

Bestimmung des Turnovers von Proteoformen in murinem
Hippocampusgewebe nach chronischer Gabe von
Paroxetin

Carla Teresa Palleis



Aus dem
Max Planck Institut für Psychiatrie
Geschäftsführende Direktorin Prof. Dr. Dr. Elisabeth Binder

Bestimmung des Turnovers von Proteoformen in murinem
Hippocampusgewebe nach chronischer Gabe von
Paroxetin

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Carla Teresa Palleis
aus München
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Günter Stalla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Moritz Roßner

PD Dr. Diethilde Theil

Prof. Dr. Uwe Ködel

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Christoph W. Turck

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hicckel

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2018

In Gedenken an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Depression – Ein Überblick über die Erkrankung	1
1.1.1	Diagnosekriterien der Depression.....	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese der Depression.....	3
1.1.2.1	Genetische Faktoren.....	4
1.1.2.2	Monoaminhypothese der Depression.....	4
1.1.2.3	Fehlregulation der Stresshormonachse und Rolle des Hippocampus.....	5
1.1.2.4	Rolle der neuronalen-astrozytären Kommunikation	7
1.1.3	Therapie	8
1.1.3.1	Nicht-medikamentöse Behandlungsstrategien	8
1.1.3.2	Psychopharmakotherapie.....	8
1.2	Präklinische Forschung zur Depression	10
1.3	Proteomanalytik und Proteoforme	11
1.3.1	Proteomik in der psychiatrischen Forschung	12
1.3.2	Quantitative Proteomik mittels Massenspektrometrie	13
1.3.3	Metabolische Markierung mit stabilen Isotopen.....	13
2	Zielsetzung.....	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Materialien.....	16
3.2	Chemikalien und Reagenzien	18
3.3	Methoden	19
3.3.1	Chronische Paroxetinbehandlung von Mäusen und Gewebeentnahme.....	20
3.3.2	Proteingewinnung aus in vivo mit ¹⁵ N partiell markiertem Hippocampusgewebe.....	22
3.3.3	Proteinquantifizierung nach Bradford.....	23

3.3.4	Auftrennung und Detektion der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese.....	24
3.3.4.1	Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension	24
3.3.4.2	Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension	24
3.3.4.3	Coomassie-Färbung der 2D-Gele	25
3.3.5	Massenspektrometische Analyse von Proteinen	25
3.3.5.1	Enzymatische Proteinspaltung und Peptidextraktion	26
3.3.5.2	Identifikation der Proteine anhand von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie.....	27
3.3.6	Datenverarbeitung und Proteinidentifikation	28
3.3.7	Bestimmung des Turnovers von Proteinen.....	29
3.3.8	Nachweis von Proteinen mit Western Blots	29
4	Ergebnisse	32
4.1	Proteom-Analyse von Mäusehippocampi nach chronischer Paroxetingabe.....	32
4.1.1	Proteindarstellung durch 2D-Gelelektrophorese	32
4.1.2	Massenspektrometrie-Analyse der Proteine	34
4.1.3	Nachweis von Proteinen durch Western Blots.....	35
4.2	Auswertung der post-translationalen Modifikationen und Unterschiede der Spotintensitäten.....	35
4.3	Turnoverbestimmung von Proteoformen und einzelnen Proteinen	35
4.3.1	Zellzyklus, -Überleben und Wachstum	39
4.3.1.1	Protein 14-3-3 η	39
4.3.1.2	Mitofilin.....	41
4.3.1.3	Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor 1	44
4.3.2	Energiestoffwechsel: Isocitrat-Dehydrogenase α	45
4.3.3	Chaperone.....	47
4.3.3.1	60kDa Hitzeschockprotein.....	47
4.3.3.2	T-Komplex Protein 1	49

4.3.4	Neurotransmittertransport: β -lösliches NSF-attachment Protein...	50
4.3.5	Astrozytäre Aktivität: Saures Gliafaserprotein	51
5	Diskussion.....	56
5.1	Proteine mit signifikanten Turnoververänderungen	58
5.1.1	Astrozytäre Aktivität	59
5.1.2	Rolle der Mitochondrien.....	62
5.1.3	Paroxetins Wirkung auf neuronales Überleben	64
5.2	Ausblick.....	67
6	Zusammenfassung.....	70
7	Literaturverzeichnis	71
8	Anhang.....	91
8.1	2D-Gele der Vehikel- und Paroxetinhippocampi	91
9	Danksagung.....	94
10	Eidesstattliche Versicherung.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der unipolaren Depression nach S3-Leitlinie	2
Abbildung 2: Schematischer Überblick über die durchgeführten Experimente .	20
Abbildung 3: Arbeitsschritte von Dr. Christian Webhofer zur Behandlung der Mäuse mit Paroxetin.....	22
Abbildung 4: 2D-Gel des Hippocampus einer Paroxetinmaus.....	33
Abbildung 5: Markierte Protein-Spots der 2D-Gele einer Vehikel- und Paroxetinmaus	34
Abbildung 6: Übersicht über Protein-Spots auf 2D-Gelen mit signifikanten Turnoverunterschieden	36
Abbildung 7: Turnover des Proteins 14-3-3 η	40
Abbildung 8: Western Blot von 14-3-3 η	41
Abbildung 9: Turnover des Proteins Mitofilin	43
Abbildung 10: Western Blot von Mitofilin	44
Abbildung 11: Turnover des Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor 1	45
Abbildung 12: Turnover der Isocitratdehydrogenase α	47
Abbildung 13: Turnover des 60kDa Hitzeschockproteins	48
Abbildung 14: Turnover der T-Komplex Proteine 1 α , ϵ und θ	50
Abbildung 15: Turnover des β -lösliche NSF-attachment Protein.....	51
Abbildung 16: Turnover des sauren Gliafaserproteins	54
Abbildung 17: Western Blot vom sauren Gliafaserprotein	55
Abbildung 18: 2D-Gel der Vehikelmaus cv16.3	91
Abbildung 19: 2D-Gel der Vehikelmaus cv17.3	91
Abbildung 20: 2D-Gel der Vehikelmaus cv20.3	92
Abbildung 21: 2D-Gel der Paroxetinmaus cp8.3	92
Abbildung 22: 2D-Gel der Paroxetinmaus cp24.3	93
Abbildung 23: 2D-Gel der Paroxetinmaus cp25.3	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Instrumente und Zubehör	16
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 3: Software und Datenbanken	17
Tabelle 4: Verwendete Materialien zur Durchführung des Mausversuchs.....	17
Tabelle 5: Antikörper für Western Blots.....	18
Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien	19
Tabelle 7: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für 2D-Gelelektrophorese und Western Blots.....	19
Tabelle 8: Übersicht der Proteine mit Unterschieden im Turnover	37
Tabelle 9: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse der Proteine mit Turnoverunterschieden	38
Tabelle 10: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von 1433F.....	40
Tabelle 11: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von IMMT.....	42
Tabelle 12: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von GDIR1.....	45
Tabelle 13: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von IDH3A	46
Tabelle 14: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von CH60.....	48
Tabelle 15: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von TCPA2, TCPE und TCPQ	50
Tabelle 16: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von SNAB.....	51
Tabelle 17: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von GFAP	53

Abkürzungen

1433F	14-3-3 η Protein
2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
a.d.	Aqua destillatum
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BSA	Bovines Serumalbumin
CH60, HSP60	60kDa Hitzeschockprotein
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
CP	Chronisch behandelte Paroxetinmaus
CV	Chronisch behandelte Vehikelmaus
DTT	Dithiothreitol
FST	Forced Swim Test
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	Glial fibrillary acidic protein = Saures Gliafaserprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSP	Hitzeschockprotein
IEF	Isoelektrisches Fokussieren
IEF-Puffer	Rehydrationspuffer
IMMT	Inneres mitochondriales Membranprotein, Mitofilin
IPG-Strip	Immobilisierter pH-Gradient-Streifen
kDa	Kilo-Dalton
LPF	Labelled Peptide Fraction (Turnover)
LPF(Par)	Labelled Peptide Fraction der Paroxetingruppe
LPF(Veh)	Labelled Peptide Fraction der Vehikelgruppe
m/z	mass-to-charge ratio = Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MICOS	mitochondrial contact site and cristae organizing system
MS	Massenspektrometrie
MW	molecular weight, Molekulargewicht
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor
pI	Isoelektrischer Punkt eines Proteins

PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PTMs	Post-translationale Modifikationen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAB	β -lösliches NSF-attachment Protein
SNARE	Löslicher NSF-attachment Proteinrezeptor
SNRI	Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TBS	Tri-buffered Saline
TCPA2	T-Komplex Protein 1 α
TCPE	T-Komplex Protein 1 ϵ
TCPQ	T-Komplex Protein 1 β
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS
theoret.	theoretisch
TCA	Trizyklisches Antidepressivum
TCP-1	T-Komplex Protein 1
WB	Western Blot

1 Einleitung

1.1 Depression – Ein Überblick über die Erkrankung

Die unipolare Depression ist eine schwere psychische Erkrankung, die die Lebensqualität der Betroffenen stark beeinträchtigt (Murray, Vos et al. 2012) und mit einer Lebenszeitprävalenz von 17% sehr häufig auftritt (Kessler, Angermeyer et al. 2007). Dabei sind Frauen doppelt so oft betroffen wie Männer (Busch, Maske et al. 2013). Weltweit nimmt die Prävalenz der Erkrankung zu. So stieg bei erwachsenen Amerikanern die Prävalenz einer schweren Depression von 3,33% zu Beginn der Studie 1991/1992 eine Dekade später auf 7,06% an (Compton, Conway et al. 2006). Bis 2030 wird die Depression laut Hochrechnungen auf den zweiten Platz der führenden globalen Krankheitslasten mit Verlust von gesunden Lebensjahren und in Ländern mit hohem Einkommen sogar auf Platz eins vorrücken (Mathers and Loncar 2006). Die Zunahme der Prävalenz hat auch große Auswirkungen auf die entstehenden Kosten für das Gesundheitssystem (Vos, Flaxman et al. 2012). So beliefen sich allein im Jahr 2004 die direkten und indirekten Krankheitskosten für eine Depression in Europa auf 118 Milliarden Euro. Die Depression ist damit die teuerste psychiatrische Erkrankung in Europa (Sobocki, Jonsson et al. 2006). Effiziente Therapien sind nicht nur zur Linderung des großen Leidensdruck der Betroffenen sondern auch zur finanziellen Entlastung der Gesellschaft von besonderer Bedeutung.

