes Tieres präpariert und für die weitere LC-MS/MS-Analyse aufbereitet. Insgesamt wurden drei verschiedene Ansätze zur Quantifizierung der Proteine durchgeführt und die Resultate zu einem Datensatz zusammengerechnet.

Das gewichtete Netzwerk für diesen Datensatz wurde nach oben beschriebenem Vorgehen aufgestellt. Als weicher Grenzwert wurde $\beta = 6$ gewählt. Nach Moduldetektion wurden folgende Messungen durchgeführt: (i) *protein significance*, (ii) *module-trait relationship*, (iii) Bestimmung der intramodularen *Hub*-Proteine und (iv) *Pathway-Enrichment*-Analyse der Module mittels IPA.

Außerdem wurde die Überlappung zwischen dem von Andreas Walker generierten Datensatz für den HC und dem Datensatz von Bitsika bestimmt.

3. Hypothesengestützte Datenanalyse

3.1. Auswertung der *Pathway-Enrichment-Analyse*

Die Bewertung der Ergebnisse der *Pathway-Enrichment-Analyse* wurde unter zwei Schwerpunktfokussierungen durchgeführt: (i) extrazelluläre Matrix und deren Interaktion mit anderen Zellen sowie (ii) Zellstress und Zelltod. Hierzu wurden die Funktionen der jeweiligen biochemischen Reaktionswege recherchiert und diese einem der oben genannten Schwerpunkte zugeordnet. Die Recherche erfolgte mittels Schlagwortsuche in der Online-Bibliothek *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Als Schlagwörter wurden jeweils folgende Begriffe zum Namen des *pathway* hinzugefügt: (i) *function*, (ii) *brain*, (iii) *epilepsy* und (iv) *epileptogenesis*. Weitere Informationen konnten auf der Homepage der Quelle des jeweiligen *pathways* gefunden werden.

Für ausgewählte Proteine wurden die Expressionsdaten zu den drei Zeitpunkten mit Hilfe von *heatmaps* visualisiert. Grundsätzlich wird hierbei eine Matrix, deren Reihen bestimmten Messwerten, wie zum Beispiel verschiedenen Proteinen, und deren Spalten den Messergebnissen dieser Messwerte entsprechen, transformiert, um komplexe Zusammenhänge sichtbar machen zu können (KEY 2012). Demnach wird in einem ersten Schritt eine Neuordnung der Spalten und Reihen vorgenommen, sodass Reihen und Spalten mit einem ähnlichen Profil näher beieinander liegen (Clustern) (KEY 2012). Im zweiten Schritt wird durch Farbskalierung jedes Datenpunktes der Matrix eine grafische Visualisierung der Zusammenhangsmuster der Ausgangsmatrix erreicht (KEY 2012). Zur Erstellung der *heatmaps* wurde die Funktion *heatmap.2* der *R*-Erweiterung „*gplots*“ (<https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>) verwendet. Als Grundlage wurden die tierindividuellen *fold changes* berechnet und durch eine logarithmische Transformierung (\log_2) normalisiert. Diese *fold changes* geben hierbei das Verhältnis der Proteinabundanz des jeweiligen Tieres zum Mittelwert der Proteinabundanz aller Kontrolltiere zum jeweiligen Zeitpunkt an. Es erfolgte nur ein Clustern der Proteinprofile, die den Reihen der Matrix entsprechen. Zusätzlich wurden die Kontroll- und Post-SE-Tiere chronologisch jeweils von eins bis 15 nummeriert. Außerdem sind die nicht- \log_2 -transformierten *fold changes* in jeder Zelle der *heatmaps* angegeben. Proteine mit fehlenden Werten (*missing values*) und/oder 0-Werten wurden von der Analyse ausgeschlossen.

3.2. Immunhistochemie

Zur Validierung der Expressionsdaten des proteomischen Datensatzes wurden zwei immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Für den Nachweis der zwei ausgewählten Proteine *Integrin subunit alpha 5* (ITGA5) und *Fermitin family number 2* (FERMT2) standen noch keine etablierten Färbeprotokolle zur Verfügung. Diese wurden im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens erarbeitet. Hierzu wurde ein bestehendes Standardprotokoll als Grundlage verwendet und für die ausgewählten Proteine optimiert. Die verwendeten Protokolle inklusive der eingesetzten Lösungen sind im Anhang aufgeführt. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 3 ersichtlich.

Zum Einsatz kam die Methode der indirekten Antigensichtbarmachung. Hierbei wird das Zielantigen zunächst mit einem spezifischen Primärantikörper detektiert. An diesen bindet der auf den Primärantikörper zugeschnittene sekundäre Antikörper. Letzterer ist mit einem Enzym markiert (Meerettich-Peroxidase), das das im letzten Färbeschritt zugegebene Substrat (3,3'-Diaminobenzidin) umsetzt. So kann der Komplex aus Antigen, Primärantikörper und sekundärem Antikörper sichtbar gemacht werden.

3.2.1. *Integrin subunit alpha 5*

Die immunhistochemische Färbung wurde mit in Paraffin eingebetteten Gehirnschnitten durchgeführt. Es wurden Schnitte von sieben Kontroll- und sieben Post-SE-Tieren des ersten und zweiten Zeitpunktes zwei bzw. zehn Tage nach SE ausgewählt, die einer Gehirnregion caudal von Bregma -4,44 mm entsprechen. Alle Inkubationsschritte (Proteinblock, primärer Antikörper, sekundärer Antikörper und Straptavidin) wurden in einer feuchten Kammer auf liegenden Objektträgern durchgeführt. Hierdurch konnte eine konstante Luftfeuchtigkeit gewährleistet werden. Alle Waschschriffe erfolgten in Glasküvetten. Die Entparaffinierung der Schnitte wurde über mehrere Stufen durchgeführt, die jeweils drei Minuten dauerten. Zunächst wurden die Schnitte dreimal in Xylol und dann in einer Küvette mit 50 % 100%igem Ethanol und 50 % Xylol verbracht. Anschließend folgte zur Rehydratisierung der Schnitte eine absteigende Alkoholreihe (95%iger, 70%iger und 50%iger Ethanol). Nach einem Spülschritt unter fließendem Leitungswasser für fünf Minuten erfolgte noch ein Waschschriff mit Aqua dest. Als nächstes wurde die Demaskierung der Antigene durchgeführt. Dieser Schriff diente zur Verbesserung der Detektion des Antigens durch den primären Antikörper. Hierzu wurden die Schnitte für 20 Minuten in Natrium-Citrat-Puffer (pH 6) in der Mikrowelle gekocht. Durch diese Behandlung können durch Paraformaldehyd induzierte Gewebebrücken zwischen Proteinen wieder gelöst werden, sodass die Antigene für den sekundären Antikörper wieder zugänglich sind (SHI et al. 1991). Nach Abkühlung und drei Waschschriffen mit Tris-gepufferter Saline (TBS) mit 0,05 % Tween® 20 (TBS-T) wurde

durch Inkubation mit 3%iger Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Lösung die endogene Peroxidase inaktiviert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurden die Schnitte mit je 200 µl je Objektträger Blockinglösung (0,25 % Casein in TBS) bedeckt und für zehn Minuten inkubiert. Dadurch können unspezifische Bindungen des primären Antikörpers reduziert werden. Dann wurde über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem primären Antikörper zur Detektion von ITGA5 durchgeführt. Hierbei handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper, der durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt worden ist. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper für 30 Minuten. Überschüssiger Antikörper wurde durch drei Waschschrritte mit TBS-T entfernt. Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten mit Meerrettichperoxidase-markiertem Streptavidin bedeckt. Dieser Schritt diente der Verstärkung der Farbreaktion. Nach drei abschließenden Waschschrritten mit TBS-T wurden die Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexe durch Verbringen in eine 3,3'-Diaminobenzidin-Reaktionslösung sichtbar gemacht. Nach acht Minuten wurde die Reaktion durch Verbringen der Schnitte in Aqua bidest. gestoppt. Zur Entfernung überschüssiger 3,3'-Diaminobenzidin-Reaktionslösung wurden noch ein Waschschrtritt in TBS und ein Waschschrtritt in Aqua dest. durchgeführt. Die Schnitte wurden nach Lufttrocknung über Nacht für eine Minute in Roti®/Histol verbracht und anschließend mit Eindeckmedium eingedeckt.

3.2.2. *Fermitin family number 2*

Der immunhistochemische Nachweis von FERMT2 wurde ebenfalls mit in Paraffin-eingebetteten Gehirnschnitten durchgeführt. Es wurden Schnitte von sieben Kontroll- und sechs Post-SE-Tieren des zweiten Zeitpunktes zehn Tage nach SE mit einer Gehirnregion caudal von Bregma -3,24 mm ausgewählt. Die Färbung wurde analog des oben beschriebenen Protokolls durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler Anti-FERMT2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Der sekundäre Antikörper war entsprechend ein biotinylierter Esel-Anti-Maus-Antikörper. Die Visualisierung der Antikörperkomplexe erfolgte in einer 3,3'-Diaminobenzidin-Reaktionslösung für sieben Minuten.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Produktnummer	Verdünnung
Anti-ITGA5	Kaninchen	Merck Millipore	AB1928	1:1000
Anti-FERMT2	Maus	LSBio Life Span Biosciences Inc.	LS-C114603	1:1000
Ziege-Anti- Kaninchen, biotinyliert	Ziege	Jackson Immunoresearch	11-065.003	1:500
Esel-Anti-Maus, biotinyliert	Esel	Jackson Immunoresearch	715-065-151	1:500

Für die Auswertung und Interpretation der immunhistochemischen Färbungen wurden Aufnahmen der entsprechenden Gehirnregionen (HC und PHC) angefertigt. Hierzu wurde ein Lichtmikroskop (Olympus BH-2, Japan) mit angeschlossener Kamera (Zeiss AxioCam Mrc, Göttingen, Deutschland) und die Bildanalysesoftware KS 400 (Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet.

V. ERGEBNISSE

1. Resultate der differentiellen Proteomanalyse

Ziel der von Andreas Walker im Rahmen seiner Dissertation durchgeführten differentiellen Proteomanalyse mit dem Schwerpunkt auf inflammatorische Prozesse war es, die Veränderungen auf molekularer Ebene während der Epilepsieentstehung genauer zu untersuchen. Hierfür wurde Gewebe zweier verschiedener Gehirnregionen (HC und PHC) massenspektrometrisch zu drei Zeitpunkten (2dpSE, 10dpSE und 8wpSE) im Verlauf der Epileptogenese analysiert. Diese drei Zeitpunkte entsprechen den drei Phasen der Epileptogenese, der frühen Post-Insult-Phase, der Latenzphase und der chronischen Phase. Für den Bereich des HC konnten zu den Zeitpunkten zwei und zehn Tage nach SE 1851 sowie zum Zeitpunkt acht Wochen nach SE 1728 Proteine identifiziert werden. Für den PHC wurden zu den ersten zwei Zeitpunkten 1803 und zum dritten Zeitpunkt 1966 Proteine detektiert.

2. Resultate der nicht-hypothesengestützten Datenanalyse

Insgesamt konnten durch die massenspektrometrische Analyse für den HC 2653 und für den PHC 2394 Proteine zu mindestens einem Zeitpunkt identifiziert werden. Von diesen Proteinen konnten für die Region des HC 1337 Proteine gefiltert werden, die an allen drei Zeitpunkten detektiert wurden (*common proteins*). Für den PHC ergaben sich 1371 *common proteins*. Als Überlappung zwischen den beiden untersuchten Gehirnregionen wurden 2125 Proteine festgestellt, von denen 1125 zu allen drei Zeitpunkten identifiziert wurden. Im Zuge der Normalisierung der Originaldaten des proteomischen Datensatzes wurden die Expressionsdaten des Proteins *GLI pathogenesis-related 2* (GLIPR2) als Ausreißer identifiziert und von allen weiteren Analysen ausgeschlossen.

Die Bestimmung der zwischen den Tiergruppen differentiell exprimierten Proteine ergab für den HC zwei Tage nach SE 121, zehn Tage nach SE 276 und acht Wochen nach SE 14 Proteine (siehe Abbildung 5a). Hiervon waren zum ersten Zeitpunkt 55 Proteine bei den Post-SE-Tieren auf- und 66 Proteine herunterreguliert. Am zweiten Zeitpunkt konnte für 156 Proteine eine Überexpression und für 120 Proteine eine verminderte Expression bei den Post-SE-Tieren festgestellt werden. In der chronischen Phase der Epileptogenese acht Wochen nach SE waren von 14 differentiell exprimierten Proteinen elf auf- und drei herunterreguliert. Für die Gehirnregion des PHC ergaben sich zwei Tage nach SE 218, zehn Tage nach SE 419 und acht Wochen nach SE 223 Proteine, die differentiell exprimiert waren (siehe Abbildung 5b). Bei der Betrachtung der Regulation dieser

Proteine ergab sich folgendes Muster: (i) 2dpSE: 139 Proteine auf- und 79 Proteine herunterreguliert, (ii) 10dpSE: 233 Proteine auf- und 186 Proteine herunterreguliert und (iii) 8wpSE: 128 Proteine auf- und 95 Proteine herunterreguliert. In Abbildung 5c ist die Überlappung der differentiell exprimierten Proteine zwischen den Zeitpunkten für den HC dargestellt. Das entsprechende Ergebnis für den PHC zeigt Abbildung 5d. Demnach konnten für den HC vier und für den PHC 23 differentiell exprimierte Proteine festgestellt werden, die zu allen drei Zeitpunkten identifiziert wurden. Die Überschneidung zwischen der frühen Post-Insult-Phase und der Latenzphase betrug im HC 43 und im PHC 129 Proteine. Drei Proteine im HC und 41 Proteine im PHC zeigten ein differentielles Regulationsmuster während der Latenzphase und während der chronischen Phase. Schließlich konnte für den HC kein Protein festgestellt werden, das sowohl zwei Tage nach SE als auch acht Wochen nach SE differentiell exprimiert gewesen wäre. Im PHC erfüllten diese Bedingung sechs Proteine.

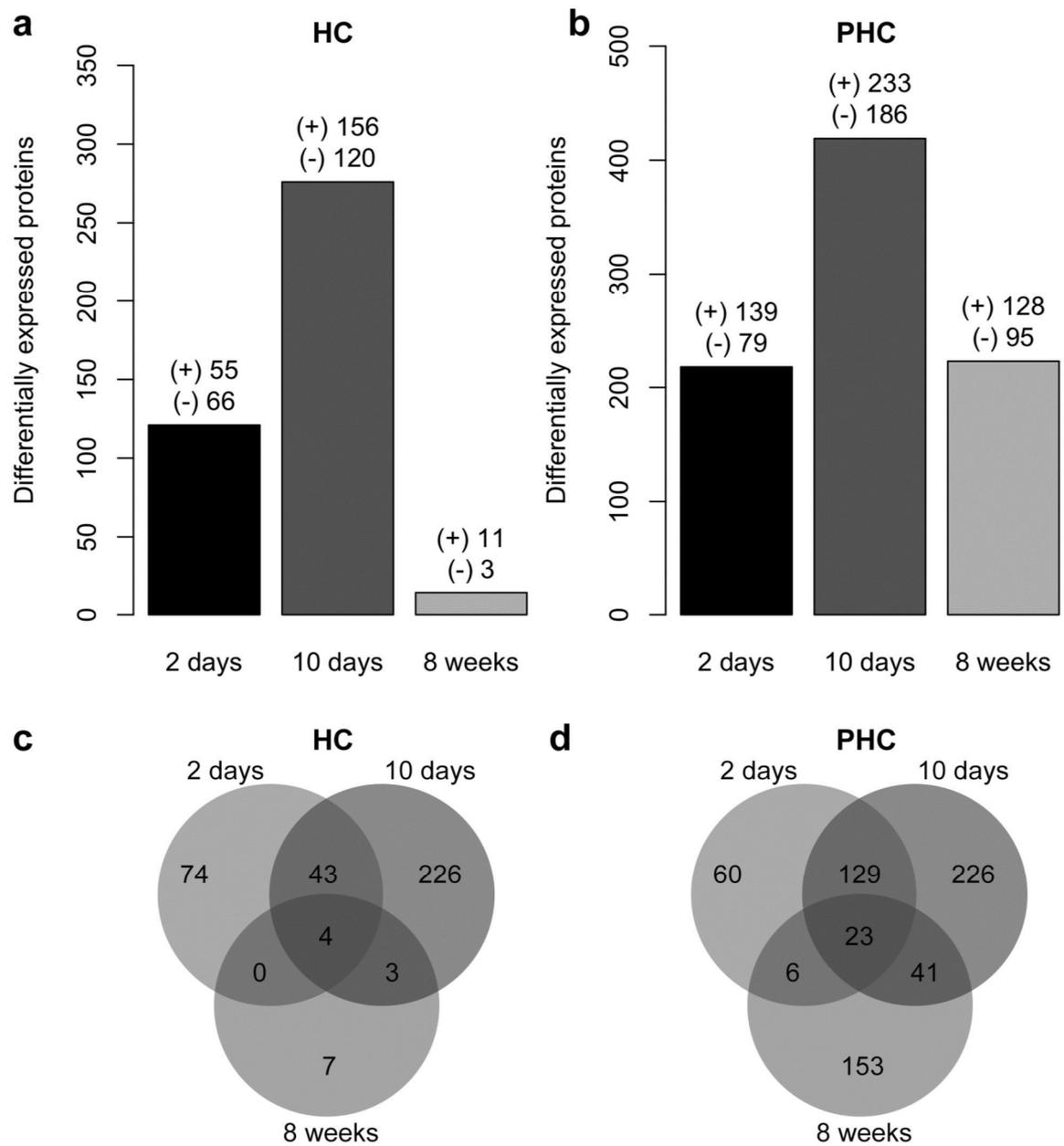


Abbildung 5

Die differentiell exprimierten Proteine sind für den HC in (a) und für den PHC in (b) dargestellt. Das Pluszeichen (+) indiziert eine Aufregulation, das Minuszeichen (-) eine Herunterregulation bei den Post-SE-Tieren. Die Überlappung der differentiell exprimierten Proteine zwischen den Zeitpunkten ist für den HC in (c) und für den PHC in (d) verdeutlicht.

2.1. Ergebnisse der *Principal-Component-Analyse*

Der Fokus der Auswertung der *Principal-Component-Analyse* des Datensatzes lag auf der Betrachtung der ersten Hauptkomponenten (Dimension 1), die die meiste Varianz zwischen den einzelnen Proben widerspiegelt. Das Ergebnis der *Principal-Component-Analyse* ist in Abbildung 6 dargestellt. Grundsätzlich kann für den Datensatz des HC zwei und zehn Tage nach SE eine Clusterbildung der Datenpunkte entlang der ersten Hauptkomponente beobachtet werden, jedoch nicht während der chronischen Phase acht Wochen nach SE. Dagegen kann für den PHC eine Clusterbildung zu allen drei Zeitpunkten festgestellt werden.

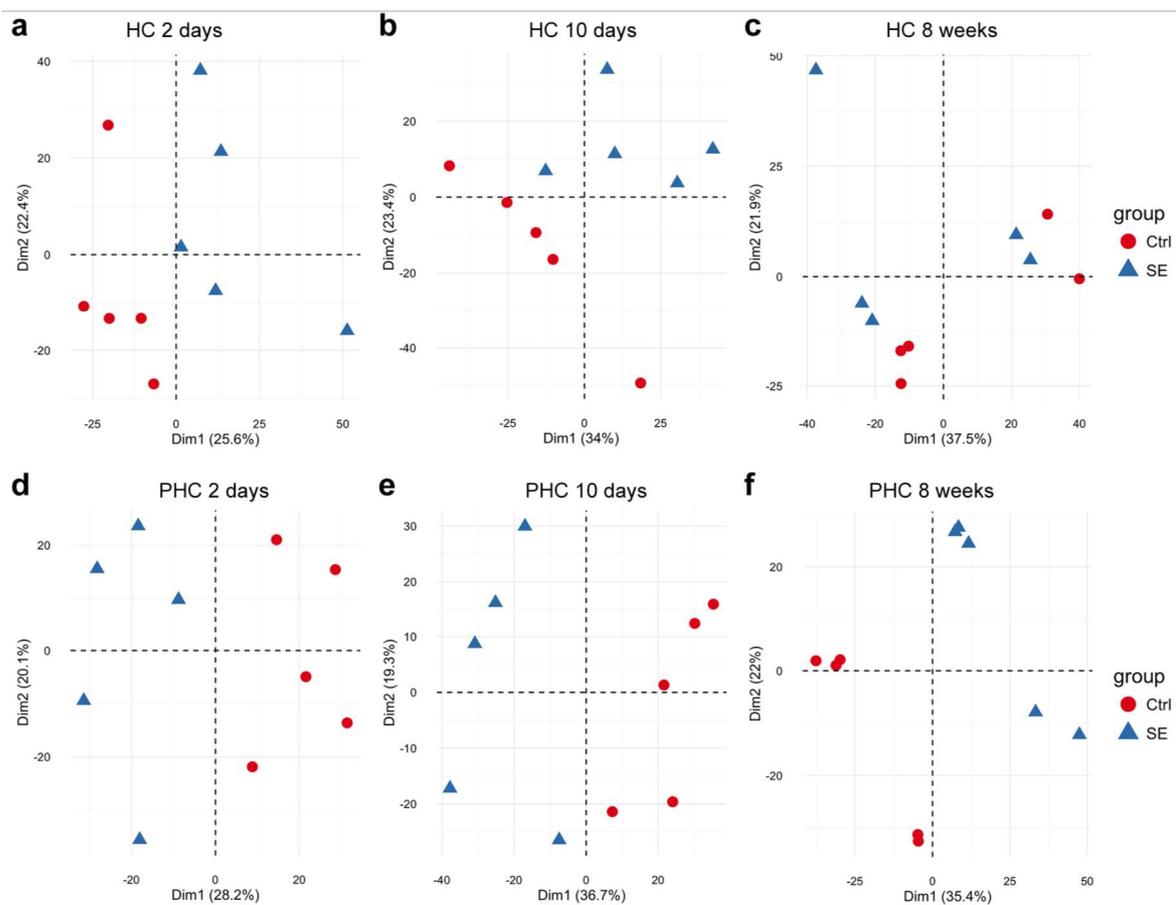


Abbildung 6

Die *Principal-Component-Analyse* wurde für jeden Zeitpunkt für den HC und den PHC mit allen zum jeweiligen Zeitpunkt im jeweiligen Gewebe identifizierten Proteinen durchgeführt. Die Kontrolltiere (Ctrl) sind mit einem Dreieck und die Post-SE-Tiere (SE) mit einem Punkt dargestellt. Die Prozentangaben an den y-Achsen geben die in der ersten Hauptkomponente (Dimension (Dim)1) enthaltene Varianz wieder. Entsprechendes gilt für die x-Achsen und Dim 2. (a) HC zwei Tage nach SE, (b) HC zehn Tage nach SE, (c) HC acht Wochen nach SE, (d) PHC zwei Tage nach SE, (e) PHC zehn Tage nach SE, (f) PHC acht Wochen nach SE.

Die zehn jeweils am stärksten mit der Dimension 1 korrelierenden Proteine, die demnach am stärksten zur Varianz entlang der ersten Hauptkomponente beitragen, sind für den HC in Tabelle 4 und für den PHC in Tabelle 5 dargestellt. Darunter sind differentiell exprimierte Proteine zu finden. Um die Listen nach geeigneten Kandidaten als Biomarker

der Epileptogenese zu filtern, wurden alle Proteine mit einer mindestens 1,5-fachen, signifikanten Aufregulation bei den Post-SE-Tieren näher betrachtet. Für den HC zeigten die Proteine *CD151 molecule* (CD151), *Mannose-P-dolichol utilization defect 1* (MPDU1) und *Clusterin* (CLU) in der frühen Post-Insult-Phase eine signifikante Überexpression. In der Latenzphase (10dpSE) wiesen die Proteine *Ectonucleosid triphosphate diphosphohydrolase 1* (ENTPD1) und *Plexin B2* (PLXNB2) einen signifikanten *fold change* von 2,7 bzw. 2,44 auf. In der chronischen Phase acht Wochen nach SE war im HC kein differentiell exprimiertes Protein unter den zehn am meisten zur ersten Hauptkomponente beitragenden Proteinen.

Bei den zehn am stärksten mit der ersten Hauptkomponente korrelierenden Proteinen für den PHC waren zwei Tage nach SE keine signifikant aufregulierten Proteine enthalten. Unter den zehn am meisten zur Dimension 1 beitragenden Proteinen in der Latenzphase zeigte nur *Annexin A3* (ANXA3) eine signifikante Induktion (*fold change* 10,38). Während der chronischen Phase erfüllten nur die folgenden vier Top-Ten-Proteine die Bedingung einer mindestens 1,5fachen, signifikanten Überexpression: (i) *ATP synthase H+ transporting mitochondrial Fo complex, subunit F2* (ATP5J2), (ii) *Glutathione S-transferase alpha 1* (GSTA1), (iii) *Proteasome subunit beta 3* (PSMB3) und (iv) *Purine nucleoside phosphorylase* (PNP).

Tabelle 4: Die zehn am stärksten zur ersten Hauptkomponente beitragenden Proteine im HC

Gensymbol	Protein	p-Wert	fold change
2 Tage nach SE			
<i>Cd151</i>	CD151 molecule (Raph blood group)	0,016	1,89
<i>Gprc5b</i>	G protein-coupled receptor, class C, group 5, member B	0,052	1,61
<i>Slc25a4</i>	Solute carrier family 25 member 4	0,074	1,23
<i>Mpdu1</i>	Mannose-P-dolichol utilization defect 1	0,000	1,73
<i>Slc25a3</i>	Solute carrier family 25 member 3	0,340	1,12
<i>Sfxn3</i>	Sideroflexin 3	0,099	1,17
<i>Lamp1</i>	Lysosomal-associated membrane protein 1	0,085	1,36
<i>Clu</i>	Clusterin	0,001	2,86
<i>Acadvl</i>	Acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	0,069	1,53
<i>Mpc2</i>	Mitochondrial pyruvate carrier 2	0,877	1,01
10 Tage nach SE			
<i>Itgb1</i>	Integrin subunit beta 1	0,054	2,39
<i>Itga6</i>	Integrin subunit alpha 6	0,054	2,75
<i>Nnt</i>	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	0,831	1,02
<i>Hspc159</i>	Galectin-like	0,044	0,51
<i>Entpd1</i>	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	0,029	2,70
<i>Cd48</i>	CD48 molecule	0,111	6,15
<i>Bsn</i>	Bassoon (presynaptic cytomatrix protein)	0,026	0,53
<i>Slc5a3</i>	Solute carrier family 5 member 3	0,054	2,28
<i>Hebp1</i>	Heme binding protein 1	0,051	0,49
<i>Plxnb2</i>	Plexin B2	0,021	2,44
8 Wochen nach SE			
<i>Myh9</i>	Myosin, heavy chain 9, non-muscle	0,518	1,32
<i>Plec</i>	Plectin	0,510	1,28
<i>Tmod1</i>	Tropomodulin 1	0,351	1,26
<i>Ctnnd2</i>	Catenin delta 2	0,481	1,22
<i>Ablim2</i>	Actin binding LIM protein family, member 2	0,563	1,23
<i>Pea15</i>	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	0,375	0,78
<i>Myh10</i>	Myosin, heavy chain 10, non-muscle	0,550	1,30
<i>Dnaja1</i>	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1;	0,628	1,14
<i>Wdr48</i>	WD repeat domain 48	0,375	1,15
<i>Myo18a</i>	Myosin XVIIIa	0,615	1,12

Tabelle 5: Die zehn am stärksten zur ersten Hauptkomponente beitragenden Proteine im PHC

Gensymbol	Protein	p-Wert	fold change
2 Tage nach SE			
<i>Cyp46a1</i>	Cytochrome P450, family 46, subfamily a, polypeptide 1	0,000	0,44
<i>Abr</i>	Active BCR-related	0,001	0,69
<i>Inpp1</i>	Inositol polyphosphate-1-phosphatase	0,000	0,60
<i>Brsk2</i>	BR serine/threonine kinase 2	0,000	0,59
<i>Ywhah</i>	14-3-3 protein eta	0,001	0,75
<i>Wars</i>	Tryptophanyl-tRNA synthetase	0,003	0,78
<i>Strn3</i>	Striatin 3	0,001	0,58
<i>Oxsm</i>	3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial	0,001	0,64
<i>Esd</i>	Esterase D	0,004	0,80
<i>Actb12</i>	Actin, beta-like 2	0,000	0,50
10 Tage nach SE			
<i>Ywhab</i>	14-3-3 protein beta-subtype	0,001	0,65
<i>Hspa4l</i>	Heat shock protein 4-like	0,003	0,78
<i>Strn4</i>	Striatin 4	0,000	0,47
<i>Ywhae</i>	14-3-3 epsilon	0,003	0,75
<i>Anxa3</i>	Annexin A3	0,000	10,38
<i>Pgls</i>	6-Phosphogluconolactonase	0,000	0,51
<i>Park7</i>	Parkinsonism associated deglycase	0,000	0,38
<i>Aco1</i>	Aconitase 1	0,001	0,69
<i>Esd</i>	Esterase D	0,002	0,75
<i>Ywhaq</i>	14-3-3 protein theta	0,001	0,66
8 Wochen nach SE			
<i>Agk</i>	Acylglycerol kinase	0,148	1,15
<i>Got2</i>	Glutamic-oxaloacetic transaminase 2	0,243	1,12
<i>Ogdh</i>	Oxoglutarate dehydrogenase	0,143	1,19
<i>Atp5j2</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2	0,002	1,71
<i>Atp5a1</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	0,240	1,10
<i>Gsta1</i>	Glutathione S-transferase alpha 1	0,011	1,62
<i>Psmb3</i>	Proteasome subunit beta 3	0,005	1,73
<i>Trap1</i>	TNF receptor-associated protein 1	0,084	1,17
<i>Pnp</i>	Purine nucleoside phosphorylase	0,027	1,55
<i>Ddb1</i>	Damage-specific DNA binding protein 1	0,060	1,24

2.2. Ergebnisse der gewichteten Netzwerkanalyse

2.2.1. Netzwerkkonstruktion

Unter Verwendung der Proteine, die zu allen drei Zeitpunkten im jeweiligen Gewebe identifiziert worden sind, wurde jeweils für den HC und den PHC ein gewichtetes Netzwerk aufgestellt. In Abbildung 7 ist die Korrelationsmatrix für den HC und in Abbildung 8 für den PHC jeweils als *heatmap* dargestellt. Es kann für beide Gehirnregionen eine deutliche Separation der Proben des dritten Zeitpunktes gegenüber den anderen Proben festgestellt werden.

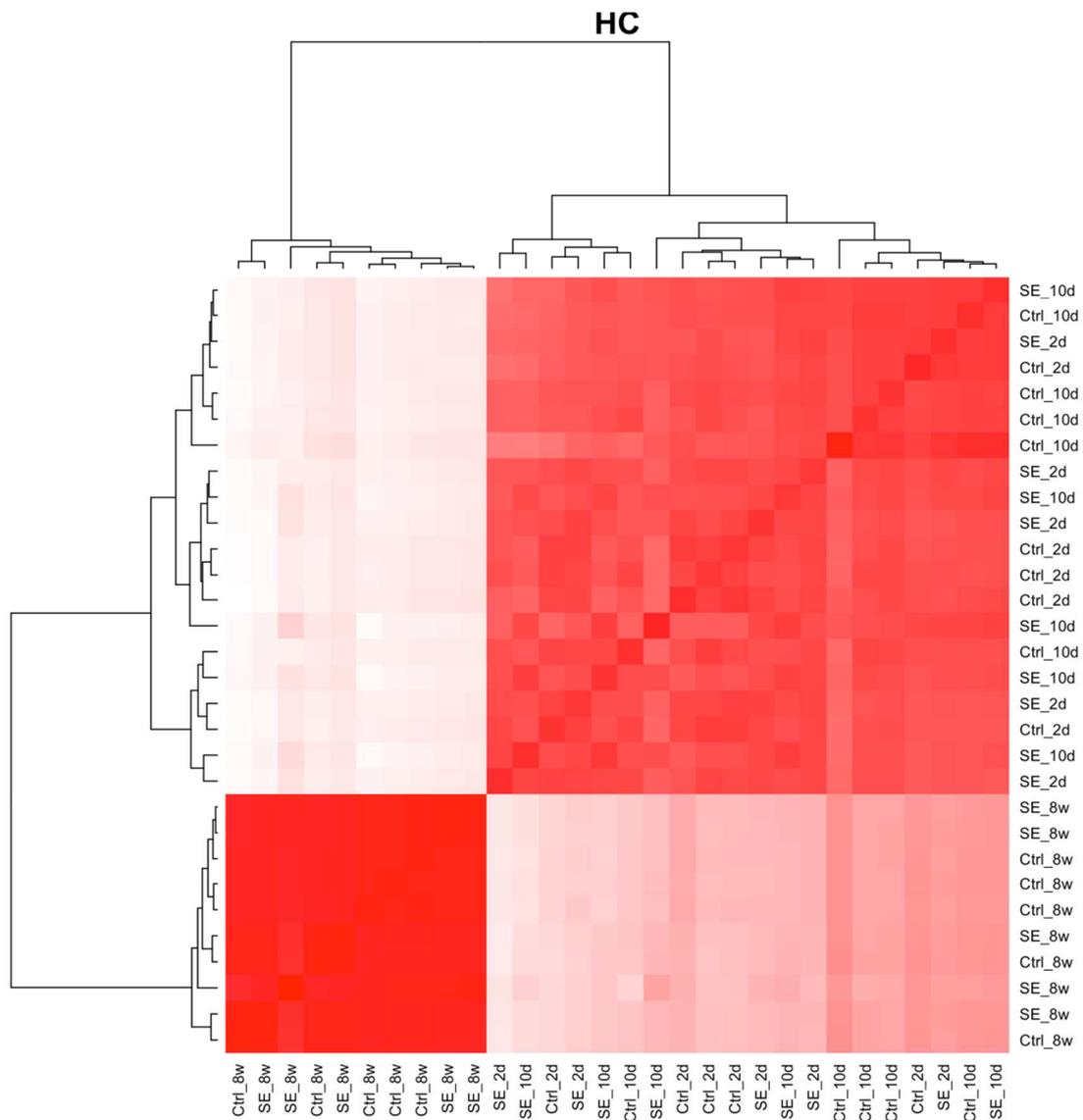


Abbildung 7

Die Spearman-Korrelation wurde zwischen den Expressionsprofilen aller Proteine der Kontrolltiere (Ctrl) und der Post-SE-Tiere (SE) berechnet. Die Zusätze *_2d*, *_10d* und *_8w* indizieren die analysierten Zeitpunkte.

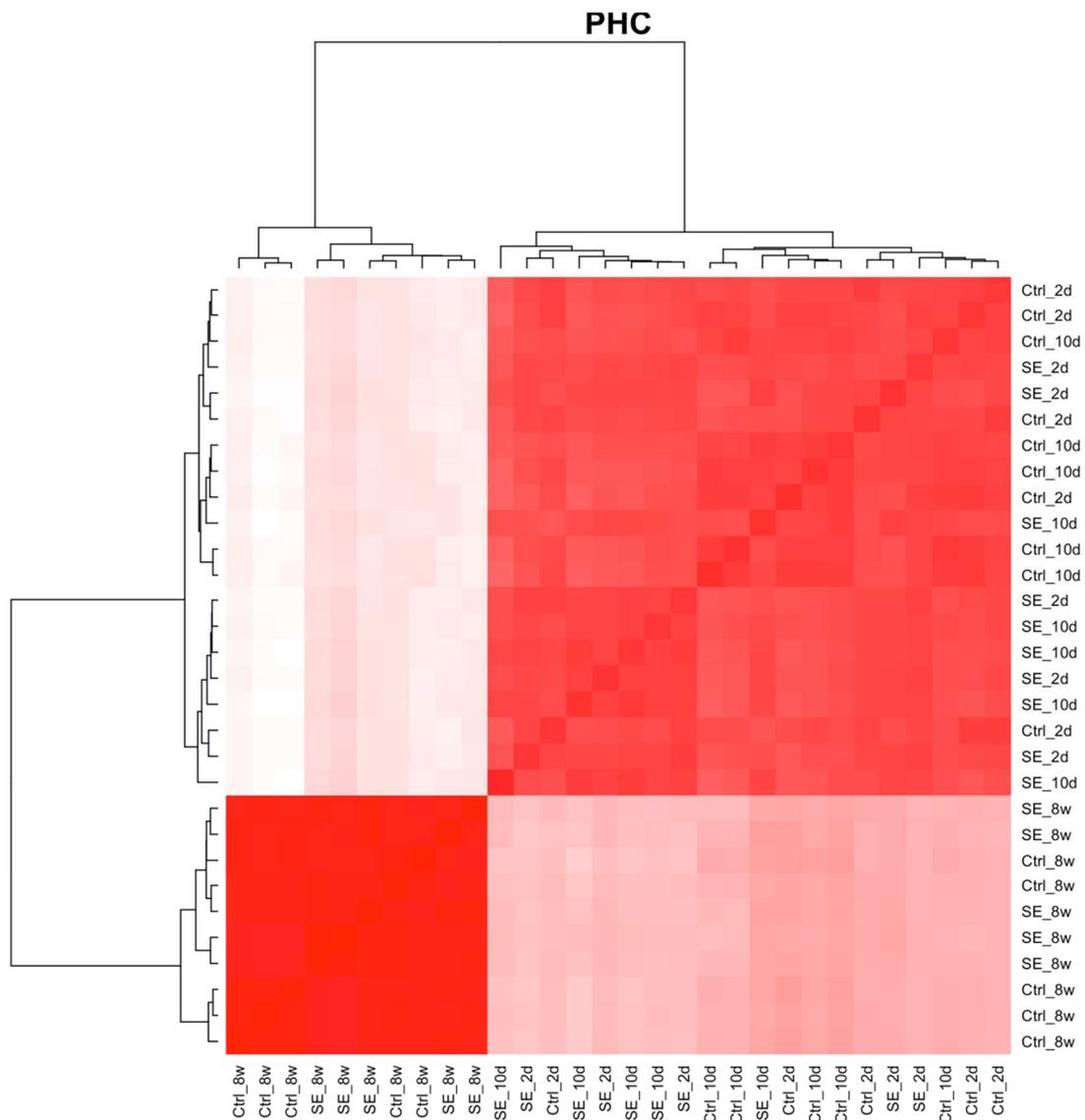


Abbildung 8

Die Spearman-Korrelation wurde zwischen den Expressionsprofilen aller Proteine der Kontrolltiere (Ctrl) und der Post-SE-Tiere (SE) berechnet. Die Zusätze *_2d*, *_10d* und *_8w* indizieren die analysierten Zeitpunkte.