1.1.1 Diagnosekriterien der Depression

Für die Diagnose der unipolaren Depression stehen keine objektiven diagnostischen Tests zur Verfügung, sondern sie wird über die subjektiven Symptome der Patienten gestellt (Nestler, Barrot et al. 2002). Die drei Hauptsymptome einer Depression umfassen nach den ICD-10 Klassifizierungen der Weltgesundheitsorganisation 1.) gedrückte, depressive Stimmung, 2.) Anhedonie und Interessensverlust und 3.) Antriebslosigkeit mit verstärkter Ermüdbarkeit (World-Health-Organization 1993). Zur Diagnose einer Depression müssen zwei der drei Hauptsymptome für mindestens zwei Wochen anhalten. Zusätzliche Symptome sind je nach Schwere der Erkrankung mindestens zwei der folgenden Symptome: Konzentrations- und

Aufmerksamkeitsschwäche, vermindertes Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen, Gefühle von Schuld und Wertlosigkeit, negative und pessimistische Zukunftsansichten, Suizidgedanken oder –handlungen, Schlafstörungen und Appetitminderung (DGPPN 2015). In schweren Fällen kann eine depressive Episode auch psychotische Symptome wie Halluzinationen, Stupor oder Wahnideen beinhalten (Ostergaard, Rothschild et al. 2012).

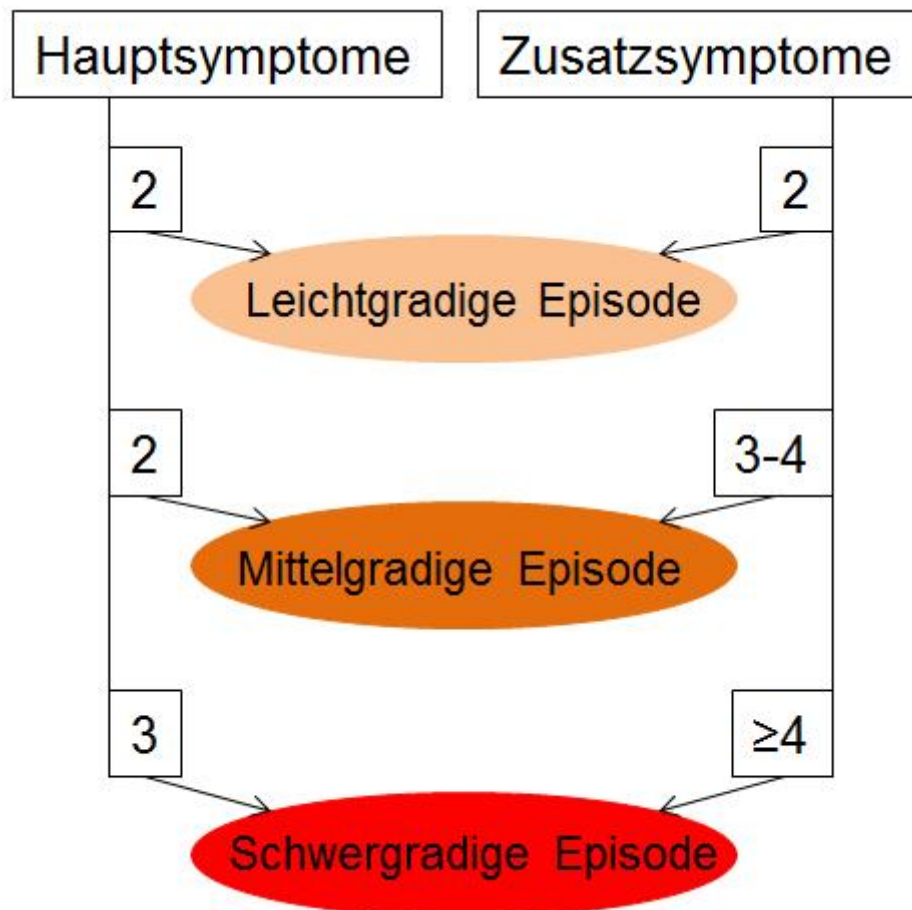


Abbildung 1: Einteilung der unipolaren Depression nach S3-Leitlinie

Zwei Haupt- plus zwei Zusatzsymptome entsprechen einer leichtgradigen, zwei Haupt- plus drei bis vier Zusatzsymptome einer mittelgradigen, drei Haupt- plus mindestens vier Zusatzsymptome einer schwergradigen Episode (DGPPN 2015).

Die Depression ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die frühzeitig erkannt und behandelt werden muss, da etwa 15% der schwer depressiven Patienten Suizid begehen (Manji, Drevets et al. 2001). Um die betroffenen Patienten frühzeitig zu detektieren, kann zur groben Einschätzung der '2-Fragen-Test' angewandt werden. Er hat eine hohe Sensitivität von 96% und kann schnell und einfach durchgeführt werden (Whooley, Avins et al. 1997). Wenn eine oder

beide der zwei Fragen, ob man sich im letzten Monat häufiger niedergeschlagen, traurig, bedrückt oder freudlos gefühlt habe und ob man deutlich weniger Lust an Dingen, die man sonst gern tat, empfunden habe, bejaht, müssen alle relevanten Haupt- und Nebensymptome abgeklärt werden, um die adäquate Diagnose einer Depression stellen zu können (DGPPN 2015). Trotz dieses einfachen und schnellen Tests zur groben Abschätzung wird die Depression oft erst sehr spät detektiert. Sie besteht vor Diagnosestellung im Durchschnitt schon ein bis vier Jahre (Kessler, Angermeyer et al. 2007).

Die depressive Störung ist nicht nur auf die Psyche der Patienten beschränkt. Sie ist vielmehr eine systemische Erkrankung mit schädlichen Auswirkungen auf multiple Organsysteme. So ist zum Beispiel die Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 2 bei depressiven Patienten erhöht (Knol, Twisk et al. 2006). Die Depression zeigte sich in diversen Studien als ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 (Musselman, Betan et al. 2003). Außerdem geht die Depression im Erwachsenenalter mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einher. Sie ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit (Arbelaez, Ariyo et al. 2007). Die Mortalität nach Herzinfarkt ist bei depressiven im Vergleich zu nicht-depressiven Patienten erhöht (Musselman, Evans et al. 1998, Schulz, Beach et al. 2000).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Depression

Die Depression ist eine komplexe Erkrankung mit sehr heterogenen Symptomen, die für eine multifaktorielle Genese sprechen. Die Heterogenität der Erkrankung erschwert eine universell geltende neurobiologische Erklärung der Ätiologie (Weissman, Merikangas et al. 1986, Goldberg 2011). Die Ursachen sind noch nicht ausreichend verstanden und es existieren verschiedene psychologische und neurobiologische Hypothesen, die aber die Pathogenese nicht umfassend erklären können. Die Interaktion von genetischer Veranlagung, emotionaler Traumata, Veränderungen des endokrinen Systems, der monoaminergen Neurotransmitter sowie der intrazellulären Signalübertragung scheint eine zentrale pathogenetische Rolle zu spielen (Sullivan, Neale et al. 2000, Ehlert, Gaab et al. 2001, Lau and Eley 2010). Zu den nicht-genetischen Faktoren zählen Stress, ‚life events‘ wie zum Beispiel der Verlust einer nahestehenden Person, Virusinfektionen oder endokrinologische

Störungen wie Erkrankungen der Schilddrüse (Nestler, Barrot et al. 2002, Malberg 2004).

1.1.2.1 Genetische Faktoren

Die Depression tritt familiär gehäuft auf (Shih, Belmonte et al. 2004, Lau and Eley 2010). Das Erkrankungsrisiko für affektive Störungen liegt bei Angehörigen bei 15-20% im Vergleich zu Angehörigen gesunder Kontrollpersonen, die mit einem Risiko von 7-10% erkranken (Schumacher, Cichon et al. 2002). In einer dänischen Zwillingsstudie beträgt die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge für eine unipolare Depression 50% (Bertelsen, Harvald et al. 1977).

In genetischen Untersuchungen wurden bestimmte Genvarianten und Risiko-Genloci gefunden, die für die Heredität der Erkrankung verantwortlich sind. (Nestler, Barrot et al. 2002, de Kloet, Joels et al. 2005, Uher 2009, Lubke, Hottenga et al. 2012, Lee, Ripke et al. 2013, Ferentinos, Koukounari et al. 2015, Gatt, Burton et al. 2015, Jansen, Penninx et al. 2016, Yamagata, Uchida et al. 2017). Die Disposition an einer Depression zu erkranken beruht jedoch nicht auf einem einzelnen mutierten Gen, sondern auf mehreren veränderten Genloci, die untereinander und mit Umwelteinflüssen wechselwirken (Nöthen, Rietschel et al. 2004). Dabei spielen auch epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierungen im Genom eine Rolle (Sabunciyan, Aryee et al. 2012, Byrne, Carrillo-Roa et al. 2013).

1.1.2.2 Monoaminhypothese der Depression

Die bekannteste und gängigste Theorie zur Entstehung der Depression ist die Monoaminhypothese, die besagt, dass in Depressiven herabgesetzte Spiegel der Neurotransmitter Serotonin, Dopamin und Noradrenalin zu den Symptomen der Erkrankung führen (Schildkraut 1965, Coppen 1967, Charney 1998, Manji, Drevets et al. 2001, Haenisch and Bonisch 2011). Ob die alterierten Neurotransmitterspiegel allerdings Symptom oder Ursache der Erkrankung sind, ist nach wie vor unklar (Nutt 2008).

Zuerst festgestellt wurde der Zusammenhang von Monoaminen und Depression vor über 50 Jahren bei Verwendung des Monoaminoxidasehemmers Iproniazid zur Behandlung von Tuberkulose (Bloch, Dooneief et al. 1954) und der trizyklischen Substanz Imipramin für psychotische Erkrankungen (Kuhn 1958).

Bei beiden Medikamenten trat eine antidepressive Wirkung bei den behandelten Patienten auf. Da sowohl Iproniazid als auch Imipramin einen erhöhten Monoamingehalt im synaptischen Spalt bewirken, leitete sich davon die Entwicklung der selektiven Wiederaufnahmehemmer von Serotonin und Noradrenalin ab (siehe Kapitel 1.1.3 Therapie).

Die Monoaminhypothese erklärt die Depression allerdings nicht ausreichend. So konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von monoaminergen Neurotransmittern in Menschen keine Depression auslöst (Ruhe, Mason et al. 2007). Außerdem zeigen selektive Wiederaufnahmehemmer erst nach einigen Wochen einen therapeutischen Effekt, obwohl die Monoaminspiegel in den Synapsen bereits wenige Stunden nach Einnahme der ersten Tablette ansteigen (Gould and Manji 2002).

1.1.2.3 Fehlregulation der Stresshormonachse und Rolle des Hippocampus

Die Stress-Hypothese der Depression wurde von Seligman im Tiermodell beschrieben (Seligman, Rosellini et al. 1975). Seligman konnte zeigen, dass Stress und depressives Verhalten in direktem Zusammenhang stehen. Mäuse, die wiederholt Stressstimuli in Form von Stromschlägen ausgesetzt waren, zeigten depressionsähnliche Verhaltensmuster, zum Beispiel Unruhe, Angststörungen, Libidoverlust, Gewichtsabnahme und assoziativ-kognitive Defizite. Das Tiermodell stützt das verhaltensbiologische Modell der erlernten Hilflosigkeit, nach dem Stresssituationen als unbeeinflussbar und unkontrollierbar wahrgenommen werden und Versuche, den aversiven Stimuli zu entkommen, unterbleiben (Seligman, Weiss et al. 1980, Vollmayr, Bachteler et al. 2004, Chourbaji, Zacher et al. 2005). Beim Menschen geht einer depressiven Episode häufig Stress in Form von psychosozialen Druck voraus (Kendler, Kessler et al. 1995, Kendler, Karkowski et al. 1999, Hammen 2005).

Bei 50-60% der Patienten mit einer schweren Depression sind Veränderungen der Hormonsekretion von CRH, ACTH und Kortisol nachweisbar (Holsboer and Barden 1996). Die Fehlregulation der Stresshormonachse mit daraus resultierenden erhöhten ACTH- und Kortisolspiegeln ist die am häufigsten beobachtete biologische Veränderung bei einer schweren depressiven Störung (Holsboer 2000). Der Feedbackmechanismus der Stressachse ist gestört, was bei längerfristigen Stressepisoden zu einem entgleisten Hyperkortisolismus führen kann (Young, Haskett et al. 1991, Ehlert, Gaab et al. 2001, de Kloet,

Joels et al. 2005, Carroll, Cassidy et al. 2007). Die erhöhte Konzentration von Glukokortikoiden führt durch Suppression des Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) zu einer verminderten Neurogenese in Hippocampi depressiver Patienten (Schaaf, De Kloet et al. 2000, Wong and Licinio 2004, Duman and Monteggia 2006, Anacker 2014). Bei Depressiven ist das Volumen des Hippocampus beidseitig um fünf bis zehn Prozent herabgesetzt (Campbell, Marriott et al. 2004, Videbech and Ravnkilde 2004, Campbell and MacQueen 2006, Schmaal, Veltman et al. 2016), was mit einer erhöhten Vulnerabilität für psychologische Traumatisierung einhergeht (Videbech and Ravnkilde 2004, Vollmert, Tost et al. 2004). Der Hippocampus ist an der Regulation der Stresshormonachse durch Einfluss auf die ACTH-Sekretion, an der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis, an der Bildung des autobiographischen Gedächtnisses mit dazugehörigen Emotionen und an der Steuerung des Affekts beteiligt (Davidson, Pizzagalli et al. 2002, Kesner and Rolls 2015).

Vor allem im Bereich des Gedächtnisses zeigen Patienten neuropsychologische Defizite (Lahr, Beblo et al. 2007). Die Verschlechterung der Gedächtnisleistung tritt in Folge eines beeinträchtigten Feedbackmechanismus der Stress-Hormon-Achse und daraus resultierenden hohen Glukokortikoidspiegeln auf (Young, Haskett et al. 1991, Lupien, de Leon et al. 1998, Belanoff, Gross et al. 2001, Bremner, Vythilingam et al. 2004, Reppermund, Zihl et al. 2007, Leon-Carrion, Atutxa et al. 2009). Neben einer auch in Tiermodellen nachgewiesenen Volumenminderung des Hippocampus durch zu hohe Glukokortikoidspiegel (Gould, Tanapat et al. 1998, Kim and Diamond 2002, Czeh, Simon et al. 2005, Fuchs 2005) zeigt sich bei Tieren, die chronischem Stress ausgesetzt sind, eine verminderte Bildung von Dendriten, was als ‚dendritic spine loss‘ bezeichnet wird (Magarinos, McEwen et al. 1996).

Die Atrophie und die Unterdrückung der Neurogenese im Hippocampus können durch Therapeutika wie Antidepressiva (Malberg, Eisch et al. 2000, Duman 2004, Alfonso, Frasch et al. 2005, Czeh and Lucassen 2007) oder im Tiermodell durch Beseitigung der Stressoren rückgängig gemacht werden (Heine, Maslam et al. 2004, Mayer, Klumpers et al. 2006).

Die Ergebnisse der Studien zur verstärkten Neurogenese unter antidepressiver Therapie decken sich auch mit klinischen Untersuchungen, die zeigen, dass

Antidepressiva wie selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), zum Beispiel Fluoxetin, kognitive Einschränkungen älterer Patienten verbessern können (Mowla, Mosavinasab et al. 2007).

Die Resultate der zahlreichen Studien zum Hippocampus und seiner zentralen Rolle im Krankheitsbild der Depression machen ihn für Untersuchungen zur Wirkungsweise von Antidepressiva sehr interessant.

1.1.2.4 Rolle der neuronalen-astrozytären Kommunikation

Ein neuerer Ansatz zum Verständnis der Depression beleuchtet die Funktion von Gliazellen und deren Veränderungen bei depressiven Erkrankungen. Das gesunde Gehirn besteht aus etwa 86 Milliarden Neuronen, die in einem großen Netzwerk untereinander und mit Gliazellen, die die Hälfte der Zellen eines Gehirns ausmachen, kommunizieren (Azevedo, Carvalho et al. 2009). Gliazellen lassen sich in Astrozyten, den Immunzellen Mikroglia und den myelinbildenden Oligodendrozyten unterteilen. Astrozyten sind unter anderem an der Bluthirnschranke und aktiv an der Transmission von Neurotransmittern an der neuronalen Synapse beteiligt. Sie umgeben die prä- und postsynaptischen Neurone, so dass in der Literatur inzwischen von einer aus drei Zellen bestehender Synapsenkommunikation geredet wird, die zwischen Astrozyt, Prä- und Postsynapse besteht. (Araque, Parpura et al. 1999, Pascual, Casper et al. 2005, Theodosis, Poulain et al. 2008, Kimelberg and Nedergaard 2010, Gundersen, Storm-Mathisen et al. 2015). In Reviews zu Studien über Gliazellen wird ihnen eine zwar noch nicht ausreichend verstandene, aber bedeutende Rolle beim Prozess neurodegenerativer und psychiatrischer Erkrankungen eingeräumt (He and Sun 2007, Barres 2008, Peng, Verkhratsky et al. 2015, Jha, Lee et al. 2016).