Tabelle 6 zeigt die topologischen Eigenschaften der Netzwerke. So weisen sowohl das Netzwerk für den HC als auch das Netzwerk für den PHC eine skalenfreie Topologie und eine starke Konnektivität auf.

Tabelle 6: Netzwerktopologie

	Dichte	Zentralisierung	Heterogenität	mittlerer Clusterkoeffizient	mittlere skalierte Konnektivität
HC	0,048	0,088	0,767	0,133	0,356
PHC	0,045	0,074	0,721	0,123	0,381

2.2.2. Modulidentifikation und Visualisierung

Durch die Messung der Unähnlichkeit der topologischen Überlappung (*topological overlap dissimilarity measure*) in Kombination mit einer hierarchischen Clustermethode konnten in beiden Netzwerken Gruppen von Proteinen mit ähnlichen Expressionsprofilen detektiert werden. Die Dendrogramme für die Netzwerke sind in Abbildung 9a für den HC und in Abbildung 9b für den PHC dargestellt. Die Äste der Dendrogramme entsprechen den detektierbaren Clustern. Durch Anwendung eines horizontalen Höhengrenzwertes wurden die Cluster zu Modulen zusammengefasst und diese mit einer Zahl und einer Farbe gekennzeichnet. So konnten die 1337 *common proteins* des HC auf acht Module aufgeteilt werden. Für den PHC ergaben die 1371 an allen drei Zeitpunkten identifizierten Proteine zwölf Module. Hierbei ist anzumerken, dass Proteine, die nicht einem der übrigen Module zugeschrieben werden konnten, in einem neunten bzw. 13. Modul zusammengefasst worden sind. Diesen Modulen wurde die Farbe Grau zugeordnet. Sie umfassten im HC zwei bzw. im PHC fünf Proteine und wurden in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. Die Größe der anderen Module (Anzahl der ihnen zugeordneten Proteine) ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

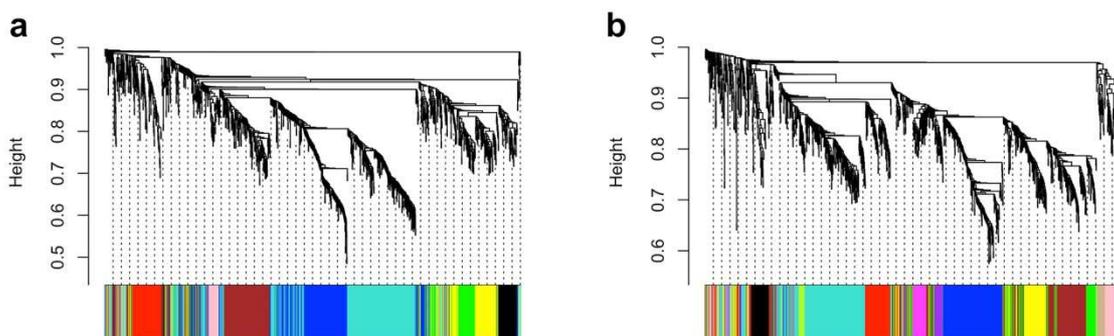


Abbildung 9

In (a) ist das Dendrogramm für den HC und in (b) für den PHC dargestellt. Die y-Achse indiziert den Abstand im Netzwerk, der mit 1 - Wert der topologischen Überlappung bestimmt wurde. Je größer dieser Wert ist, desto unähnlicher sind die Expressionsprofile der Proteine. Der Farbblock zeigt die den Modulen zugeordnete Farbe. Der horizontale Höhengrenzwert zur Modulidentifikation wurde mittels *Dynamic-Hybrid-Algorithmus* bestimmt und betrug für den HC 0,992 bzw. für den PHC 0,993.

Tabelle 7: Modulgrößen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
HC	371	260	212	156	113	95	80	48				
PHC	290	223	210	139	113	111	60	60	57	39	34	30

Abbildung 10 zeigt die Visualisierung des konstruierten Netzwerks für den HC mit dem Programm *Cytoscape* und Abbildung 11 das Netzwerk für den PHC. Die Knotenfarben indizieren die Zugehörigkeit zum jeweiligen Modul.

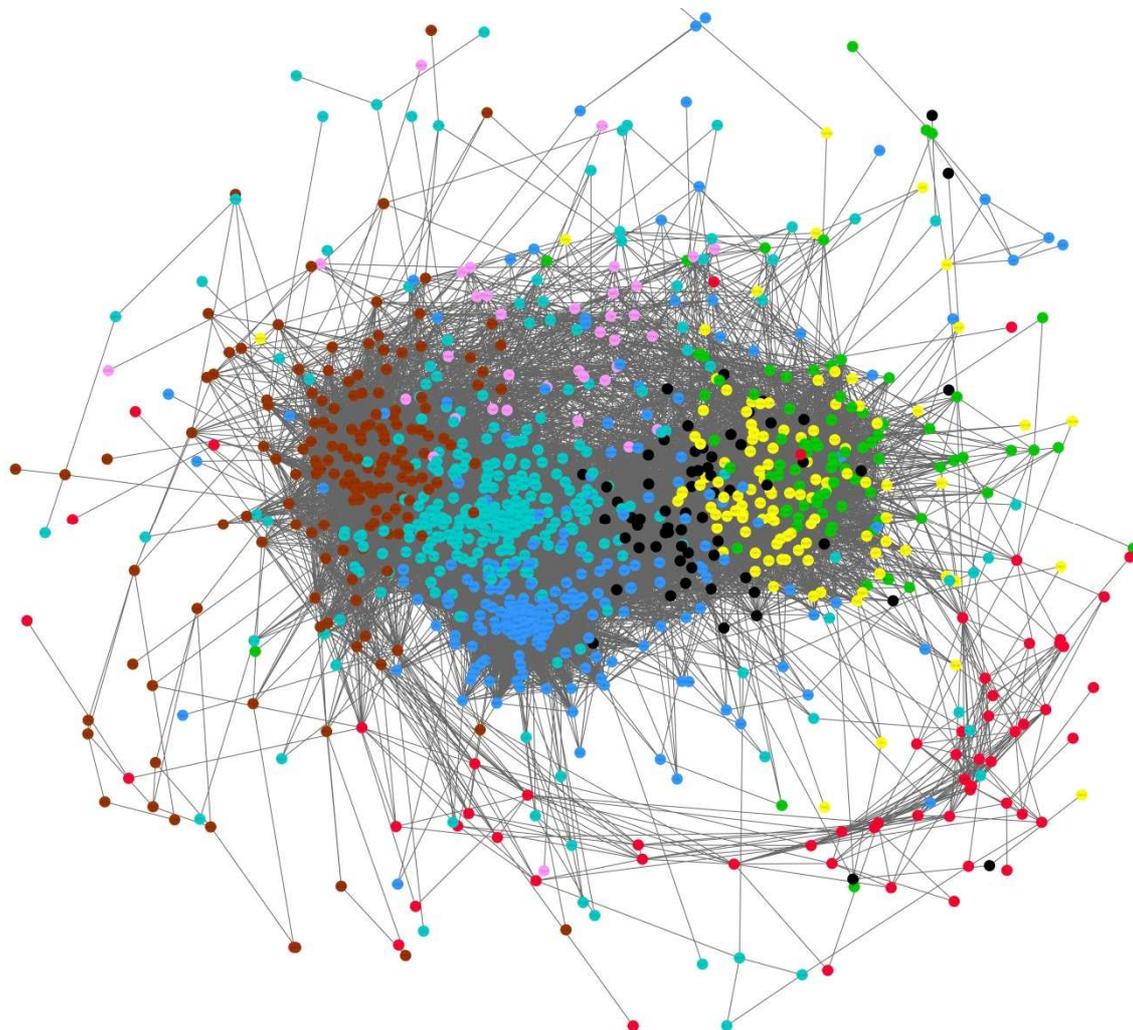


Abbildung 10

Das Netzwerk für den HC wurde mit dem Programm *Cytoscape* visualisiert. Jeder Knoten entspricht einem Protein und die Knotenfarben indizieren die Modulzugehörigkeiten.

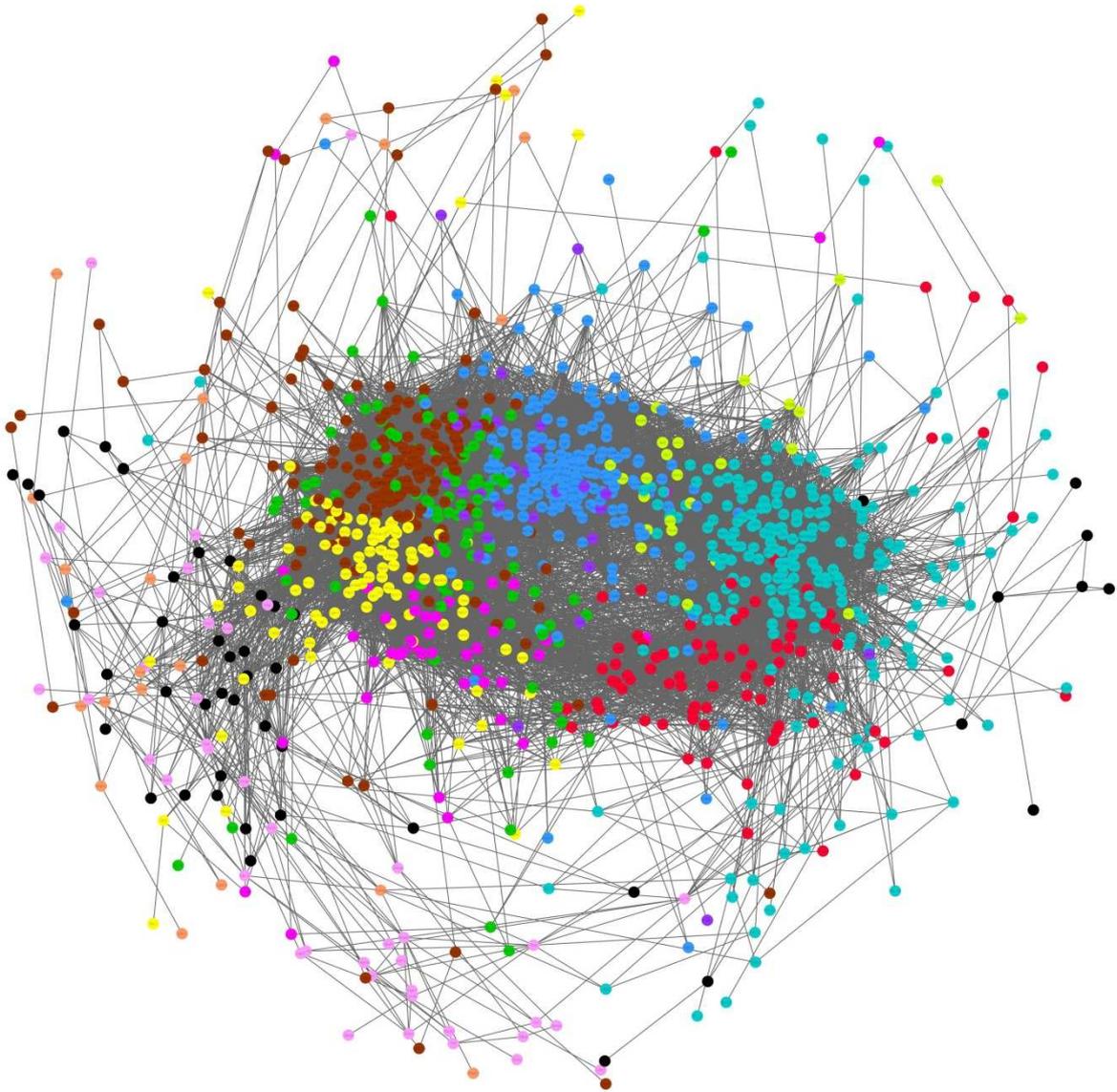


Abbildung 11

Das Netzwerk für den PHC wurde mit dem Programm *Cytoscape* visualisiert. Jeder Knoten entspricht einem Protein und die Knotenfarben indizieren die Modulzugehörigkeiten.

2.2.3. Epileptogenese assoziierte Module

Die Ergebnisse der Korrelationsberechnung zwischen den Expressionsprofilen der Proteine eines Moduls und den Expressionsprofilen der Post-SE-Tiere sind in Abbildung 12 dargestellt. Module, die für die weitere Analyse aufgrund einer möglichen Assoziation zur Epileptogenese als interessant erachtet wurden, mussten eine *protein significance* $> 0,2$ aufweisen. Dieser Wert entspricht einer Korrelation eines Moduls mit den Expressionsprofilen der Post-SE-Tiere von $> 20\%$. Diese Bedingung erfüllten im HC die Module 3, 4, 6 und 7. Für den PHC wurden die Module 1, 3, 4, 7, 8 und 12 ausgewählt.

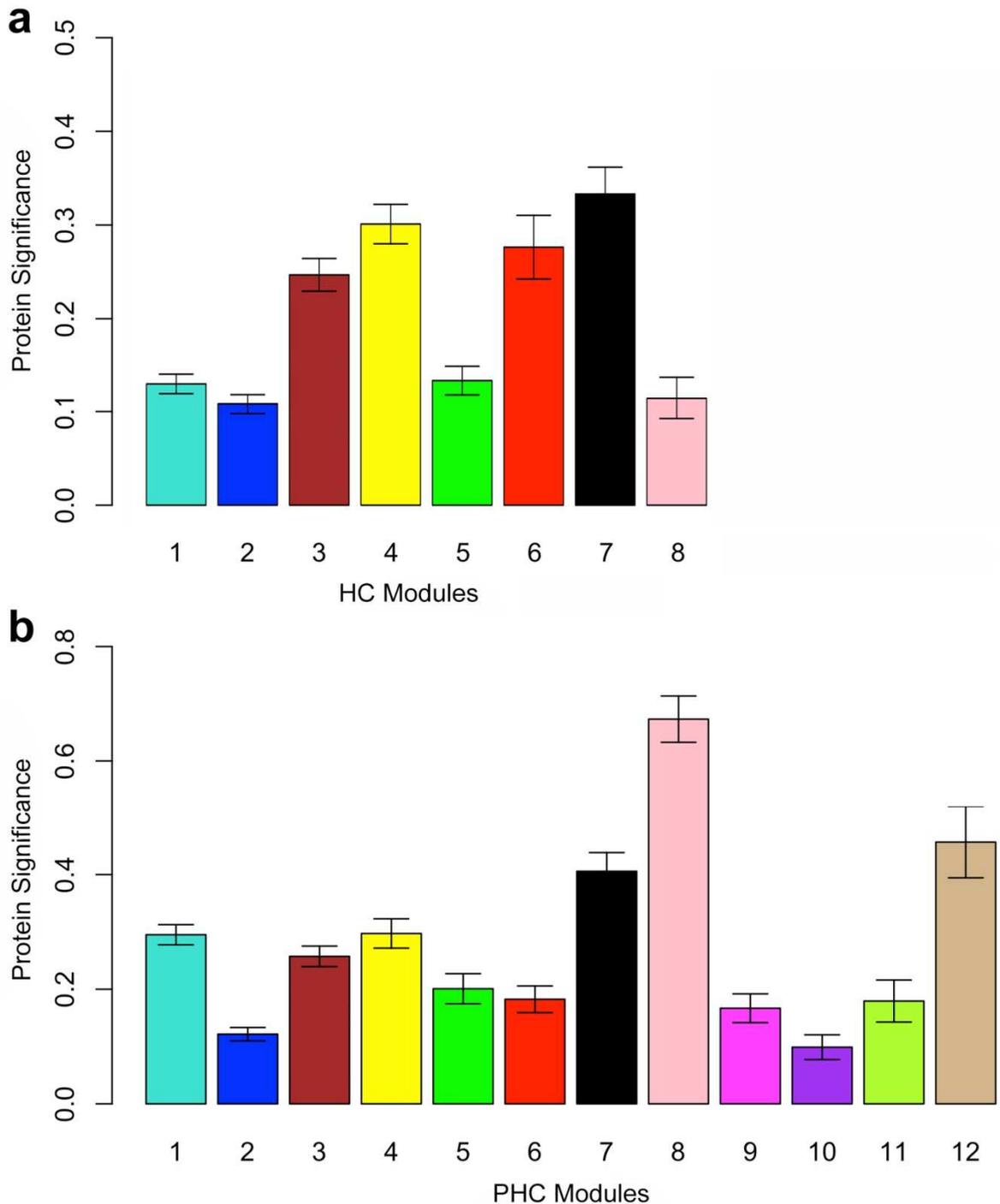


Abbildung 12

Zur Bestimmung der *protein significance* wurde die Korrelation zwischen Expressionsprofilen eines Moduls und den Expressionsprofilen der Post-SE-Tiere berechnet. In (a) ist das Ergebnis für jedes Modul des HC und in (b) für jedes Modul des PHC dargestellt. Als Grenzwert zur Selektion Epileptogenese assoziierter Module wurde eine *protein significance* > 0,2 gewählt.

Die Expressionsprofile der Proteine eines Moduls wurden als erste Hauptkomponente (Moduleigenen, ME) zusammengefasst, um eine Regressionsanalyse der Module durchführen zu können. Hierzu wurde die Spearman-Korrelation zwischen den ME und dem Status Post-SE-Tier zu allen untersuchten Zeitpunkten berechnet. Abbildung 13 zeigt

für jedes Modul den berechneten Korrelationskoeffizienten inklusive des Signifikanzniveaus (p-Wert). Für die weitere Analyse wurden Module herausgefiltert, die eine signifikante Korrelation mit einem p-Wert $< 0,001$ zu mindestens zwei Zeitpunkten aufwiesen. Derartige Module können Epileptogenese assoziiert sein. Dieses Kriterium erfüllten alle durch Messung der *protein significance* ermittelten Module. Außerdem ergaben sich sowohl für den HC als auch für den PHC jeweils ein weiteres Modul (HC Modul 8, PHC Modul 5). Eine negative Korrelation zwischen der ersten Hauptkomponente eines Moduls und dem Auftreten eines SE bedeutet hierbei, dass im entsprechenden Modul relativ viele Proteine zusammengefasst sind, für die eine Herunterregulation bei den Post-SE-Tieren festgestellt werden konnte. Für die Module 3, 4, 6 und 7 im HC und 4, 5 und 7 im PHC ergab die Berechnung einen negativen Korrelationskoeffizienten. Sind einem Modul vor allem Proteine zugeordnet, die eine Überexpression bei den Post-SE-Tieren aufwiesen, kann für dieses Modul eine positive Korrelation berechnet werden. Dies war für die Module 3 und 8 im PHC der Fall. Das Modul 8 im HC zeigte zum ersten Zeitpunkt eine positive und zum zweiten Zeitpunkt eine negative Korrelation. Für Modul 12 im PHC konnte ebenfalls ein gemischtes Muster festgestellt werden: (i) 2dpSE und 10dpSE: negative Korrelation und (ii) 8wpSE: positive Korrelation.

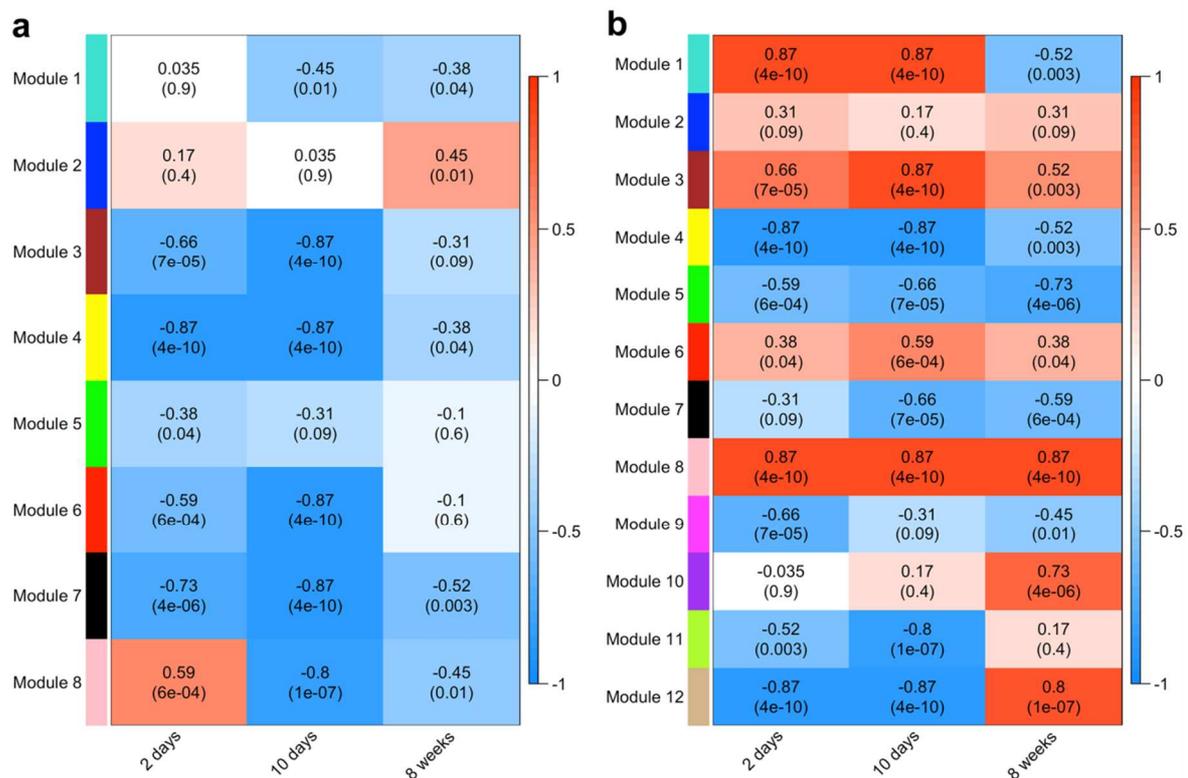


Abbildung 13

Die Korrelation jedes Moduls mit dem Status Post-SE-Tier ist in (a) für den HC und in (b) für den PHC dargestellt. Jede Zelle enthält den ermittelten Korrelationskoeffizienten und darunter den zugehörigen p-Wert. Eine rote Einfärbung der Zelle indiziert eine positive und eine blaue Einfärbung eine negative Korrelation.

2.2.4. Funktionelle Annotation

Jedes Modul wurde mittels des Programms IPA analysiert, um das funktionelle *enrichment* zu bestimmen. Abbildung 14 zeigt die ersten fünf festgestellten *pathways* der ausgewählten Module mit dem kleinsten p-Wert.

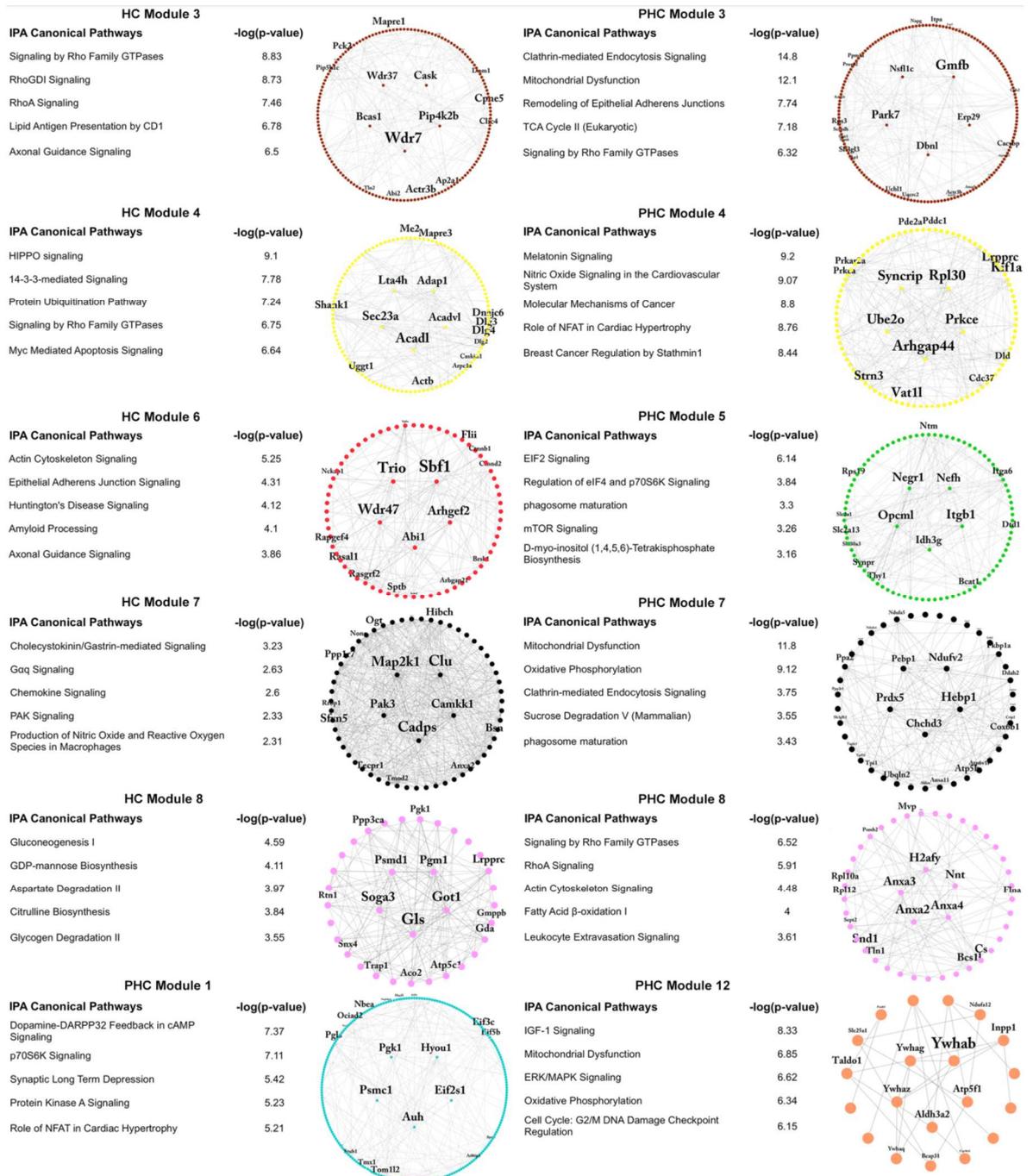


Abbildung 14

Die Tabellen zeigen die fünf identifizierten *pathways* mit den kleinsten p-Werten für jedes der selektierten Module im HC und im PHC. Die Abbildungen zeigen die Top 15 Proteinverbindungen in jedem Modul. Die beschrifteten Punkte indizieren die Top 15 intramodularen *Hub*-Proteine. Die Schriftgröße repräsentiert die intramodulare Konnektivität.

Es konnten signifikante *pathways* aus verschiedenen funktionellen Bereichen detektiert werden. Zum Beispiel wurden Reaktionswege des Proteins RHO festgestellt: (i) *Signaling by Rho family GTPases* (HC Modul 3, 4; PHC Modul 3), (ii) *RhoA signaling* (HC Modul 3; PHC Modul 8) und (iii) *RhoGDI signaling* (HC Modul 3). Der *pathway Mitochondrial dysfunction* wurde jeweils bei den Modulen 3, 7 und 12 des PHC detektiert. Ferner wurden metabolische Reaktionswege erfasst, wie zum Beispiel *Gluconeogenesis I* (HC Modul 8) oder *Fatty acid β -oxidation I* (PHC Modul 8).

Im Weiteren wurde analysiert, ob bestimmte *pathways* und damit bestimmte Module einzelnen Aspekten der Epileptogenese zugeordnet werden können. So können die für Modul 3 des HC festgestellten *pathways Signaling by Rho family GTPases, RhoGDI signaling, RhoA signaling* und *Axonal guidance signaling* in den funktionellen Bereich der zellulären Plastizität eingeordnet werden. Gleiches gilt für die Reaktionswege *Actin cytoskeleton signaling, Epithelial adherens junction signaling* und *Axonal guidance signaling* des Moduls 6 im HC. Die zwei weiteren *pathways* dieses Moduls, *Amyloid processing* und *Huntington`s disease signaling*, sind mit anderen neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen verknüpft. Die biochemischen Reaktionswege des Moduls 8 des HC legen eine Assoziation dieses Moduls mit dem Metabolismus von Kohlenhydraten und Aminosäuren nahe. Folgende *pathways* wurden hierzu detektiert: (i) *Gluconeogenesis I*, (ii) *GDP-mannose biosynthesis*, (iii) *Aspartate degradation II*, (iv) *Citrulline biosynthesis* und (v) *Glycogen degradation II*. Vier von fünf *pathways* mit den kleinsten p-Werten des Moduls 4 des HC lassen sich dem Funktionsbereich der Zellhomöostase (Zelltod, Apoptose und Proteindegradation) zuordnen. Diese *pathways* umfassten *Hippo signaling, 14-3-3-mediated signaling, Myc mediated apoptosis signaling* und *Protein ubiquitination pathway*.

Im PHC ergab sich für das Modul 5 eine Assoziation mit der Regulation von Zelltod und Apoptose. Die zugeordneten Reaktionswege waren *EIF2 signaling, Regulation of eIF4 and p70S6K signaling, Phagosome maturation* und *mTOR signaling*. Vier der Top Five *pathways* des PHC Moduls 8 können mit Plastizität und transendothelialer Leukozytenmigration in Verbindung gebracht werden. Detektiert wurden: (i) *Signaling by Rho family GTPases*, (ii) *RhoA signaling*, (iii) *Actin cytoskeleton signaling* und (iv) *Leukocyte extravasation signaling*. Für das Modul 7 im PHC ergab die *Pathway*-Analyse ein deutlich signifikantes *enrichment* im funktionellen Bereich der zellulären Energiegewinnung bzw. deren Störung. Die hierzu detektierten Reaktionswege waren *Mitochondrial dysfunction* und *Oxidative phosphorylation*.

2.2.5. Intramodulare *Hub*-Proteine

Stark verknüpfte Knoten eines Netzwerkes, die sogenannten *hubs*, können als zentrale Schaltstellen des Netzwerks angesehen werden (ALBERT et al. 2000). Diese *hubs* entstehen durch die in skalenfreien Netzwerken nicht homogen verteilte Konnektivität (ALBERT et al. 2000). Diese Art der Verteilung macht derartige Netzwerke auf der einen Seite robust gegenüber dem Verlust zufällig ausgewählter Knoten, auf der anderen Seite aber sehr anfällig gegenüber der Deletion stark verknüpfter Knoten (ALBERT et al. 2000). So sind nach JEONG et al. (2001) die *Hub*-Proteine einer Zelle relevant für deren Überleben. Ihnen kann also eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben werden. In Abbildung 14 sind je die 15 am stärksten verknüpften Proteine der ausgewählten Module dargestellt, wobei die Schriftgröße die Rangfolge widerspiegelt.

Weiterhin wurden die Tabellen der fünf Proteine mit den meisten Verbindungen zu anderen Proteinen auf *hubs* durchsucht, die einen signifikanten (p -Wert $< 0,05$) *fold change* $\geq 1,5$ oder $\leq 0,67$ aufwiesen. Für den HC ergab sich, dass die meisten der differentiell exprimierten Proteine eine Herunterregulation bei den Post-SE-Tieren zeigten (siehe Tabelle 8). Dies waren zum Beispiel die Proteine *Sec23 homolog A, coat complex II component* (SEC23A) und *Trio Rho guanine nucleotide exchange factor* (TRIO), die beide in der frühen Post-Insult-Phase und in der Latenzphase eine verminderte Expression aufwiesen. Als Proteine mit einer Überexpression bei den Post-SE-Tieren konnten nur *Acyl-CoA dehydrogenase, long chain* (ACADL) in der Latenzphase und CLU zu allen drei Zeitpunkten detektiert werden. Unter den fünf am stärksten verknüpften Proteinen des HC Moduls 8 war zu allen drei Zeitpunkten kein differentiell exprimiertes Protein vorhanden.

Tabelle 9 zeigt für jedes der selektierten Module des PHC die fünf Proteine mit den meisten Verbindungen zu anderen Proteinen des jeweiligen Moduls. Ein Großteil dieser Proteine wies ein signifikant differentielles Regulationsmuster auf. Im PHC Modul 3 zeigten die meisten *Hub*-Proteine eine Herunterregulation bei den Post-SE-Tieren (2dpSE: zwei von fünf; 10dpSE: fünf von fünf; 8wpSE: zwei von fünf). Dabei zeigte das Protein *Glia maturation factor, beta* (GMFB) zu allen Phasen der Epileptogenese eine verminderte Expression bei den Post-SE-Tieren. Ein weiteres Modul mit ausschließlich herunterregulierten, differentiell exprimierten *hubs* in der Latenzphase und in der chronischen Phase war das PHC Modul 7 (10dpSE: fünf von fünf; 8wpSE: drei von fünf). Demgegenüber konnten in PHC Modul 5 vor allem *Hub*-Proteine mit einer Aufregulation identifiziert werden. Dies waren die Proteine *Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like* (OPCML; 10dpSE), *Integrin subunit beta 1* (ITGB1; 2dpSE, 10dpSE und 8wpSE), *Integrin subunit alpha 6* (ITGA6; 2dpSE, 10dpSE und 8wpSE) und *Neuronal growth regulator 1* (NEGR1; 10dpSE). Im Modul 8 des PHC wiesen vier der fünf am stärksten verknüpften Proteine zu allen drei Zeitpunkten eine signifikante Überexpression

bei den Post-SE-Tieren auf. Dies waren die Proteine *Annexin A2* (ANXA2), ANXA3, *H2A histone family, member Y* (H2AFY) und *Annexin A4* (ANXA4). Das fünfte intramodulare *Hub*-Protein, *Nicotinamide nucleotide transhydrogenase* (NNT), zeigte ausschließlich in der Latenzphase eine Induktion.