Zellpathologisch findet sich bei der unbehandelten Depression eine Reduktion der Gliazellen, vor allem der Astrozyten (Rajkowska and Miguel-Hidalgo 2007, Gos, Schroeter et al. 2013, Cobb, O'Neill et al. 2016), die bei Patienten unter antidepressiver Medikation nicht auftrat (Czeh and Di Benedetto 2013, Rajkowska and Stockmeier 2013). Eine genaue Einordnung der Funktion der Astrozyten bei der Depression ist nach aktuellem Stand der Forschung noch nicht möglich, aber sie scheinen eine bedeutende Rolle zu spielen.

1.1.3 Therapie

Ziel der Therapie der Depression ist es, den Patienten den hohen Leidensdruck zu nehmen und Suizidgedanken entgegenzuwirken. Mit der Therapie erhoffen sich Patienten nicht nur eine Abnahme der Symptome sondern vor allem das Zurückfinden in ihren Alltag und in ihr soziales Umfeld (Battle, Uebelacker et al. 2010). Zur Therapie können auf medikamentöse und nicht-medikamentöse Strategien zurückgegriffen werden. Bei einer leichten oder mittelgradigen Depression wird entweder eine Psychotherapie oder eine Pharmakotherapie durchgeführt. Ab der Diagnose einer schweren Depression ist eine Kombination beider Therapien obligat (DGPPN 2015).

1.1.3.1 Nicht-medikamentöse Behandlungsstrategien

Als nicht-medikamentöse Therapie steht eine Vielzahl von evidenzbasierten psychotherapeutischen Ansätzen zur Verfügung. Zu den am häufigsten angewandten Therapieformen gehören die kognitive Verhaltenstherapie, interpersonelle Psychotherapie und psychodynamische Psychotherapie (Hollon, Thase et al. 2002). Die unterschiedlichen Therapien scheinen in Meta-Analysen alle einen ähnlichen Effekt auf das Outcome der Patienten zu haben (Cuijpers, van Straten et al. 2008). Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, dem Patienten andere Therapieformen anzubieten. Dazu zählen beispielsweise Schlafentzug (Kuks and Tolle 1991, Leibenluft and Wehr 1992, Wirz-Justice and Van den Hoofdakker 1999), Elektrokrampftherapie (UK-ECT-Review-Group 2003), Lichttherapie (Eastman, Young et al. 1998, Golden, Gaynes et al. 2005, Rastad, Wetterberg et al. 2017) und Ergotherapie (Schene, Koeter et al. 2007, Hees, de Vries et al. 2013).

1.1.3.2 Psychopharmakotherapie

Seit den fünfziger Jahren werden affektive Störungen mit Monoaminoxidasehemmern oder trizyklischen Antidepressiva (TCAs) behandelt (Bloch, Dooneief et al. 1954, Kuhn 1958). Basierend auf der Monoaminhypothese zur Entstehung der Depression wurden in den 1980er Jahren die selektiven Monamin-Wiederaufnahmehemmer entwickelt, darunter die SSRIs Paroxetin und Fluoxetin (Vaswani, Linda et al. 2003), die weniger gängigen selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer wie Reboxetin oder

die Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) (Brunello, Blier et al. 2003), die die Menge an Neurotransmittern im synaptischen Spalt erhöhen. SSRIs bewirken durch Blockierung der serotonergen Autorezeptoren eine Verbesserung der neuronalen serotonergen Transmission und eine klinische Besserung der Symptome (Celada, Puig et al. 2004, Geddes and Cipriani 2004).

In Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass SSRIs und SNRIs dank ihrer spezifischen Rezeptorwirkung bei geringerem Nebenwirkungsprofil eine ähnliche Wirksamkeit wie trizyklische Antidepressiva haben (Song, Freemantle et al. 1993, Montgomery, Henry et al. 1994, Anderson 2000, Peretti, Judge et al. 2000). Heute sind SSRIs aufgrund ihres günstigen Nutzen-Risiko-Profiles Mittel der Wahl in der medikamentösen Behandlung der Depression und werden zunehmend auch bei Angst- und Zwangsstörungen eingesetzt (Wagstaff, Cheer et al. 2002). Paroxetin ist das wirksamste SSRI (Sanchez and Hyttel 1999, Bourin, Chue et al. 2001, Purgato, Papola et al. 2014). Neben einem schwachen Effekt auf das noradrenerge Transmittersystem (Sugimoto, Yamamoto et al. 2011) hat es im Vergleich zu trizyklischen Substanzen eine geringere Wirkung auf dopaminerge, histaminerge und muskarinerg-cholinerge Systeme. So sind anticholinerge Nebenwirkungen bei SSRIs weniger stark ausgeprägt. Durch die geringe antihistaminerge Wirkung sind bei SSRIs Sedierung und Gewichtszunahme seltener als bei TCAs. Relevante Nebenwirkungen der SSRIs sind sexuelle Dysfunktion, Schlafstörungen, Schwindel und gastrointestinale Beschwerden (Bourin, Chue et al. 2001, Arroll, Elley et al. 2009, Sanchez, Reines et al. 2014).

Die Ansprechrate auf Pharmakotherapie liegt bei 50-80%, was durch den späten Wirkeintritt erst verzögert zu einer Therapieanpassung führt (Holsboer 2001, Walsh, Seidman et al. 2002, Oeljeschläger and Müller-Oerlinghausen 2004, Wong and Licinio 2004, Berton and Nestler 2006). In einer Metaanalyse, die 16 Studien verglich, konnte die Wirksamkeit der Pharmakotherapie im Vergleich zu Placebo nachgewiesen werden (Arroll, Elley et al. 2009).

Allen Antidepressiva ist gemein, dass ihr therapeutischer Effekt frühestens zwei bis vier Wochen nach kontinuierlicher Einnahme eintritt, obwohl SSRIs bereits wenige Stunden nach der ersten Einnahme die Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt erhöhen (Gould and Manji 2002). Neben der Erhöhung des Serotoninspiegels setzen Antidepressiva noch weitere Langzeiteffekte und

Anpassungsvorgänge auf genetischer Ebene oder durch Second-Messenger-Systeme in Neuronen und Gliazellen in Gang, die die späte Therapieansprache erklären könnten. Wie in den Kapiteln 1.1.2.3 und 1.1.2.4 erwähnt, scheinen die Förderung der Neurogenese im Hippocampus (Malberg, Eisch et al. 2000, Duman 2004, Alfonso, Frasch et al. 2005, Czeh and Lucassen 2007) und die aktivierende Wirkung auf Astrozyten (Czeh and Di Benedetto 2013, Rajkowska and Stockmeier 2013) daran beteiligt zu sein.

In Anbetracht der späten Therapieansprache und dem hohen Leidensdruck der Patienten mit einer Suizidrate von 15% bei schwer depressiven Patienten (Manji, Drevets et al. 2001), ist weitere Forschung dringend notwendig, um Patienten schneller und effektiver zu helfen und neue therapeutische ‚Drug Targets‘ und Biomarker zu identifizieren, an denen der Erfolg der Therapie gemessen werden kann.

1.2 Präklinische Forschung zur Depression

Um den Effekt der Therapie mit Antidepressiva einzuschätzen, werden in Studien häufig Nagetieruntersuchungen durchgeführt (Nakatani, Aburatani et al. 2004, Yamada, Yamada et al. 2005, Conti, Maier et al. 2007, Sillaber, Panhuysen et al. 2008), da frisches menschliches Gehirngewebe aus ethischen Gründen nur selten zugänglich ist und Ergebnisse aus dem peripheren Blut nur bedingt mit Gewebs- und Liquorproben aus dem zentralen Nervensystem korrelieren (Sullivan, Fan et al. 2006). Ein weiterer Nachteil der humanen Proben ist, dass bei Menschen die interindividuelle genetische und Lebensstil abhängige Variabilität sehr hoch ist. So erschweren Faktoren wie zerebraler pH, postmortales Zeitintervall, Alter, Einnahme von Antidepressiva oder anderen Medikamenten und Nikotin- oder Alkoholabusus die statistische Analyse humaner Proben (Filiou and Turck 2011). Folglich ist eine hohe Anzahl an Proben nötig, um relevante Ergebnisse zu bekommen (Kim and Webster 2009). Aus diesen Gründen eignen sich auf Tiermodellen basierte Studien in der experimentellen psychiatrischen Forschung, da eine höhere Standardisierung und Probenquantität möglich ist (Turck, Maccarrone et al. 2005, Krishnan and Nestler 2011).

Da Mausmodelle die Depression in ihrer vollen Heterogenität und Komplexität von Symptomen nur eingeschränkt darstellen können, konzentrieren sich Tierexperimente auf einzelne Hauptsymptome wie Anhedonie oder erlernte

Hilflosigkeit. Der Effekt der antidepressiven Behandlung kann dann mit Augenmerk auf diese ausgewählten Symptome untersucht werden (Nakatani, Aburatani et al. 2004, Wong and Licinio 2004).