Tabelle 8: Intramodulare *Hub*-Proteine im HC

Gen-symbol	Protein	C ^a	p-Wert	fold change	p-Wert	fold change	p-Wert	fold change
			2 Tage nach SE		10 Tage nach SE		8 Wochen nach SE	
Modul 3								
<i>Wdr7</i>	WD repeat domain 7	1,000	0,048	0,81	0,006	0,68	0,952	0,99
<i>Wdr37</i>	WD repeat domain 37	0,916	0,248	0,87	0,059	0,78	0,907	0,99
<i>Pck2</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	0,904	0,709	0,95	0,005	0,68	0,254	0,90
<i>Pip5k1c</i>	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 gamma	0,888	0,064	0,82	0,001	0,62	0,329	0,90
<i>Cpne5</i>	Copine 5	0,885	0,025	0,78	0,012	0,67	0,112	0,87
Modul 4								
<i>Acadl</i>	Acyl-CoA dehydrogenase, long chain	1,000	0,022	1,32	0,006	1,51	0,538	1,05
<i>Sec23a</i>	Sec23 homolog A, coat complex II component	0,924	0,000	0,37	0,000	0,35	0,833	0,97
<i>Lta4h</i>	Leukotriene A4 hydrolase	0,919	0,010	1,41	0,082	1,27	0,291	1,08
<i>Dlg4</i>	Discs large MAGUK scaffold protein 4	0,917	0,045	0,83	0,002	0,66	0,155	0,87
<i>Adap1</i>	ArfGAP with dual PH domains 1	0,858	0,014	0,74	0,023	0,75	0,151	0,85
Modul 6								
<i>Sbf1</i>	SET binding factor 1	1,000	0,023	0,78	0,018	0,77	0,884	1,04
<i>Wdr47</i>	WD repeat domain 47	0,931	0,013	0,75	0,006	0,63	0,919	1,02
<i>Trio</i>	Trio Rho guanine nucleotide exchange factor	0,845	0,001	0,59	0,003	0,51	0,835	1,10
<i>Rasal1</i>	RAS protein activator like 1 (GAP1 like)	0,835	0,027	0,69	0,001	0,59	0,873	0,97
<i>Scai</i>	Suppressor of cancer cell invasion	0,813	0,150	0,80	0,032	0,66	0,644	0,93
Modul 7								
<i>Map2k1</i>	Mitogen activated protein kinase kinase 1	1,000	0,041	0,76	0,004	0,68	0,662	0,95
<i>Clu</i>	Clusterin	0,987	0,001	2,86	0,003	5,14	0,037	2,06
<i>Cadps</i>	Calcium dependent secretion activator	0,953	0,335	0,92	0,006	0,69	0,242	0,82
<i>Camkk1</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1	0,882	0,037	0,70	0,009	0,57	0,704	0,95
<i>Pak3</i>	P21 (RAC1) activated kinase 3	0,874	0,598	0,95	0,021	0,69	0,250	0,85
Modul 8								
<i>Gls</i>	Glutaminase	1,000	0,339	1,09	0,026	0,75	0,101	0,87
<i>Got1</i>	Glutamic-oxaloacetic transaminase 1	0,884	0,511	1,06	0,011	0,80	0,347	0,94
<i>Soga3</i>	SOGA family member 3	0,852	0,500	1,07	0,010	0,78	0,751	0,97
<i>Ppp3ca</i>	Protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha	0,805	0,793	1,03	0,022	0,73	0,306	0,90
<i>Psm1</i>	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 1	0,782	0,256	1,13	0,294	0,91	0,942	1,00

^aC: intramodulare Konnektivität

Tabelle 9: Intramodulare *Hub*-Proteine im PHC

Gen-symbol	Protein	C ^a	p-Wert	fold change	p-Wert	fold change	p-Wert	fold change
			2 Tage nach SE		10 Tage nach SE		8 Wochen nach SE	
Modul 1								
<i>Pgk1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	1,000	0,066	0,88	0,004	0,76	0,491	0,92
<i>Eif3c</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C	0,984	0,002	2,33	0,002	2,92	0,186	0,83
<i>Psmc1</i>	Proteasome 26S subunit, ATPase 1	0,972	0,011	0,77	0,005	0,74	0,125	1,12
<i>Auh</i>	AU RNA binding methylglutaconyl-CoA hydratase	0,952	0,012	1,34	0,008	1,39	0,161	0,84
<i>Hyou1</i>	Hypoxia up-regulated 1	0,948	0,004	0,72	0,004	0,66	0,001	1,52
Modul 3								
<i>Gmfb</i>	Glia maturation factor, beta	1,000	0,029	0,42	0,000	0,24	0,025	0,62
<i>Park7</i>	Parkinsonism associated deglycase	0,896	0,035	0,59	0,000	0,38	0,100	0,85
<i>Dbnl</i>	Drebrin-like	0,878	0,091	0,64	0,037	0,56	0,022	0,65
<i>Uchl1</i>	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1	0,849	0,420	0,81	0,016	0,48	0,008	0,72
<i>Nsfl1c</i>	NSFL1 cofactor	0,843	0,125	0,64	0,001	0,39	0,831	1,03
Modul 4								
<i>Arhgap44</i>	Rho GTPase activating protein 44	1,000	0,001	0,65	0,000	0,63	0,380	0,91
<i>Rpl30</i>	Ribosomal protein L30	0,991	0,000	1,87	0,000	1,88	0,650	0,94
<i>Prkce</i>	Protein kinase C, epsilon	0,965	0,001	0,66	0,000	0,65	0,237	0,86
<i>Syncrip</i>	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	0,946	0,002	1,77	0,009	1,90	0,121	1,15
<i>Ube2o</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2O	0,944	0,000	0,53	0,001	0,50	0,011	0,76
Modul 5								
<i>Opcml</i>	Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	1,000	0,176	1,22	0,036	1,58	0,025	1,29
<i>Itgb1</i>	Integrin subunit beta 1	1,000	0,008	1,62	0,000	2,41	0,000	2,16
<i>Itga6</i>	Integrin subunit alpha 6	0,961	0,099	1,64	0,000	3,32	0,000	2,17
<i>Negr1</i>	Neuronal growth regulator 1	0,931	0,159	1,29	0,009	1,73	0,073	1,32
<i>Nefh</i>	Neurofilament, heavy polypeptide	0,929	0,075	0,69	0,002	0,35	0,515	0,89
Modul 7								
<i>Hebp1</i>	Heme binding protein 1	1,000	0,059	0,47	0,001	0,22	0,013	0,42
<i>Prdx5</i>	Peroxiredoxin 5	0,983	0,089	0,71	0,003	0,47	0,208	0,82
<i>Chchd3</i>	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	0,924	0,261	0,75	0,004	0,48	0,044	0,57
<i>Ndufv2</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V2	0,897	0,511	0,76	0,004	0,36	0,217	0,55
<i>Atp5h</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit d	0,890	0,930	0,97	0,030	0,53	0,006	0,44
Modul 8								
<i>Anxa2</i>	Annexin A2	1,000	0,000	3,16	0,000	4,54	0,000	3,11
<i>Anxa3</i>	Annexin A3	0,960	0,060	1,60	0,000	10,38	0,000	2,59
<i>H2afy</i>	H2A histone family, member Y	0,953	0,005	1,58	0,000	3,01	0,005	2,03
<i>Nnt</i>	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	0,916	0,023	1,27	0,009	1,51	0,022	1,26
<i>Anxa4</i>	Annexin A4	0,882	0,003	1,74	0,000	3,33	0,000	1,93
Modul 12								
<i>Ywhab</i>	14-3-3 protein beta-subtype	1,000	0,001	0,71	0,001	0,65	0,809	0,98
<i>Prkar1b</i>	Protein kinase cAMP-dependent type 1 regulatory subunit beta	0,925	0,001	0,60	0,000	0,50	0,179	1,21
<i>Oxsm</i>	3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial	0,895	0,001	0,64	0,002	0,60	0,015	1,29
<i>Taldo1</i>	Transaldolase 1	0,888	0,000	1,56	0,001	1,51	0,049	0,84
<i>Ywhag</i>	14-3-3 protein gamma	0,865	0,002	0,73	0,002	0,66	0,808	0,98

^aC: intramodulare Konnektivität

2.2.6. Validierung

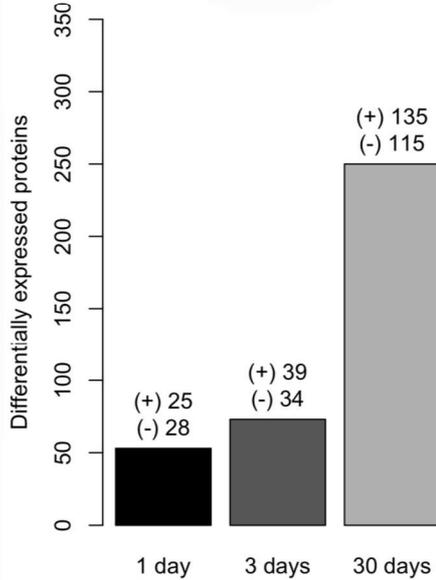
Um die Ergebnisse der gewichteten Netzwerkanalyse validieren und bewerten zu können, wurde für einen weiteren proteomischen Datensatz ebenfalls ein Netzwerk aufgestellt. Der verwendete Datensatz wurde von BITSIKA et al. (2016) in einem chronischen Epilepsiemodell mittels LC-MS/MS-Analyse generiert. Dieser Datensatz wird im Folgenden mit „Bitsika“ bezeichnet. Die Unterschiede zwischen Bitsika und dem vorliegenden Datensatz lagen in der verwendeten Spezies (Maus gegenüber Ratte), in der Induktion des SE (chemisch durch Kainsäure gegenüber elektrisch) und in der Wahl der Zeitpunkte für die Probenentnahme. BITSIKA et al. (2016) präparierten den injizierten HC einen Tag, zwei Tage und 30 Tage nach Injektion (3dpi, 10dpi und 30dpi) im Gegensatz zu den oben beschriebenen Zeitpunkten zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach Induktion des SE. Für die vergleichende Netzwerkanalyse wurde der Bitsika Datensatz den gleichen Vorbereitungs- und Netzwerkberechnungsschritten wie oben beschrieben unterzogen.

Von 1715 Proteinen, die mindestens an einem Zeitpunkt identifiziert worden sind, wurden 1326 und 1351 Proteine auch im HC bzw. PHC des vorliegenden Datensatzes detektiert. 1045 Proteine konnten zu allen drei Zeitpunkten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Überlappung zwischen den differentiell exprimierten Proteinen (*fold change* $\geq 1,5$ oder $\leq 0,67$ mit einem p-Wert $< 0,05$) bei Bitsika und beim vorliegenden Datensatz untersucht (siehe Abbildung 15a). Demnach konnten die größten Überlappungen zwischen Bitsika 1dpi und HC 10dpSE (14 Proteine), Bitsika 3dpi und HC 10dpSE (18 Proteine) und Bitsika 30dpi und HC 8wpSE (41 Proteine) festgestellt werden. Die Betrachtung der absoluten Anzahl an differentiell exprimierten Proteinen ergab ein ähnliches Bild wie in der Originalpublikation (siehe Abbildung 15b). Zum ersten Zeitpunkt zwei Tage nach Injektion konnten 53, zehn Tage nach Injektion 73 und 30 Tage nach Injektion 250 Proteine mit einem differentiellen Regulationsmuster identifiziert werden. In Abbildung 15c ist die Korrelationsmatrix, die durch Berechnung der paarweisen Spearman-Korrelation zwischen den zu allen drei Zeitpunkten nachgewiesenen Proteinen aufgestellt wurde, als *heatmap* dargestellt. In dieser werden stärker miteinander korrelierende Proben näher zusammen dargestellt und können durch die entsprechende Farbskalierung aufgefunden werden. So zeigt sich sowohl zwischen den Proben der Versuchs- und der Kontrolltiere drei Tage nach Injektion als auch zwischen den Proben der Versuchstiere 30 Tage nach Injektion eine stärkere Korrelation.

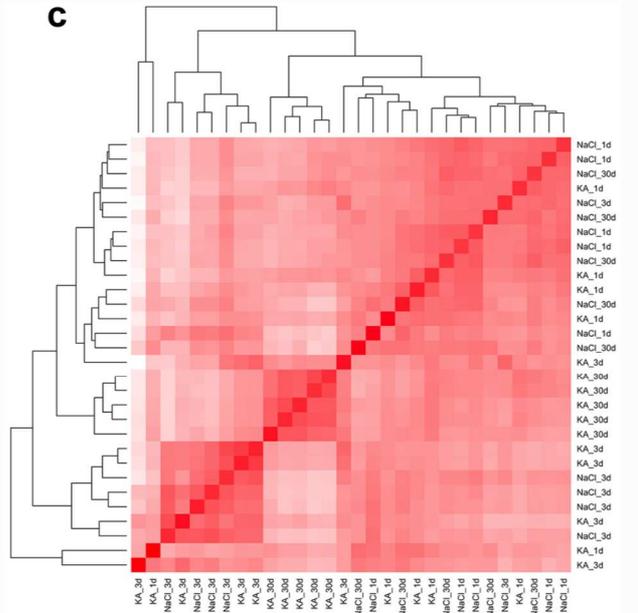
a Overlap between differentially expressed proteins

Bitsika 1 day	6	14	1
Bitsika 3 days	8	18	2
Bitsika 30 days	16	41	4
	HC 2 days	HC 10 days	HC 8 weeks

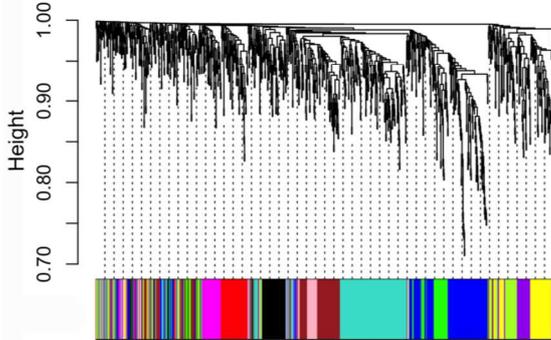
b



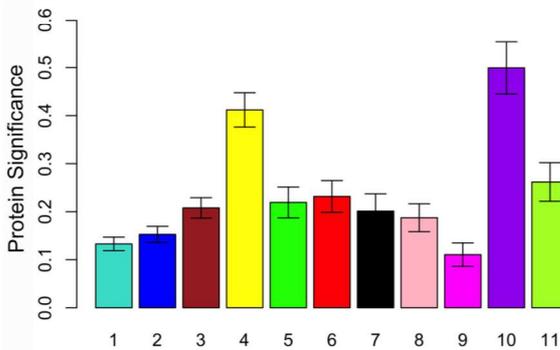
c



d



f



e

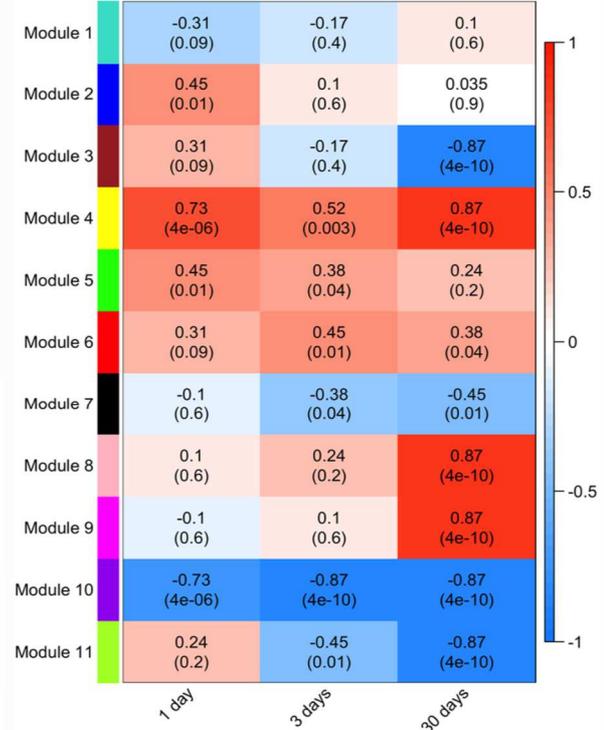


Abbildung 15

Für den Bitsika Datensatz wurde eine vergleichende Netzwerkanalyse durchgeführt. Die Überlappung zwischen den differentiell exprimierten Proteinen des Bitsika Datensatzes und des HC des vorliegenden Datensatzes ist in (a) dargestellt. (b) zeigt die absolute Anzahl der differentiell exprimierten Proteine zum jeweiligen Zeitpunkt. Das Pluszeichen (+) indiziert eine Aufregulation, das Minuszeichen (-) indiziert eine Herunterregulation der Proteine bei den Versuchstieren. Die Korrelationsmatrix der Spearman-Korrelation zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren ist in (c) dargestellt. (d) visualisiert das Netzwerk dendrogramm und die den Modulen zugeordneten Farben. In (e) sind die Ergebnisse der Regressionsanalyse der Module mit dem Status Versuchstier zu den drei Zeitpunkten aufgelistet. In jeder Zelle sind der berechnete Korrelationskoeffizient und darunter der jeweilige p-Wert angegeben. Die Zellenfarbe indiziert die Korrelation: rot bedeutet eine positive und blau eine negative Korrelation. (f) zeigt die errechnete *protein significance* jedes Moduls.

In Tabelle 10 sind die topologischen Eigenschaften des Netzwerkes des Bitsika Datensatzes zusammengestellt.

Tabelle 10: Netzwerktopologie

	Dichte	Zentralisierung	Heterogenität	mittlerer Clusterkoeffizient	mittlere skalierte Konnektivität
Bitsika	0,005	0,021	0,908	0,032	0,186

Durch Bestimmung der Unähnlichkeit der topologischen Überlappung (*topological overlap dissimilarity measure*) konnten im Bitsika Netzwerk elf Module identifiziert werden (siehe Abbildung 15d). Die Modulgröße lag zwischen 48 und 198 Proteinen (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Modulgrößen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Bitsika	198	177	139	88	79	69	68	66	54	49	48

Durch Berechnung der *protein significance* und durch die Regressionsanalyse der Module auf den Status Versuchstier zu den drei Zeitpunkten (*module-trait relationship*) wurden die Module 3, 4, 5, 6, 10 und 11 für die weitere Analyse ausgewählt. Die Ergebnisse der Messung der *protein significance* sind in Abbildung 15f und die Resultate der Regressionsanalyse in Abbildung 15e dargestellt. Hierbei galten dieselben Grenzwerte wie oben festgelegt: *protein significance* > 0,2 und/oder signifikante Korrelation der ersten Hauptkomponente des jeweiligen Moduls mit dem Status Versuchstier zu mindestens zwei Zeitpunkten mit einem p-Wert < 0,001.

Weiterhin wurde die funktionelle Annotation der ausgewählten Module untersucht. Hierzu wurde mittels IPA eine *Pathway-Enrichment*-Analyse durchgeführt und die fünf *pathways* mit den kleinsten p-Werten näher betrachtet. So wurde in den Modulen 4, 10 und 11 der Reaktionsweg *Clathrin-mediated endocytosis signaling* detektiert. Weiterhin wurde der *pathway EIF2 signaling* im Modul 3 und im Modul 6 identifiziert. In diesen Modulen konnte auch der biochemische Reaktionsweg *Mitochondrial dysfunction* festgestellt werden. Die zwei *pathways* mit den kleinsten p-Werten in Modul 5 waren *TCA cycle II (eukaryotic)* und *Oxidative phosphorylation*. Letzterer konnte in Modul 6 ebenfalls detektiert werden. Mit *Huntington's disease signaling* (Modul 3 und 5) und *Amyotrophic lateral sclerosis signaling* (Modul 6) wurden weitere mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen assoziierte Reaktionswege festgestellt. Zusätzlich wurden folgende *pathways* identifiziert: *14-3-3-mediated signaling* (Modul 4), *Calcium signaling* (Modul 10) und *Integrin signaling* (Modul 11).

Außerdem wurden die detektierten *Hub*-Proteine auf Überlappungen zwischen dem vorliegenden Datensatz und Bitsika untersucht. Folgende Proteine wurden in beiden Netzwerkanalysen als intramodulare *hubs* identifiziert: *Bassoon (presynaptic cytomatrix protein)* (HC Modul 7, Bitsika Modul 10), *CLU* (HC Modul 7, Bitsika Modul 4), *Discs large MAGUK scaffold protein 4* (HC Modul 4, Bitsika Modul 4), *Myosin 18a* (HC Modul 5, Bitsika Modul 9), *Heat shock protein 4-like* (PHC Modul 1, Bitsika Modul 7) und *14-3-3 protein theta* (PHC Modul 12, Bitsika Modul 2).

3. Resultate der hypothesengestützten Datenanalyse

3.1. Ergebnisse der *Pathway-Enrichment-Analyse*

Um die Überrepräsentation von biochemischen Reaktionswegen im vorliegenden Datensatz zu evaluieren, wurde von Andreas Walker im Rahmen seiner Dissertation eine *Pathway-Enrichment-Analyse* durchgeführt. Für die Untersuchung wurden die zwei web-basierten Programme *Genomatix* und *ConsensusPathDB* verwendet. Die Analyse erfolgte unter Verwendung aller Proteine, die zum jeweiligen Zeitpunkt ein signifikant reguliertes Expressionsmuster aufwiesen. Hierzu mussten die Proteine einen *fold change* $\geq 1,5$ und einen p-Wert (Signifikanzniveau) $< 0,05$ aufweisen. Als Hintergrund dienten alle zum jeweiligen Zeitpunkt im jeweiligen Gewebe identifizierten Proteine. Alle *pathways*, denen mindestens zwei Proteine zugeordnet werden konnten und für die ein p-Wert $< 0,05$ bestimmt wurde, wurden nähergehend analysiert. Im Rahmen des hier vorliegenden Dissertationsvorhabens wurden die Ergebnislisten der Analyse zum einen unter dem Fokus extrazellulärer Matrix und deren Interaktion mit den anderen Zellen ausgewertet. Zum anderen wurden mit Zellstress und Zelltod assoziierte Reaktionswege herausgefiltert und näher analysiert. Es wird an dieser Stelle daraufhin gewiesen, dass eine Überschneidung der im folgenden dargestellten Ergebnisse mit den von Andreas Walker (WALKER 2016; WALKER et al. 2016) und Katharina Kistler (KISTLER 2016) im Rahmen ihrer Doktorarbeiten durchgeführten Auswertungen des vorliegenden Datensatzes festgestellt werden kann. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ein Teil der in der proteomischen Studie identifizierten Proteine mehreren funktionellen Bereichen zugeordnet werden kann.

3.1.1. Extrazelluläre Matrix assoziierte *pathways*

Aus den Ergebnislisten der Analyse konnten für den HC in beiden Programmen jeweils neun mit der extrazellulären Matrix assoziierte *pathways* identifiziert werden. Hiervon waren vier (*Genomatix*) bzw. zwei (*ConsensusPathDB*) *pathways* während der frühen Post-Insult-Phase, drei (*Genomatix*) bzw. vier (*ConsensusPathDB*) *pathways* während der Latenzphase und zwei (*Genomatix*) bzw. drei (*ConsensusPathDB*) *pathways* während der chronischen Phase reguliert. Die Tabellen 12 und 13 zeigen die Zusammenstellung dieser *pathways* inklusive der ihnen zugeordneten Proteine jeweils für das Programm *Genomatix* und für das Programm *ConsensusPathDB*. Die identifizierten Reaktionswege umfassten vor allem Integrin assoziierte *pathways*. In der frühen Post-Insult-Phase waren dies *Alpha6Beta4Integrin* ($p = 0,049$) und *Amb2 integrin signaling* ($p = 0,043$). Zehn Tage nach SE konnten hierzu die Reaktionswege *Integrin* ($p = 0,015$), *Amb2 integrin signaling* ($p = 0,018$ bzw. $p = 0,017$) und *Paxillin* ($p = 0,049$) sowie acht Wochen nach SE die

pathways Integrin linked kinase ($p = 0,006$) und *Paxillin* ($p = 0,008$) festgestellt werden. Des Weiteren wurden neben den Reaktionswegen *Tissue inhibitor of metalloproteinase* ($p = 0,042$; 2dpSE) und *Cell-extracellular matrix interactions* ($p = 0,018$; 10dpSE) in der chronischen Phase acht Wochen nach SE weitere in die Zellkommunikation involvierte *pathways* identifiziert. Diese waren *Cell junction organization* ($p = 0,006$), *Cell adhesion molecules (CAMs)* ($p = 0,016$) und *Cell-cell communication* ($p = 0,019$).

Tabelle 12: Extrazelluläre Matrix assoziierte *pathways* im HC - Genomatix

p-Wert	pathway	Quelle	Proteine
<i>2 Tage nach SE</i>			
0,027	Focal adhesion kinase 1	Genomatix	CDC42, TGM2, TLN1, TRIO, RASA1, CD151, ACTN1, CD44, LDHB
0,040	Beta catenin degradation signaling (Canonical) (Canonical Wnt signaling pathway Diagram)	INOH	YWHAE, YWHAZ, YWHAG, CD44
0,042	Tissue inhibitor of metalloproteinase	Genomatix	SERPINH1, CD63, CTSB, CD44
0,049	Alpha6Beta4Integrin	CellMap	YWHAE, YWHAZ, CD151, VIM
<i>10 Tage nach SE</i>			
0,015	Integrin	Genomatix	LCP1, ITGAM, CD9, HNRNPU, ITGAL, FLNA, ITGB2, PTK2B, TLN1, VCL, JAM3, CD63, FERMT3, CD44, FERMT2
0,018	amb2 Integrin signaling	NCI-nature	KNG1, LRP1, ITGAM, ITGB2, TLN1, JAM3
0,048	Paxillin	Genomatix	KNG1, PLCG1, GNB2L1, FLNA, ITGB2, PTK2B, TLN1, VCL
<i>8 Wochen nach SE</i>			
0,006	Integrin linked kinase	Genomatix	ITGB1, ANXA2
0,008	Paxillin	Genomatix	ITGB1, MARCKSL1

Tabelle 13: Extrazelluläre Matrix assoziierte *pathways* im HC - ConsensusPathDB

p-Wert	pathway	Quelle	Proteine
<i>2 Tage nach SE</i>			
0,015	MAPK signaling pathway	Wikipathways	HSPA5, HSPB1, PPP5C, HSPA1A, RASA1, PAK2, CDC42
0,043	amb2 integrin signaling	PID	HMGB1, JAM3, TLN1
<i>10 Tage nach SE</i>			
0,010	Rho cell motility signaling pathway	BioCarta	PFN1, TRIO, GSN, VCL, TLN1
0,013	Amoebiasis - Homo sapiens (human)	KEGG	RAB7A, ITGB2, HSPB1, PRKCB, VCL, ACTN1, PRKCG, ITGAM
0,017	amb2 integrin signaling	PID	JAM3, LRP1, ITGAM, ITGB2, TLN1
0,018	Cell-extracellular matrix interactions	Reactome	FERMT2, ACTN1, RSU1
<i>8 Wochen nach SE</i>			
0,006	Cell junction organization	Reactome	ITGB1, CDH4
0,016	Cell adhesion molecules (CAMs) - Homo sapiens (human)	KEGG	ITGB1, CDH4
0,019	Cell-cell communication	Reactome	ITGB1, CDH4

Für den PHC ergaben sich mittels *Genomatix* 20 und mittels *ConsensusPathDB* 26 Reaktionswege mit einer Assoziation zur extrazellulären Matrix. Die Verteilung zwischen den verschiedenen Phasen der Epileptogenese und die den Reaktionswegen zugeordneten Proteine können für *Genomatix* Tabelle 14 und für *ConsensusPathDB* Tabelle 15 entnommen werden. Es konnten zwei allgemeine, mit der extrazellulären Matrix assoziierte Reaktionswege identifiziert werden. Dies waren *Extracellular matrix organization* (2dpSE: $p = 0,021$; 10dpSE: $p = 0,007$) und *ECM-receptor interaction* (8wpSE; $p = 0,004$). Des Weiteren konnten für die Gehirnregion des PHC ebenfalls Integrin assoziierte *pathways* festgestellt werden. Dies waren zum zweiten Zeitpunkt zehn Tage nach SE zum Beispiel die Reaktionswege *$\alpha 6 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 4$ integrin signaling* ($p = 0,000$ bzw. $p = 0,001$), *Integrin family cell surface interactions* ($p = 0,001$), *Integrin signaling pathway* ($p = 0,033$) und *Integrin-mediated cell adhesion* ($p = 0,012$). Außerdem war es möglich, *pathways* weiteren funktionellen Bereichen der Interaktion der extrazellulären Matrix zuzuordnen. So wurden mehrere biochemische Reaktionswege detektiert, die mit den Proteoglykanen der extrazellulären Matrix und deren Interaktionen mit anderen Zellen assoziiert sind. In der frühen Post-Insult-Phase waren dies *Syndecan-2 mediated signaling events* ($p = 0,000$ bzw. $p = 0,010$), *Syndecan-4 mediated signaling events* ($p = 0,004$ bzw. $p = 0,004$), *Fibronectin matrix formation* ($p = 0,015$), *Syndecan interactions* ($p = 0,015$) und *Urokinase-type plasminogen (uPA) and uPAR-mediated signaling* ($p = 0,025$). Zwei dieser Reaktionswege, *Syndecan-4 mediated signaling events* ($p = 0,007$ bzw. $p = 0,005$) und *Urokinase-type plasminogen (uPA) and uPAR-mediated signaling* ($p = 0,021$), waren während der Latenzphase ebenfalls signifikant reguliert. In der chronischen Phase konnten die *pathways* *Matrix metalloproteinase* ($p = 0,001$), *ECM proteoglycans* ($p = 0,034$) und *Laminin interactions* ($p = 0,027$) diesem funktionellen Bereich zugeordnet werden.

Tabelle 14: Extrazelluläre Matrix assoziierte *pathways* im PHC - *Genomatix*

p-Wert	<i>pathway</i>	Quelle	Proteine
<i>2 Tage nach SE</i>			
0,000	Syndecan-2-mediated signaling events	NCI-nature	NF1, PRRT2, CDC42, EZR, ITGB1, RASA1, ITGA5, GNB2L1
0,004	Syndecan-4-mediated signaling events	NCI-nature	PRKCA, ITGB1, ACTN1, ITGA5
0,010	Paxillin	Genomatix	CDC42, CTTN, FLNA, ITGB2, ITGB1, PTK2B, MCAM, GNB2L1
0,024	Focal adhesion kinase 1	Genomatix	CDC42, CTTN, TGM2, EZR, ITGB1, PTK2B, MCAM, RASA1, ACTN1, CD44, ITGA5, GNB2L1
<i>10 Tage nach SE</i>			
0,000	a6b1 and a6b4 integrin signaling	NCI-nature	PRKCA, ITGB1, ITGA6, YWHAG, YWHAZ, SFN, YWHAQ, GRB2, HRAS, YWHAB
0,001	Integrin family cell surface interactions	NCI-nature	ITGB1, ITGAM, ITGA6, ITGB8, ITGA1, ITGB2, ITGA5
0,007	Syndecan-4-mediated signaling events	NCI-nature	PRKCA, DNM2, ITGB1, ACTN1, ITGA5
0,012	Alpha6Beta4Integrin	CellMap	PRKCA, ITGA6, YWHAZ, SFN, CD151, MBP, YWHAQ, VIM, GRB2, YWHAB
0,012	Tyrosine protein kinase src	Genomatix	DNM2, CRK, ITGB1, PRKCE, ASAP1, RASA1, GPRIN1, ACTN1, ACP1, ANXA2, PTPRC, ALB, PRRT2, SH3KBP1, CDC42, EZR, GSN, TOM1L2, PTK2B, MAPK8IP3, KIFAP3, FHIT, PTPN6, ANPEP, MIF, ADRBK1, ADAM17, ITGA5, GRB2, ARRB1
0,016	Focal adhesion kinase 1	Genomatix	CRK, ITGB1, ITGA6, SLK, RASA1, ACTN1, NME1, CDC42, TGM2, EZR, PTK2B, TLN1, MAPK8IP3, MCAM, PPAP2B, SFN, CD151, CD44, ITGA5, GRB2
0,020	Beta catenin degradation signaling (Canonical) (Canonical Wnt signaling pathway Diagram)	INOH	YWHAG, SKP1, AGRN, YWHAZ, SFN, YWHAQ, CD44, YWHAB
0,027	Integrin	Genomatix	ITGB1, ITGAM, ITGA6, EDIL3, NME1, ITGB8, ITGA1, AGRN, MFGE8, CDC42, HNRNPU, FLNA, ITGB2, PTK2B, TLN1, CD151, ANXA7, CD44, ITGA5
0,028	Paxillin	Genomatix	CRK, ITGB1, SLK, CDC42, MARCKSL1, FLNA, ITGB2, PTK2B, TLN1, MCAM, PPAP2B
0,033	Integrin signaling pathway	BioCarta	ITGB1, ACTN1, ITGA1, TLN1, GRB2, HRAS
0,048	Filopodium formation (Integrin signaling pathway)	INOH	CRK, ITGB1, ITGAM, ITGA6, ITGB8, ITGA1, AGRN, CDC42, ITGB2, TLN1, CD44, ITGA5, GRB2, HRAS
0,049	mcalpain and friends in cell motility	BioCarta	ITGB1, ITGA1, EZR, TLN1, PRKAR2A, PRKAR1B, GRB2, HRAS
<i>8 Wochen nach SE</i>			
0,000	Integrin	Genomatix	LCP1, ITGB1, ITGA6, CD9, ITGAV, AGRN, RAP1A, HNRNPU, SLC3A2, FLNA, TLN1, SLC12A2, TNC, VCL, DAG1, JAM3
0,000	Beta1 integrin cell surface interactions	NCI-nature	ITGB1, ITGA6, ITGAV, CD81, TNC
0,001	Matrix metalloproteinase	Genomatix	LRP1, STOML2, ITGB1, CD9, ITGAV, HMGA1, NDRG2, CACNA2D3, SLC3A2, FLNA, CLU, JAM3, MIF
0,004	Integrin family cell surface interactions	NCI-nature	ITGB1, ITGA6, ITGAV

Tabelle 15: Extrazelluläre Matrix assoziierte *pathways* im PHC – *ConsensusPathDB*

p-Wert	<i>pathway</i>	Quelle	Proteine
<i>2 Tage nach SE</i>			
0,003	Syndecan-4-mediated signaling events	PID	PRKCA, ITGB1, ACTN1, ITGA5
0,010	Syndecan-2-mediated signaling events	PID	GNB2L1, ITGB1, RASA1, EZR, NF1
0,015	Fibronectin matrix formation	Reactome	ITGB1, ITGA5
0,015	Phospholipase c delta in phospholipid associated cell signaling	BioCarta	TGM2, PLCD1
0,015	Syndecan interactions	Reactome	PRKCA, ITGB1, ACTN1
0,021	Extracellular matrix organization	Reactome	ITGB1, ACTN1, ITGB2, PRKCA, CD44, P4HB, ITGA5, SERPINH1, PPIB
0,025	Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPAR-mediated signaling	PID	ITGB1, ITGB2, NCL, ITGA5
0,036	a6b1 and a6b4 Integrin signaling	PID	YWHAZ, PRKCA, YWHAB, ITGB1
0,041	Cell-extracellular matrix interactions	Reactome	ITGB1, ACTN1
0,049	Integrin-linked kinase signaling	PID	CDC42, ACTN1, NACA, CDC37
<i>10 Tage nach SE</i>			
0,001	a6b1 and a6b4 integrin signaling	PID	YWHAZ, ITGB1, PRKCA, HRAS, YWHAQ, SFN, YWHAB, YWHAG
0,005	Syndecan-4-mediated signaling events	PID	PRKCA, ITGB1, ACTN1, ITGA5, DNM2
0,007	Extracellular matrix organization	Reactome	ITGB1, ACTN1, ITGB8, ITGB2, PRKCA, ITGA1, P4HB, ADAM17, ITGA5, PRSS1, CD151, AGRN, ITGAM, CD44, SERPINH1, PPIB
0,011	Integrin cell surface interactions	Reactome	ITGB1, ITGB8, ITGB2, ITGA1, ITGA5, AGRN, ITGAM, CD44
0,012	Integrin-mediated cell adhesion	Wikipathways	ITGB1, ITGB2, ITGA1, HRAS, ITGA5, ROCK2, TLN1, ITGAM, ITGB8, CRK, PAK2, CDC42
0,021	Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPAR-mediated signaling	PID	ITGB1, ITGB2, ITGA5, NCL, ITGAM, CRK
0,040	Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling	Reactome	YWHAZ, CRK, HRAS, PTPN6
0,042	MAPK Signaling Pathway	Wikipathways	MINK1, STMN1, PPP3R1, PPM1A, HSPB1, HSPA1A, MAPT, ARR1, CRK, MAPK8IP3, RASA1, PAK2, CDC42
<i>8 Wochen nach SE</i>			
0,000	Integrin cell surface interactions	Reactome	ITGB1, JAM3, ITGAV, AGRN, DAG1, TNC
0,003	Beta1 integrin cell surface interactions	PID	CD81, ITGB1, ITGAV, TNC
0,004	ECM-receptor interaction - Homo sapiens (human)	KEGG	ITGB1, AGRN, TNC, DAG1, ITGAV
0,008	Non-integrin membrane-ECM interactions	Reactome	AGRN, ITGB1, TNC, DAG1, ITGAV
0,027	Laminin interactions	Reactome	ITGB1, ITGAV
0,029	amb2 integrin signaling	PID	JAM3, LRP1, RAP1A, TLN1
0,033	Cell surface interactions at the vascular wall	Reactome	ITGB1, JAM3, SLC3A2, ATP1B3, ITGAV, SLC16A1, MAG
0,034	ECM proteoglycans	Reactome	AGRN, ITGB1, TNC, DAG1, ITGAV

Weiterhin wurden die Expressionswerte der Proteine, die den *pathways* mit Assoziation zur extrazellulären Matrix zugeordnet wurden, mittels *heatmaps* dargestellt. Hierbei wurden Proteine mit einem ähnlichen Expressionsprofil geclustert, d.h. diese werden näher zusammen abgebildet. Abbildung 16 zeigt die *heatmaps* des HC für die drei Zeitpunkte. Im HC ist für einen Großteil der Proteine eine Induktion bei den Post-SE-Tieren sowohl in der frühen Post-Insult-Phase als auch in der Latenzphase festzustellen. In Abbildung 17 sind die entsprechenden *heatmaps* für den PHC dargestellt. Hierbei ist festzustellen, dass zwei und zehn Tage nach SE jeweils etwa die Hälfte der Proteine eine Überexpression und die andere Hälfte eine Herunterregulation bei den Post-SE-Tieren aufweisen. In der chronischen Phase acht Wochen nach SE kann überwiegend eine Induktion der Proteine festgestellt werden.

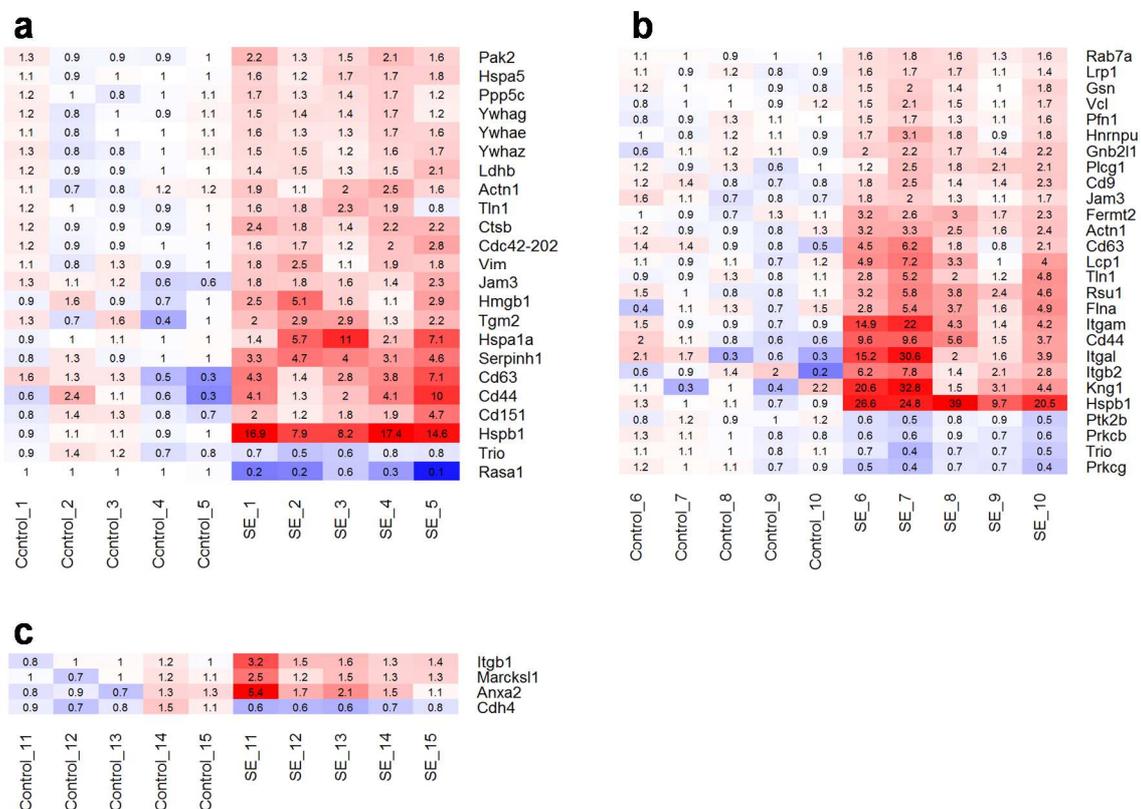


Abbildung 16

Expressionsanalyse der den *pathways* mit Assoziation zur extrazellulären Matrix zugeordneten Proteine für den HC zum Zeitpunkt zwei Tage (a), zehn Tage (b) und acht Wochen (c) nach SE. Die Kontrolltiere (Control) und die Post-SE-Tiere (SE) wurden chronologisch von eins bis 15 nummeriert. Die Anordnung der Proteine erfolgte gemäß einer Clustering, sodass Proteine mit einem ähnlichem Expressionsprofil näher zusammen abgebildet wurden. Die Zellen repräsentieren die log₂-transformierten tierindividuellen *fold changes*. Die Zellenfarbe indiziert die Veränderung der Expression im Vergleich zum Mittelwert der Kontrolltiere. Eine rote Einfärbung gibt eine Aufregulation, eine blaue Einfärbung eine Herunterregulation an. Die Zellenwerte stellen die tatsächlichen tierindividuellen *fold changes* dar.

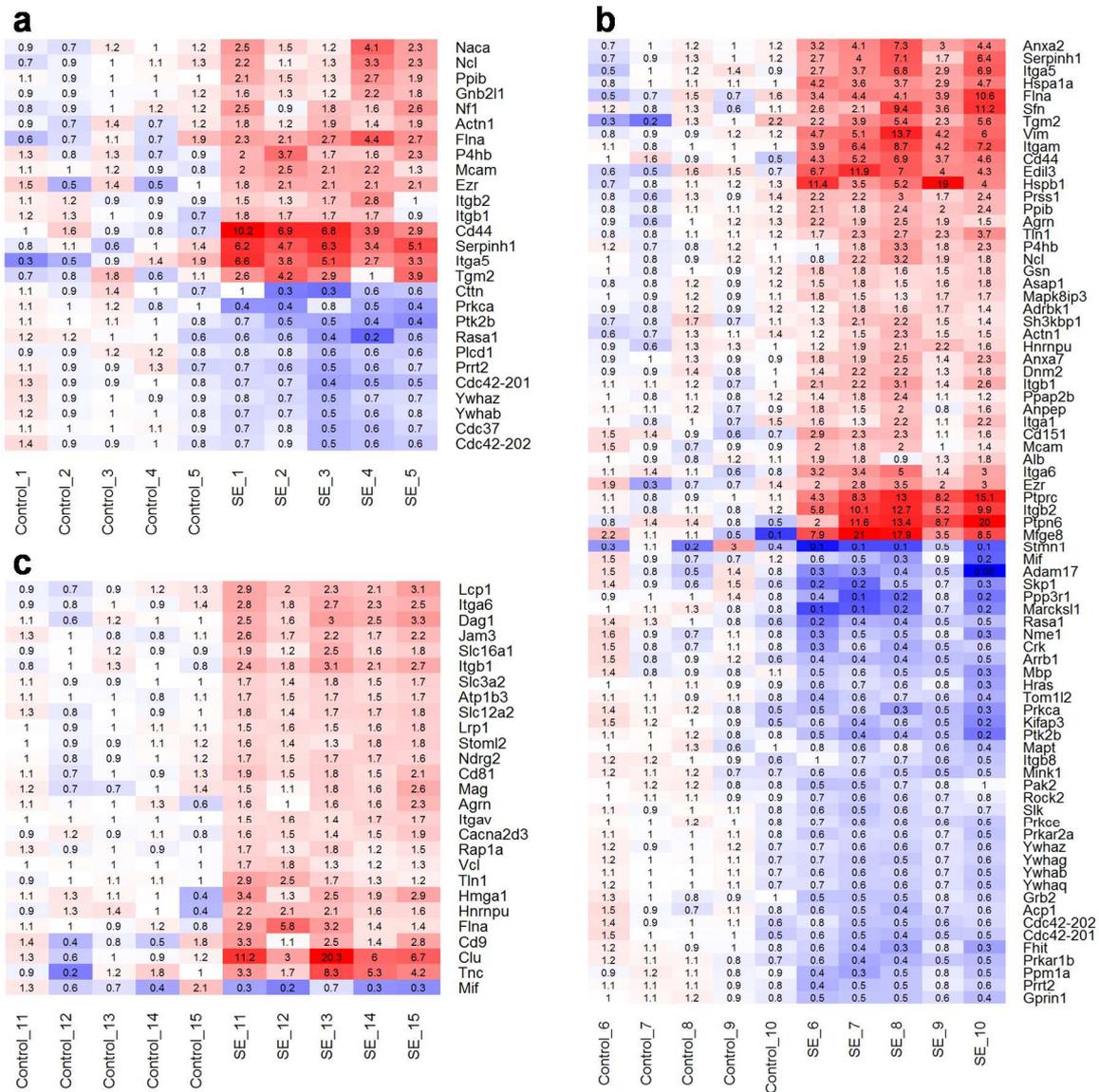


Abbildung 17

Expressionsanalyse der den *pathways* mit Assoziation zur extrazellulären Matrix zugeordneten Proteine für den PHC zum Zeitpunkt zwei Tage (a), zehn Tage (b) und acht Wochen (c) nach SE. Die Kontrolltiere (Control) und die Post-SE-Tiere (SE) wurden chronologisch von eins bis 15 nummeriert. Die Anordnung der Proteine erfolgte gemäß einer Clusterung, sodass Proteine mit einem ähnlichem Expressionsprofil näher zusammen abgebildet wurden. Die Zellen repräsentieren die log₂-transformierten tierindividuellen *fold changes*. Die Zellenfarbe indiziert die Veränderung der Expression im Vergleich zum Mittelwert der Kontrolltiere. Eine rote Einfärbung gibt eine Aufregulation, eine blaue Einfärbung eine Herunterregulation an. Die Zellenwerte stellen die tatsächlichen tierindividuellen *fold changes* dar.

Bei der Analyse der den Reaktionswegen zugeordneten Proteine konnten verschiedene funktionelle Gruppen detektiert werden. Mit den Proteinen *Tenascin C* (TNC) und *Agrin* (AGRN) konnten zwei spezifische Glykoproteine der extrazellulären Matrix identifiziert werden. Für TNC wird eine wichtige Rolle bei Vorgängen der strukturellen Plastizität im Gehirn diskutiert (LEVY et al. 2014; STAMENKOVIC et al. 2017). TNC zeigte ausschließlich im PHC in der chronischen Phase eine signifikante Überexpression. AGRN

könnte über verschiedene Isoformen bei der Formation der Blut-Hirn-Schranke und bei der Differenzierung von Synapsen beteiligt sein (BARBER u. LIETH 1997; BOSE et al. 2000). AGRN wies im PHC zehn Tage und acht Wochen nach SE ein differentielles Expressionsmuster mit einer Induktion bei den Post-SE-Tieren auf. Weiterhin konnten mehrere Rezeptoren und Interaktionspartner von Molekülen der extrazellulären Matrix evaluiert werden. *CD44 molecule* (CD44) wies im HC und im PHC in den beiden ersten untersuchten Phasen der Epileptogenese eine Induktion auf und stellt einen Hauptrezeptor für Hyaluronsäure dar (ROSZKOWSKA et al. 2016). *Dystroglycan 1* (DAG1) besteht aus einer extrazellulären und einer transmembranösen Untereinheit und bindet Laminin (VENSTROM u. REICHARDT 1993). DAG1 zeigte ausschließlich im PHC in der chronischen Phase eine Induktion. Das Protein *Transglutaminase 2* (TGM2), das in beiden Gehirnregionen zwei und zehn Tage nach SE eine Überexpression aufwies, könnte bei der Interaktion zwischen Astrozyten und Fibronectin involviert sein (VAN STRIEN et al. 2011).

Außerdem zeigten mehrere Mitglieder der Familie der Integrine im Verlauf der Epileptogenese ein differentielles Regulationsmuster. Integrine vermitteln Vorgänge der Zell-Zell-Kommunikation, Zell-Adhäsionsvorgänge und stellen Rezeptoren für Moleküle der extrazellulären Matrix dar (WU u. REDDY 2012). Den selektierten *pathways* wurden folgende Integrine zugeordnet: ITGA1, ITGA5, ITGA6, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB8. Hiervon zeigte vor allem ITGA5 eine deutliche Induktion im PHC zwei und zehn Tage nach SE. Ebenfalls wurden differentiell exprimierte Proteine evaluiert, die in die Aktivierung von Integrinrezeptoren involviert sind. Dies waren *Talin 1* (TLN1), *FERMT2* und *Fermitin family member 3* (FERMT3).

Eine weitere funktionelle Gruppe stellten zytoskeletale Proteine dar. Dies waren die Proteine *Actinin alpha 1* (ACTN1), *Cortactin* (CTTN), *Filamin A* (FLNA), *Ezrin* (ERZ), *Vimentin* (VIM) und *Vinculin* (VCL).

3.1.2. Zellstress und Zelltod assoziierte *pathways*

Es können verschiedene Arten des Zelltodes unterschieden werden, wobei eine Hauptunterscheidung in einen inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Zelluntergang erfolgen kann (DINGLELINE et al. 2014). Die unterschiedlichen Formen und Möglichkeiten des Zelltodes finden sich in den zu diesem funktionellen Bereich durch die *Pathway-Enrichment*-Analyse detektierten Reaktionswegen wieder.

Für den HC konnten mittels *Genomatix* 14 und mittels *ConsensusPathDB* 20 Zellstress und Zelltod assoziierte *pathways* identifiziert werden. Die Aufschlüsselung in die drei Zeitpunkte nach SE sowie die jeweils zugeordneten Proteine können für *Genomatix* Tabelle 16 und für *ConsensusPathDB* Tabelle 17 entnommen werden. Es konnten hauptsächlich Reaktionswege festgestellt werden, die an der Regulation des

apoptotischen Zelltodes beteiligt sind. Beispielsweise wurden hierzu folgende *pathways* zugeordnet: *Apoptosis* (2dpSE, $p = 0,013$ bzw. $p = 0,010$), *Programmed cell death* (2dpSE, $p = 0,018$), *Antiapoptotic* (2dpSE, $p = 0,008$), *Caspase cascade in apoptosis* (10dpSE, $p = 0,028$ bzw. $p = 0,019$ und $p = 0,048$) und *14 3 3 protein* (8wpSE, $p = 0,034$). Zusätzlich konnten Reaktionswege festgestellt werden, die die Reaktion der Zelle auf Stress widerspiegeln. Diese waren in der frühen Post-Insult-Phase *Cellular response to heat stress* ($p = 0,010$) und *HSF1 activation* ($p = 0,013$). Während der Latenzphase waren hierzu die Reaktionswege *FAS pathway and stress induction von HSP regulation* ($p = 0,034$) und *FAS signaling pathway (CD95)* ($p = 0,044$) reguliert. Außerdem konnte in der chronischen Phase acht Wochen nach SE der *pathway Mixed lineage kinase* ($p = 0,014$) identifiziert werden, der dem funktionellen Bereich der Nekroptose zugeordnet werden kann.

Tabelle 16: Zellstress und Zelltod assoziierte *pathways* im HC - *Genomatix*

p-Wert	<i>pathway</i>	Quelle	Proteine
<i>2 Tage nach SE</i>			
0,002	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	NCI-nature	YWHAE, HSPB1, YWHAZ, YWHAG
0,008	Antiapoptotic	Genomatix	HSPA5, CLU, HSPB1, ANKHD1, PLSCR3, HNRNPL, ANXA5, CD44
0,010	Apoptosis	Genomatix	TGM2, HSPA5, CLU, HSPB1, PHB, LMNA, CALR, PLSCR3, HSPA1A, HNRNPC, HSP90B1, SDHC, CTSB, EEF1A1, ANXA5, ANP32A
0,029	Apoptosis (Fas signaling pathway)	INOH	YWHAE, YWHAZ, YWHAG
0,029	Aurora B signaling	NCI-nature	RASA1, VIM, NCL
0,037	Dna repair	Genomatix	COPS5, LMNA, UBE2V2, COPS5, PPP5C, DDB1
0,044	Hypoxia-inducible factor in the cardiovascular system	BioCarta	COPS5, LDHA
<i>10 Tage nach SE</i>			
0,019	Caspase cascade in apoptosis	BioCarta	LMNA, LMNB1, PARP1
0,026	Stress	Genomatix	OGT, HSPB1, PPIB, CALR, APOE, ACADVL, HSPA1A, FLNB, LMNB1, CP, ACTN1, G6PD, FAM120A, HSP90B1, CLIC4, RDX, HYOU1, SRM, P4HB, PFN1, TGM2, CLU, USP7, RPL11, VCL, PARP1, TXNRD1, EIF5B, HAGH, EIF2S1, KIF1B
0,043	FAS signaling pathway (CD95)	NCI-nature	LMNA, GSN, PARP1
0,048	Caspase cascade in apoptosis	NCI-nature	LMNA, LMNB1, GSN, PARP1, VIM
<i>8 Wochen nach SE</i>			
0,002	Glial cell line derived neurotrophic factor	Genomatix	GFAP, ITGB1
0,014	Mixed lineage kinase	Genomatix	ABI2, ANXA2
0,034	14 3 3 protein	Genomatix	GFAP, ABI2

Tabelle 17: Zellstress und Zelltod assoziierte *pathways* im HC - *ConsensusPathDB*

p-Wert	<i>pathway</i>	Quelle	Proteine
<i>2 Tage nach SE</i>			
0,004	Apoptosis-related network due to altered Notch3 in ovarian cancer	Wikipathways	VIM, ANXA5, PAK2, HSPA5, HSPB1
0,010	Cellular response to heat stress	Reactome	EEF1A1, HSPA1A, HSPB1, SERPINH1, YWHAE
0,013	Apoptosis	Reactome	YWHAZ, HMGB1, VIM, LMNA, YWHAG, PAK2, YWHAE
0,013	HSF1 activation	Reactome	EEF1A1, HSPA1A, SERPINH1, HSPB1
0,015	Activation of BAD and translocation to mitochondria	Reactome	YWHAZ, YWHAG, YWHAE
0,018	Programmed cell death	Reactome	YWHAZ, HMGB1, VIM, LMNA, YWHAG, PAK2, YWHAE
0,023	Cell cycle	Wikipathways	YWHAZ, YWHAG, YWHAE
0,032	Aurora B signaling	PID	NCL, RASA1, VIM
0,032	Cell cycle - Homo sapiens (human)	KEGG	YWHAZ, YWHAG, YWHAE
0,032	Activation of BH3-only proteins	Reactome	YWHAZ, YWHAG, YWHAE
0,032	Intrinsic pathway for apoptosis	Reactome	YWHAZ, YWHAG, YWHAE
0,036	Hypoxia-inducible factor in the cardiovascular system	BioCarta	LDHA, COPS5
0,036	Bile acid biosynthesis, neutral pathway	HumanCyc	ACAA2, POR
0,036	Metabolism of polyamines	Reactome	SMS, SRM
<i>10 Tage nach SE</i>			
0,000	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	Reactome	RPL8, RPL6, RPL7, RPL4, RPL5, RPL18A, RPL35A, RPS15A, RPS6, RPS5, EIF2S1, RPS9, EIF2S2, RPS18, RPL7A, EIF3C, RPS19, RPS26, RPS25, RPL3, RPL14, RPL15, RPL10, RPL11, RPSA, RPL36, RPL10A
0,018	Caspase cascade in apoptosis	BioCarta	LMNA, LMNB1, PARP1
0,022	Apoptosis-related network due to altered Notch3 in ovarian cancer	Wikipathways	APOE, ANXA5, HSPB1, VIM, PTK2B, CTNNA1
0,028	Caspase cascade in apoptosis	PID	LMNA, LMNB1, PARP1, VIM, GSN
0,034	FAS pathway and stress induction of HSP regulation	Wikipathways	LMNA, LMNB1, PARP1, HSPB1
0,034	NRAGE signals death through JNK	Reactome	KALRN, TRIO, ARHGEF2, RASGRF2

Für die Gehirnregion des PHC wurden durch das Programm *Genomatix* neun und durch das Programm *ConsensusPathDB* 27 Reaktionswege identifiziert, die mit den funktionellen Bereichen Zellstress und Zelltod assoziiert waren. In der frühen Post-Insult-Phase waren von diesen *pathways* zwei bzw. drei, in der Latenzphase vier bzw. zehn und in der chronischen Phase drei bzw. 14 reguliert. Tabelle 18 zeigt die Aufschlüsselung nach den drei Zeitpunkten zusammen mit den zugeordneten Proteinen für *Genomatix* und Tabelle 19 für *ConsensusPathDB*. Ähnlich zu den Ergebnissen für den HC konnten auch für den PHC hauptsächlich Reaktionswege detektiert werden, die in die Regulation der Apoptose involviert sind. Dies waren zum Beispiel in der frühen Post-Insult-Phase *14-3-3 protein* ($p = 0,037$) und während der Latenzphase *Apoptosis* ($p = 0,001$), *Programmed cell death* ($p = 0,001$), *Apoptotic execution phase* ($p = 0,015$) und *Intrinsic pathway for apoptosis* ($p = 0,021$). Zum dritten Zeitpunkt acht Wochen nach SE konnten neben vier bereits zum zweiten Zeitpunkt regulierten *pathways* noch weitere dem funktionellen Bereich der Apoptose zugeordnet werden. Beispielsweise waren dies *Caspase cascade in apoptosis* ($p = 0,001$ bzw. $p = 0,001$ und $p = 0,001$ bzw. $p = 0,003$) und *Apoptosis*

induced DNA fragmentation ($p = 0,034$). Ferner konnten Reaktionswege aufgefunden werden, die bei der Reaktion der Zelle auf Stress beteiligt sind. Dies waren die *pathways Cellular response to stress* ($p = 0,016$) während der Latenzphase und *FAS pathway and stress induction of HSP regulation* ($p = 0,008$) in der chronischen Phase. Weiterhin konnte der zehn Tage nach SE regulierte Reaktionsweg *Mixed lineage kinase* ($p = 0,006$) dem nekroptotischen Zelluntergang zugeordnet werden.

Tabelle 18: Zellstress und Zelltod assoziierte *pathways* im PHC - *Genomatix*

p-Wert	<i>pathway</i>	Quelle	Proteine
<i>2 Tage nach SE</i>			
0,023	Aurora B signaling	NCI-nature	PSMA3, RASA1, VIM, NCL
0,037	14 3 3 protein	Genomatix	NF1, FLNA, BSN, ITGB2, GFAP, MVP, YWHAZ, VIM, KPNA3, NEFL, PPP1R9B, YWHAB
<i>10 Tage nach SE</i>			
0,006	Mixed lineage kinase	Genomatix	PSME1, PARK7, HSPB1, SLK, PSMC3, NEFH, ANXA2, SH3KBP1, CDC42, FLNA, MAPK8IP3, WNK2, PRDX2, RPS5, YWHAQ, COPS2
0,013	Glial cell line derived neurotrophic factor	Genomatix	GFAP, ITGB1, HSPB1, GAP43, SNCA, ENO2, CALB1, ITGA5
0,017	Aurora B signaling	NCI-nature	PSMA3, RASA1, PEBP1, STMN1, VIM, NCL
0,022	il 3 signaling pathway	BioCarta	PTPN6, GRB2, HRAS
<i>8 Wochen nach SE</i>			
0,001	Caspase cascade in apoptosis	BioCarta	LMNA, LMNB1, PARP1, LMNB2
0,003	Caspase cascade in apoptosis	NCI-nature	LMNA, APP, LMNB1, GSN, PARP1, VIM, LMNB2
0,018	Glial cell line derived neurotrophic factor	Genomatix	MAOB, GFAP, ITGB1, HSPB1, SLC1A3

Tabelle 19: Zellstress und Zelltod assoziierte *pathways* im PHC - *ConsensusPathDB*

p-Wert	<i>pathway</i>	Quelle	Proteine
<i>2 Tage nach SE</i>			
0,010	Regulation of Ras family activation	PID	PRKCA, SYNGAP1, PRKCE, RASA1, NF1
0,025	Aurora B signaling	PID	PSMA3, NCL, RASA1, VIM
0,034	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	Reactome	RPS27A, RPL29, RPL23A, RPL27, EIF3C, RPL30, RPL31, RPL11, RPL12, RPL22, RPS19
<i>10 Tage nach SE</i>			
0,001	Apoptosis	Reactome	YWHAZ, BCAP31, LMNB1, DBNL, PPP3R1, HIST1H1A, YWHAQ, VIM, SFN, HIST1H1B, MAPT, YWHAB, LMNA, YWHAG, PAK2, GSN
0,001	Programmed cell death	Reactome	YWHAZ, BCAP31, LMNB1, DBNL, PPP3R1, HIST1H1A, YWHAQ, VIM, SFN, HIST1H1B, MAPT, ADAM17, YWHAB, LMNA, YWHAG, PAK2, GSN
0,004	Aurora B signaling	PID	PEBP1, STMN1, VIM, PSMA3, NCL, H3F3A, RASA1
0,005	Activation of BAD and translocation to mitochondria	Reactome	YWHAZ, PPP3R1, YWHAQ, SFN, YWHAB, YWHAG
0,010	LKB1 signaling events	PID	YWHAZ, SFN, YWHAQ, CTSD, EZR, CDC37, MAP2, MAPT, YWHAB, YWHAG
0,015	Apoptotic execution phase	Reactome	BCAP31, LMNB1, DBNL, VIM, PAK2, MAPT, LMNA, HIST1H1A, HIST1H1B, GSN
0,016	Cellular responses to stress	Reactome	EHMT1, MINK1, HIST1H4A, LMNB1, DNAJB6, HIST1H1A, HSPB1, PTGES3, PRDX6, PRDX5, RPS27A, ERO1L, PRDX2, HSPA1A, H3F3A, SERPINH1, P4HB, HIST1H1B, TXNRD1
0,021	Intrinsic pathway for apoptosis	Reactome	YWHAZ, PPP3R1, YWHAQ, SFN, YWHAB, YWHAG
0,041	Apoptotic cleavage of cellular proteins	Reactome	BCAP31, LMNB1, DBNL, VIM, MAPT, LMNA, GSN
0,041	RhoA signaling pathway	PID	ITGB1, EZR, TLN1, MSN, ROCK2, CDC42, SH3GL2
<i>8 Wochen nach SE</i>			
0,000	Dna damage/telomere stress induced senescence	Reactome	HIST1H1D, H1F0, LMNB1, HIST1H1B, HMGA1
0,001	Caspase cascade in apoptosis	BioCarta	LMNB2, LMNA, LMNB1, PARP1
0,001	Caspase cascade in apoptosis	PID	LMNB2, LMNB1, APP, PARP1, VIM, LMNA, GSN
0,002	Apoptotic execution phase	Reactome	TJP2, LMNB1, DSP, VIM, H1F0, HIST1H1D, LMNA, TJP1, HIST1H1B, GSN
0,002	Apoptosis-related network due to altered Notch3 in ovarian cancer	Wikipathways	APOE, ANXA5, HSPA5, HSPB1, APP, GCLC, VIM
0,008	FAS pathway and Stress induction of HSP regulation	Wikipathways	LMNB2, LMNA, LMNB1, PARP1, HSPB1
0,009	Apoptotic cleavage of cellular proteins	Reactome	TJP2, LMNB1, DSP, VIM, TJP1, LMNA, GSN
0,015	Apoptotic cleavage of cell adhesion proteins	Reactome	TJP2, TJP1, DSP
0,027	Breakdown of the nuclear lamina	Reactome	LMNA, LMNB1
0,034	Activation of DNA fragmentation factor	Reactome	HIST1H1D, H1F0, HIST1H1B
0,034	Apoptosis induced DNA fragmentation	Reactome	HIST1H1D, H1F0, HIST1H1B
0,040	Apoptosis	Reactome	TJP2, LMNB1, DSP, VIM, H1F0, HIST1H1D, LMNA, TJP1, HIST1H1B, GSN
0,046	RhoA signaling pathway	PID	ITGB1, VCL, RDX, EZR, TLN1, MSN
0,048	Programmed cell death	Reactome	TJP2, LMNB1, DSP, VIM, TJP1, HIST1H1D, LMNA, H1F0, HIST1H1B, GSN

Abbildung 18 zeigt die grafische Darstellung der Proteine mittels *heatmaps*, die zum jeweiligen Zeitpunkt einem Apoptose assoziierten *pathway* zugeordnet worden sind. Bei der Betrachtung des zeitlichen Regulationsmusters der selektierten Apoptose assoziierten *pathways* zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem HC und dem PHC. Im HC ergab sich für die frühe Post-Insult-Phase eine starke Induktion Apoptose assoziierter Proteine. Während der Latenzphase war eine weniger starke Überexpression derartiger Proteine zu beobachten. In der chronischen Phase wiesen nur zwei Proteine ein differentielles Expressionsmuster auf. Demgegenüber zeigten im PHC in den ersten beiden Phasen der Epileptogenese jeweils in etwa die Hälfte der den *pathways* zugeordneten Proteine eine Auf- oder eine Herunterregulation. Acht Wochen nach SE dominierten im PHC überexprimierte Proteine mit Assoziation zur Apoptose.

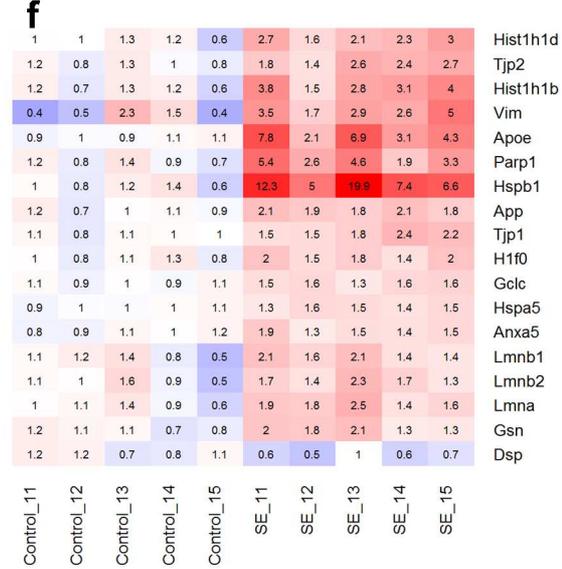
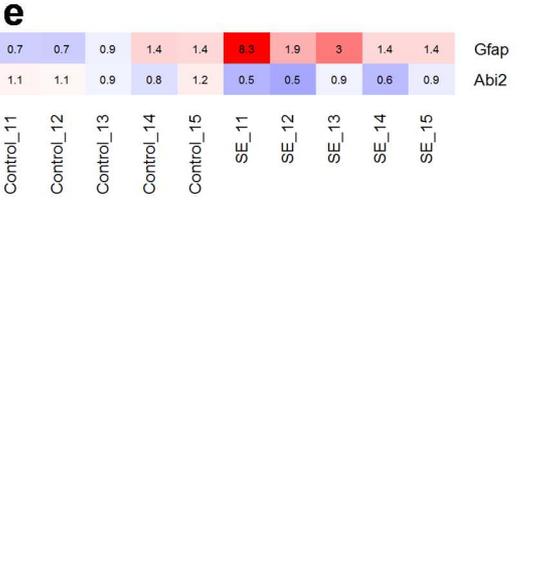
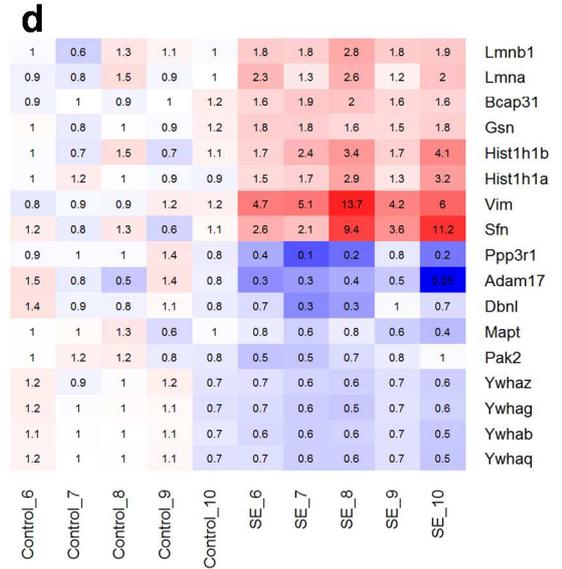
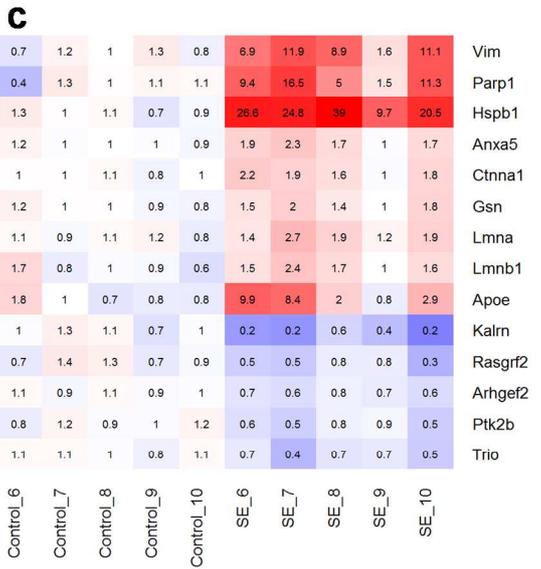
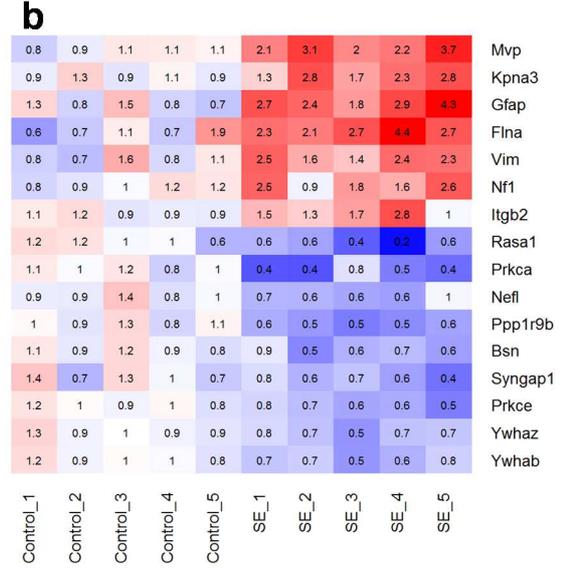
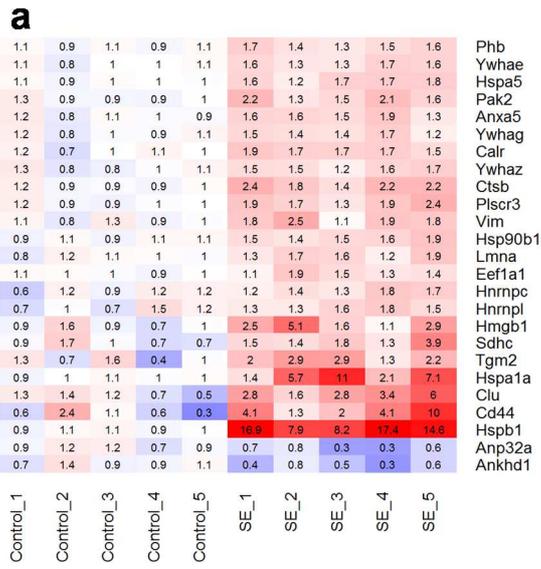


Abbildung 18

Expressionsanalyse der den *pathways* mit Apoptose Assoziation zugeordneten Proteine für den HC zum Zeitpunkt zwei Tage (a), zehn Tage (c) und acht Wochen (e) nach SE bzw. für den PHC zum Zeitpunkt zwei Tage (b), zehn Tage (d) und acht Wochen (f) nach SE. Die Kontrolltiere (Control) und die Post-SE-Tiere (SE) wurden chronologisch von eins bis 15 nummeriert. Die Anordnung der Proteine erfolgte gemäß einer Clusterung, sodass Proteine mit einem ähnlichem Expressionsprofil näher zusammen abgebildet wurden. Die Zellen repräsentieren die \log_2 -transformierten tierindividuellen *fold changes*. Die Zellenfarbe indiziert die Veränderung der Expression im Vergleich zum Mittelwert der Kontrolltiere. Eine rote Einfärbung gibt eine Aufregulation, eine blaue Einfärbung eine Herunterregulation an. Die Zellenwerte stellen die tatsächlichen tierindividuellen *fold changes* dar.

Mehrere Proteine, die als Modulatoren und Regulatoren der Apoptose angesehen werden, zeigten während der Epileptogenese ein differentielles Expressionsmuster. Das Protein *P21 (Rac1) activated kinase 2* (PAK2) wies im HC eine frühe und im PHC eine verzögerte Induktion auf. Für PAK2 wird eine komplexe Rolle im *Caspase*-vermittelten Zelluntergang diskutiert (ERON et al. 2017). *Ankyrin repeat and KH domain containing 1* (ANKHD1) zeigt zwei Tage nach SE eine Herunterregulation im HC. MILES et al. (2005) stellten für Ankhd1 eine antiapoptotische Funktion fest. Für das Protein *B-cell receptor-associated protein 31* (BCAP31) konnte im PHC eine Überexpression in der frühen Post-Insult-Phase und in der Latenzphase detektiert werden. BCAP31 wird eine proapoptotische Rolle im *Caspase-8*-vermittelten Zelltod zugeschrieben (IWASAWA et al. 2011). TGM2, ein weiteres Apoptose assoziiertes Protein (KUO et al. 2011), wies sowohl im HC als auch im PHC während den ersten beiden Phasen der Epileptogenese bei den Post-SE-Tieren eine signifikante Überexpression auf. HEYDEN et al. (2011) beobachteten in ihrer Studie für *Bassoon (presynaptic cytomatrix protein)* (BSN) eine regulatorische Funktion im Vorgang der Apoptose. Für BSN konnte zwei und zehn Tage nach SE im Bereich des PHC eine signifikant verminderte Expression nachgewiesen werden. Der Verlust des Proteins *Synaptic Ras GTPase activating protein 1* (SYNGAP1) führt zu einem gesteigerten apoptotischen Neuronenuntergang (KNUESEL et al. 2005). Im vorliegenden proteomischen Datensatz konnte für SYNGAP1 eine signifikante Herunterregulation im PHC in der frühen Post-Insult-Phase und im HC in der latenten Phase detektiert werden. *Poly (ADP-ribose) polymerase 1* (PARP1) trägt zu Reparatur geschädigter DNA bei und übernimmt dadurch eine antiapoptotische Rolle (KIM et al. 2015). Die Expression von PARP1 war im HC während der Latenzphase und im PHC während der chronischen Phase signifikant erhöht.

Weiterhin konnten mehrere *Lamine* den Apoptose assoziierten *pathways* zugeordnet werden. Die Proteinfamilie der *Lamine* übernimmt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der nukleären Stabilität (DECHAT et al. 2008). Es gibt Hinweise auf eine mögliche Beteiligung dieser Proteingruppe beim Prozess der Apoptose (HARBORTH et al. 2001; YANG et al. 2011). *Lamin A/C* (LMNA) zeigte im HC zwei und zehn Tage

nach SE und im PHC zehn Tage und acht Wochen nach SE eine signifikante Induktion. Für das Protein *Lamin B1* (LMNB1) konnte in beiden untersuchten Gehirnregionen während der Latenzphase eine Überexpression nachgewiesen werden. Im PHC hielt die Induktion auch in der chronischen Phase an. Demgegenüber zeigte *Lamin B2* (LMNB2) ausschließlich im PHC acht Wochen nach SE eine differentielle Überexpression.

Außerdem konnte eine Regulation mehrerer Mitglieder der Familie der *Heat shock proteins* festgestellt werden. So zeigte zum Beispiel das Protein *Heat shock protein family B (small) member 1* (HSPB1) im Verlauf der Epileptogenese im HC in den beiden ersten Phasen und im PHC in allen drei Phasen eine deutliche Überexpression bei den Post-SE-Tieren. Für HSPB1 wurde eine antiapoptotische Wirkung beschrieben (PAUL et al. 2010).