Die in dieser Arbeit verwendeten DBA/2-Ola-Mäuse zeigen ein ausgeprägtes ängstliches Verhaltensmuster (Ohl, Roedel et al. 2003). Im Vergleich zu anderen Inzucht-Mausstämmen ist in DBA/2-Ola-Mäusen die negative Rückkopplung in der Stresshormonachse herabgesetzt. Das heißt, auf Stress reagieren sie mit höheren Kortisolspiegeln (Thoeringer, Sillaber et al. 2007). In vorangehenden Studien konnte gezeigt werden, dass DBA/2-Ola-Mäuse mit Veränderung ihres ängstlichen Verhaltens sehr gut auf eine Paroxetingabe reagieren. In Stress- und Belastbarkeitstests schnitten die behandelten Mäuse im Vergleich zu Vehikelmäusen signifikant besser ab (Porsolt, Bertin et al. 1977, Sugimoto, Yamamoto et al. 2011). Dieser Mausstamm eignet sich, die molekularen Effekte der antidepressiven Behandlung mit Paroxetin zu untersuchen (Sillaber, Panhuysen et al. 2008).

1.3 Proteomanalytik und Proteoforme

Die Proteomik beschreibt die Erforschung des Proteinexpressionsmusters einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus unter definierten Bedingungen zu einem bestimmten Zeitpunkt (Wilkins, Sanchez et al. 1996, Pennington, Wilkins et al. 1997). Die Detektion der dynamischen Veränderungen des Proteoms ist der große Vorteil der Proteomik gegenüber der ‚statischen‘ Genomik. Das Proteom ist ein dynamischer, sich ständig an innere und äußere Faktoren anpassender Bestandteil eines Organismus, da er kontinuierlich dem Turnover, der Synthese und Abbau der Proteine umfasst, unterliegt.

Unterschiede der post-translationalen Modifikationen (PTMs) und des Splicings bei der Proteinsynthese können Aktivitätsmuster von Proteinen verändern, was sich auf das gesamte Proteom auswirkt (Gao, Qi et al. 2013, Pantazatos, Andrews et al. 2015, Sehgal, Mannan et al. 2015, Wagner, Hartmann et al. 2015). Solche Proteine, die von einem Gen ausgehen, sich aber in ihren PTMs und durch alternatives Splicing unterscheiden, werden als „Proteoforme“ bezeichnet, während der Begriff Isoforme sich auf Unterschiede auf genetischer Ebene bezieht (Smith and Kelleher 2013). Der Turnover kann sich nicht nur zwischen Proteinen sondern auch zwischen Proteoformen eines Proteins unterscheiden.

Es sind über 200 PTMs bekannt (Gooley and Packer 1997). Zu den bekanntesten zählen Phosphorylierungen, Acetylierungen, Glykosylierungen und Ubiquitinierungen. Die unterschiedlichen PTMs wirken sich auf die Aktivität des Proteins, Signaltransduktion, Lokalisation des Proteins in der Zelle und den Proteinabbau aus (Gao, Qi et al. 2013, Pantazatos, Andrews et al. 2015, Sehgal, Mannan et al. 2015, Wagner, Hartmann et al. 2015). Proteoforme haben also eigene chemische und physikalische Charakteristika und können mit auf Proteomik basierenden Methoden separiert, isoliert und identifiziert werden (Ngounou Wetie, Woods et al. 2014). Zur Darstellung der Proteoforme findet die zweidimensionale Auftrennung nach pH und molekularer Größe Anwendung (Klose 1975, O'Farrell 1975), die in Kapitel 1.3.2 näher beschrieben wird.

In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass die Erforschung und der Nachweis solcher Modifikationen durch präzise Proteomuntersuchungen mittels Massenspektrometrie (MS) zum Verständnis patho-biochemischer Prozesse in lebenden Zellen beitragen (Taurines, Dudley et al. 2011).

1.3.1 Proteomik in der psychiatrischen Forschung

Seitdem das komplette menschliche Genom vor etwa 15 Jahren sequenziert wurde (Lander, Linton et al. 2001, Venter, Adams et al. 2001), wurden in der psychiatrischen Forschung vermehrt funktionelle Genomikuntersuchungen wie Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik angewandt, um die durch antidepressive Medikation beeinflussten Signalwege zu untersuchen und neue mögliche Zielmoleküle, sogenannte Drug Targets, zu entdecken (Khawaja, Xu et al. 2004, Carboni, Vighini et al. 2006, Cecconi, Mion et al. 2007, McHugh, Rogers et al. 2008, Sillaber, Panhuysen et al. 2008, McHugh, Rogers et al. 2010, Webhofer, Gormanns et al. 2013, Ge, Zhu et al. 2015). So konnten Unterschiede in exprimierten Proteoformen und ihren PTMs in psychiatrischen Erkrankungen festgestellt werden (Gao, Qi et al. 2013, Pantazatos, Andrews et al. 2015, Sehgal, Mannan et al. 2015, Vialou, Thibault et al. 2015, Wagner, Hartmann et al. 2015).

Auf die funktionelle Genomik basierend können neue ‚unvoreingenommene‘ Hypothesen zur Pathophysiologie psychiatrischer Erkrankungen und zu Wirkmechanismen von Medikamenten entstehen (Turck, Maccarrone et al. 2005, Geschwind and Konopka 2009, Filiou 2015).

1.3.2 Quantitative Proteomik mittels Massenspektrometrie

Die Proteom-Analyse mit Hilfe von zweidimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE) erlaubt eine hochauflösende Proteintrennung und Proteinquantifizierung (Klose 1975, O'Farrell 1975). Proteinmaterial aus zerebralen Zellen wird zuerst nach isoelektrischen Punkt und anschließend in der zweiten Dimension nach molekularem Gewicht aufgetrennt. Mit dem Färben der Proteine können quantitative Aussagen zum Expressionslevel gemacht werden und qualitative Unterschiede zu den Proteoformen durch die Lokalisation auf dem Gel festgestellt werden. Proteoforme und unterschiedlich in Vehikel- und Paroxetinproben exprimierte Proteine können in Peptidform im Massenspektrometer nach Durchführung eines proteolytischen In-Gel-Verdaus identifiziert werden (Steen and Mann 2004). Die zu untersuchenden Peptide werden während der MS in die Gasphase überführt und ionisiert und die geladenen Teilchen durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Anschließend teilt der Analysator die Ionen nach Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z ratio) auf, die dann vom Detektor erfasst werden. Eine möglichst sensitive Proteomikuntersuchung bietet das LTQ-Orbitrap Hybridmassenspektrometer, das eine Chromatographie zur Auftrennung des Probenmaterials an die MS koppelt (Yates, Cociorva et al. 2006, Webhofer, Gormanns et al. 2013).

1.3.3 Metabolische Markierung mit stabilen Isotopen

Durch eine partielle Markierung der Proteine mit stabilen Isotopen sind neben der Identifizierung der Proteoforme auch die Quantifizierung und die Bestimmung der Turnoverrate der Proteine möglich (Steen and Mann 2004, Doherty and Whitfield 2011, Claydon, Thom et al. 2012, Ngounou Wetie, Woods et al. 2014), da sich Peptide je nach Turnover in ihrer isotopischen Zusammensetzung unterscheiden und mittels MS unterschieden werden können (De Leenheer, Lefevre et al. 1985).

Die Dynamik des Proteoms wird wesentlich durch die Turnoverrate bestimmt. Der Turnover beschreibt die Balance zwischen Synthese und Abbau eines Proteins und damit die Dauer, die ein Protein seine Funktion erfüllen kann. Unter anabolen Umständen, wenn ein Organismus oder eine Zelle wächst, ist die Proteinsyntheserate größer als die Abbaurate und vice versa unter katabolen Umständen (Eagle, Piez et al. 1959). Proteoforme können in

Abhängigkeit von ihren Modifikationen unterschiedliche Turnover haben (Doherty and Beynon 2006).

Zur metabolischen Markierung mit stabilen Isotopen sind verschiedene Methoden etabliert, die entweder ^2H , ^{13}C , ^{15}N oder ^{18}O als Marker benutzen, wie ICAT (Gygi, Rist et al. 1999), ICPL (Schmidt, Kellermann et al. 2005), iTRAQ (Ross, Huang et al. 2004), ^{18}O -Markierungen (Reynolds, Yao et al. 2002), SILAC (Ong, Blagoev et al. 2002) und ^{15}N -Markierungen (Oda, Huang et al. 1999, Claydon, Thom et al. 2012). SILAC und die ^{15}N -Markierung haben sich durch ihre sehr akkurate Proteinquantifizierung als Goldstandard durchgesetzt (Bantscheff, Schirle et al. 2007, Bantscheff, Lemeer et al. 2012).

Das ^{15}N -enthaltende Futter wird von Mäusen gut toleriert und der markierte Stickstoff ausreichend inkorporiert (Frank, Kessler et al. 2009, Filiou, Webhofer et al. 2012). Die entstehenden ^{15}N Aminosäuren werden anschließend in Proteine eingebaut. Der Turnover kann dann über das Verhältnis des ^{15}N -markierten zu unmarkiertem Protein berechnet werden (Zhang, Reckow et al. 2011).

2 Zielsetzung

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit bestand darin, Veränderungen von molekularen und zellulären Prozessen, die über die Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmung hinausgehen, in mit dem SSRI Paroxetin behandelten Mäusen mit Hilfe von Proteomik-Hochleistungstechnologie zu untersuchen.

Dazu wurde der Effekt der chronischen Gabe von Paroxetin auf das Proteom murinen Hippocampusgewebes untersucht:

- Sind quantitative Unterschiede in der Protein- und Proteoformexpression zwischen Vehikel- und Paroxetinmäusen auf 2D-Gelen detektierbar?
- Unterscheiden sich die post-translationalen Modifikationen der Proteoforme der Paroxetinmäuse im Vergleich zu den Vehikelmäusen?
- Haben Paroxetinmäuse andere Turnover in Proteoformen als Vehikelmäuse?

Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, die therapeutischen Möglichkeiten der Depression durch ein tieferes Verständnis der Wirkungsweise von SSRIs am Beispiel von Paroxetin zu verbessern.

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden kurz die analytischen Verfahren dargestellt, die in dieser Arbeit Anwendung fanden.

3.1 Materialien

Instrumente und Zubehör

Amersham grinding kit

ChemiDoc Scanner
Feinwaage Analytical Standard
IEF Bio-Rad Protein IEF CELL
PowerPac Universal Power Supply
Rotationsschüttler Thermomixer 5436
Scanner GS-800 Densitometer
Spectrophotometer
Speed-Vac Plus SC210A Savant
Tischzentrifuge 5804R
Ultraschallbad
Ultraschalldisintegrator Branson
Sonifier 250
Vortexgerät Vortex-Genie 2

Zubehör für das LC-MS/MS-System

ESI-Quelle
LTQ Orbitrap XL
nano 2D-HPLC-System
Trennsäule Picofrit
Vorsäule Zorbay-C18

Tabelle 1: Instrumente und Zubehör

Hersteller

GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Großbritannien
Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ohaus, Parsippany, NJ, USA
Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Merck, Darmstadt, Deutschland
Emerson, St. Louis, MO, USA

Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eksigent, Dublin, CA, USA
New Objective Woburn, MA, USA
Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

Verbrauchsmaterialien

Criterion-Gel-Kassetten
Criterion-Zellsystem
Einmal 0,5 ml Reaktionsgefäße
Einmal 1,0 ml Reaktionsgefäße
Einmal 1,5 ml Reaktionsgefäße
Einmal Microvials für MS

Firma

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
VWR, Radnor, PA, USA

Einmal Pipettenspitzen (diverse Größen)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filterröhrchen	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Gelhaltekassetten zum Transfer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
IPG-Strip, 11 cm, pH4-7	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Protean-Gel-Kassetten	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Protean-Zellsystem	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
PVDF Transfermembran	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Whatman Filterpapier	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Software	Hersteller
Bioworks	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Compute MW/pI tool	SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Schweiz
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, LaJolla, CA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, USA
ImageLab Software	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mascot Daemon	MatrixScience, Boston, MA, USA
PDQuest 2-D Software	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
ProTurnyzer 1.2	Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, Deutschland
SwissProt	UniProt
Xcalibur	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 3: Software und Datenbanken

Materialien für den Mausversuch	Hersteller
0,9% Salzlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bakterienbasiertes 14N- und 15N-Futter	Silantes, München, Deutschland
DBA/2-Ola-Mäuse	Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Paroxetin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 4: Verwendete Materialien zur Durchführung des Mausversuchs

Erstantikörper	Firma	Verdünnung	Wirt
Anti-14-3-3 η	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	1:200	Ziege
Anti-GFAP	Abcam, Cambridge, Großbritannien	1:1000	Kaninchen
Anti-Mitofilin	Abcam, Cambridge, Großbritannien	1:500	Maus
Zweitantikörper	Firma	Verdünnung	Wirt
Anti-Goat	Santa Cruz, Dallas, TX, USA	1:2000	Esel

Anti-Mouse	VWR, Radnor, PA, USA	1:5000	Schaf
Anti-Rabbit	VWR, Radnor, PA, USA	1:10000	Esel

Tabelle 5: Antikörper für Western Blots

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien haben den analytischen Reinheitsgrad (p.a) und sind für Untersuchungen mit dem MS geeignet.

Reagenzien und Chemikalien	Firma
0,5 M Tris-HCL ph 6,8	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
1,5 M Tris-HCL ph 8,8	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
10-fach konzentriertes TGS a.d.	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Acetonitril	ELGA, Paris, Frankreich
Acrylamid-Bis 30% 37.5:1	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ameisensäure p.a. 98-100%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ammoniumbicarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
APS	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
BiolYTE 40%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Bradford-Reagenz Pierce Coomassie Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
BSA	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
CHAPS	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Complete C inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Coomassie stain	Serva, Heidelberg, Deutschland
DTT	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Essigsäure 99%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Iodoacetamid	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Isopropanol 99%	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Luminata Forte Western HRP Substrate	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mineralöl	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin	Roche, Basel, Schweiz
Phosphorsäure p.a. 87%	Merck, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Precision Plus unstained Proteinstandard	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Precision Plus stained Proteinstandard	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
SDS	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
TEMED	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Thiourea	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris Base	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trypsin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Urea	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

12% Trenngel	Menge für ein Gel
Acrylamid-Bis 30% 37.5:1	8 ml
Tris-HCL 1,5 M ph 8,8	5 ml
a.d.	7 ml
10% SDS	0,2 ml
TEMED	0,01 ml
10% APS	0,2 ml
5% Sammelgel	Menge für ein Gel
Acrylamid-Bis 30% 37.5:1	1,25 ml
Tris-HCL 0,5 M ph 6,8	1,88 ml
a.d.	4,3 ml
10% SDS	0,075 ml
TEMED	0,01 ml
10% APS	0,025 ml

Tabelle 7: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für 2D-Gelelektrophorese und Western Blots

3.3 Methoden

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die in den Unterkapiteln erläuterten Arbeitsschritte der durchgeführten Experimente und Datenanalysen.

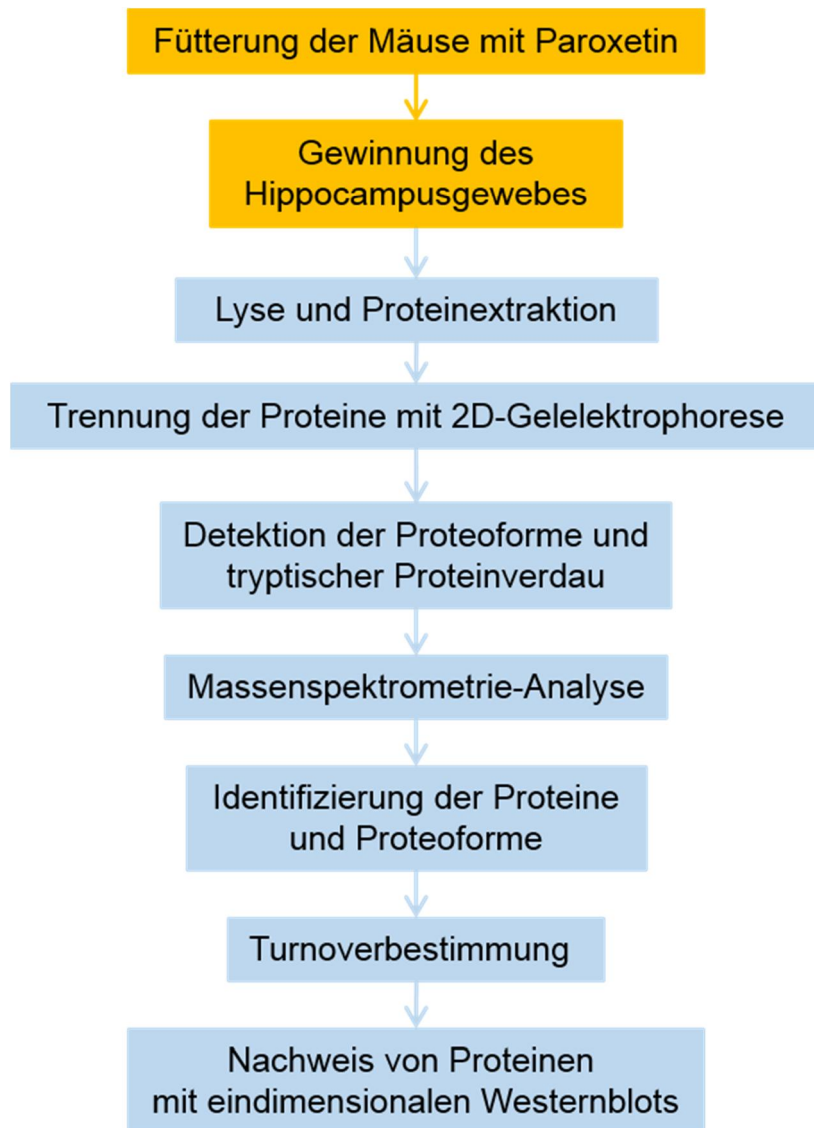


Abbildung 2: Schematischer Überblick über die durchgeführten Experimente

Die Abbildung ist eine Übersicht über den experimentellen Ablauf der durchgeführten Proteomuntersuchung der Hippocampi von Mäusen, die zuvor mit Paroxetin oder Vehikellösung behandelt wurden. Aus den Hippocampi wurden Proteine durch Extraktion gewonnen und durch 2D-PAGE aufgetrennt. Danach erfolgte ein tryptischer Proteinverdau der Proteoforme. Daran schloss sich eine massenspektrometrische Analyse an, bei der die Proteine identifiziert wurden. Die Turnover der Proteine und Proteoforme wurden bestimmt und zwischen Vehikel- und Paroxetinhippocampi verglichen. Einige Proteine mit unterschiedlichen Turnoverraten wurden zusätzlich mit eindimensionalen Western Blots nachgewiesen.

Gelb: Durchführung der Arbeitsschritte durch Dr. Christian Webhofer.