3.2. Ergebnisse der Immunhistochemie

Zur Validierung der Expressionsdaten des proteomischen Datensatzes wurden immunhistochemische Färbungen von zwei Proteinen durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine ITGA5 und FERMT2 ausgewählt. Beide Proteine sind unter anderem in biochemische Vorgänge der extrazellulären Matrix und deren Interaktion involviert.

3.2.1. Integrin subunit alpha 5

Integrine sind Glykoproteine, die als Transmembranrezeptoren fungieren und aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen (WU u. REDDY 2012). Zur Familie der Integrine gehören acht Proteine mit β -Untereinheit und 19 Proteine mit α -Untereinheit, aus denen 25 unterschiedliche Rezeptorkombinationen gebildet werden können (LI et al. 2009). Durch Bindung mit Proteinen der extrazellulären Matrix und anderen Transmembranproteinen vermitteln Integrine Interaktionen der extrazellulären Matrix mit anderen Zellen und Zelladhäsionsvorgänge (WU u. REDDY 2012). Die zur Signalweiterleitung nötige Rezeptoraktivierung geschieht vor allem durch Proteine, die den zytoplasmatischen Teil der β -Untereinheit beeinflussen (MEVES et al. 2009). ITGA5 bildet zusammen mit der β_1 -Untereinheit einen funktionellen Rezeptor für Fibronectin (HYNES 2002). Gemäß WU und REDDY (2012) gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Integrinen bei der Epileptogenese und Epilepsiemanifestation. Unter anderem kann eine modifizierte Bindung zwischen Integrinen und der extrazellulären Matrix die Plastizität im Gehirn während der Epilepsieentwicklung beeinflussen (WU u. REDDY 2012). FASEN et al. (2003) untersuchten immunhistochemisch die Regulation von Integrinen im HC von Ratten nach durch Pilocarpin induziertem SE. Für ITGA5 stellten sie zum einen eine dem Neuronenuntergang entsprechende Expressionsreduktion in Neuronen und zum anderen eine starke Expression in reaktiven Astrozyten fest (FASEN et al. 2003).

Im vorliegenden Datensatz wurde das Protein ITGA5 im PHC zwei und zehn Tage nach SE identifiziert. Die statistische Auswertung ergab zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Überexpression bei den Post-SE-Tieren. In der frühen Post-Insult-Phase betrug der *fold change* 4,3 ($p = 0,002$) und in der Latenzphase 4,6 ($p = 0,001$). Die Resultate der immunhistochemischen Färbung sind in Abbildung 19 dargestellt. So konnte sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Post-SE-Tieren ein positives Signal festgestellt werden, das zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert war. Zwischen den Tiergruppen zeigte sich immunhistochemisch an beiden Zeitpunkten zwei und zehn Tage nach SE kein Unterschied. Demnach konnte die Regulation von ITGA5 entsprechend der Ergebnisse aus der proteomischen Studie nicht bestätigt werden.

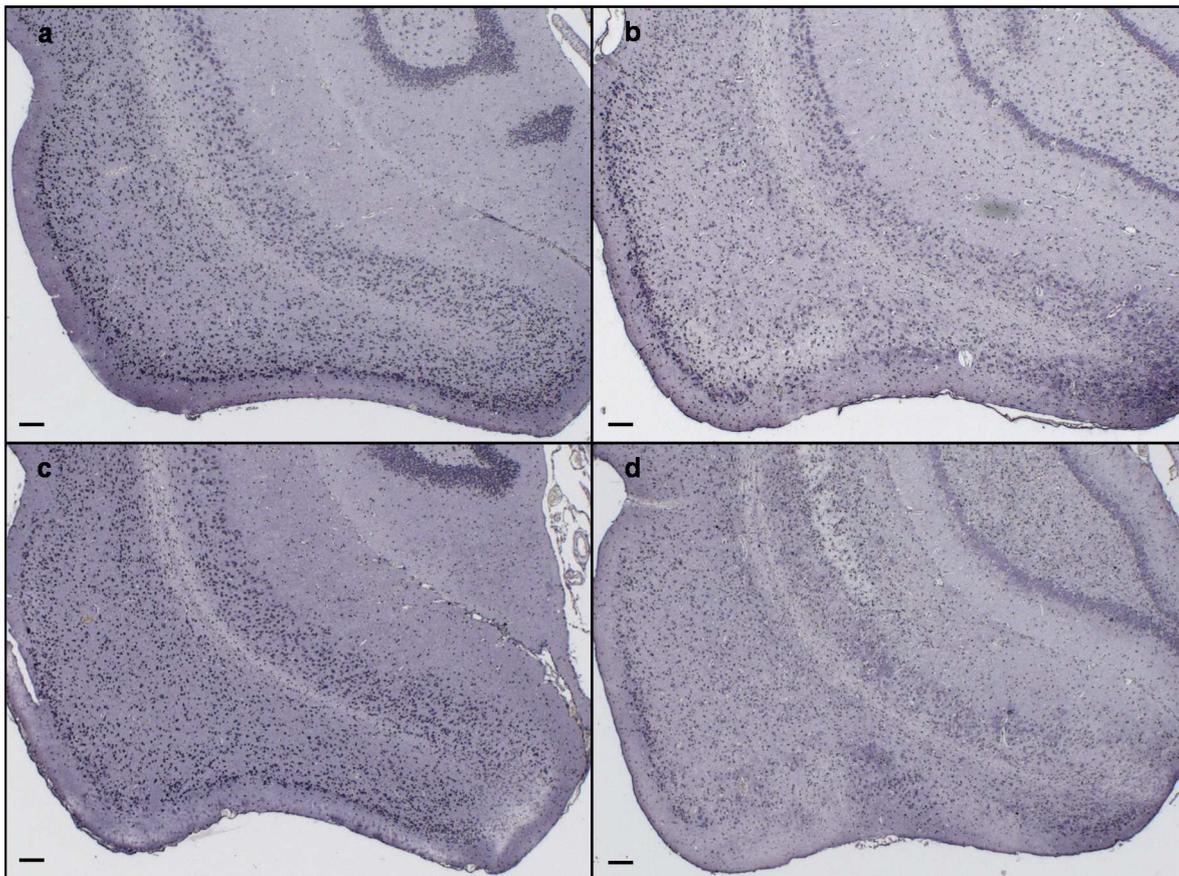


Abbildung 19

Die immunhistochemische Färbung von ITGA5 wurde im PHC zwei Tage (a) und (b) bzw. zehn Tage (c) und (d) nach SE durchgeführt. Die linke Seite zeigt mit (a) und (c) jeweils die Färbung eines Kontrolltieres, die rechte Seite mit (b) und (d) die Färbung eines Post-SE-Tieres. Zwischen den Tiergruppen war kein Unterschied in der Expression von ITGA5 detektiert. Maßstab = 100 μm .

3.2.2. *Fermitin family number 2*

Das Protein FERMT2, auch Kindlin 2 genannt, gehört zur Familie der Kindline, die noch die Mitglieder Kindlin 1 und 3 umfasst (SIEGEL et al. 2003). Kindline sind Adapterproteine, die eine FERM (4.1, *Ezrin, Radixin, Moesin*)-Domäne als Bindungsstelle aufweisen (KLOEKER et al. 2004). Hierdurch können Kindline, ähnlich zum Protein TLN1, an den zytoplasmatischen Teil einer β -Integrin-Untereinheit binden und den Integrinrezeptor aktivieren (PARK u. GODA 2016; ROGNONI et al. 2016). Die Hauptaufgabe der Kindlin-Familie ist die Regulation der Integrinaktivierung und der damit verbundenen Interaktion mit der extrazellulären Matrix sowie Zell-Adhäsionsvorgänge (ROGNONI et al. 2016). Weiterhin geben neuere Studien Hinweise darauf, dass Kindline neben dieser Signalweiterleitung vom Zellinneren nach außen (*inside-out signaling*) auch bei der Weitergabe von Signalen von außen nach innen (*outside-in signaling*) beteiligt sind (MEVES et al. 2009). Demnach könnte durch Kindline die Signalweitergabe von gebundenen Integrinen in weitere Zellkompartimente erfolgen (MEVES et al. 2009). Des Weiteren werden Kindline gewebespezifisch exprimiert. Kindlin-1 kann hauptsächlich in epithelialen Zellen nachgewiesen werden, Kindlin-2 weist ein nahezu ubiquitäres Expressionsmuster auf und die Kindlin-3 Expression ist beschränkt auf das hämatopoetische System (USSAR et al. 2006; MEVES et al. 2009). Kindline können auf zellulärer Ebene in verschiedenen Kompartimenten detektiert werden (ROGNONI et al. 2016). Für Kindlin-2 wurde im Gegensatz zu den zwei anderen Kindlinen auch eine nukleäre Lokalisation nachgewiesen (USSAR et al. 2006).

Im vorliegenden Datensatz wurde das Protein FERMT2 im HC an den ersten beiden und im PHC an allen drei Zeitpunkten identifiziert. Eine signifikante Regulation konnte nur während der Latenzphase im HC festgestellt werden. Hier wurde eine Aufregulation bei den Post-SE-Tieren beobachtet (*fold change* 2,6; $p = 0,000$). Die Resultate der immunhistochemischen Färbung sind in Abbildung 20 dargestellt. Bei den Post-SE-Tieren zeigt sich eine verstärkte, positive Farbreaktion. Hauptsächlich war das Signal zytoplasmatisch und in Zellfortsätzen lokalisiert. Positive Zellen ließen sich im *Stratum radiatum*, im *Stratum pyramidale* und im *Stratum oriens* des Ammonshorns (*Cornu ammonis* (CA)) finden. Weiterhin konnten angefärbte Zellen im *Stratum moleculare* und im Bereich des *Hilus* und des *Gyrus dentatus* detektiert werden. Im CA1-Bereich konnte ein starker Unterschied in der Expression von FERMT2 zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. Die Morphologie der positiven Zellen mit verzweigten Fortsätzen lässt auf mikrogliaartige Zellen schließen.

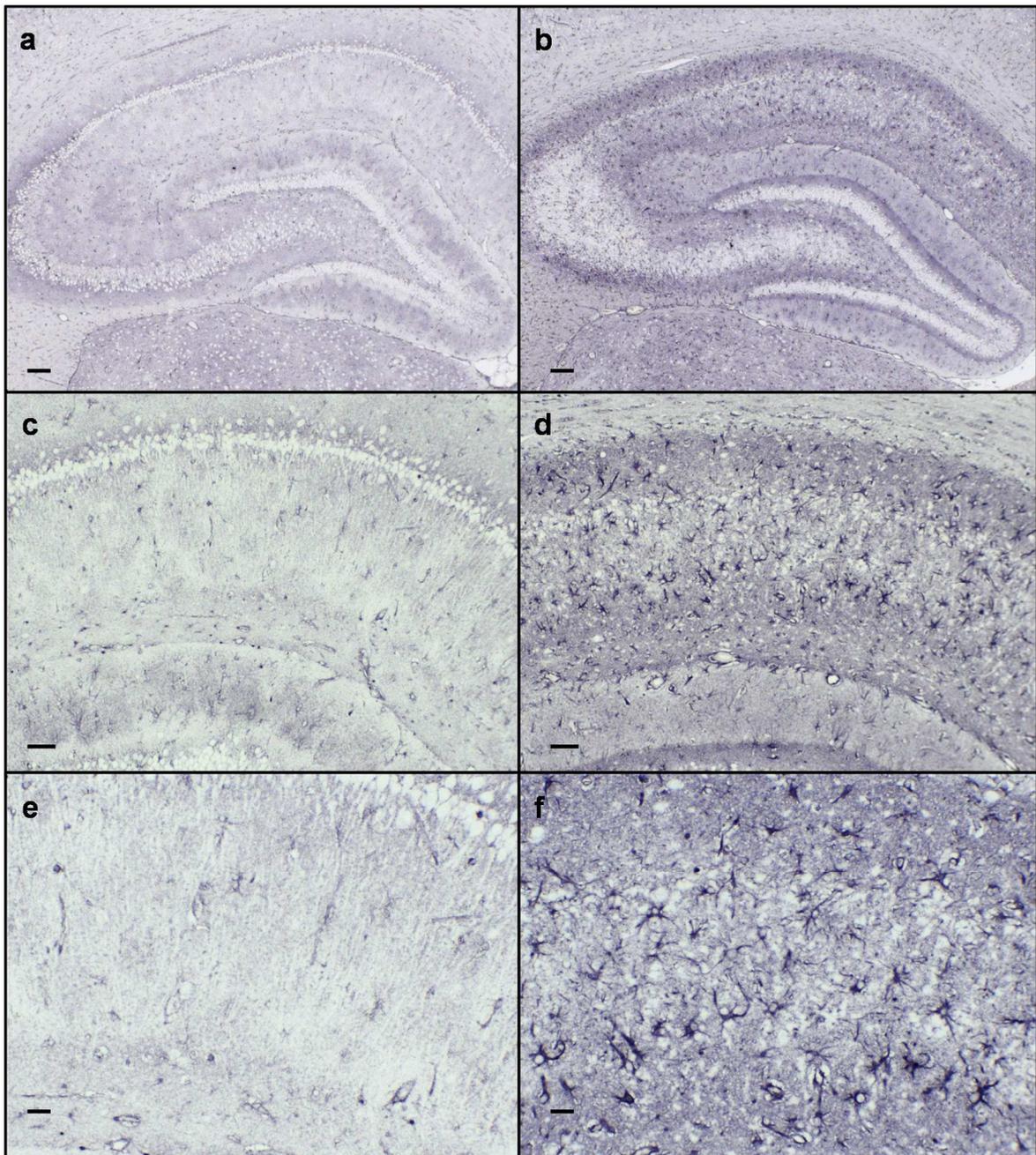


Abbildung 20

Die immunhistochemische Färbung von FERMT2 wurde im HC zehn Tage nach SE durchgeführt. Die linke Seite zeigt mit (a), (c) und (e) jeweils die Färbung eines Kontrolltieres, die rechte Seite mit (b), (d) und (f) jeweils die Färbung eines Post-SE-Tieres. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Tiergruppen konnte im CA1-Bereich detektiert werden. Dieser Bereich ist in (c) und (d) zehnfach sowie in (e) und (f) zwanzigfach vergrößert dargestellt. Maßstab = 100 μm in (a) und (b), 50 μm in (c) und (d) sowie 20 μm in (e) und (f).

VI. DISKUSSION

Aktuell steht keine medikamentöse Interventionsmöglichkeit zur Modifikation oder Verhinderung der Epilepsieentstehung nach einem epileptogenen Gehirninsult zur Verfügung (HOLTKAMP u. MEIERKORD 2007; LÖSCHER u. BRANDT 2010). Da Epilepsien zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen gehören, wäre die Möglichkeit eines präventiven Eingreifens von großem Vorteil. Weiterhin ist es bislang nicht möglich, Patienten nach einem Gehirninsult hinsichtlich ihres Risikos zur Epilepsieentwicklung zu stratifizieren. Hierzu müssen klinisch einsetzbare Biomarker identifiziert und validiert werden (LUKASIUK u. BECKER 2014; TERRONE et al. 2016). Sowohl die Entwicklung antiepileptogener Strategien als auch die Identifizierung klinisch einsetzbarer Biomarker werden durch die Heterogenität der Epilepsien erschwert (PITKÄNEN et al. 2016). Außerdem fehlt ein umfassendes Verständnis der Vorgänge im Gehirn während der Epileptogenese (PITKÄNEN 2010; WALKER et al. 2015). Weiterhin ist bei den molekularen und zellulären Veränderungen während der Epilepsieentstehung die Unterscheidung zwischen anti- und proepileptogenen Vorgängen schwierig (BROOKS-KAYAL et al. 2009). Hierbei könnten Analysen mit einem globalen Ansatz, wie zum Beispiel Genom- oder Proteomstudien, zum weiteren Erkenntnisgewinn beitragen. Derartige Ansätze ermöglichen eine weitgefassete Untersuchung der der Epileptogenese zugrunde liegenden Mechanismen (WANG et al. 2010). Proteomische Analysen beinhalten im Gegensatz zu genomischen Analysen auch funktionelle Informationen und können Hinweise auf therapeutische Zielstrukturen geben (KANG et al. 2015). Auswertungen proteomischer Datensätze mittels bioinformatischer und systembiologischer Ansätze können die Identifikation für die Epileptogenese relevanter biochemischer Reaktionswege und Proteinen erleichtern (LOEB 2011). Zu diesem Zweck wurde im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens eine gewichtete Netzwerkanalyse eines während der Epileptogenese generierten proteomischen Datensatzes zweier Gehirnregionen durchgeführt. Diese unvoreingenommene, nicht-hypothesengestützte Herangehensweise bietet die Möglichkeit der Reduktion großer Datensätze auf für die Fragestellung relevante Gruppen von Proteinen (LANGFELDER u. HORVATH 2008). Der Netzwerkanalyse wurde eine *Principal-Component-Analyse* zur Detektion möglicher Biomarkerkandidaten vorangestellt. In einem weiteren Teil des vorliegenden Dissertationsvorhabens wurde derselbe Datensatz hypothesengestützt unter dem Fokus zweier biologischer Vorgänge ausgewertet. Hierzu wurde der Datensatz auf das Vorhandensein von biochemischen Reaktionswegen untersucht, die mit der extrazellulären Matrix und mit Zellstress bzw. Zelltod assoziiert sind.

1. Nicht-hypothesengestützte Datenanalyse

Im Datensatz sind Proteine identifiziert worden, die maßgeblich zur Trennung der Expressionsprofile zwischen den Tiergruppen beitragen.

Die *Principal-Component-Analyse* ergab in der frühen Post-Insult-Phase und in der Latenzphase eine deutliche Trennung der Post-SE-Tiere von den Kontrolltieren entlang der ersten Hauptkomponente. Dies impliziert das Vorhandensein von Proteinen, deren differentielle Expressionsprofile maßgeblich zur Clusterbildung beitragen. Derartige Proteine könnten mögliche Kandidaten für Biomarker der Epileptogenese darstellen. Am interessantesten hierfür sind Proteine mit einer signifikanten Überexpression bei den Post-SE-Tieren. Das Protein mit der stärksten Korrelation zur ersten Hauptkomponente in der frühen Post-Insult-Phase im HC war CD151 mit einem signifikanten *fold change* von 1,89. CD151, ein Membranprotein und Mitglied der Familie der Tetraspanine, wird eine Rolle in grundlegenden zellulären Vorgängen, wie zum Beispiel der Zelladhäsion, zugeschrieben (FITTER et al. 1999). Demnach interagiert CD151 mit Integrinen, um Zelladhäsion und –migration zu regulieren (BASSANI u. CINGOLANI 2012). Weiterhin ist CD151 essentiell für die durch *Netrin-1* vermittelte Angiogenese (YANG et al. 2017). Interessanterweise konnten HUA et al. (2001) beobachten, dass durch die Gabe des Antiepileptikums Valproinsäure eine Herunterregulation der CD151 Expression erreicht werden kann. Für Valproinsäure stellten BOLANOS et al. (1998) weiterhin eine positive Beeinflussung der molekularen Veränderungen und einen neuroprotektiven Effekt nach chemisch induziertem SE fest. Dieser Effekt wurde im elektrischen Post-SE-Modell ebenfalls beobachtet (BRANDT et al. 2006). Weiterhin konnte für CD151 im PHC im Gegensatz zum HC erst in der Latenzphase eine Induktion festgestellt werden. Diese Feststellungen lassen zwei Schlüsse zu. Zum einen könnte CD151 als Biomarker zur frühen Risikoeinschätzung nach einem epileptogenen Gehirninsult dienen. Zum anderen könnte CD151 in seiner Rolle als proangionetischer Faktor und Interaktionspartner von Integrinen an den pathologischen Umbauvorgängen nach einem Gehirninsult beteiligt sein. Das unterschiedliche Regulationsmuster der untersuchten Gehirnregionen lässt darauf schließen, dass die CD151 vermittelten Umbauvorgänge in der extrazellulären Matrix im HC bereits in der frühen Post-Insult-Phase abgeschlossen sind. Dies könnte CD151 als potentielle Zielstruktur zur Modifikation der Epileptogenese implizieren. Mit Valproinsäure stünde bereits ein zugelassenes Medikament zur Verfügung, um der in der vorliegenden Studie festgestellten Überexpression nach SE entgegenzuwirken. Die genaue Rolle von CD151 in der Epileptogenese sollte in weiteren Studien tiefergehend evaluiert werden.

Das Protein CLU war ebenfalls unter den zehn Proteinen mit dem stärksten Beitrag zur ersten Hauptkomponente für den HC zwei Tage nach SE enthalten. CLU wies an diesem

Zeitpunkt einen signifikanten *fold change* von 2,86 auf. Dem Glykoprotein CLU wird eine komplexe Rolle im Vorgang des Zelltodes zugeschrieben (LESKOV et al. 2003). So konnte für die sekretorische Variante von CLU eine antiapoptotische Funktion festgestellt werden (ZHANG et al. 2005). Auf der anderen Seite wird die Überexpression der nukleären Form von CLU als proapoptotisches Zelltodsignal angesehen (LESKOV et al. 2003). Weiterhin gibt es Untersuchungen zur Expression von CLU nach Auftreten von epileptischen Anfällen. DRAGUNOW et al. (1995) stellten eine Akkumulation von CLU in untergehenden Neuronen nach elektrisch induziertem SE fest. Nach KIM et al. (2012) führen länger andauernde epileptische Anfälle zur verstärkten Expression der nukleären Isoform von CLU. Dies trägt zum anfallsinduzierten Neuronenuntergang bei. Demgegenüber kann beim Menschen in der Cerebrospinalflüssigkeit von Epilepsiepatienten, insbesondere von Epilepsiepatienten mit aufgetretener Pharmakoresistenz, im Gegensatz zu Kontrollen eine reduzierte Menge an CLU detektiert werden (YU et al. 2014). Diese Autoren stellten auch bei Ratten nach chemisch induziertem SE eine reduzierte CLU-Expression über einen Zeitraum von zwei Monaten fest und sehen damit CLU als potentiellen Biomarkerkandidaten (YU et al. 2014). In der vorliegenden Studie war CLU in allen drei Phasen der Epileptogenese im HC und im PHC signifikant aufreguliert mit einem Peak zehn Tage nach SE. Diese Überexpression steht zum Teil im Einklang mit den oben genannten Beobachtungen und könnte mit dem nach Induktion des SE auftretenden Neuronenverlust verknüpft sein. Der Unterschied zu den Ergebnissen der Studie von YU et al. (2014) kann in der Verwendung unterschiedlicher SE-Modelle und damit einhergehenden Differenzen in der Dauer der einzelnen Phasen der Epileptogenese begründet sein. Es bleibt festzuhalten, dass die vorliegenden Ergebnisse einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Eignung von CLU als Biomarker der Epileptogenese liefern. Die exakte Regulation der nukleären und sekretorischen Variante von CLU sollte jedoch in weiteren Studien und über einen längeren Zeitraum nach SE tiefergehend analysiert werden.

Weiterhin könnten Proteine, die zehn Tage nach SE eine Aufregulation zeigten, als Basis für ein Follow-up und zur Überprüfung der Wirksamkeit eines therapeutischen Eingreifens dienen. So zeigte im PHC das Protein ANXA3, das unter den zehn Proteinen mit dem stärksten Beitrag zur ersten Hauptkomponente zehn Tage nach SE enthalten war, eine signifikante Überexpression bei den Post-SE-Tieren mit einem *fold change* von 10,38. ANXA3 gehört zur Familie der Annexine, die calciumabhängig an Membranen mit sauren Phospholipiden binden (EBERHARD et al. 1994). JUNKER et al. (2007) assoziierten in ihrer Studie zum experimentellen Schlaganfall eine Aufregulation von ANXA3 mit phagozytierenden, mikrogliaartigen Zellen, die mit dem Abbau von untergehenden Neuronen verknüpft sind. Weiterhin implizierten JUNKER et al. (2007) für ANXA3 eine Rolle in Apoptose und Phagozytose im Gehirn und sie sahen ANXA3 als Mikrogliamarker

an. In der vorliegenden Studie konnte für ANXA3 in der Latenzphase in beiden untersuchten Gehirnregionen und in der chronischen Phase im PHC eine signifikante Aufregulation detektiert werden. Diese Überexpression könnte die Reaktion mikrogliartiger Zellen auf vermehrt anfallende untergehende Zellen darstellen und demnach mit dem Verlust von Neuronen korrelieren. Folglich könnte ANXA3 als potentieller Biomarker den neuroprotektiven Erfolg eines medikamentösen Eingreifens anzeigen.

Im Datensatz konnten Module aus stark verknüpften Proteinen identifiziert werden, die verschiedene molekulare Aspekte der Epileptogenese reflektieren.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals ein gewichtetes Netzwerk für einen Datensatz aufgestellt, der die Veränderungen während der Epileptogenese auf Proteomebene widerspiegelt. Mittels gewichteter Netzwerkanalyse kann die Struktur großer Datensätze auf Modularität untersucht werden (LANGFELDER u. HORVATH 2008). Im proteomischen Datensatz konnten für den HC acht und für den PHC zwölf Module detektiert werden. In einem Modul werden Proteine mit ähnlichem Expressionsprofil zusammengefasst. So zeigten die intramodularen *Hub*-Proteine bestimmter Module zum Beispiel durchweg eine Auf- oder Herunterregulation bei den Post-SE-Tieren. Weiterhin kann durch eine Netzwerkanalyse eine Reduktion des Datensatzes realisiert werden (LANGFELDER u. HORVATH 2008). So wurden im vorliegenden Fall aus 1317 Proteinen im HC fünf Module und aus 1337 Proteinen im PHC sieben Module evaluiert, die eine signifikante Assoziation zur Epileptogenese aufwiesen. Auf diese Weise konnte die Zahl der zu betrachtenden Proteine reduziert werden, wodurch die Identifikation von für die Epilepsieentstehung relevanter biochemischer Prozesse erleichtert wird.

Die funktionelle Annotation der ausgewählten Module mittels *Pathway-Enrichment*-Analyse deutet auf Schlüsselmechanismen der pathophysiologischen Vorgänge während der Epileptogenese hin. Es ist bekannt, dass epileptogene Gehirninsulte zur Schädigung und zum Untergang von Neuronen führen (PITKÄNEN et al. 2002). Weiterhin wird dem Vorgang der Apoptose eine Rolle in der Epileptogenese zugeschrieben (OKAMOTO et al. 2010; HENSHALL u. ENGEL 2013). Das Modul 4 im HC ist durch die Repräsentation von molekularen Reaktionswegen gekennzeichnet, die in die Regulation von Zelltod und Apoptose involviert sind. So wurde die Rolle des *pathways 14-3-3-mediated signaling* bereits im Kontext der Temporallappenepilepsie und der Neurodegeneration diskutiert (SCHINDLER et al. 2006; STEINACKER et al. 2011). Demgegenüber wurde für die anderen Apoptose assoziierten Reaktionswege dieses Moduls in der Literatur bislang noch kein Zusammenhang zur Epileptogenese beschrieben. Diese Reaktionswege waren *Hippo signaling*, *Protein ubiquitination pathway* und *Myc mediated apoptosis signaling*. Der Reaktionsweg *Hippo signaling* ist relevant für die Kontrolle von Zellwachstum,

Zellproliferation und Apoptose (REN et al. 2010). Zusätzlich kann für diesen *pathway* ein Zusammenspiel mit den 14-3-3 Proteinen festgestellt werden (REN et al. 2010). Für das Modul 5 im PHC konnte ebenfalls eine Assoziation mit der Regulation von Zelltod und Apoptose festgestellt werden. Ein in diesem Modul detektierter Reaktionsweg ist *mTOR signaling*. Dieser *pathway* wurde bereits im Kontext der Epileptogenese und Epilepsiemanifestation als mögliche Zielstruktur für eine medikamentöse Beeinflussung diskutiert (GALANOPOULOU et al. 2012; VEZZANI 2012; CITRARO et al. 2016). Für die weiteren Apoptose assoziierten *pathways* *EIF2 signaling* und *Regulation of eIF4 and p70S6K signaling* wurde bislang noch keine Beteiligung bei der Epilepsieentstehung beschrieben. Jedoch konnte für diese Reaktionswege zusammen mit dem oben genannten *pathway* *mTOR signaling* eine Beteiligung und Regulation bei der Parkinson-Erkrankung festgestellt werden (DIJKSTRA et al. 2015). Durch Analyse der diesen detektierten *pathways* zugeordneten Proteine könnten Hinweise auf interessante mögliche Zielstrukturen für neuroprotektive und antiapoptotische Ansätze gefunden werden. Insgesamt steht die Detektion von Zelltod und Apoptose assoziierten Reaktionswegen im Einklang mit dem bereits diskutierten Zusammenhang zwischen epileptischen Anfällen, Zelltod und Epileptogenese.

Weiterhin können während der Epileptogenese Modifizierungen in Prozessen der zellulären Plastizität beobachtet werden. Zum Beispiel kann bei der Temporallappenepilepsie eine abnormal veränderte Neurogenese im *Gyrus dentatus* festgestellt werden (KURUBA et al. 2009; JESSBERGER u. PARENT 2015). In der vorliegenden Analyse konnten drei Module identifiziert werden, die durch die Regulation von biochemischen Reaktionswegen der zellulären Plastizität gekennzeichnet sind. Dies waren im HC die Module 3 und 6 und im PHC das Modul 8. Die Reaktionswege waren in die Kontrolle von Veränderungen im Zytoskelett, von Zell-Zell-Interaktionen und der Lenkung von Axonen involviert. So konnten mehrere *pathways* detektiert werden, die mit der Familie der *Rho-GTPasen* assoziiert sind. DUBREUIL et al. (2006) zeigten, dass Gehirninsulte, wie ein Schädelhirntrauma, und epileptische Anfälle zur Aktivierung von *Rho*-Signalwegen und von *RhoA* führen können. Dies deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen. Des Weiteren kann durch die große Anzahl an detektierten *pathways* zu diesem funktionellen Bereich auf eine wichtige Rolle der zellulären Plastizität während der Epileptogenese geschlossen werden.

Bei der funktionellen Analyse wurden dem Modul 6 im HC auch die *pathways* *Huntington's disease signaling* und *Amyloid processing* zugeordnet. Dies impliziert eine mögliche Überschneidung der pathophysiologischen Mechanismen der Epileptogenese mit anderen neurologischen Erkrankungen. Die Überlappung der molekularen Veränderungen zwischen der Alzheimer-Krankheit und den Epilepsien wurde bereits näher untersucht (NOEBELS 2011; CHIN u. SCHARFMAN 2013). Dahingegen bedarf es

für das Verständnis einer möglichen Verbindung zwischen den Epilepsien und der Huntington-Krankheit weiterer Untersuchungen.

Ein weiterer funktioneller Bereich, dem Module zugeordnet werden konnten, war der Bereich der zellulären Energiegewinnung und des Metabolismus. Es ist bekannt, dass Epilepsien durch Störungen in der Energieversorgung verursacht werden können (REID et al. 2014). Zum Beispiel kann durch eine unzureichende Versorgung des Gehirns mit Glukose die Anfallsempfänglichkeit modifiziert werden (REID et al. 2014). Außerdem besteht die Möglichkeit, durch eine ketogene Diät eine Anfallskontrolle zu erreichen (CLANTON et al. 2017). In der vorliegenden Studie fiel das Modul 8 im HC durch eine deutliche Repräsentation metabolischer Reaktionswege auf. So konnten mit *Gluconeogenesis I* und *Glyxogen degradation II* zwei *pathways* detektiert werden, die direkt mit dem Glukosemetabolismus verknüpft sind. Auch die weiteren Reaktionswege dieses Moduls und die funktionelle Bedeutung der intramodularen *Hub*-Proteine *Glutaminase* (GLS) und *Glutamic-oxaloacetic transaminase 1* (GOT1) implizieren für das HC Modul 8 eine wichtige Rolle im Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel. Außerdem konnten im PHC zwei Module, Modul 3 und Modul 7, evaluiert werden, die an der Regulation der mitochondrialen Energiegewinnung bzw. deren Störung beteiligt sind. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass Defizite in der Zellatmung und daraus entstehende reaktive Sauerstoffspezies die Epilepsieentstehung beeinflussen können (ROWLEY et al. 2015). Zusammenfassend unterstreichen diese Ergebnisse eine mögliche Beteiligung der festgestellten umfassenden metabolischen Veränderungen bei der Epileptogenese. Eine weitere Analyse dieser Vorgänge könnte zum Verständnis der Wirkung einer diätetischen Anfallsmodifikation beitragen und neue Ansätze zur Therapie der Epileptogenese liefern.

Die am stärksten verknüpften Proteine im Netzwerk können Hinweise auf mögliche interessante Zielstrukturen zur Behandlung der Epileptogenese liefern.

Protein-Interaktionsnetzwerke können durch eine geringe Anzahl stark verknüpfter Proteinen charakterisiert werden (JEONG et al. 2001). Derartige Proteine werden als *Hub*-Proteine und, bezogen auf ein Modul, als intramodulare *Hub*-Proteine bezeichnet. Bei der Analyse der intramodularen *Hub*-Proteine der ausgewählten Epileptogenese assoziierten Module fiel auf, dass im PHC deutlich mehr von diesen Proteinen ein signifikant zwischen den Tiergruppen differentielles Expressionsmuster aufwies als im HC. Demnach waren von den jeweils fünf am stärksten verknüpften Proteinen jedes Moduls im PHC 32 und im HC elf an mindestens einem Zeitpunkt differentiell reguliert. Die Auswahl von sieben Modulen im PHC und lediglich fünf Modulen im HC erklärt diese Beobachtung nicht gänzlich. Vielmehr deckt sich dieses Ergebnis mit der Feststellung, dass grundsätzlich im PHC in der proteomischen Studie zu allen drei Zeitpunkten der Epileptogenese mehr differentiell regulierte Proteine als im HC identifiziert worden sind.

Diese Tatsache unterstützt die These, dass die molekularen und zellulären Veränderungen in den verschiedenen *Cortices* des PHC zur Epilepsieentstehung beitragen können (DE GUZMAN et al. 2004; JAMALI et al. 2006).

Weiterhin ergab die Analyse der intramodularen *Hub*-Proteine, dass für zwei interessante Proteine aus der *Principal-Component-Analyse* ebenfalls eine bedeutende Rolle im gewichteten Netzwerk festgestellt werden konnte. So konnte im HC das Protein CLU als intramodulares *Hub*-Protein in Modul 7 identifiziert werden. Im PHC konnte für das Protein ANXA3 eine starke Verknüpfung in Modul 8 detektiert werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die oben diskutierte mögliche Eignung dieser Proteine als Biomarkerkandidaten der Epileptogenese.

Ein weiteres intramodulares *Hub*-Protein mit einer signifikanten Überexpression bei den Post-SE-Tieren war das Protein H2AFY im PHC Modul 8. Dieses Protein reguliert die Transkription durch Beeinflussung der Nukleosomstruktur und wurde als möglicher Biomarker für die Huntington-Krankheit diskutiert (HU et al. 2011; LAKE 2011). Diese Tatsache unterstützt die oben erwähnte, mögliche Überlappung in der Pathophysiologie der Huntington-Krankheit und der Epilepsien.

Insgesamt ist aber zu beachten, dass die Deletion von *Hub*-Proteinen wahrscheinlicher zu letalen Folgen führt als die Deletion von Nicht-*Hub*-Proteinen (HE u. ZHANG 2006). Demnach kann die Auswahl stark verknüpfter Proteine als Zielstrukturen zu mehr und gravierenderen Nebenwirkungen führen als die Auswahl weniger stark verknüpfter Proteine. Trotzdem ist ein umfassendes Wissen über Epileptogenese assoziierte Module, deren *Hub*-Proteine und wiederum deren Interaktionspartner für die Identifikation neuer Behandlungszielstrukturen im Sinne einer Netzwerkpharmakologie nützlich.

Die vergleichende Netzwerkanalyse eines weiteren Datensatzes zeigt eine partielle Überlappung in den detektierten pathways und Hub-Proteinen.

Um die Ergebnisse der vorliegenden Studie einordnen und bewerten zu können, wurde für den von BITSIKA et al. (2016) generierten Datensatz ebenfalls eine Netzwerkanalyse durchgeführt. Für die Bewertung dieses Vergleichs muss beachtet werden, dass die verwendeten Tiermodelle nicht identisch waren. Zwar können beide eingesetzten Induktionsmechanismen zu schwer behandelbaren bzw. behandlungsresistenten epileptischen Anfällen führen (LÖSCHER 2011), aber die Studiendesigns differierten stark. Folgende Unterschiede bestanden: (i) unterschiedliche Spezies: Ratte gegenüber Maus, (ii) elektrische gegenüber chemische SE-Induktion, (iii) Elektrodenimplantation gegenüber lokaler Injektion, (iv) Entwicklung von generalisierten, tonisch-klonischen Anfällen gegenüber einer Mischung aus nicht-convulsiven, im EEG detektierbaren Anfällen und (v) Latenzperiode von Wochen gegenüber Epileptogenese ohne Latenzperiode. Trotz dieser Differenzen ergab die funktionelle Analyse der Module des

Bitsika-Netzwerkes eine partielle Überlappung in den festgestellten *pathways*. Weiterhin konnten zum Teil Proteine in beiden Netzwerken als intramodulare *Hub*-Proteine identifiziert werden. Dies lässt auf ähnliche pathophysiologische Mechanismen in den eingesetzten Tiermodellen schließen. Somit scheinen die Ergebnisse zwischen den Modellen und zwischen den Tierarten übertragbar zu sein. Insgesamt gibt der Vergleich der beiden Datensätze einen Hinweis auf die Robustheit der Resultate der gewichteten Netzwerkanalyse im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens.