Blau: Eigenständige Durchführung der Arbeitsschritte.

3.3.1 Chronische Paroxetinbehandlung von Mäusen und Gewebeentnahme

Die Durchführung der Paroxetin-Verabreichung an die Mäuse und die Gewebeentnahme wurde von Dr. Christian Webhofer im Rahmen seiner Dissertation in unserer Forschungsgruppe ‚Proteomik und Biomarker‘ von 2009

bis 2013 durchgeführt (Webhofer, Gormanns et al. 2011, Filiou, Webhofer et al. 2012, Webhofer, Gormanns et al. 2013). Zum Verständnis der in dieser Arbeit durchgeführten Proteingewinnung aus Hippocampusgewebe und der anschließenden Analyse der Daten werden Dr. Christian Webhofers Arbeitsschritte hier kurz dargestellt.

Die Experimente fanden in Übereinstimmung mit dem European Communities Council Directive 86/609/EEC statt. Der Versuchsaufbau und die Protokolle wurden vom Amt für Verbraucherschutz und Veterinärswesen der Regierung von Oberbayern, Deutschland, kontrolliert und genehmigt.

Männliche DBA/2-Ola-Mäuse, die bei Erhalt acht Wochen alt waren, wurden ab Ankunft für zwei Wochen einzeln unter folgenden Standardlaborbedingungen gehalten: Essen und Wasser ad libitum mit zwölfstündigem Hell-Dunkel-Zyklus mit Licht ab 7.00 Uhr, 45-55% Luftfeuchtigkeit bei $21\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Die Mäuse erhielten eine chronische Paroxetingabe über vier Wochen. Nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase wurde den Mäusen zweimal täglich zwischen 8.00 und 9.00 Uhr bzw. 18.00 und 19.00 Uhr mit 10 mg/kg Paroxetin über eine Schlundsonde verabreicht. Den Vehikelmäusen wurde Leitungswasser zugeführt. Das Paroxetin wurde vor jeder Behandlung frisch mit Leitungswasser aufgelöst. Nach dreiwöchiger Behandlung erhielten die Mäuse für eine Woche statt der bisherigen 14N-Ernährung ein mit 15N-markiertes Futter.

Eine Stunde nach der letzten Dosisverabreichung wurden die Mäuse mit einer Überdosis Isofluran eingeschläfert. Die Organe wurden mit 0,9% eiskalter Salzlösung perfundiert, das Gehirn anschließend entnommen und präpariert. Die Hippocampi wurden mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

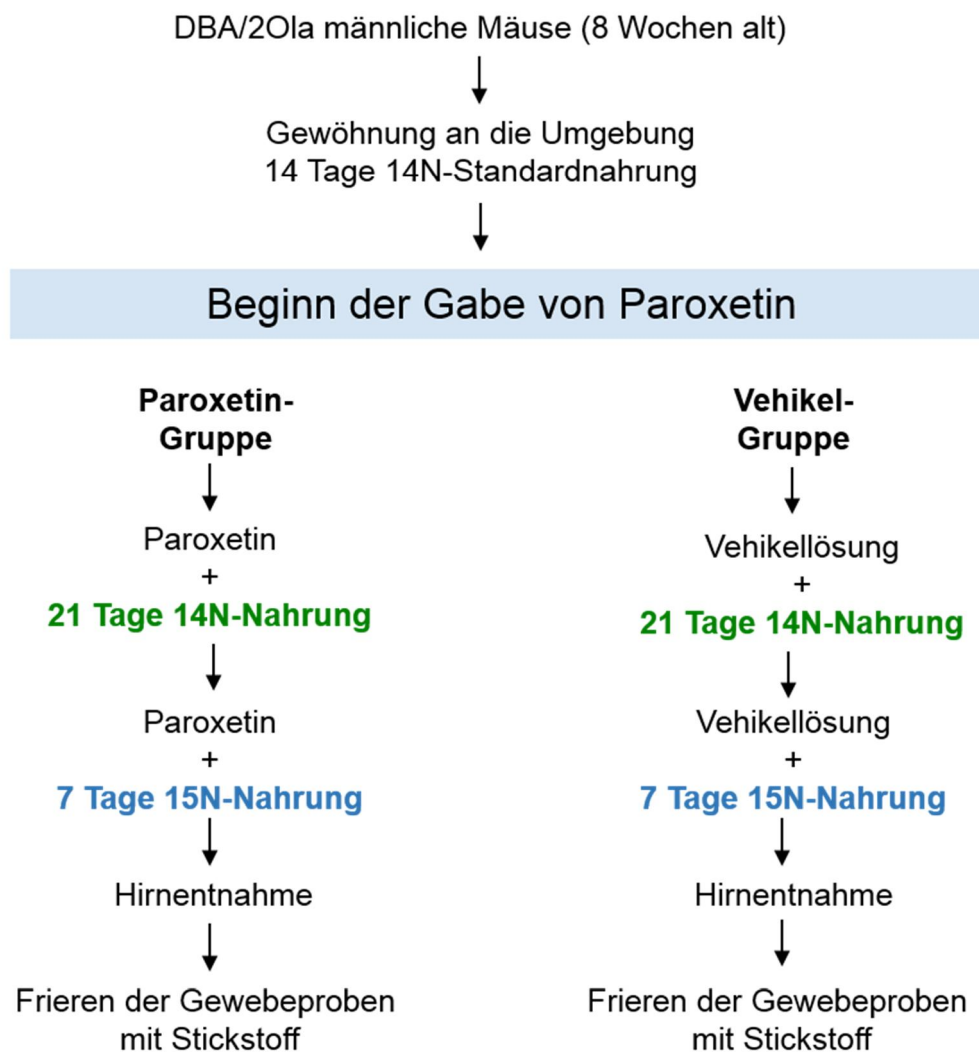


Abbildung 3: Arbeitsschritte von Dr. Christian Webhofer zur Behandlung der Mäuse mit Paroxetin

Die Fütterung der Mäuse mit Paroxetin und die Gewinnung der Gewebeprobe wurden 2010 von Dr. Christian Webhofer durchgeführt. Acht Wochen alte männliche DBA/2-Ola-Mäuse wurden für zwei Wochen einzeln unter Standardlaborbedingungen gehalten. Anschließend erhielt die Paroxetin-Gruppe zweimal täglich 10mg/kg Paroxetin über insgesamt vier Wochen. Der Vehikelgruppe wurde Leitungswasser zugeführt. Nach der dritten Behandlungswoche erhielten die Mäuse für eine Woche ein mit 15N markiertes Futter. Eine Stunde nach der letzten Dosis wurden die Mäuse mit einer Überdosis Isofluran eingeschläfert. Die Organe wurden mit 0,9% eiskalter Salzlösung perfundiert, das Gehirn entnommen und präpariert. Die Hippocampi wurden mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert (Webhofer, Gormanns et al. 2011, Filiou, Webhofer et al. 2012, Webhofer, Gormanns et al. 2013).

3.3.2 Proteingewinnung aus in vivo mit 15N partiell markiertem Hippocampusgewebe

Die Proteinextraktion der gefrorenen Hippocampi erfolgte mit Rehydrationspuffer (IEF-Puffer: 7M Urea, 2M Thiourea, 2% CHAPS, 100mM DTT). Für 100 mg Proteinmenge wurden 1 ml IEF-Puffer verwendet. Die

Biolyte, das Bromphenolblau und die Protease-Inhibitoren wurden erst nach Messung der Proteinkonzentration durch den Bradford Protein Assay hinzugefügt, da die Reagenzien die Proteinquantifizierung nach Bradford gestört hätten (Molloy 2000).

Bei Zugabe des IEF-Puffers wurden die Mäusehippocampi vorsichtig und schonend in der Flüssigkeit durch leichtes Mahlen mit dem Amersham grinding kit gelöst und anschließend im Ultraschalldisintegrator mit den Parametern Output control 4 und Duty cycle 40 sonifiziert. Insgesamt wurden pro Probe 30 Zyklen durchgeführt. Die homogenisierten Hippocampi wurden in der Tischzentrifuge zehn Minuten lang bei 4°C mit 1400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Röhrchen überführt und die Niederschläge verworfen. Von jedem Überstand wurde Probe für die Proteinbestimmung nach Bradford entnommen.

Mit dem Rehydrationspuffer wurden die Proteine sowohl aus dem Zytoplasma als auch aus Zellorganellen neuronaler und glialer Zellen im Hippocampus gelöst. Den Überständen wurden die Protease-Inhibitoren (5% 25%-fach konzentrierter Complete C Inhibitor, 0,2% 40%-Biolyte, 100mM PMSF, 1µM Pepstatin, 0,002% Bromphenolblau) zum Schutz der Proteine in der Probe zugegeben. Die Proben wurden in Aliquoten bei -80°C eingefroren.

3.3.3 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Proben ohne Protease-Inhibitoren, Biolyte und Bromphenolblau wurde mittels des Bradford Protein Assays bestimmt (Bradford 1976). Die Proben wurden zuvor 10-fach mit destilliertem Wasser verdünnt (20µl Probe, 180µl a.d.). Ein Aliquot der verdünnten Probe (10µl), deren Proteinkonzentration bestimmt werden sollte, wurde mit destilliertem Wasser auf 800µl aufgefüllt.