Schlussfolgerung und Limitation

Netzwerkanalysen können zum besseren Verständnis der molekularen und zellulären pathophysiologischen Veränderungen einer Krankheit beitragen. Dieses Wissen kann zum Auffinden geeigneter Zielstrukturen für Behandlungsansätze genutzt werden. So können Netzwerkanalysen helfen, entsprechende Ansatzpunkte im Sinne einer Netzwerkpharmakologie zu identifizieren (HOPKINS 2008). Die vorliegende Studie hat die Eignung bestimmter Proteine als Biomarker der Epileptogenese oder als mögliche Zielstrukturen bestärkt. Es können für die durchgeführte Netzwerkanalyse aber auch limitierende Faktoren festgestellt werden. Um eine für die Netzwerkanalyse ausreichende Probenanzahl zu erreichen, mussten für die vorliegende Studie die Messergebnisse aller drei untersuchten Zeitpunkte gemeinsam analysiert werden. Dies hat den Vorteil, dass durch eine größere Probenanzahl robustere Ergebnisse erwartet werden können. Auf der anderen Seite kann die Vermischung von Tieren, die sich noch am Beginn der Epileptogenese befanden, mit Tieren, die bereits spontane epileptische Anfälle zeigten, zu einer möglichen Über- oder Unterbewertung von molekularen Veränderungen führen. Weiterhin war es in diesem Kontext nötig, eine Reduktion des Datensatzes auf Proteine durchzuführen, die zu allen drei Zeitpunkten identifiziert worden sind. Hierdurch könnten molekulare Prozesse, die nur zu einer bestimmten Phase der Epileptogenese stattfinden, unerkannt bleiben. Ein weiterer limitierender Faktor stellt die in der Korrelationsmatrix deutlich werdende Trennung der Tiergruppen der ersten beiden Zeitpunkte gegenüber dem dritten Zeitpunkt dar. Ein möglicher Grund könnte sein, dass sich die Tiergruppen in unterschiedlichen Phasen der Epilepsieentstehung befinden. Dies würde implizieren, dass sich die molekularen Vorgänge in der chronischen Phase deutlich von denen in den ersten beiden Phasen unterscheiden. Die Tatsache, dass sich die Kontrolltiere des dritten Zeitpunktes von den Kontrolltieren der anderen Zeitpunkte separieren, widerspricht dieser Annahme jedoch zum Teil. Unter Umständen beeinflusste die zeitliche Differenz zwischen den massenspektrometrischen Analysen die Ergebnisse. Insgesamt zeugt jedoch die Identifikation von bereits im Kontext der Epilepsieentstehung diskutierten Reaktionswegen in den aufgestellten Netzwerken und die Überlappung der detektierten *pathways* und *Hub*-Proteine beim Vergleich der beiden Datensätze von belastbaren Ergebnissen.

2. Hypothesengestützte Datenanalyse

Während der Epileptogenese kann eine Regulation von mit der extrazellulären Matrix assoziierten pathways festgestellt werden.

Molekulare Vorgänge in der extrazellulären Matrix nach einem Gehirninsult können zur Epileptogenese beitragen (PITKÄNEN et al. 2014). Eine veränderte Zusammensetzung und strukturelle Verschiebungen in der extrazellulären Matrix können nach KIM et al. (2016) direkt die neuronale Aktivität sowie die Stabilität von Synapsen beeinflussen. Hierdurch kann die Balance zwischen neuronaler Exzitation und Inhibition gestört werden (KIM et al. 2016). Auch im proteomischen Datensatz, der im Verlauf der Epileptogenese generiert wurde, wurden biochemische Reaktionswege detektiert, die an der Regulation von Vorgängen in der extrazellulären Matrix beteiligt sind. So ergab die *Pathway-Enrichment*-Analyse der differentiell exprimierten Proteine zu allen drei Zeitpunkten in beiden Gehirnregionen mit der extrazellulären Matrix assoziierte *pathways*. Insgesamt war die absolute Anzahl an regulierten *pathways* zu diesem funktionellen Bereich in allen Phasen der Epileptogenese im PHC höher als im HC. Außerdem konnten für den PHC mehr differentiell exprimierte Proteine den detektierten *pathways* zugeordnet werden als für den HC. Dies zeigte sich vor allem in der Latenzphase und in der chronischen Phase. Weiterhin ergab sich durch Analyse der Expressionsprofile der zugeordneten Proteine mittels *heatmaps* ein für den HC und PHC unterschiedliches Regulationsmuster. So scheinen die Vorgänge im PHC während der frühen Post-Insult-Phase und während der Latenzphase sowohl auf bei den Post-SE-Tieren induzierten als auch auf herunterregulierten Proteinen zu basieren. Im Gegensatz dazu dominieren im HC zu allen drei Zeitpunkten und im PHC während der chronischen Phase bei den Post-SE-Tieren überexprimierte Proteine. Diese Beobachtungen implizieren, dass im Bereich des PHC die Umbauvorgänge in der extrazellulären Matrix in einem größeren und komplexeren Ausmaß stattfinden als im Bereich des HC.

Weiterhin konnten mehrere *pathways* mit einer Verbindung zu den Proteoglykanen der extrazellulären Matrix detektiert werden. Dies waren zum Beispiel die Reaktionswege *Tissue inhibitor of metalloproteinase* und *Matrix metalloproteinase*. Diese *pathways* sind bei der Regulation der proteolytischen Aktivität im extrazellulären Raum beteiligt. Es ist bekannt, dass durch Spaltung von Molekülen der extrazellulären Matrix durch Proteasen morphologische Veränderungen in der extrazellulären Matrix vollzogen werden können (KIM et al. 2016). Diesen Änderungen und einer veränderten Zusammensetzung der Proteoglykane wird eine Rolle in der Epileptogenese zugeschrieben (LUKASIUK et al. 2011; WONG 2012). Demnach steht der Nachweis derartiger Reaktionswege im vorliegenden Datensatz im Einklang mit den bereits bekannten Vorgängen in der extrazellulären Matrix nach einem Gehirninsult.

Als weiterer interessanter Reaktionsweg wurde *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPAR-mediated signaling* detektiert. Dieser Reaktionsweg war im vorliegenden Datensatz im PHC in der frühen Post-Insult-Phase und in der Latenzphase reguliert. Für den *Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR)* wurde sowohl beim Menschen als auch in Tiermodellen eine veränderte Expression im Kontext der Epilepsie nachgewiesen (LUKASIUK et al. 2011; PITKÄNEN et al. 2014). uPAR kann über mehrere Liganden und Korezeptoren ebenfalls Interaktionen der extrazellulären Matrix mit anderen Zellen und strukturelle Umbauvorgänge regulieren (PITKÄNEN et al. 2014). Der genaue Wirkmechanismus im Kontext der Epileptogenese ist bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, dass eine Deletion des uPAR-Systems nicht zu einer negativen Beeinflussung der Folgen eines SE führt (RANTALA et al. 2015). Der Nachweis einer Regulation dieses Reaktionsweges im vorliegenden Datensatz bekräftigt eine mögliche Rolle des uPAR-Systems in der Epilepsieentstehung, jedoch sollte in weiteren Studien die funktionelle Bedeutung näher untersucht werden.

Bei der Analyse der den selektierten *pathways* zugeordneten Proteine zeigte ein Teil dieser Proteine in mehreren Phasen der Epilepsieentstehung eine deutliche Aufregulation. Derartige Proteine könnten Schlüsselfunktionen in den extrazellulären Umbauvorgängen nach einem epileptogenen Gehirninsult wahrnehmen. Zum Beispiel wies das Protein CD44 im vorliegenden Datensatz in beiden untersuchten Gehirnregionen in den ersten beiden Phasen der Epileptogenese eine signifikante Überexpression bei den Post-SE-Tieren auf. CD44 ist ein Transmembranrezeptor für Hyaluronsäure und agiert als Adhäsionsmolekül (ROSZKOWSKA et al. 2016). Hyaluronsäure ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (GALTREY u. FAWCETT 2007). Weiterhin kann für CD44 eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Funktion von Synapsen sowie in der Modulation der synaptischen Plastizität festgestellt werden (ROSZKOWSKA et al. 2016). BORGES et al. (2004) und BITSIKA et al. (2016) beobachteten beide in ihren Studien eine Aufregulation von CD44 in der hippocampalen Formation nach einem chemisch induzierten SE in Mäusen. Weiterhin konnte bei der Temporallappenepilepsie des Menschen eine verstärkte Expression von CD44 im HC nachgewiesen werden (LEE et al. 2007). Die Tatsache, dass CD44 in der chronischen Phase im vorliegenden Datensatz nicht identifiziert wurde, könnte implizieren, dass die CD44 vermittelte Reorganisation der extrazellulären Matrix in dieser Phase weitgehend abgeschlossen ist. Insgesamt unterstreicht der erneute Nachweis einer Induktion von CD44 nach SE eine mögliche Beteiligung dieses Proteins bei der Epilepsieentstehung. Die genauen Wirkmechanismen sollten in weitergehenden Untersuchungen näher analysiert werden.

Das Expressionsprofil des Proteins FERMT2 konnte immunhistochemisch bestätigt werden.

Zur Validierung des proteomischen Datensatzes wurde für das Protein FERMT2 eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Bislang wurde für FERMT2 noch keine Beteiligung bei der Epileptogenese beschrieben. FERMT2 aktiviert durch Bindung an den intrazellulären Teil einer β -Integrin-Untereinheit Integrinrezeptoren in der Zellmembran (PARK u. GODA 2016; ROGNONI et al. 2016). Somit könnte FERMT2 eine Rolle in durch Integrine vermittelten Vorgängen zur Reorganisation der extrazellulären Matrix nach einem Gehirninsult wahrnehmen. Im vorliegenden Datensatz wies FERMT2 im HC während der Latenzphase eine signifikante Überexpression mit einem *fold change* von 2,6 auf. Die Aufregulation konnte mittels der durchgeführten immunhistochemischen Färbung bestätigt werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Belastbarkeit der Resultate der proteomischen Studie.

Das Expressionsprofil des Proteins ITGA5 konnte immunhistochemisch nicht bestätigt werden.

Im vorliegenden Datensatz wies das Protein ITGA5 im PHC während der frühen Post-Insult-Phase und während der Latenzphase ein differentielles Regulationsmuster mit einem signifikanten *fold change* von 4,3 bzw. 4,6 auf. In der immunhistochemischen Färbung dieses Proteins war zu beiden Zeitpunkten eine bei den Kontroll- und Post-SE-Tieren in etwa gleich starke positive Farbreaktion feststellbar. Demnach zeigte die Immunhistochemie ein vom proteomischen Datensatz abweichendes Bild. Hierfür sind mehrere Gründe denkbar. Zum einen könnten durch mangelnde Sensitivität der massenspektrometrischen Analyse bzw. durch die Dominanz von umfassenden Veränderungen im Zellmilieu die Daten der proteomischen Studie falsch positiv sein. So könnte durch Zelltod vermehrt vorliegendes freies ITGA5 im extrazellulären Raum die detektierten Werte beeinflussen. Zusätzlich kann die Kumulation des Alphafehlers bei einer multiplen Testung zu Fehlern bei der statistischen Auswertung führen. Ferner könnte das Auftreten von Proteinisoformen, wie zum Beispiel Spleißvarianten oder posttranslational modifizierte Proteinformen, falsch negative Ergebnisse in der immunhistochemischen Färbung verursachen (BERGLUND et al. 2008). Folglich sollte die Spezifität des verwendeten primären Antikörpers durch Einsatz eines anderen primären Antikörpers überprüft werden.

Während der Epileptogenese kann eine Regulation von Zellstress und Zelltod assoziierten pathways festgestellt werden.

Der Verlust von Neuronen im HC kennzeichnet die pathologischen Vorgänge im Gehirn bei der Temporallappenepilepsie des Menschen und wird ebenfalls in Tiermodellen von Epilepsien beobachtet (BRANDT et al. 2003; HENSALL u. ENGEL 2013). Dieser

Zellverlust wird vor allem auf einen initialen, epileptogenen Insult zurückgeführt (HENSHALL u. ENGEL 2013). Inwieweit der Verlust von Neuronen zum Prozess der Epileptogenese beiträgt, wird kontrovers diskutiert und ist bislang nicht gänzlich verstanden (ENGEL u. HENSHALL 2009; HENSHALL u. ENGEL 2013; DINGLEDINE et al. 2014). Im vorliegenden proteomischen Datensatz waren ebenfalls *pathways* mit einer Assoziation zum funktionellen Bereich Zellstress und Zelltod reguliert. Einem Großteil dieser detektierten Reaktionswege kann eine Beteiligung beim apoptotischen Zelluntergang zugeschrieben werden. TSVERAVA et al. (2016) und OKAMOTO et al. (2010) beobachteten ebenfalls beide in ihren Studien nach einem chemisch induzierten SE eine Regulation von Apoptose assoziierten Genen und biochemischen Reaktionswegen. Folglich steht die Detektion von Apoptose assoziierten *pathways* in der vorliegenden Studie im Einklang mit bereits diskutierten Ergebnissen anderer Untersuchungen.

Weiterhin fiel bei der Analyse der Expressionsprofile der den selektierten *pathways* zugeordneten Proteine ein komplexes Regulationsmuster auf. Im HC dominieren zunächst induzierte Proteine, wohingegen in der Latenzphase sowohl aufregulierte als auch herunterregulierte Proteine festgestellt wurden. In der chronischen Phase konnte im HC nur ein mit Apoptose assoziierter Reaktionsweg identifiziert werden. Dies lässt darauf schließen, dass acht Wochen nach SE im HC apoptotische Vorgänge nur noch in einem geringen Ausmaß stattfinden. Demgegenüber waren im PHC in der frühen Post-Insult-Phase und in der Latenzphase sowohl induzierte als auch herunterregulierte Proteine bei der Regulation der Apoptose beteiligt. In der chronischen Phase dominierten im PHC überexprimierte Proteine. Dies impliziert, dass die Apoptose assoziierten Vorgänge nach SE im HC und PHC unterschiedlich lange andauern und einer verschiedenen Regulation unterliegen könnten. Im Gegensatz zum HC kann im PHC eine verzögerte Reaktion festgestellt werden. Bei der Bewertung der Expressionsmuster muss beachtet werden, dass der Vorgang der Apoptose an sich einer exakten Regulation durch pro- und antiapoptotischen Proteine unterliegt. Demnach kann die Herunterregulation eines antiapoptotisch wirkenden Proteins ebenfalls einen Apoptose verstärkenden Effekt haben. So könnte die detektierte Herunterregulation mehrerer *14-3-3* Proteine, die eine antiapoptotische Wirkung besitzen (SHIMADA et al. 2013), ebenfalls zum Zelluntergang beitragen.

Ein deutlich induziertes Protein, das den Apoptose assoziierten *pathways* zugeordnet worden ist, war HSPB1. HSPB1 gehört zur Familie der *heat shock proteins*, die als Teil des zellulären Schutzmechanismus in Folge von schädlichen Stimuli induziert werden (BURDON 1986). Die Aufregulation von HSPB1 wird als Zeichen für oxidativen Stress angesehen (BIDMON et al. 2004). HSPB1 zeigte im vorliegenden Datensatz eine signifikante Überexpression im HC in den ersten beiden und im PHC in allen drei Phasen

der Epileptogenese. AKBAR et al. (2003) und KALWY et al. (2003) untersuchten in ihren Studien die Auswirkung einer Überexpression von HSPB1 auf den Zelluntergang nach chemisch induziertem SE und stellten eine antiapoptotische und neuroprotektive Wirkung von HSPB1 fest. Bei der humanen Temporallappenepilepsie kann ebenfalls eine Aufregulation von HSPB1 festgestellt werden (BIDMON et al. 2004). Möglicherweise vermittelt Hspb1 seine antiapoptotische Wirkung über Interaktion mit dem Protein *DAXX* (CHARETTE et al. 2000). Folglich impliziert die detektierte, deutliche Induktion von HSPB1 nach SE im vorliegenden Datensatz zum einen das Vorliegen von starkem oxidativen Stress, der im PHC sogar bis in die chronische Phase acht Wochen nach SE andauert. Zum anderen reflektiert die Aufregulation von HSPB1 einen zelleigenen Schutzmechanismus gegen Apoptose. Eine medikamentöse Verstärkung der Überexpression könnte zur Neuroprotektion nach einem epileptogenen Gehirninsult beitragen. Insgesamt unterstreicht dieses Ergebnis die Beteiligung von HSPB1 in den zellulären Veränderungen nach SE.

Schlussfolgerung und Limitationen

Im vorliegenden proteomischen Datensatz konnten regulierte *pathways* evaluiert werden, die mit den Umbauvorgängen in der extrazellulären Matrix verknüpft sind. Ebenfalls konnten Zellstress und Zelltod assoziierte Reaktionswege identifiziert werden. Dies bekräftigt die Beteiligung dieser beiden funktionellen Bereiche bei den pathologischen Veränderungen nach einem epileptogenen Gehirninsult und gibt einen Hinweis auf die Belastbarkeit des Datensatzes. Es muss aber insbesondere für den Bereich des Zellunterganges angemerkt werden, dass eine abschließende Aussage, ob der Verlust von Zellen relevant für die Epileptogenese ist oder nur eine Begleiterscheinung des SE darstellt, nicht getroffen werden kann. Diese Frage könnte durch weitergehende Untersuchungen, wie zum Beispiel durch Überprüfung der funktionellen Relevanz ausgewählter Proteine in transgenen Tiermodellen, unter Umständen beantwortet werden. Des Weiteren stellen die drei untersuchten Zeitpunkte während der Epileptogenese nur Punktproben dar. Es ist zu erwarten, dass in den verschiedenen Phasen unterschiedliche molekulare Vorgänge dominieren. Folglich könnte die Wahl der Messpunkte eine Auswirkung auf die dann detektierten Prozesse haben. Außerdem könnten sich die Post-SE-Tiere individuell in der Dauer der einzelnen Phasen unterscheiden. Hier könnte eine größere Tieranzahl die Robustheit der Messdaten verbessern.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsien gehören sowohl beim Menschen als auch bei den Haustieren (Hund und Katze) zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Neben genetischen Ursachen tritt ein Großteil der Epilepsieerkrankungen nach einem Gehirnsult, wie zum Beispiel einem Schädel-Hirn-Trauma, auf. Trotz umfassender Bemühungen steht aktuell noch keine wirksame Interventionsmöglichkeit zur Verfügung, um die Epilepsieentstehung (Epileptogenese) präventiv verhindern zu können. Weiterhin wurden bislang noch keine klinisch einsetzbaren Biomarker identifiziert, die eine Abschätzung des Epilepsierisikos nach einem Gehirnsult oder eine Prognose über die Krankheitsentwicklung ermöglichen. Der Hauptgrund hierfür liegt in einem noch nicht umfassenden Verständnis der molekularen Veränderungen und Prozesse während der Epileptogenese. Globale Ansätze, wie differentielle Proteomanalysen, könnten hierzu einen wichtigen Beitrag leisten. Deshalb wurde im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens eine bioinformatische Analyse eines proteomischen Datensatzes durchgeführt. Für diesen Datensatz wurden zu drei Zeitpunkten (zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen) nach Induktion eines Status epilepticus im Verlauf der Epileptogenese Proben des Hippocampus (HC) und des parahippocampalen Cortex (PHC) gewonnen und massenspektrometrisch untersucht. Die drei Zeitpunkte spiegeln die frühe Post-Insult-Phase, die Latenzphase und die chronische Phase wider.

In einem ersten nicht-hypothesengestütztem Ansatz wurde für den Datensatz eine gewichtete Netzwerkanalyse durchgeführt. Das Ziel einer Netzwerkanalyse ist es, unvoreingenommen die Struktur eines Datensatzes auf Modularität zu untersuchen und durch Selektion relevanter Module eine Reduktion des Datensatzes zu erreichen. Für beide untersuchten Gehirnregionen konnten mehrere Module bestehend aus stark miteinander verknüpften Proteingruppen detektiert werden. Durch Anwendung von Regressionsanalysen konnten hieraus für den HC fünf und für den PHC sieben Epileptogenese assoziierte Module selektiert werden. Die funktionelle Annotation dieser Module wurde mittels einer *Pathway-Enrichment*-Analyse näher untersucht. Hierdurch konnten einzelne Module bestimmten molekularen Prozessen, wie zum Beispiel dem funktionellen Bereich der zellulären Plastizität oder des Zellmetabolismus, zugeordnet werden. Die zusätzlich durchgeführte *Principal-Component*-Analyse liefert Hinweise auf neue mögliche Biomarkerkandidaten zur frühen Risikoeinschätzung und zur Überprüfung des Therapieerfolges nach einem epileptogenen Gehirnsult. Insgesamt konnten durch die Netzwerkanalyse bereits im Kontext der Epileptogenese diskutierte *pathways* identifiziert werden. Dies trägt zur Validierung des proteomischen Datensatzes bei. Zusätzlich wurden biochemische Reaktionswege detektiert, für die bislang noch keine

Beteiligung bei der Epilepsieentstehung beschrieben wurde. Diese Reaktionswege und deren zugeordnete Proteine könnten mögliche neue Zielstrukturen zur präventiven Intervention nach einem epileptogenen Gehirninsult darstellen.

In einer zweiten hypothesengestützten Analyse wurde der Datensatz auf Regulation von *pathways* untersucht, die mit der extrazellulären Matrix und deren Interaktion mit anderen Zellen bzw. mit den funktionellen Bereichen Zellstress und Zelltod assoziiert sind. Hierzu wurden durch eine *Pathway-Enrichment*-Analyse entsprechende Reaktionswege bestimmt. Für den Schwerpunkt der extrazellulären Matrix konnten in allen Phasen der Epileptogenese regulierte *pathways* detektiert werden. Die Analyse der diesen Reaktionswegen zugeordneten Proteine ergab Hinweise auf eine ausgeprägte differentielle Expression von Proteinen, die verschiedene Aufgaben bei Umbauvorgängen in der extrazellulären Matrix wahrnehmen können. Ferner konnte mittels einer immunhistochemischen Färbung das differentielle Expressionsmuster des Proteins *Fermitin family number 2* bestätigt werden. Für den Fokus Zellstress und Zelltod ergab die Auswertung der *Pathway-Enrichment*-Analyse eine starke Regulation Apoptose assoziierter Prozesse. Die Analyse der den selektierten Reaktionswegen zugeordneten Proteine lieferte Hinweise auf mögliche Zielstrukturen für neuroprotektive Therapieansätze.

Zusammenfassend trägt die vorliegende Studie zum besseren Verständnis der molekularen und zellulären Veränderungen im Gehirn während der Epileptogenese bei. Weiterhin bieten die Ergebnisse der Netzwerkanalyse umfassende Informationen über Epileptogenese assoziierte Proteingruppen und deren zeitliche Regulationsmuster. Diese unvoreingenommene Auswertung könnte eine Basis für die Identifizierung und Validierung neuer Zielstrukturen zur Prävention der Epileptogenese liefern. Die funktionelle Relevanz der Resultate der fokussierten Datenanalyse sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

VIII. SUMMARY

Epilepsies are among the most common neurological diseases in humans as well as in small companion animals (dogs and cats). Besides genetic causes, epilepsies are often acquired after brain insults like traumatic brain injuries. Despite intense research efforts, there is currently no effective intervention available to prevent the development of epilepsy (epileptogenesis). Furthermore, no clinically applicable biomarkers have been identified yet which allow an estimation of the epilepsy risk after a brain injury or a prognosis about the further development of the disease. The main reason for this is the still incomplete and limited knowledge about the cellular and molecular changes in the brain during epileptogenesis. Global approaches such as proteomic studies can help to gain a deeper understanding of the pathophysiological processes. Therefore, a bioinformatic analysis of a proteomic data set was carried out in this study. Samples of the hippocampus (HC) and the parahippocampal cortex (PHC) were collected and analysed by mass spectrometry at three time points (two days, ten days and eight weeks) after induction of a status epilepticus during the course of epileptogenesis. The three time points reflect the early post-insult phase, the latency phase, and the chronic phase.

In a first unbiased approach this data set was subjected to a weighted network analysis. The aim of this analysis has been to investigate the modularity of the data set and to achieve a reduction of the data set by selecting relevant modules. We were able to detect modules containing highly connected proteins for both brain regions. By using different regression analyses, five epileptogenesis related modules for the HC and seven for the PHC were selected. The functional annotation of these modules was determined by pathway enrichment analysis. In this way, some modules could be assigned to specific molecular processes such as cellular plasticity or cell metabolism. The additionally performed principal component analysis suggests possible biomarker candidates, which could serve in early risk assessment and in the evaluation of therapeutic outcomes after an epileptogenic brain insult. Overall, the detection of several already known epileptogenesis related pathways validated the data set further. Additionally, some pathways were identified which were not described previously in the context of epilepsy development. These pathways and their associated proteins may serve as novel targets for preventive interventions after an epileptogenic brain insult.

In a second hypothesis driven approach the dataset was examined for regulated pathways related to the extracellular matrix and its interaction with other cells or to cell stress and cell death. For this purpose, respective pathways were identified by pathway enrichment analysis. We were able to detect pathways associated with the extracellular matrix in all phases of epileptogenesis. The analysis of the proteins assigned to these

pathways revealed a pronounced differential expression of proteins, which serve several functions during the structural changes in the extracellular matrix following a brain insult. Furthermore, the differential expression pattern of the protein *Fermitin family number 2* was confirmed by immunohistochemical staining. The pathway enrichment analysis also revealed a strong regulation of apoptosis related processes. The analysis of the respective proteins assigned to the selected pathways suggested several target candidates for neuroprotective approaches.

In summary, this study offers further insights into the molecular and cellular changes taking place in the brain during the development of epilepsy. The findings of the network analysis provide comprehensive information about epileptogenesis-related protein groups and their temporal regulatory patterns. In addition, this unbiased approach may serve as a basis for the identification and validation of new target structures for the prevention of epileptogenesis. Future studies are needed to further evaluate the functional impact of the results of the hypothesis-driven analysis.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

AKBAR, M. T., A. M. LUNDBERG, K. LIU, S. VIDYADARAN, K. E. WELLS, H. DOLATSHAD, S. WYNN, D. J. WELLS, D. S. LATCHMAN and J. DE BELLEROCHE (2003): The neuroprotective effects of heat shock protein 27 overexpression in transgenic animals against kainate-induced seizures and hippocampal cell death. *The Journal of biological chemistry* 278 19956-19965.

ALBERT, R., H. JEONG and A. L. BARABASI (2000): Error and attack tolerance of complex networks. *Nature* 406 378-382.

ALZATE, O. (2010): *Neuroproteomics*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 978-1-4200-7625-7

ANDERSON, N. L. and N. G. ANDERSON (1998): Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19 1853-1861.

AUVIN, S. and N. DUPUIS (2014): Outcome of status epilepticus. What do we learn from animal data? *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape* 16 Spec No 1 S37-43.

BANDTLOW, C. E. and D. R. ZIMMERMANN (2000): Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiological reviews* 80 1267-1290.

BARABASI, A. L. and E. BONABEAU (2003): Scale-free networks. *Scientific American* 288 60-69.

BARABASI, A. L. and Z. N. OLTVAI (2004): Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews. Genetics* 5 101-113.

BARBER, A. J. and E. LIETH (1997): Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 208 62-74.

BASSANI, S. and L. A. CINGOLANI (2012): Tetraspanins: Interactions and interplay with integrins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44 703-708.

BAYES, A. and S. G. GRANT (2009): Neuroproteomics: understanding the molecular organization and complexity of the brain. *Nat Rev Neurosci* 10 635-646.

BECKER, M., J. SCHINDLER and H. G. NOTHWANG (2006): Neuroproteomics - the tasks lying ahead. *Electrophoresis* 27 2819-2829.

BEN-ARI, Y., E. TREMBLAY, O. P. OTTERSEN and R. NAQUET (1979): Evidence suggesting secondary epileptogenic lesion after kainic acid: pre treatment with diazepam reduces distant but not local brain damage. *Brain research* 165 362-365.

BERENDT, M., R. G. FARQUHAR, P. J. MANDIGERS, A. PAKOZDY, S. F. BHATTI, L. DE RISIO, A. FISCHER, S. LONG, K. MATIASEK, K. MUNANA, E. E. PATTERSON, J. PENDERIS, S. PLATT, M. PODELL, H. POTSCHKA, M. B. PUMAROLA, C. RUSBRIDGE, V. M. STEIN, A. TIPOLD and H. A. VOLK (2015): International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC veterinary research* 11 182.

BERG, A. T., S. F. BERKOVIC, M. J. BRODIE, J. BUCHHALTER, J. H. CROSS, W. VAN EMDE BOAS, J. ENGEL, J. FRENCH, T. A. GLAUSER, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, D. NORDLI, P. PLOUIN and I. E. SCHEFFER (2010): Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51 676-685.

BERGLUND, L., E. BJORLING, P. OKSVOLD, L. FAGERBERG, A. ASPLUND, C. A. SZIGYARTO, A. PERSSON, J. OTTOSSON, H. WERNERUS, P. NILSSON, E. LUNDBERG, A. SIVERTSSON, S. NAVANI, K. WESTER, C. KAMPF, S. HOBER, F. PONTEN and M. UHLEN (2008): A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7 2019-2027.

BERGSBAKEN, T., S. L. FINK and B. T. COOKSON (2009): Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology* 7 99-109.

BIDMON, H. J., B. GORG, N. PALOMERO-GALLAGHER, F. BEHNE, R. LAHL, H. W. PANNEK, E. J. SPECKMANN and K. ZILLES (2004): Heat shock protein-27 is upregulated in the temporal cortex of patients with epilepsy. *Epilepsia* 45 1549-1559.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics* 69 89-95.

BITSIKA, V., V. DUVEAU, J. SIMON-ARECES, W. MULLEN, C. ROUCARD, M. MAKRIDAKIS, G. MERMELEKAS, P. SAVVOPOULOS, A. DEPAULIS and A. VLAHOU (2016): High-Throughput LC-MS/MS Proteomic Analysis of a Mouse Model of Mesiotemporal Lobe Epilepsy Predicts Microglial Activation Underlying Disease Development. *Journal of proteome research* 15 1546-1562.

BOLANOS, A. R., M. SARKISIAN, Y. YANG, A. HORI, S. L. HELMERS, M. MIKATI, P. TANDON, C. E. STAFSTROM and G. L. HOLMES (1998): Comparison of valproate and phenobarbital treatment after status epilepticus in rats. *Neurology* 51 41-48.

BORATE, B. R., E. J. CHESLER, M. A. LANGSTON, A. M. SAXTON and B. H. VOY (2009): Comparison of threshold selection methods for microarray gene co-expression matrices. *BMC research notes* 2 240.

BORGES, K., D. L. MCDERMOTT and R. DINGLEDINE (2004): Reciprocal changes of CD44 and GAP-43 expression in the dentate gyrus inner molecular layer after status epilepticus in mice. *Experimental neurology* 188 1-10.

BOSE, C. M., D. QIU, A. BERGAMASCHI, B. GRAVANTE, M. BOSSI, A. VILLA, F. RUPP and A. MALGAROLI (2000): Agrin controls synaptic differentiation in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20 9086-9095.

BRANDT, C., A. M. GASTENS, M. SUN, M. HAUSKNECHT and W. LÖSCHER (2006): Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology* 51 789-804.

BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHKA, H. VOLK and W. LÖSCHER (2003): Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. *Epilepsy research* 55 83-103.

BROOKS-KAYAL, A. R., Y. H. RAOL and S. J. RUSSEK (2009): Alteration of epileptogenesis genes. *Neurotherapeutics* 6 312-318.

BROWN, G. C. and J. J. NEHER (2012): Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends in biochemical sciences* 37 325-332.

BRUSCHI, F. (2011): Was Julius Caesar's epilepsy due to neurocysticercosis? *Trends in parasitology* 27 373-374.

BUCKMASTER, P. S. and F. E. DUDEK (1997): Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *The Journal of comparative neurology* 385 385-404.

BURDON, R. H. (1986): Heat shock and the heat shock proteins. *The Biochemical journal* 240 313-324.

BUTTE, A. J. and I. S. KOHANE (2000): Mutual information relevance networks: functional genomic clustering using pairwise entropy measurements. *Pacific Symposium on Biocomputing*. *Pacific Symposium on Biocomputing* 418-429.

CARTER, S. L., C. M. BRECHBUHLER, M. GRIFFIN and A. T. BOND (2004): Gene co-expression network topology provides a framework for molecular characterization of cellular state. *Bioinformatics (Oxford, England)* 20 2242-2250.

CAVALHEIRO, E. A., J. P. LEITE, Z. A. BORTOLOTTI, W. A. TURSCHI, C. IKONOMIDOU and L. TURSCHI (1991): Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32 778-782.

CHANDLER, K. (2006): Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders? *Veterinary journal (London, England : 1997)* 172 207-217.

CHARLETTE, S. J., J. N. LAVOIE, H. LAMBERT and J. LANDRY (2000): Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Molecular and cellular biology* 20 7602-7612.

CHEN, G. and B. N. PRAMANIK (2009): Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects. *Drug discovery today* 14 465-471.

CHIN, J. and H. E. SCHARFMAN (2013): Shared cognitive and behavioral impairments in epilepsy and Alzheimer's disease and potential underlying mechanisms. *Epilepsy Behav* 26 343-351.

CHOUDHARY, J. and S. G. GRANT (2004): Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nature neuroscience* 7 440-445.

CITRARO, R., A. LEO, A. CONSTANTINI, E. RUSSO and G. DE SARRO (2016): mTOR pathway inhibition as a new therapeutic strategy in epilepsy and epileptogenesis. *Pharmacological research* 107 333-343.

CLANTON, R. M., G. WU, G. AKABANI and R. ARAMAYO (2017): Control of seizures by ketogenic diet-induced modulation of metabolic pathways. *Amino acids* 49 1-20.

DAVIDSON, E. H., D. R. MCCLAY and L. HOOD (2003): Regulatory gene networks and the properties of the developmental process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 1475-1480.

DE GUZMAN, P., M. D'ANTUONO and M. AVOLI (2004): Initiation of electrographic seizures by neuronal networks in entorhinal and perirhinal cortices in vitro. *Neuroscience* 123 875-886.

DE JONG, S., M. P. BOKS, T. F. FULLER, E. STRENGMAN, E. JANSON, C. G. DE KOVEL, A. P. ORI, N. VI, F. MULDER, J. D. BLOM, B. GLENTHOJ, C. D. SCHUBART, W. CAHN, R. S. KAHN, S. HORVATH and R. A. OPHOFF (2012): A gene co-expression network in whole blood of schizophrenia patients is independent of antipsychotic-use and enriched for brain-expressed genes. *PloS one* 7 e39498.

DECHAT, T., K. PFLEGHAAR, K. SENGUPTA, T. SHIMI, D. K. SHUMAKER, L. SOLIMANDO and R. D. GOLDMAN (2008): Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & development* 22 832-853.

DERACINOIS, B., C. FLAHAUT, S. DUBAN-DEWEER and Y. KARAMANOS (2013): Comparative and Quantitative Global Proteomics Approaches: An Overview. *Proteomes* 1 180.

DIJKSTRA, A. A., A. INGRASSIA, R. X. DE MENEZES, R. E. VAN KESTEREN, A. J. ROZEMULLER, P. HEUTINK and W. D. VAN DE BERG (2015): Evidence for Immune Response, Axonal Dysfunction and Reduced Endocytosis in the Substantia Nigra in Early Stage Parkinson's Disease. *PloS one* 10 e0128651.

DINGLEDINE, R., N. H. VARVEL and F. E. DUDEK (2014): When and how do seizures kill neurons, and is cell death relevant to epileptogenesis? *Advances in experimental medicine and biology* 813 109-122.

DITYATEV, A. (2010): Remodeling of extracellular matrix and epileptogenesis. *Epilepsia* 51 Suppl 3 61-65.

DITYATEV, A., M. SCHACHNER and P. SONDEREGGER (2010): The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 11 735-746.

DRAGUNOW, M., K. PRESTON, J. DODD, D. YOUNG, P. LAWLOR and D. CHRISTIE (1995): Clusterin accumulates in dying neurons following status epilepticus. *Brain research. Molecular brain research* 32 279-290.

DUBREUIL, C. I., N. MARKLUND, K. DESCHAMPS, T. K. MCINTOSH and L. MCKERRACHER (2006): Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats. *Experimental neurology* 198 361-369.

EBERHARD, D. A., M. D. BROWN and S. R. VANDENBERG (1994): Alterations of annexin expression in pathological neuronal and glial reactions. Immunohistochemical localization of annexins I, II (p36 and p11 subunits), IV, and VI in the human hippocampus. *The American journal of pathology* 145 640-649.

EISEN, M. B., P. T. SPELLMAN, P. O. BROWN and D. BOTSTEIN (1998): Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 14863-14868.

ENGEL, J. J. (2011): Biomarkers in epilepsy: introduction. *Biomarkers in medicine* 5 537-544.

ENGEL, J. J., A. PITKANEN, J. A. LOEB, F. E. DUDEK, E. H. BERTRAM, 3RD, A. J. COLE, S. L. MOSHE, S. WIEBE, F. E. JENSEN, I. MODY, A. NEHLIG and A. VEZZANI (2013): Epilepsy biomarkers. *Epilepsia* 54 Suppl 4 61-69.

ENGEL, T. and D. C. HENSHALL (2009): Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 1 97-115.

ERDÖS, P. and A. RÉNYI (1961): On the evolution of random graphs. *Bull. Inst. Internat. Statist* 38 343-347.

ERON, S. J., K. RAGHUPATHI and J. A. HARDY (2017): Dual Site Phosphorylation of Caspase-7 by PAK2 Blocks Apoptotic Activity by Two Distinct Mechanisms. *Structure (London, England : 1993)* 25 27-39.

FASEN, K., C. E. ELGER and A. A. LIE (2003): Distribution of alpha and beta integrin subunits in the adult rat hippocampus after pilocarpine-induced neuronal cell loss, axonal reorganization and reactive astrogliosis. *Acta neuropathologica* 106 319-322.

FISHER, R. S., C. ACEVEDO, A. ARZIMANOGLU, A. BOGACZ, J. H. CROSS, C. E. ELGER, J. ENGEL, JR., L. FORSGREN, J. A. FRENCH, M. GLYNN, D. C. HESDORFFER, B. I. LEE, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, E. PERUCCA, I. E. SCHEFFER, T. TOMSON, M. WATANABE and S. WIEBE (2014): ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55 475-482.

FISHER, R. S., W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE and J. ENGEL, JR. (2005): Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46 470-472.

FITTER, S., P. M. SINCOCK, C. N. JOLLIFFE and L. K. ASHMAN (1999): Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with beta 1 and alpha IIb beta 3 integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *The Biochemical journal* 338 (Pt 1) 61-70.

FORSGREN, L., E. BEGHI, A. OUN and M. SILLANPAA (2005): The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. *European journal of neurology* 12 245-253.

FOUNTOULAKIS, M. (2004): Application of proteomics technologies in the investigation of the brain. *Mass spectrometry reviews* 23 231-258.

GALANOPOULOU, A. S., J. A. GORTER and C. CEPEDA (2012): Finding a better drug for epilepsy: the mTOR pathway as an antiepileptogenic target. *Epilepsia* 53 1119-1130.

GALANOPOULOU, A. S. and S. L. MOSHE (2014): Does epilepsy cause a reversion to immature function? *Advances in experimental medicine and biology* 813 195-209.

GALTREY, C. M. and J. W. FAWCETT (2007): The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain research reviews* 54 1-18.

GOLDBERG, E. M. and D. A. COULTER (2013): Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 14 337-349.

GORTER, J. A., E. A. VAN VLIET and F. H. LOPES DA SILVA (2016): Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? *Journal of neuroscience methods* 260 96-108.

GREEN, D. R., L. GALLUZZI and G. KROEMER (2011): Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science (New York, N.Y.)* 333 1109-1112.

HARBORTH, J., S. M. ELBASHIR, K. BECHERT, T. TUSCHL and K. WEBER (2001): Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *Journal of cell science* 114 4557-4565.

HAUCK, S. M., J. DIETTER, R. L. KRAMER, F. HOFMAIER, J. K. ZIPPLIES, B. AMANN, A. FEUCHTINGER, C. A. DEEG and M. UEFFING (2010): Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 9 2292-2305.

HAUCK, S. M., F. HOFMAIER, J. DIETTER, M. E. SWADZBA, M. BLINDERT, B. AMANN, J. BEHLER, E. KREMMER, M. UEFFING and C. A. DEEG (2012): Label-free LC-MS/MS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *Journal of proteomics* 75 4545-4554.

HE, X. and J. ZHANG (2006): Why do hubs tend to be essential in protein networks? *PLoS genetics* 2 e88.

HENSHALL, D. C. and T. ENGEL (2013): Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts. *Frontiers in cellular neuroscience* 7 110.

HESKE, L., A. NØDTVEDT, K. H. JÄDERLUND, M. BERENDT and A. EGENVALL (2014): A cohort study of epilepsy among 665,000 insured dogs: Incidence, mortality and survival after diagnosis. *The Veterinary Journal* 202 471-476.

HEYDEN, A., M. C. IONESCU, S. ROMORINI, B. KRACHT, V. GHIGLIERI, P. CALABRESI, C. SEIDENBECHER, F. ANGENSTEIN and E. D. GUNDELFINGER (2011): Hippocampal enlargement in Bassoon-mutant mice is associated with enhanced neurogenesis, reduced apoptosis, and abnormal BDNF levels. *Cell and tissue research* 346 11-26.

HOLTKAMP, M. and H. MEIERKORD (2007): Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 64 2023-2041.

HOPKINS, A. L. (2008): Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature chemical biology* 4 682-690.

HU, Y., V. CHOPRA, R. CHOPRA, J. J. LOCASCIO, Z. LIAO, H. DING, B. ZHENG, W. R. MATSON, R. J. FERRANTE, H. D. ROSAS, S. M. HERSCH and C. R. SCHERZER (2011): Transcriptional modulator H2A histone family, member Y (H2AFY) marks Huntington disease activity in man and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 17141-17146.

HUA, L. V., M. GREEN, A. WONG, J. J. WARSH and P. P. LI (2001): Tetraspan protein CD151: a common target of mood stabilizing drugs? *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 25 729-736.

HUNT, D. F., J. R. YATES, 3RD, J. SHABANOWITZ, S. WINSTON and C. R. HAUER (1986): Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 6233-6237.

HYNES, R. O. (2002): Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110 673-687.

IVOSEV, G., L. BURTON and R. BONNER (2008): Dimensionality reduction and visualization in principal component analysis. *Analytical chemistry* 80 4933-4944.

IWASAWA, R., A. L. MAHUL-MELLIER, C. DATLER, E. PAZARENTZOS and S. GRIMM (2011): Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *The EMBO journal* 30 556-568.

JAMALI, S., F. BARTOLOMEI, A. ROBAGLIA-SCHLUPP, A. MASSACRIER, J. C. PERAGUT, J. REGIS, H. DUFOUR, R. RAVID, P. ROLL, S. PEREIRA, B. ROYER, N. ROECKEL-TREVISIOL, M. FONTAINE, M. GUYE, J. BOUCRAUT, P. CHAUVEL, P. CAU and P. SZEPETOWSKI (2006): Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain : a journal of neurology* 129 625-641.

JEONG, H., S. P. MASON, A. L. BARABASI and Z. N. OLTVAI (2001): Lethality and centrality in protein networks. *Nature* 411 41-42.

JESSBERGER, S. and J. M. PARENT (2015): Epilepsy and Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 a020677.

JOLLIFFE, I. (2002): Principal component analysis. Springer New York, ISBN 0387954422

JUNKER, H., Y. SUOFU, S. VENZ, M. SASCAU, J. G. HERNDON, C. KESSLER, R. WALTHER and A. POPA-WAGNER (2007): Proteomic identification of an upregulated isoform of annexin A3 in the rat brain following reversible cerebral ischemia. *Glia* 55 1630-1637.

KALWY, S. A., M. T. AKBAR, R. S. COFFIN, J. DE BELLEROCHE and D. S. LATCHMAN (2003): Heat shock protein 27 delivered via a herpes simplex virus vector can protect neurons of the hippocampus against kainic-acid-induced cell loss. *Brain research*.

Molecular brain research 111 91-103.

KAMBUROV, A., K. PENTCHEV, H. GALICKA, C. WIERLING, H. LEHRACH and R. HERWIG (2011): ConsensusPathDB: toward a more complete picture of cell biology. *Nucleic acids research* 39 D712-717.

KANG, M. G., K. BYUN, J. H. KIM, N. H. PARK, H. HEINSEN, R. RAVID, H. W. STEINBUSCH, B. LEE and Y. M. PARK (2015): Proteogenomics of the human hippocampus: The road ahead. *Biochimica et biophysica acta* 1854 788-797.

KARP, P. D. (2001): Pathway databases: a case study in computational symbolic theories. *Science (New York, N.Y.)* 293 2040-2044.

KASSAMBARA, A. (2015): factoextra: Visualization of the outputs of a multivariate analysis. R Package version 1.0. 1.

KEARSLEY-FLEET, L., D. G. O'NEILL, H. A. VOLK, D. B. CHURCH and D. C. BRODBELT (2013): Prevalence and risk factors for canine epilepsy of unknown origin in the UK. *The Veterinary record* 172 338.

KERR, J. F., A. H. WYLLIE and A. R. CURRIE (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26 239-257.

KEY, M. (2012): A tutorial in displaying mass spectrometry-based proteomic data using heat maps. *BMC bioinformatics* 13 Suppl 16 S10.

KIM, J. Y., A. R. KO and J. E. KIM (2015): P2X7 receptor-mediated PARP1 activity regulates astroglial death in the rat hippocampus following status epilepticus. *Frontiers in cellular neuroscience* 9 352.

KIM, S. Y., B. E. PORTER, A. FRIEDMAN and D. KAUFER (2016): A potential role for glia-derived extracellular matrix remodeling in postinjury epilepsy. *Journal of neuroscience research* 94 794-803.

KIM, Y. S., M. Y. CHOI, J. H. RYU, D. H. LEE, B. T. JEON, G. S. ROH, S. S. KANG, H. J. KIM, G. J. CHO and W. S. CHOI (2012): Clusterin interaction with Bcl-xL is associated with seizure-induced neuronal death. *Epilepsy research* 99 240-251.

KISTLER, K. A. (2016): Einfluss der Entstehung und der Therapie von Epilepsien auf die Blut-Hirn-Schranke: Untersuchung zur Regulation von ABC-Transportern und differentielle Proteomanalysen. LMU München, Tierärztliche Fakultät, Doktorarbeit.

KLOEKER, S., M. B. MAJOR, D. A. CALDERWOOD, M. H. GINSBERG, D. A. JONES and M. C. BECKERLE (2004): The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *The Journal of biological chemistry* 279 6824-6833.

KNUESEL, I., A. ELLIOTT, H. J. CHEN, I. M. MANSUY and M. B. KENNEDY (2005): A role for synGAP in regulating neuronal apoptosis. *The European journal of neuroscience* 21 611-621.

KOBOW, K., S. AUVIN, F. JENSEN, W. LOSCHER, I. MODY, H. POTSCHKA, D. PRINCE, A. SIERRA, M. SIMONATO, A. PITKANEN, A. NEHLIG and J. M. RHO (2012): Finding a better drug for epilepsy: antiepileptogenesis targets. *Epilepsia* 53 1868-1876.

KROEMER, G., G. MARINO and B. LEVINE (2010): Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* 40 280-293.

KUMAR, C. and M. MANN (2009): Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. *FEBS letters* 583 1703-1712.

KUO, T. F., H. TATSUKAWA and S. KOJIMA (2011): New insights into the functions and localization of nuclear transglutaminase 2. *The FEBS journal* 278 4756-4767.

KURUBA, R., B. HATTIANGADY and A. K. SHETTY (2009): Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1 65-73.

LAKE, F. (2011): Hunting biomarkers for Huntington's disease: H2AFY. *Biomarkers in medicine* 5 817-820.

LANE, S. B. and S. E. BUNCH (1990): Medical management of recurrent seizures in dogs and cats. *Journal of veterinary internal medicine* 4 26-39.

LANGFELDER, P. and S. HORVATH (2008): WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC bioinformatics* 9 559.

LANGFELDER, P., R. LUO, M. C. OLDHAM and S. HORVATH (2011): Is my network

module preserved and reproducible? PLoS computational biology 7 e1001057.

LANGFELDER, P., P. S. MISCHER and S. HORVATH (2013): When is hub gene selection better than standard meta-analysis? PloS one 8 e61505.

LANUCARA, F. and C. E. EYERS (2013): Top-down mass spectrometry for the analysis of combinatorial post-translational modifications. Mass spectrometry reviews 32 27-42.

LÉ, S., J. JOSSE and F. HUSSON (2008): FactoMineR: An R package for multivariate analysis. Journal of statistical software 25 1-18.

LEE, T. S., S. MANE, T. EID, H. ZHAO, A. LIN, Z. GUAN, J. H. KIM, J. SCHWEITZER, D. KING-STEVENSON, P. WEBER, S. S. SPENCER, D. D. SPENCER and N. C. DE LANEROLLE (2007): Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes. Mol Med 13 1-13.

LESKOV, K. S., D. Y. KLOKOV, J. LI, T. J. KINSELLA and D. A. BOOTHMAN (2003): Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. The Journal of biological chemistry 278 11590-11600.

LEVY, A. D., M. H. OMAR and A. J. KOLESKE (2014): Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. Frontiers in neuroanatomy 8 116.

LI, R., A. MAMINISHKIS, G. ZAHN, D. VOSSMEYER and S. S. MILLER (2009): Integrin alpha5beta1 mediates attachment, migration, and proliferation in human retinal pigment epithelium: relevance for proliferative retinal disease. Investigative ophthalmology & visual science 50 5988-5996.

LOEB, J. A. (2011): Identifying targets for preventing epilepsy using systems biology. Neuroscience letters 497 205-212.

LÖSCHER, W. (2011): Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Seizure 20 359-368.

LÖSCHER, W. (2016): Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. Epilepsy research 126 157-184.

LÖSCHER, W. and C. BRANDT (2010): Prevention or modification of epileptogenesis

after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev* 62 668-700.

LÖSCHER, W., L. J. HIRSCH and D. SCHMIDT (2015): The enigma of the latent period in the development of symptomatic acquired epilepsy - Traditional view versus new concepts. *Epilepsy Behav* 52 78-92.

LÖSCHER, W., H. KLITGAARD, R. E. TWYMAN and D. SCHMIDT (2013): New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery* 12 757-776.

LOTHMAN, E. W., E. H. BERTRAM, J. W. BEKENSTEIN and J. B. PERLIN (1989): Self-sustaining limbic status epilepticus induced by 'continuous' hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. *Epilepsy research* 3 107-119.

LUKASIUK, K. and A. J. BECKER (2014): Molecular biomarkers of epileptogenesis. *Neurotherapeutics* 11 319-323.

LUKASIUK, K., L. KONTULA and A. PITKANEN (2003): cDNA profiling of epileptogenesis in the rat brain. *The European journal of neuroscience* 17 271-279.

LUKASIUK, K., G. M. WILCZYNSKI and L. KACZMAREK (2011): Extracellular proteases in epilepsy. *Epilepsy research* 96 191-206.

MA'AYAN, A. (2009): Insights into the organization of biochemical regulatory networks using graph theory analyses. *The Journal of biological chemistry* 284 5451-5455.

MA, Y., L. GALLUZZI, L. ZITVOGEL and G. KROEMER (2013): Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* 39 211-227.

MAGIORKINIS, E., K. SIDIROPOULOU and A. DIAMANTIS (2010): Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy Behav* 17 103-108.

MATSUI, F. and A. OOHIRA (2004): Proteoglycans and injury of the central nervous system. *Congenital anomalies* 44 181-188.

MCINTYRE, D. C., D. NATHANSON and N. EDSON (1982): A new model of partial status epilepticus based on kindling. *Brain research* 250 53-63.

MCRAE, P. A., E. BARANOV, S. L. ROGERS and B. E. PORTER (2012): Persistent decrease in multiple components of the perineuronal net following status epilepticus. *The European journal of neuroscience* 36 3471-3482.

MCRAE, P. A. and B. E. PORTER (2012): The perineuronal net component of the extracellular matrix in plasticity and epilepsy. *Neurochemistry international* 61 963-972.

MEVES, A., C. STREMMEL, K. GOTTSCHALK and R. FASSLER (2009): The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends in cell biology* 19 504-513.

MILES, M. C., M. L. JANKET, E. D. WHEELER, A. CHATTOPADHYAY, B. MAJUMDER, J. DERICCO, E. A. SCHAFER and V. AYYAVOO (2005): Molecular and functional characterization of a novel splice variant of ANKHD1 that lacks the KH domain and its role in cell survival and apoptosis. *The FEBS journal* 272 4091-4102.

MILLER, J. A., S. HORVATH and D. H. GESCHWIND (2010): Divergence of human and mouse brain transcriptome highlights Alzheimer disease pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 12698-12703.

NEWMAN, M. E. (2003): The structure and function of complex networks. *SIAM review* 45 167-256.

NICHOLSON, C. and E. SYKOVA (1998): Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in neurosciences* 21 207-215.

NISSINEN, J., T. HALONEN, E. KOIVISTO and A. PITKANEN (2000): A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy research* 38 177-205.

NOEBELS, J. (2011): A perfect storm: Converging paths of epilepsy and Alzheimer's dementia intersect in the hippocampal formation. *Epilepsia* 52 Suppl 1 39-46.

OKAMOTO, O. K., L. JANJOPPI, F. M. BONONE, A. P. PANSANI, A. V. DA SILVA, F. A. SCORZA and E. A. CAVALHEIRO (2010): Whole transcriptome analysis of the hippocampus: toward a molecular portrait of epileptogenesis. *BMC Genomics* 11 230.

PANAYIOTOPOULOS, C. P. (2011): The new ILAE report on terminology and concepts for organization of epileptic seizures: a clinician's critical view and contribution. *Epilepsia* 52 2155-2160.

PARK, Y. K. and Y. GODA (2016): Integrins in synapse regulation. *Nat Rev Neurosci* 17 745-756.

PAUL, C., S. SIMON, B. GIBERT, S. VIROT, F. MANERO and A. P. ARRIGO (2010): Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27). *Experimental cell research* 316 1535-1552.

PENNINGTON, S. R., M. R. WILKINS, D. F. HOCHSTRASSER and M. J. DUNN (1997): Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends in cell biology* 7 168-173.

PITKÄNEN, A. (2010): Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. *Epilepsia* 51 Suppl 3 2-17.

PITKÄNEN, A. and J. ENGEL, JR. (2014): Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics* 11 231-241.

PITKÄNEN, A., W. LÖSCHER, A. VEZZANI, A. J. BECKER, M. SIMONATO, K. LUKASIUK, O. GROHN, J. P. BANKSTAHL, A. FRIEDMAN, E. ARONICA, J. A. GORTER, T. RAVIZZA, S. M. SISODIYA, M. KOKAIA and H. BECK (2016): Advances in the development of biomarkers for epilepsy. *The Lancet. Neurology* 15 843-856.

PITKÄNEN, A. and K. LUKASIUK (2009): Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1 16-25.

PITKÄNEN, A. and K. LUKASIUK (2011a): Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet. Neurology* 10 173-186.

PITKÄNEN, A. and K. LUKASIUK (2011b): Molecular biomarkers of epileptogenesis. *Biomarkers in medicine* 5 629-633.

PITKÄNEN, A., K. LUKASIUK, F. E. DUDEK and K. J. STALEY (2015): Epileptogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5 a022822.

PITKÄNEN, A., X. E. NDODE-EKANE, K. LUKASIUK, G. M. WILCZYNSKI, A. DITYATEV, M. C. WALKER, E. CHABROL, S. DEDEURWAERDERE, N. VAZQUEZ and E. M. POWELL (2014): Neural ECM and epilepsy. *Progress in brain research* 214 229-262.

PITKÄNEN, A., J. NISSINEN, J. NAIRISMAGI, K. LUKASIUK, O. H. GROHN, R. MIETTINEN and R. KAUPPINEN (2002): Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Progress in brain research* 135 67-83.

POLLARD, H., C. CHARRIAUT-MARLANGUE, S. CANTAGREL, A. REPRESA, O. ROBAIN, J. MOREAU and Y. BEN-ARI (1994): Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* 63 7-18.

POTSCHKA, H. and M. J. BRODIE (2012): Pharmacoresistance. *Handbook of clinical neurology* 108 741-757.

POTSCHKA, H., A. FISCHER, E. L. VON RÜDEN, V. HULSMEYER and W. BAUMGARTNER (2013): Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia* 54 571-579.

RACINE, J., V. GERBER, M. M. FEUTZ, C. P. RILEY, J. ADAMEC, J. E. SWINBURNE and L. L. COUETIL (2011): Comparison of genomic and proteomic data in recurrent airway obstruction affected horses using Ingenuity Pathway Analysis(R). *BMC veterinary research* 7 48.

RANTALA, J., S. KEMPPAINEN, X. E. NDODE-EKANE, L. LAHTINEN, T. BOLKVADZE, K. GUREVICIUS, H. TANILA and A. PITKANEN (2015): Urokinase-type plasminogen activator deficiency has little effect on seizure susceptibility and acquired epilepsy phenotype but reduces spontaneous exploration in mice. *Epilepsy Behav* 42 117-128.

RAUCH, U. (2004): Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61 2031-2045.

RAVASZ, E. and A.-L. BARABÁSI (2003): Hierarchical organization in complex networks. *Physical Review E* 67 026112.

RAVASZ, E., A. L. SOMERA, D. A. MONGRU, Z. N. OLTVAI and A. L. BARABASI (2002): Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science (New York, N.Y.)* 297 1551-1555.

RAVICHANDRAN, K. S. (2011): Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35 445-455.

REID, C. A., S. MULLEN, T. H. KIM and S. PETROU (2014): Epilepsy, energy deficiency and new therapeutic approaches including diet. *Pharmacology & therapeutics* 144 192-

201.

REN, F., L. ZHANG and J. JIANG (2010): Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Developmental biology* 337 303-312.

REN, Y., Y. CUI, X. LI, B. WANG, L. NA, J. SHI, L. WANG, L. QIU, K. ZHANG, G. LIU and Y. XU (2015): A co-expression network analysis reveals lncRNA abnormalities in peripheral blood in early-onset schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 63 1-5.

RINGNÉR, M. (2008): What is principal component analysis? *Nature biotechnology* 26 303-304.

ROGNONI, E., R. RUPPERT and R. FÄSSLER (2016): The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *Journal of cell science* 129 17-27.

ROSKOWSKA, M., A. SKUPIEN, T. WOJTOWICZ, A. KONOPKA, A. GORLEWICZ, M. KISIEL, M. BEKISZ, B. RUSZCZYCKI, H. DOLEZYCZEK, E. REJMAK, E. KNAPSKA, J. W. MOZRYMAS, J. WLODARCZYK, G. M. WILCZYNSKI and J. DZWONEK (2016): CD44: a novel synaptic cell adhesion molecule regulating structural and functional plasticity of dendritic spines. *Molecular biology of the cell* 27 4055-4066.

ROWLEY, S., L. P. LIANG, R. FULTON, T. SHIMIZU, B. DAY and M. PATEL (2015): Mitochondrial respiration deficits driven by reactive oxygen species in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease* 75 151-158.

SCAFFIDI, P., T. MISTELI and M. E. BIANCHI (2002): Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418 191-195.

SCHINDLER, C. K., M. HEVERIN and D. C. HENSHALL (2006): Isoform- and subcellular fraction-specific differences in hippocampal 14-3-3 levels following experimentally evoked seizures and in human temporal lobe epilepsy. *Journal of neurochemistry* 99 561-569.

SCHMIDT, D. and M. SILLANPÄÄ (2016): Prevention of Epilepsy: Issues and Innovations. *Current neurology and neuroscience reports* 16 95.

SERRANO, G. E., N. LELUTIU, A. ROJAS, S. COCHI, R. SHAW, C. D. MAKINSON, D. WANG, G. A. FITZGERALD and R. DINGLEDINE (2011): Ablation of cyclooxygenase-2 in forebrain neurons is neuroprotective and dampens brain inflammation after status

epilepticus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 14850-14860.

SHANNON, P., A. MARKIEL, O. OZIER, N. S. BALIGA, J. T. WANG, D. RAMAGE, N. AMIN, B. SCHWIKOWSKI and T. IDEKER (2003): Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* 13 2498-2504.

SHEVCHENKO, G., A. KONZER, S. MUSUNURI and J. BERGQUIST (2015): Neuroproteomics tools in clinical practice. *Biochimica et biophysica acta* 1854 705-717.

SHI, S. R., M. E. KEY and K. L. KALRA (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 39 741-748.

SHIMADA, T., A. E. FOURNIER and K. YAMAGATA (2013): Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *BioMed research international* 2013 564534.

SHIRASAKI, D. I., E. R. GREINER, I. AL-RAMAHI, M. GRAY, P. BOONTHEUNG, D. H. GESCHWIND, J. BOTAS, G. COPPOLA, S. HORVATH, J. A. LOO and X. W. YANG (2012): Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron* 75 41-57.

SHORVON, S. D. (2011): The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia* 52 1052-1057.

SIEGEL, D. H., G. H. ASHTON, H. G. PENAGOS, J. V. LEE, H. S. FEILER, K. C. WILHELMSSEN, A. P. SOUTH, F. J. SMITH, A. R. PRESCOTT, V. WESSAGOWIT, N. OYAMA, M. AKIYAMA, D. AL ABOUD, K. AL ABOUD, A. AL GITHAMI, K. AL HAWSAWI, A. AL ISMAILY, R. AL-SUWAID, D. J. ATHERTON, R. CAPUTO, J. D. FINE, I. J. FRIEDEN, E. FUCHS, R. M. HABER, T. HARADA, Y. KITAJIMA, S. B. MALLORY, H. OGAWA, S. SAHIN, H. SHIMIZU, Y. SUGA, G. TADINI, K. TSUCHIYA, C. B. WIEBE, F. WOJNAROWSKA, A. B. ZAGHLOUL, T. HAMADA, R. MALLIPEDDI, R. A. EADY, W. H. MCLEAN, J. A. MCGRATH and E. H. EPSTEIN (2003): Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *American journal of human genetics* 73 174-187.

SIMONATO, M., W. LOSCHER, A. J. COLE, F. E. DUDEK, J. ENGEL, JR., R. M. KAMINSKI, J. A. LOEB, H. SCHARFMAN, K. J. STALEY, L. VELISEK and H. KLITGAARD (2012): Finding a better drug for epilepsy: preclinical screening strategies and experimental trial design. *Epilepsia* 53 1860-1867.

SLOVITER, R. S. and A. V. BUMANGLAG (2013): Defining "epileptogenesis" and

identifying "antiepileptogenic targets" in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology* 69 3-15.

SMITH BAILEY, K. and C. W. DEWEY (2009): The seizing cat. Diagnostic work-up and therapy. *Journal of feline medicine and surgery* 11 385-394.

SMYTH, G. K. (2004): Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3 Article3.

SOLEMAN, S., M. A. FILIPPOV, A. DITYATEV and J. W. FAWCETT (2013): Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience* 253 194-213.

STAMENKOVIC, V., S. STAMENKOVIC, T. JAWORSKI, M. GAWLAK, M. JOVANOVIĆ, I. JAKOVCEVSKI, G. M. WILCZYNSKI, L. KACZMAREK, M. SCHACHNER, L. RADENOVIC and P. R. ANDJUS (2017): The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C and matrix metalloproteinases modify cerebellar structural plasticity by exposure to an enriched environment. *Brain structure & function* 222 393-415.

STEINACKER, P., A. AITKEN and M. OTTO (2011): 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *Seminars in cell & developmental biology* 22 696-704.

SUENAGA, N., T. ICHIYAMA, M. KUBOTA, H. ISUMI, J. TOHYAMA and S. FURUKAWA (2008): Roles of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *Journal of the neurological sciences* 266 126-130.

TEMKIN, N. R. (2009): Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia* 50 Suppl 2 10-13.

TERRONE, G., A. PAULETTI, R. PASCENTE and A. VEZZANI (2016): Preventing epileptogenesis: A realistic goal? *Pharmacological research* 110 96-100.

TSVERAVA, L., T. LORDKIPANIDZE, E. LEPSVERIDZE, M. NOZADZE, M. KIKVIDZE and R. SOLOMONIA (2016): Myoinositol Attenuates the Cell Loss and Biochemical Changes Induced by Kainic Acid Status Epilepticus. *BioMed research international* 2016 2794096.

TURSKI, L., C. IKONOMIDOU, W. A. TURSKI, Z. A. BORTOLOTTO and E. A. CAVALHEIRO (1989): Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy.

Synapse (New York, N.Y.) 3 154-171.

USSAR, S., H. V. WANG, S. LINDER, R. FASSLER and M. MOSER (2006): The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development. *Experimental cell research* 312 3142-3151.

VAN STRIEN, M. E., J. J. BREVE, S. FRATANTONI, M. W. SCHREURS, J. G. BOL, C. A. JONGENELEN, B. DRUKARCH and A. M. VAN DAM (2011): Astrocyte-derived tissue transglutaminase interacts with fibronectin: a role in astrocyte adhesion and migration? *PloS one* 6 e25037.

VANDENABEELE, P., L. GALLUZZI, T. VANDEN BERGHE and G. KROEMER (2010): Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 700-714.

VENSTROM, K. A. and L. F. REICHARDT (1993): Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7 996-1003.

VEZZANI, A. (2012): Before epilepsy unfolds: finding the epileptogenesis switch. *Nature medicine* 18 1626-1627.

WALKER, A. (2016): Differentielle Proteomanalyse in einem Modell der Epileptogenese: Regulation inflammations-assoziiierter Proteine. LMU München, Tierärztliche Fakultät Doktorarbeit.

WALKER, A., V. RUSSMANN, C. A. DEEG, C. VON TOERNE, K. J. KLEINWORT, C. SZOBER, M. L. RETTENBECK, E. L. VON RUDEN, J. GOC, T. ONGERTH, K. BOES, J. D. SALVAMOSER, A. VEZZANI, S. M. HAUCK and H. POTSCHKA (2016): Proteomic profiling of epileptogenesis in a rat model: Focus on inflammation. *Brain, behavior, and immunity* 53 138-158.

WALKER, L. E., N. MIRZA, V. L. YIP, A. G. MARSON and M. PIRMOHAMED (2015): Personalized medicine approaches in epilepsy. *Journal of internal medicine* 277 218-234.

WANG, Y. Y., P. SMITH, M. MURPHY and M. COOK (2010): Global expression profiling in epileptogenesis: does it add to the confusion? *Brain Pathol* 20 1-16.

WHITE, H. S. (2002): Animal models of epileptogenesis. *Neurology* 59 S7-s14.

WHITE, H. S. and W. LÖSCHER (2014): Searching for the ideal antiepileptogenic agent in experimental models: single treatment versus combinatorial treatment strategies. *Neurotherapeutics* 11 373-384.

WHO (2016): Epilepsy. aufgerufen am 15.01.2017, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>

WILCZYNSKI, G. M., F. A. KONOPACKI, E. WILCZEK, Z. LASIECKA, A. GORLEWICZ, P. MICHALUK, M. WAWRZYNIAK, M. MALINOWSKA, P. OKULSKI, L. R. KOLODZIEJ, W. KONOPKA, K. DUNIEC, B. MIODUSZEWSKA, E. NIKOLAEV, A. WALCZAK, D. OWCZAREK, D. C. GORECKI, W. ZUSCHRATTER, O. P. OTTERSEN and L. KACZMAREK (2008): Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *The Journal of cell biology* 180 1021-1035.

WILKINS, M. R., J. C. SANCHEZ, A. A. GOOLEY, R. D. APPEL, I. HUMPHERY-SMITH, D. F. HOCHSTRASSER and K. L. WILLIAMS (1996): Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & genetic engineering reviews* 13 19-50.

WILLIAMS, O. and C. I. DEL GENIO (2014): Degree correlations in directed scale-free networks. *PLoS one* 9 e110121.

WILSON, J. V. and E. H. REYNOLDS (1990): Texts and documents. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy. *Med Hist* 34 185-198.

WILSON, K. E., M. M. RYAN, J. E. PRIME, D. P. PASHBY, P. R. ORANGE, G. O'BEIRNE, J. G. WHATELEY, S. BAHN and C. M. MORRIS (2004): Functional genomics and proteomics: application in neurosciences. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 75 529-538.

WISNIEWSKI, J. R., A. ZOUGMAN, N. NAGARAJ and M. MANN (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* 6 359-362.

WONG, M. (2012): Degrading epilepsy: the role of extracellular proteases and the extracellular matrix. *Epilepsy currents* 12 118-120.

WU, X. and D. S. REDDY (2012): Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacology & therapeutics* 134 68-81.

XIAO FAN, W. and C. GUANRONG (2003): Complex networks: small-world, scale-free and beyond. *IEEE Circuits and Systems Magazine* 3 6-20.

YAMAGUCHI, Y. (2000): Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cellular and molecular life sciences* : *CMLS* 57 276-289.

YANG, S. H., H. J. JUNG, C. COFFINIER, L. G. FONG and S. G. YOUNG (2011): Are B-type lamins essential in all mammalian cells? *Nucleus (Austin, Tex.)* 2 562-569.

YANG, X., S. LI, J. ZHONG, W. ZHANG, X. HUA, B. LI and H. SUN (2017): CD151 mediates netrin-1-induced angiogenesis through the Src-FAK-Paxillin pathway. *Journal of cellular and molecular medicine* 21 72-80.

YANG, Y., L. HAN, Y. YUAN, J. LI, N. HEI and H. LIANG (2014): Gene co-expression network analysis reveals common system-level properties of prognostic genes across cancer types. *Nature communications* 5 3231.

YU, W., D. CHEN, Z. WANG, C. ZHOU, J. LUO, Y. XU, L. SHEN, H. YIN, S. TAO, Z. XIAO, F. XIAO, Y. LU and X. WANG (2014): Time-dependent decrease of clusterin as a potential cerebrospinal fluid biomarker for drug-resistant epilepsy. *J Mol Neurosci* 54 1-9.

ZHANG, B. and S. HORVATH (2005): A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 4 Article17.

ZHANG, H., J. K. KIM, C. A. EDWARDS, Z. XU, R. TAICHMAN and C. Y. WANG (2005): Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nature cell biology* 7 909-915.

X. ANHANG

1. Geräte und Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
AxioCam Mrc	Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
BH2-Lichtmikroskop	Olympus, Japan
Bildanalysesoftware KS 400	Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
ConsensusPathDB	http://consensuspathdb.org/
Datenanalyseprogramm <i>R</i>	https://www.r-project.org/
Genomatix	http://www.genomatix.de/
Labor-pH-Meter, HI 4222	Hanna instruments, Zagreb, Kroatien
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ VMS-C7 Advanced	VWR International GmbH, Ismaning, Deutschland
Mascot Software Version 2.4	Matrix Science Ltd., London, UK
Microsoft Office für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Mikrowelle Severin MW7803	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Personal Computer	Diverse
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Progenesis Software Version 2.5	Nonliner Dynamics Limited, Newcastle upon Tyne, UK
Rotationsmikrotom 1165/Rotocut	Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland
Vortexer LMS® VTX-300OL Mixer UZUSIO	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Wasserbad Typ 24900	Medax Nagel GmbH & Co KG, Neumünster, Deutschland

2. Lösungen und Substanzen

Lösungen

Antikörperdiluent

- Blockinglösung
- 0,1 % Tween® 20

Blockinglösung

- 250 mg Casein
- 100 ml TBS

3,3'-Diaminobenzidin-Reaktionslösung

- 80 ml Tris-Nickel-Lösung
- 20 mg 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in 2 ml Aqua bidest.
- 20 µl H₂O₂ 30 % frisch hinzufügen

Natrium-Citrat-Puffer 10 mM pH 6,0

- 2,94 g tri-Natriumcitrat Dihydrat auf 1000 ml Aqua dest.
- Einstellen auf pH 6,0 mit NaOH

TBS

- 0,05 mol/l Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
- 0,15 mol/l NaCl
- in Aqua dest. lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,6 einstellen

TBS-T

- TBS
- 0,05 % Tween® 20

Tris-Nickel-Lösung

- in 0,05 M TBS
- 0,6 % Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat
- mit 2 M NaOH auf pH 7,6 einstellen
- mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Wasserstoffperoxidlösung 3 %

- 30 % H₂O₂
- 0,05 M TBS

Substanzen

Substanz	Hersteller
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Anti-FERMT2-Antikörper (Maus, monoklonal)	LSBio Life Span BioSciences Inc., Seattle, Washington, USA
Anti-ITGA5-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Casein aus Kuhmilch	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Eindeckmedium Entellan®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Esel-Anti-Maus-Antikörper (biotinyliert)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ethanol 95 % und 99,9 % für Immunhistochemie	AgrAlko AG, München, Deutschland
Streptavidin/Meerrettichperoxidase	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris[hydroxymethyl]-aminomethan	VWR International GmbH, Ismaning, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol-Ersatzmedium Roti®-Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol-Isomerengemisch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (biotinyliert)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

3. Protokoll Immunhistochemie

Tag 1:

Entparaffinierung:

- dreimal 3 min in Xylol
- 3 min in 100%igem Ethanol und Xylol zu je 50 %
- zweimal 3 min in 95%igem Ethanol
- zweimal 3 min in 70%igem Ethanol
- zweimal 3 min in 50%igem Ethanol
- in Leitungswasser spülen: 5 min unter fließendem Wasser
- einmal in Aqua dest. waschen

Demaskierung:

- 20 min in Natrium-Citrat-Puffer pH 6 in der Mikrowelle (760 W) kochen
- 10 min abkühlen

Küvette:

- dreimal 5 min mit TBS-T waschen
- 20 min in Wasserstoffperoxidlösung 3 %
- dreimal 5 min mit TBS-T waschen

feuchte Kammer:

- 10 min Blockinglösung 200 µl je Objektträger
- über Nacht Inkubation des primären Antikörpers in Antikörperdiluent bei 4° C, 200 µl je Objektträger

Tag 2:

Küvette:

- dreimal 5 min mit TBS-T waschen

feuchte Kammer:

- 30 min Inkubation des sekundären Antikörpers in Blockinglösung, 200 µl je Objektträger

Küvette:

- dreimal 5 min mit TBS-T waschen

feuchte Kammer:

- 30 min Inkubation mit Streptavidin/Meerrettichperoxidase, Verdünnung 1:2000 in TBS, 200 µl je Objektträger

Küvette:

- zweimal 5 min mit TBS-T waschen
- einmal 5 min TBS waschen
- Farbentwicklung in 3,3'-Diaminobenzidin-Reaktionslösung
- einmal mit Aqua bidest. waschen
- einmal mit TBS waschen
- einmal 5 min mit Aqua dest. waschen
- trocknen über Nacht

Tag 3:*Küvette:*

- 1 min in Roti[®]/Histol
- eindecken mit Eindeckmedium

4. R-Skripte

Im Folgenden sind die im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens verwendeten *R*-Erweiterungen und *R*-Programmcodes aufgeführt.

4.1. Nicht-hypothesengestützte Datenanalyse

Das folgende Skript zur Durchführung der Netzwerkanalyse wurde von Frau Androsova aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Krause am *Bioinformatics Core* der Universität Luxemburg geschrieben.

4.1.1. Konfiguration

```
##### Config Settings #####
#General settings
options(stringsAsFactors = FALSE)

#Indicate the directory with original data
original_directory = "/Original_data"

#Indicate the directory for input files
input_directory = "/Preprocessed_data"

#Indicate the output directory
output_directory = "/Generated_results"

#List excel files with original data
HC_excel_files = list("HC_combinedfiles_network_2days.xlsx",
                     "HC_combinedfiles_network_10days.xlsx",
                     "HC_combinedfiles_network_8weeks.xlsx")
PHC_excel_files = list("PHC_combinedfiles_network_2days.xlsx",
                       "PHC_combinedfiles_network_10days.xlsx",
                       "PHC_combinedfiles_network_8weeks.xlsx")
time_label = c("2 days", "10 days", "8 weeks")
```

4.1.2. Datenanalyse und Netzwerkkonstruktion

```
#####
##
## FUNCTIONS FOR DATA ANALYSIS AND NETWORK CONSTRUCTION
##
## These script contains the functions used to reproduce results
generated in paper
## "A systems level analysis of epileptogenesis-associated proteome
alterations" by
## M. Keck and G. Androsova et al. (2017).
##
## Script author: Ganna Androsova, ganna.androsova@uni.lu
##
#####

# ipak function was developed by Steven Worthington and deposited at
# https://gist.github.com/stevenworthington/3178163
ipak = function(pkg) {
  new.pkg = pkg[!(pkg %in% installed.packages()[, "Package"])]
  if (length(new.pkg))
    install.packages(new.pkg, dependencies = TRUE)
  sapply(pkg, require, character.only = TRUE)
}

ipak(c("openxlsx", "FactoMineR", "qvalue", "WGCNA", "flashClust",
"made4"))

if (!require("factoextra")) {
  install_github("kassambara/factoextra")
  library("factoextra")
}

merge_original_tables = function(original_directory, excel_files,
brain_region){

  original_data = lapply(excel_files, function(file){
    input_file = read.xlsx(file.path(original_directory, file),
                           sheet = 1, colNames = TRUE, startRow = 3)

    #Transform excel output into data frame and keep only expression
values
    df = data.frame(input_file[which(input_file[,7]!="N/A"),18:27])
    rownames(df) = input_file[which(input_file[,7]!="N/A"),7]
    colnames(df) = c(rep("Ctrl",5), rep("SE", 5))

    return(df)
  })

  merged_full_data = original_data[[1]]
  for(i in c(2:length(original_data))){
    merge2 = merge(merged_full_data, original_data[[i]], by="row.names",
all = TRUE)
    merged_full_data = merge2[,2:ncol(merge2)]
    rownames(merged_full_data) = merge2[,1]
  }
  colnames(merged_full_data) <- c(rep("Ctrl_2d",5), rep("SE_2d", 5),
                                rep("Ctrl_10d",5), rep("SE_10d", 5),
                                rep("Ctrl_8w",5), rep("SE_8w", 5))

  png(file = paste(output_directory, "/", brain_region,
"_expression_before_norm.png", sep = ""),
      height = 5, width = 7, units="in", res=300)
  boxplot(merged_full_data, xlab="Samples", ylab="Protein abundances",
```

```

        main="Protein expression values before normalization")
dev.off()

return(list(merged_full_data, original_data))
}

plot_PCA = function(filtered_measurements, output_directory,
brain_region, type){
  #The proteins with highest contribution to the variability of data tend
to be on horizontal axis (of principle component 1) thus it is difficult
to have a clear separation
  res.pca = PCA(filtered_measurements,
quali.sup=ncol(filtered_measurements), graph=FALSE)

  png(file = paste(output_directory, "/", brain_region, "_", type,
"_PCA.png", sep = ""), height = 5, width = 5, units="in", res=300)
  print(fviz_pca_ind(res.pca, pointsize=4, invisible="quali",
label="none", habillage=ncol(filtered_measurements)) + labs(title =
brain_region) + scale_color_brewer(palette="Set1") + theme_minimal())
  dev.off()
  print(fviz_pca_ind(res.pca, pointsize=4, invisible="quali",
label="none", habillage=ncol(filtered_measurements)) + labs(title =
brain_region) + scale_color_brewer(palette="Set1") + theme_minimal())

  top_10_contributors = sapply(1:ncol(res.pca$var$contrib),
function(x){names(sort(res.pca$var$contrib[,x], decreasing = T)[1:10])})
  colnames(top_10_contributors) = colnames(res.pca$var$contrib)
  write.table(top_10_contributors, file=paste(output_directory, "/",
brain_region, "_", type, "_top10_PCA_proteins.txt", sep = ""), sep="\t",
row.names=F, quote=FALSE)
}

plot_separate_PCA = function(separate_data, output_directory,
brain_region, time_label){
  sapply(c(1:length(separate_data)), function(i){
    time_point = t(asinh(separate_data[[i]]))
    rownames(time_point) = NULL
    time_point = as.data.frame(time_point)
    filtered_measurements = time_point[, colSums(is.na(time_point)) !=
nrow(time_point)]
    filtered_measurements$group = c(rep("Ctrl", 5), rep("SE", 5))
    plot_PCA(filtered_measurements, output_directory, brain_region,
time_label[i])
  })
}

normalization = function(merged_data, input_directory, output_directory,
brain_region, data.type){

  #Arcsin transformation and median centering
  asin_df = as.data.frame(asinh(merged_data))
  preprocessed_data = t(apply(asin_df, 2, function(x){x-
median(x[!is.na(x)])}))

  png(file = paste(output_directory, "/", brain_region,
"_expression_after_norm.png", sep = ""), height = 6, width = 8,
units="in", res=300)
  boxplot(t(preprocessed_data), xlab="Samples", ylab="Protein
abundances", main="Protein expression values after normalization")
  dev.off()
}

```

```

outliers = NULL
for (i in 1:nrow(preprocessed_data)){
  outliers = c(outliers, names(which(preprocessed_data[i,]<(-10))))
}
outliers = unique(outliers)

write.csv(preprocessed_data, file = file.path(input_directory,
paste0(brain_region, "_preprocessed_data.csv")), quote=F)
write.table(outliers, file = file.path(output_directory,
paste0(brain_region, "_outliers.txt", sep="")), quote=F, row.names=F,
col.names=F)
return(preprocessed_data)
}

DE_prots = function(data, output_directory, time_label, brain_region){
  data = t(data)
  design = model.matrix(~factor(c(rep(1,5), rep(2, 5))))
  stat_results = lapply(seq(0, 20, by=10), function(i){
    subset = data[, (i+1):(i+10)]
    subset = subset[!!rowSums(!is.na(subset)),]
    fit = lmFit(subset, design)
    fit_ebayes = eBayes(fit)
    logFC = fit_ebayes$coefficients[, 2]
    FC = exp(logFC)
    t_tset = fit_ebayes$t[, 2]
    p_values = fit_ebayes$p.value[, 2]
    q_values = qvalue(p_values)$q
    results = data.frame(FC, logFC, t_tset, p_values)
  })
  names(stat_results) = time_label

  DE_table = stat_results[[1]][,c("p_values", "FC")]
  for(i in c(2:length(stat_results))){
    m1=merge(DE_table, stat_results[[i]][,c("p_values", "FC")],
by="row.names", all = T)
    DE_table=m1[,2:ncol(m1)]
    rownames(DE_table) = m1[,1]
  }
  colnames(DE_table) <- c(paste(rep(time_label, each=2), c("p-values",
"Fold Change")))
  write.csv2(DE_table, file = file.path(output_directory,
paste0(brain_region, "_DEG.csv")))

  return(stat_results)
}

hist_FC = function(stat_results, output_directory, brain_region){
  png(file = paste(output_directory, "/", brain_region,
"_FC_distribution.png", sep = ""), height = 3, width = 6, units="in",
res=300)
  par(mfrow=c(1,3))
  for(i in 1:length(stat_results)){
    hist(stat_results[[i]]$logFC, main = paste(brain_region,
names(stat_results)[i]), breaks=20, xlab="log(fold change)")
  }
  dev.off()

  #Plotting into Markdown
  par(mfrow=c(1,3))
  for(i in 1:length(stat_results)){

```

```

    hist(stat_results[[i]]$logFC, main = paste(brain_region,
names(stat_results)[i]), breaks=20, xlab="log(fold change)")
  }
}

volcano_DE = function(stat_results, output_directory, brain_region){
  png(file = paste(output_directory, "/", brain_region,
"_DE_volcano.png", sep = ""), height = 3, width = 7, units="in", res=300)
  par(mfrow=c(1,3))
  for(i in 1:length(stat_results)){
    ry <- c(0, ceiling(max(-log10(stat_results[[i]]$p_values))))
    plot(stat_results[[i]]$logFC, -log10(stat_results[[i]]$p_values),
pch=21, bg="lightgrey", cex=0.9,
      xlab="log(fold change)", ylab="-log10(p-value)", xlim=c(-2,2),
main = paste(brain_region, names(stat_results)[i]))
    abline(h=(-log10(0.05)), col="grey", lty="dotted")

    # Add colored points: red if padj<0.05, orange if log2FC>1, green if
both)
    sub1 = rownames(subset(stat_results[[i]], p_values<.05))
    points(stat_results[[i]][sub1, "logFC"], -
log10(stat_results[[i]][sub1, "p_values"]), pch=20, col="red")
    sub2 = rownames(subset(stat_results[[i]],
stat_results[[i]]$FC<=0.67|stat_results[[i]]$FC>=1.5))
    points(stat_results[[i]][sub2, "logFC"], -
log10(stat_results[[i]][sub2, "p_values"]), pch=20, col="orange")
    sub3 = rownames(subset(stat_results[[i]], p_values<.05 &
(stat_results[[i]]$FC<=0.67|stat_results[[i]]$FC>1.5)))
    points(stat_results[[i]][sub3, "logFC"], -
log10(stat_results[[i]][sub3, "p_values"]), pch=20, col="green")
  }
  dev.off()

  #Plotting into Markdown
  par(mfrow=c(1,3))
  for(i in 1:length(stat_results)){
    ry <- c(0, ceiling(max(-log10(stat_results[[i]]$p_values))))
    plot(stat_results[[i]]$logFC, -log10(stat_results[[i]]$p_values),
pch=21, bg="lightgrey", cex=0.9,
      xlab="log(fold change)", ylab="-log10(p-value)", xlim=c(-2,2),
main = paste(brain_region, names(stat_results)[i]))
    abline(h=(-log10(0.05)), col="grey", lty="dotted")

    # Add colored points: red if padj<0.05, orange if log2FC>1, green if
both)
    sub1 = rownames(subset(stat_results[[i]], p_values<.05))
    points(stat_results[[i]][sub1, "logFC"], -
log10(stat_results[[i]][sub1, "p_values"]), pch=20, col="red")
    sub2 = rownames(subset(stat_results[[i]],
stat_results[[i]]$FC<=0.67|stat_results[[i]]$FC>=1.5))
    points(stat_results[[i]][sub2, "logFC"], -
log10(stat_results[[i]][sub2, "p_values"]), pch=20, col="orange")
    sub3 = rownames(subset(stat_results[[i]], p_values<.05 &
(stat_results[[i]]$FC<=0.67|stat_results[[i]]$FC>1.5)))
    points(stat_results[[i]][sub3, "logFC"], -
log10(stat_results[[i]][sub3, "p_values"]), pch=20, col="green")
  }
}

barplot_DE = function(stat_results, output_directory, brain_region){
  list_of_DE_prots = lapply(stat_results, function(x){

```

```

    prot=subset(x, p_values<.05 & (x$FC<=0.67|x$FC>=1.5))
    write.table(prot,
                file=file.path(output_directory,
                                paste0(brain_region, " DE at ",
                                         names(stat_results[parent.frame()$i[]]), ".txt")),
                quote = F, sep = "\t")
    nrow(prot)
  })

  up_down_regulated = lapply(stat_results, function(x){
    sub1 = nrow(subset(x, p_values<.05 & x$FC>=1.5))
    sub2 = nrow(subset(x, p_values<.05 & x$FC<=0.67))
    up_down_regulated = paste(paste("+", sub1), paste("-", sub2),
                              sep="\n")
  })

  DEs = unlist(list_of_DE_protos)
  colours = c("red", "blue", "yellow")

  png(file = paste(output_directory, "/", brain_region,
                  "_DE_proteins.png", sep = ""), height = 7, width = 5, units="in",
      res=300)
  par(mar=c(4,5,2,2))
  bp1 = barplot(DEs[1:3], col=colours, names=names(DEs[1:3]),
               ylim=c(0,max(DEs[1:3])+50), ylab = "Differentially expressed proteins",
               main=brain_region)
  text(bp1, DEs[1:3], up_down_regulated[1:3], pos=3)
  dev.off()

  par(mar=c(4,5,2,2))
  bp1 = barplot(DEs[1:3], col=colours, names=names(DEs[1:3]),
               ylim=c(0,max(DEs[1:3])+50), ylab = "Differentially expressed proteins",
               main=brain_region)
  text(bp1, DEs[1:3], up_down_regulated[1:3], pos=3)
}

get_common_protos = function(original_data, input_directory,
                              output_directory, brain_region){

  merged_common_data = original_data[[1]]
  for(i in c(2:length(original_data))){
    mergel = merge(merged_common_data, original_data[[i]],
                  by="row.names", all = FALSE)
    merged_common_data = mergel[,2:ncol(mergel)]
    rownames(merged_common_data) = mergel[,1]
  }
  colnames(merged_common_data) <- c(rep("Ctrl_2d",5), rep("SE_2d", 5),
                                   rep("Ctrl_10d",5), rep("SE_10d", 5),
                                   rep("Ctrl_8w",5), rep("SE_8w", 5))
  normalized_data = normalization(merged_common_data, input_directory,
                                  output_directory, brain_region)
  return(normalized_data)
}

visualize_correlation = function(correlation_matrix, output_directory,
                                 brain_region){
  hmcols = colorRampPalette(c("white", "red"))(256)
  png(file = paste(output_directory, "/", brain_region,
                  "_correlation_heatmap.png", sep = ""), height = 9, width = 9, units="in",
      res=300)

```

```

heatmap(correlation_matrix, col=hmcols, main = brain_region)
dev.off()
heatmap(correlation_matrix, col=hmcols, main = brain_region)
}

estimate_correlation = function(preprocessed_data){
  # Indicate the method for estimation of the protein expression
  similarity
  options = "use = 'p', method = 'spearman'"

  # Create adjacency matrix required for network construction
  adjacency_matrix = adjacency(preprocessed_data, corFnc = "cor",
  corOptions = options, type = "unsigned", power = 6)
  adjacency_matrix[is.na(adjacency_matrix)] = 0
  return(adjacency_matrix)
}

estimate_network_topology = function(adjacency_matrix, output_directory,
brain_region){
  topological_table = matrix(rep(0,5), nrow = 1, ncol = 5)
  colnames(topological_table) = c("Density", "Centralization",
"Heterogeneity", "Mean clustering coefficient", "Mean scaled
connectivity")

  # Estimation of the network topological parameters
  statistics = fundamentalNetworkConcepts(adjacency_matrix, GS = NULL)
  topological_table[,1] = statistics$Density
  topological_table[,2] = statistics$Centralization
  topological_table[,3] = statistics$Heterogeneity
  topological_table[,4] = mean(statistics$ClusterCoef)
  topological_table[,5] = mean(statistics$ScaledConnectivity)

  # Write-down the table
  write.table(topological_table, file=file.path(output_directory,
paste(brain_region, "_network_topological_parameters.txt", sep = "")),
sep="\t", row.names=F, quote=FALSE)
  return(topological_table)
}

detect_modules = function(adjacency_matrix, output_directory,
brain_region){
  # Calculation of the topological overlap matrix
  TOM = TOMsimilarity(adjacency_matrix)
  # Calculation of topological overlap dissimilarity
  dissTOM = 1-TOM

  # Call the hierarchical clustering function
  geneTree = flashClust(as.dist(dissTOM), method = "average");

  # Module identification using dynamic tree cut:
  dynamicMods = cutreeDynamic(dendro = geneTree, distM = dissTOM,
deepSplit = 2,
                                pamRespectsDendro = FALSE, minClusterSize =
20);
  print(table(dynamicMods))

  # Convert numeric labels into colors
  module_assignment = labels2colors(dynamicMods)
  print(table(module_assignment))
}

```

```

# Save the plotted dendrogram into a JPEG file
title = paste(brain_region, "_network_dendrogram_and_module_assignment",
sep="")
jpeg(file=file.path(output_directory, paste(title, ".jpg", sep="")),
width = 680, height = 480)
plotDendroAndColors(geneTree, module_asignment, "Module colors",
dendroLabels = FALSE,
                    hang = 0.03, addGuide = TRUE, guideHang = 0.05,
main = title)
dev.off()
plotDendroAndColors(geneTree, module_asignment, "Module colors",
dendroLabels = FALSE,
                    hang = 0.03, addGuide = TRUE, guideHang = 0.05,
main = title)

# Save the network, detected modules and modules colors into a RData
file
return(module_asignment)
}

```

```

#Modified WGCNA plotMat to correct colors for color-blind people
plotMat = function (x, nrgcols = 50, rlabels = FALSE, clabels = FALSE,
rcols = 1, ccols = 1, title = "", ...){
  n <- nrow(x)
  p <- ncol(x)
  image(1:p, 1:n, t(x[n:1, ]), col = blueWhiteRed(nrgcols),
        axes = FALSE, xlab = "", ylab = "", ...)
  if (length(ccols) == 1) {
    axis(3, at = 1:p, labels = clabels, las = 2, cex.axis = 0.6,
         col.axis = ccols)
  }
  if (length(ccols) == p) {
    cols <- unique(ccols)
    for (i in 1:length(cols)) {
      which <- (1:p)[ccols == cols[i]]
      axis(3, at = which, labels = clabels[which], las = 2,
           cex.axis = 0.6, col.axis = cols[i])
    }
  }
  if (length(rcols) == 1) {
    axis(2, at = n:1, labels = rlabels, las = 2, cex.axis = 0.6,
         col.axis = rcols)
  }
  if (length(rcols) == n) {
    cols <- unique(rcols)
    for (i in 1:length(cols)) {
      which <- (1:n)[rcols == cols[i]]
      axis(2, at = (n:1)[which], labels = rlabels[which],
           las = 2, cex.axis = 0.6, col.axis = cols[i])
    }
  }
  mtext(title, side = 3, line = 3)
  box()
}

```

```

plot_eigengenes = function(preprocessed_data, module_asignment,
output_directory, brain_region){
  module_eigengenes = moduleEigengenes(preprocessed_data,
module_asignment)$eigengenes
  no = 1
  for (color in standardColors(length(table(module_asignment))-1)){

```

```

    ME=module_eigengenes[, paste("ME",color, sep="")]
    png(file = paste(output_directory, "/", brain_region, " module ", no,
" expression.png", sep = ""), width=8, height=10, units="in", res=300)
    layout(matrix(c(1,2)), heights=c(2,1))
    par(mar=c(0.3, 5.5, 6, 2))
    plotMat(t(scale(preprocessed_data[,module_asignment==color]))),

nrgcols=50,rlabels=colnames(preprocessed_data[,module_asignment==color]),
clabels = rownames(preprocessed_data), cex.main=2)
    title(main = paste(brain_region, " module ", no, sep = ""), line =
4.5)
    par(mar=c(5, 4.2, 1, 0.7))
    barplot(ME, col=c(rep("lightpink",5), rep("red",5),
rep("lightskyblue",5), rep("blue",5), rep("moccasin",5),
rep("orange",5)), main="", cex.main=2,
          ylab="eigengene expression",xlab="array sample")
    dev.off()
    no = no+1
  }
}

plot_overlap_between_modules = function(HC_preprocessed, HC_modules,
PHC_preprocessed, PHC_modules, output_directory){
  no = 1
  HC_present_prots = lapply(standardColors(length(table(HC_modules))-1),
function(color)
  colnames(HC_preprocessed)[which(HC_modules == color)]
)
  PHC_present_prots = lapply(standardColors(length(table(PHC_modules))-
1), function(color)
  colnames(PHC_preprocessed)[which(PHC_modules == color)]
)

  Jaccard_matrix = matrix(0, ncol = (length(table(PHC_modules))-1), nrow
= (length(table(HC_modules))-1),
                        dimnames=list(paste("Module",
1:(length(table(HC_modules))-1)),
                                     paste("Module",
1:(length(table(PHC_modules))-1))))

  for(i in 1:(length(table(HC_modules))-1)){
    list1 = HC_present_prots[[i]]
    for(j in 1:(length(table(PHC_modules))-1)){
      list2 = PHC_present_prots[[j]]
      x = comparelists(list1,list2)
      intersection = x$intersec
      union = union(list1,list2)

      Jaccard_index = length(intersection)/length(union)
      Jaccard_matrix[i,j] = round(Jaccard_index, digits = 2)
    }
  }
  png(file = paste(output_directory, "/", "Jaccard_module_overlap.png",
sep = ""), height = 6, width = 8, units="in", res=300)
  labeledHeatmap(Matrix = Jaccard_matrix,
                 xLabels = colnames(Jaccard_matrix),
                 yLabels = rownames(Jaccard_matrix),
                 colorLabels = F, colors = blueWhiteRed(100)[50:100],
                 cex.text = 0.8, textMatrix = Jaccard_matrix,
                 cex.lab = 0.8, main = "Jaccard similarity between
modules", cex.main = 1, xLabelsAngle=25)
  dev.off()
}

```

```

labeledHeatmap(Matrix = Jaccard_matrix,
  xLabels = colnames(Jaccard_matrix),
  yLabels = rownames(Jaccard_matrix),
  colorLabels = F, colors = blueWhiteRed(100)[50:100],
  cex.text = 0.8, textMatrix = Jaccard_matrix,
  cex.lab = 0.8, main = "Jaccard similarity between
modules", cex.main = 1, xLabelsAngle=25)
}

#Modified function from WGCNA
plotModuleSignificance = function(GeneSignificance, module_assignment,
  brain_region, boxplot = FALSE, ylab = "Gene Significance", xlab =
"Modules", ...){
  no.colors = length(names(table(module_assignment)))
  pp = try(kruskal.test(GeneSignificance,
  factor(module_assignment))$p.value)
  title = paste(brain_region, " gene significance across modules,", " p-
value=", signif(pp, 2), sep = "")

  if (boxplot != TRUE) {
    means1 = as.vector(tapply(GeneSignificance, module_assignment, mean,
      na.rm = TRUE))
    sel = as.vector(tapply(GeneSignificance, module_assignment, stdErr))
    merged = matrix(c(means1, sel), ncol = 2)
    rownames(merged) = names(table(module_assignment))
    merged = merged[rownames(merged) != "grey",]
    merged = merged[standardColors(length(table(module_assignment))-1),]

    barplot(merged[,1], names.arg = c(1:nrow(merged)), col =
rownames(merged),
      ylab = ylab, xlab = xlab, main = title, ...)
    addErrorBars(merged[,1], as.vector(1.96 * merged[,2]),
      two.side = TRUE)
  }
  else {
    boxplot(split(GeneSignificance, module_assignment), notch = T,
varwidth = T,
      col = names(table(module_assignment)), ylab = ylab, main =
title,
      ...)
  }
}

calculate_module_significance = function(trait, preprocessed_data,
  module_assignment, output_directory, brain_region){

  GeneSignificance = abs(as.numeric(cor(trait, preprocessed_data,
use="p", method="spearman")))

  # Module significance is defined as average gene significance.
  ModuleSignificance=tapply(GeneSignificance, module_assignment, mean,
na.rm=T)

  #Plot module significance
  png(file = paste(output_directory, "/", brain_region, " module
significance.png", sep = ""), width=10, height=7, units="in", res=300)
  plotModuleSignificance(GeneSignificance, module_assignment,
  brain_region)
  dev.off()

  return(GeneSignificance)
}

```

```

get_module_trait_relationship = function(preprocessed_data,
module_asignment, output_directory, time_label, brain_region){
  nGenes = ncol(preprocessed_data)
  nSamples = nrow(preprocessed_data)
  trait = matrix(c(rep(0,5), rep(1,5), rep(NA, 30), rep(0,5), rep(1,5),
rep(NA, 30), rep(0,5), rep(1,5)), ncol=3,
dimnames=list(rownames(preprocessed_data), time_label))

  #Calculate module Eigengenes
  MEs0 = moduleEigengenes(preprocessed_data, module_asignment,
excludeGrey = TRUE)$eigengenes

  for(i in 1:ncol(MEs0)){
    names(MEs0)[i] = paste("Module",
which(standardColors(length(table(module_asignment))-1) ==
strsplit(names(MEs0)[i], "ME")[1][2]))
  }
  MEs = MEs0[,order(as.numeric(gsub(".* ", "", names(MEs0)))]

  plot_module_trait_relationship(trait, MEs, nSamples, "time points
separated", output_directory, brain_region)
}

plot_module_trait_relationship = function(trait, MEs, nSamples, type,
output_directory, brain_region){
  moduleTraitCor = cor(MEs, trait, use = "p", method="spearman")
  moduleTraitCor = moduleTraitCor[which(rownames(moduleTraitCor) !=
"MEgrey"),]
  moduleTraitPvalue = corPvalueStudent(moduleTraitCor, nSamples)

  textMatrix = paste(signif(moduleTraitCor, 2),
"\n(",signif(moduleTraitPvalue, 1), ")", sep = "");
  dim(textMatrix) = dim(moduleTraitCor)
  par(mar = c(6, 8.5, 3, 3));
  # Display the correlation values within a heatmap plot
  png(file = paste(output_directory, "/", brain_region, " module-trait
relationship ", type, ".png", sep = ""), width=7, height=9, units="in",
res=300)
  labeledHeatmap(Matrix = moduleTraitCor,
xLabels = colnames(trait),
yLabels = paste0("ME",
standardColors(nrow(moduleTraitCor))),
ySymbols = names(MEs),
colorLabels = FALSE,
colors = blueWhiteRed(50),
textMatrix = textMatrix,
setStdMargins = TRUE,
cex.text = 1,
zlim = c(-1,1),
main = paste(brain_region, "module-trait
relationships"))
  dev.off()
  labeledHeatmap(Matrix = moduleTraitCor,
xLabels = colnames(trait),
yLabels = paste0("ME",
standardColors(nrow(moduleTraitCor))),
ySymbols = names(MEs),
colorLabels = FALSE,
colors = blueWhiteRed(50),
textMatrix = textMatrix,
setStdMargins = TRUE,
cex.text = 0.9,

```

```

        zlim = c(-1,1),
        main = paste(brain_region, "module-trait
relationships"))
    }

get_intramodular_connectivity = function(adjacency_matrix,
module_asignment, output_directory, brain_region){
  protein_intramodular_connectivity =
intramodularConnectivity(adjacency_matrix, module_asignment, scaleByMax =
TRUE) [, -1]
  protein_intramodular_connectivity[,2] = module_asignment
  hubs = lapply(1:(length(table(module_asignment))-1),
function(module_no){
    color = standardColors(length(table(module_asignment))-1)[module_no]
    filtered_module =
protein_intramodular_connectivity[protein_intramodular_connectivity[,2]
== color,]
    filtered_module = filtered_module[order(filtered_module$kWithin,
decreasing = TRUE),]
    filtered_module = filtered_module["kWithin"]
    colnames(filtered_module) = paste(brain_region, "module", module_no)
    print(head(filtered_module))
    write.table(filtered_module, file = paste(output_directory, "/",
brain_region, " module ", module_no, " intramodular hubs.txt", sep = ""),
row.names = T, col.names = F, sep = "\t", quote = FALSE)
    return(rownames(filtered_module)[1:15])
  })
  return(hubs)
}

compare_hubs_with_PCA = function(hubs, time_label, brain_regions){
  hub_table = NULL
  for (i in 1:length(hubs)){
    brain_region = brain_regions[i]
    sub = data.frame(paste(brain_region, rep(1:length(hubs[[i]]),
each=15)), row.names=unlist(hubs[i]))
    hub_table = rbind(hub_table, sub)
  }
  for (brain_region in brain_regions){
    for (time in time_label){
      prots = rep(0, nrow(hub_table))
      file = paste(brain_region, time, "top10_PCA_proteins.txt", sep="_")
      PC1 = read.table(file.path(output_directory, file), sep="\t",
header=TRUE) [,1]
      hub_table = cbind(hub_table, i=ifelse(rownames(hub_table) %in%
PC1==TRUE, "+", "-"))
    }
  }
  colnames(hub_table) = c("Module", paste(rep(brain_regions,
each=length(time_label)), time_label))
  write.table(hub_table, file = file.path(output_directory,
"Hubs_and_PC1.txt"), row.names = T, col.names = T, sep = "\t", quote =
FALSE)
  return(hub_table)
}

```

4.1.3. Anwendung auf den vorliegenden Datensatz

```
#####  
##  
## WORKFLOW TO REPRODUCE MANUSCRIPT RESULTS  
##  
## These script contains a workflow used to reproduce results generated  
## in paper  
## "A systems level analysis of epileptogenesis-associated proteome  
## alterations" by  
## M. Keck and G. Androsova et al. (2017).  
##  
## Script author: Ganna Androsova, ganna.androsova@uni.lu  
##  
#####  
  
### Call scripts with functions and configurations  
source("Data_analysis_and_network_construction.R")  
source("Configurations.R")  
  
##### Data preprocessing #####  
#Read-in original data  
HC_data = merge_original_tables(original_directory, HC_excel_files, "HC")  
PHC_data = merge_original_tables(original_directory, PHC_excel_files,  
"PHC")  
  
#PCA for each separate timepoint with all detected proteins  
plot_separate_PCA(HC_data[[2]], output_directory, "HC", time_label)  
plot_separate_PCA(PHC_data[[2]], output_directory, "PHC", time_label)  
  
#Arcsinh transformation of median-centering  
HC_preprocessed_all = normalization(HC_data[[1]], input_directory,  
output_directory, "HC")  
PHC_preprocessed_all = normalization(PHC_data[[1]], input_directory,  
output_directory, "PHC")  
  
#Identify differentially expressed proteins  
HC_DEGs = DE_prots(HC_preprocessed_all, output_directory, time_label,  
"HC")  
PHC_DEGs = DE_prots(PHC_preprocessed_all, output_directory, time_label,  
"PHC")  
  
hist_FC(HC_DEGs, output_directory, "HC")  
hist_FC(PHC_DEGs, output_directory, "PHC")  
  
volcano_DE(HC_DEGs, output_directory, "HC")  
volcano_DE(PHC_DEGs, output_directory, "PHC")  
  
barplot_DE(HC_DEGs, output_directory, "HC")  
barplot_DE(PHC_DEGs, output_directory, "PHC")  
  
#Get the merged datasets with proteins present at all timepoints  
HC_merged_data = get_common_prots(HC_data[[2]], input_directory,  
output_directory, "HC_common")  
PHC_merged_data = get_common_prots(PHC_data[[2]], input_directory,  
output_directory, "PHC_common")  
  
HC_correlation_matrix = cor(t(HC_merged_data), method="spearman",  
use="complete.obs")  
PHC_correlation_matrix = cor(t(PHC_merged_data), method="spearman",  
use="complete.obs")  
  
visualize_correlation(HC_correlation_matrix, output_directory, "HC")  
visualize_correlation(PHC_correlation_matrix, output_directory, "PHC")
```

```
##### Network construction #####

#Create adjacency matrix
HC_adjacency_matrix = estimate_correlation(HC_merged_data)
PHC_adjacency_matrix = estimate_correlation(PHC_merged_data)

#Calculate network topology
HC_topological_table = estimate_network_topology(HC_adjacency_matrix,
output_directory, "HC")
PHC_topological_table = estimate_network_topology(PHC_adjacency_matrix,
output_directory, "PHC")
topology = rbind(HC_topological_table, PHC_topological_table)
rownames(topology) = c("Hippocampus", "Parahippocampus")

#Module detection
HC_modules = detect_modules(HC_adjacency_matrix, output_directory, "HC")
PHC_modules = detect_modules(PHC_adjacency_matrix, output_directory,
"PHC")

#Export network to Cytoscape
exportNetworkToCytoscape(HC_adjacency_matrix, weighted = TRUE, threshold
= 0.26,
                        nodeName = colnames(HC_adjacency_matrix),
nodeAttr = HC_modules,
                        edgeFile = file.path(output_directory,
"HC_network_edges.txt"),
                        nodeFile = file.path(output_directory,
"HC_node_color_attribute.txt"))
exportNetworkToCytoscape(PHC_adjacency_matrix, weighted = TRUE, threshold
= 0.26,
                        nodeName = colnames(PHC_adjacency_matrix),
nodeAttr = PHC_modules,
                        edgeFile = file.path(output_directory,
"PHC_network_edges.txt"),
                        nodeFile = file.path(output_directory,
"PHC_node_color_attribute.txt"))

#Plot module eigengenes
plot_eigengenes(HC_merged_data, HC_modules, output_directory, "HC")
plot_eigengenes(PHC_merged_data, PHC_modules, output_directory, "PHC")

#Module overlap
plot_overlap_between_modules(HC_merged_data, HC_modules, PHC_merged_data,
PHC_modules, output_directory)

##### Module-trait relationship #####
#Create the trait matrix
trait = matrix(rep(c(rep(0,5), rep(1,5)),3))
rownames(trait) = rownames(HC_merged_data)

#Get protein significance
HC_protein_significance = calculate_module_significance(trait,
HC_merged_data,
                                                    HC_modules,
output_directory, "HC")
rownames(trait) = rownames(PHC_merged_data)
PHC_protein_significance = calculate_module_significance(trait,
PHC_merged_data,
                                                    PHC_modules,
output_directory, "PHC")

#Calculate module-trait relationship
```

```

get_module_trait_relationship(HC_merged_data, HC_modules,
                             output_directory, time_label, "HC")
get_module_trait_relationship(PHC_merged_data, PHC_modules,
                             output_directory, time_label, "PHC")

#Intramodular hub proteins
#Get tables with intramodular connectivity of the proteins
HC_hubs = get_intramodular_connectivity(HC_adjacency_matrix, HC_modules,
output_directory, "HC")
PHC_hubs = get_intramodular_connectivity(PHC_adjacency_matrix,
PHC_modules, output_directory, "PHC")

#Compare intramodular hubs to PCA contributing proteins
hubs_vs_PCA = compare_hubs_with_PCA(list(HC_hubs, PHC_hubs), time_label,
c("HC", "PHC"))

```

4.2. Hypothesengestützte Datenanalyse

Heatmap

```

##### R-Paket #####

library(gplots)

##### Einlesen und Bearbeiten der Daten #####

data <- read.csv("Dateipfad.csv")

mat_data <- data.matrix(log2(data[,2:ncol(data)]))
rownames(mat_data) <- data[,1]

mat <- data.matrix(data[,2:ncol(data)])
mat <- ifelse(mat>0.05, round(mat, digits=1), round(mat, digits=2))
my_palette <- colorRampPalette(c("blue", "white", "red")) (n=299)

png("Speicherort.png", width = 5*300, height = 5*300, res = 300,
pointsize = 8) # Ausgabe als PNG

heatmap.2(mat_data, cellnote=mat, notecol="black", notecex=0.68,
scale="none", key = FALSE, density.info="none", trace="none", margins
=c(10,9), col=my_palette, dendrogram="none", cexCol=1.0, cexRow=1.0, Colv
= FALSE)

dev.off()

```

XI. DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka gilt mein größter Dank für die Überlassung des spannenden Themas und für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ihre Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und ihre konstruktiven Anregungen haben zum Gelingen dieses Dissertationsvorhabens beigetragen.

Frau Ganna Androsova und Herrn Dr. Roland Krause danke ich für die sehr gute und intensive Zusammenarbeit bei der Durchführung der Netzwerkanalyse.

Bei Frau Dr. Eva-Lotta von Rüden und Frau Dr. Vera Russmann bedanke ich mich für die allzeit sehr gute wissenschaftliche und menschliche Betreuung während meiner Doktorarbeit. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen. Frau Dr. von Rüden danke ich insbesondere für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Potschka danke ich für die angenehme Zeit und die gute Gemeinschaft. An dieser Stelle möchte ich besonders meine Mitdoktoranden Fabio Wolf und Christina Möller erwähnen. Sie standen mir immer mit Rat und Tat unterstützend zur Seite und trugen viel zum guten Arbeitsklima im Doktorandenzimmer bei.

Allen technischen Mitarbeitern danke ich für die exzellente Einarbeitung in labortechnische Methoden und die stete Bereitschaft, mich bei meiner Dissertation zu unterstützen. Hier gilt mein Dank insbesondere Carmen Meyer, Ines Koska, Claudia Siegel und Isabella Waclawczyk, die mir bei den immunhistochemischen Färbungen eine große Hilfe waren.

Zuletzt bedanke ich bei allen weiteren Personen, die mich auf die unterschiedlichsten Arten bei meiner Dissertation unterstützt haben.