Um die unbekannte Proteinkonzentration messen zu können, wurde eine Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. Die Konzentration der Standardlösung betrug 0, 1, 2, 4, 6, 10 und 15 µg/µl. Nach Zugabe von 200µl Bradford-Reagenz wurden die Proben in einem Vortexgerät durchgemischt und für fünf Minuten in Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Standard- und die Mausproben bei $\lambda=595\text{nm}$ im Spectrophotometer photometrisch gemessen. Mit den Werten der Standardlösung konnte eine Eichkurve erstellt werden, anhand derer die Proteinmenge und -konzentration der Proben ermittelt

wurden. Die Proben wurden zweimal gemessen und der Mittelwert der beiden Ergebnisse berechnet. Dabei wurde darauf geachtet, dass in keinem Fall die Abweichung der Ergebnisse größer als 5% war.

3.3.4 Auftrennung und Detektion der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine mittels der 2D-PAGE wurden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrer molekularen Größe getrennt (Klose 1975, O'Farrell 1975, Klose and Kobalz 1995).

3.3.4.1 Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension

Es wurden 11 cm lange „immobilized pH gradient strips“ (IPG-Strip) mit einem pH-Bereich von vier bis sieben verwendet. IEF-Puffer (siehe oben) wurde zu 100µg Probenprotein hinzugefügt, so dass auf einen IPG-Strip 200µl, bestehend aus Probe und IEF-Puffer, geladen werden konnten. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Rehydratation in der IEF-Zelle bei einer Spannung von 50V über 12 Stunden durchgeführt. Dazu wurden die IPG-Strips mit Mineralöl benetzt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach der Rehydratationsphase wurden die Proteine über einen Zeitraum von 15 Minuten bei einer Spannung von 250V, dann 3 Stunden lang bei 10000V und anschließend bis zu einer Spannung von 60000V auf dem IPG-Strip an ihrem isoelektrischen Punkt fokussiert. Die mit Protein beladenen IPG-Strips wurden bei -80°C gelagert.

3.3.4.2 Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Größe wurden 1,0 mm dicke 12%-Acrylamidgele in Criteriongelkassetten verwendet. Die Größe der Gele betrug 13,3 x 8,7 cm. Zur vollständigen Polymerisation wurden die Gele einen Tag vor Gebrauch gegossen und in schützenden feuchten Tüchern im Kühlschrank bei +4°C über Nacht aufbewahrt.

Am Tag nach dem Gießen der Polyacrylamidgele wurden die IEF-Streifen der ersten Dimension für zehn Minuten bei Raumtemperatur zuerst in Äquilibriumspuffer (50mM 1,5M-Tris-HCl pH8,8, 6M Urea, 30% Glycerin, 2%

SDS, 3 Tropfen Bromphenolblau zum Anfärben) mit 2% Dithiothreitol und anschließend in Äquilibrierungspuffer mit 2 % Iodoacetamid inkubiert.

Danach wurden die IPG-Strips in TGS-Puffer (10% 10-fach konzentriertes TGS, 90% a.d.) gelegt. Pro Criteriongel wurde ein IPG-Strip verwendet. Die Elektrophoresekammer wurde mit TGS-Puffer gefüllt und die Gele eingebaut. Die Gele wurden mit flüssiger 0,5%-Agarose (0,5% Agarose, 0,5% Bromphenolblau, 99% 1%-TGS-Puffer) bedeckt. Die IPG-Strips wurden luftblasenfrei so in die Agarose eingelegt, dass während der Elektrophorese die fokussierten Proteine von den Streifen auf die Gele übertragen und je nach molekularem Gewicht aufgetrennt werden. Zur Darstellung der molekularen Größe der Proteine wurden pro Gel 6µl nichtgefärbter Precision-Plus-Proteinstandardmarker in eine Vertiefung am linken Rand des Gels hinzugegeben. Es wurde zunächst eine Spannung von 50V für 30 Minuten und danach von 180V angelegt. Der Lauf wurde beendet, sobald die Agarose die untere Kante des Gels erreicht hatte.

3.3.4.3 Coomassie-Färbung der 2D-Gele

Zur Sichtbarmachung der Protein-Spots wurden die Gele mit Coomassie Blue G gefärbt (Neuhoff, Arold et al. 1988). Zuerst wurden für jeweils eine Stunde die mit Proteinen beladenen Gele in 120ml Fixierlösung (Ethanol 30%, 2% 87%-Phosphorsäure, 68% a.d.) fixiert, in destilliertem Wasser gewaschen und dann in Färbelösung (17% Ammoniumsulfat, 2% 87%-Phosphorsäure, 34% Methanol, 47% a.d.) gelegt. Anschließend wurden 120mg Coomassie Blue G mit einer Konzentration von 1 mg/ml auf die Oberfläche der Gele gestreut. Die Gele wurden so für vier Tage bei Raumtemperatur auf einem langsamen Schüttelgerät inkubiert, eine Stunde mit destilliertem Wasser gewaschen und dann im Scanner mit PDQuest 2-D Software eingescannt.

3.3.5 Massenspektrometische Analyse von Proteinen

Vor der Analyse der Proteinpunkte wurden die Gele anhand der Scanfotos visuell auf Proteoforme und Unterschiede zwischen Vehikel- und Paroxetinhippocampi untersucht. Proteoforme und unterschiedliche Spots wurden für jedes Gel mit den gleichen Nummern versehen.

3.3.5.1 Enzymatische Proteinspaltung und Peptidextraktion

Zur Proteinspaltung wurden beim In-Gel-Verdau die Gelstücke entfärbt und die darin enthaltenen Proteine enzymatisch mittels Trypsin in Peptide gespalten und aus den Gelstücken extrahiert (Rosenfeld, Capdevielle et al. 1992).

Die Proteinpunkte wurden manuell aus den Gelen ausgeschnitten. Dazu wurden Pipettenspitzen mit unterschiedlichen Durchmessern verwendet, mit denen die Proteinpunkte aus den Gelen herausgelöst werden konnten. Die Gelpunkte wurden zweimal in mit den entsprechend korrespondierenden Proteinpunktnummern versehenen Röhrchen mit 20µl von 2D-Spot-Entfärbelösung (10mM Ammoniumbicarbonat (ph=8.0) und 50% Acetonitril) entfärbt und für jeweils 30 Minuten geschüttelt. Das Acetonitril wurde zur Verminderung der Bindung der Peptide an die Pipetten- und Röhrchenoberfläche verwendet (Erdjument-Bromage, Lui et al. 1998). Zum Trocknen der Gelpunkte wurden die Röhrchen für fünf Minuten geöffnet gelassen. Anschließend wurden 5µl Trypsin mit einer Konzentration von 10 ng/µl in 1mM Ammoniumbicarbonat zu den Gelstücken gegeben, für 15 Minuten bei 4°C gelagert und danach unter leichtem Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert.

Um den Trypsinverdau zu beenden, wurden die Gelspots kurz zentrifugiert und in 1µl Lösung aus 2% Ameisensäure und 50% Acetonitril bei Raumtemperatur für 20 Minuten geschüttelt. Danach wurden die Proben fünf Minuten lang im Ultraschallbad behandelt und wieder kurz zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde abgenommen. Diese Schritte wurden anschließend zweimal mit 5µl Lösung aus 1% Ameisensäure und 50% Acetonitril wiederholt. Bei der Extraktion der Peptide aus den Gelstücken wurden somit dreimal Überstände abgenommen und als eine flüssige Peptidfraktion pro Gelstück gesammelt. Der Peptidüberstand wurde in der Gefriertrocknungszentrifuge lyophilisiert und anschließend in 12µl 0,1%iger Ameisensäure gelöst. Um Kontaminationen während der Messung im Massenspektrometer zu vermeiden, wurden die Proben in der Zentrifuge mit 3000g Umdrehungen bei 4°C für zwei Minuten in Filtrerröhrchen filtriert. Die filtrierten Lösungen wurden bis zu ihrer Analyse im MS in Microvials bei -20°C aufbewahrt.

3.3.5.2 Identifikation der Proteine anhand von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Die Proteoforme wurden mit einem Flüssigkeitschromatographie-Tandem-MS-System (LC-MS/MS-System) analysiert. Es besteht aus einer 2D nano-HPLC und einem direkt daran gekoppelten LTQ Orbitrap XL.

Über den Probennehmer wurden 10 µl der Peptidlösung in die Probenschleife injiziert. Bei sehr intensiv angefärbten Gelpunkten mit einer hohen Proteinmenge wurden nur 5 µl untersucht. Pro Probe dauerte die komplette LC-MS/MS-Untersuchung 65 Minuten mit kurzem Gradienten.

Zuerst wurden die Proben für 10 Minuten mit 0,1% Ameisensäure bei 3 ml/min (5 µm Zorbay-C18 Vorsäule, 300 µm x 5 mm) entsalzt und in der Hauptsäule, einer C18-Trennsäule (3 µm PicoFrit-Trennsäule, 75 µm x 15 cm) aufgetrennt. Im LC-Kanal wurde bei einer gesamten Flußrate von 200 nl/min zur Lösung der Peptidionen ein Gradient zwischen Lösung A (0,1% Ameisensäure) und Lösung B (95% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) aufgebaut. Nach dem Laden der Probe folgte ein Gradientenabfall von 85% auf 42% von Lösungsmittel B von Minute 0 bis 5, anschließend von 42% B auf 0% B von Minute 5 bis 16. 0% B wurde bis Minute 24 beibehalten. Dann erfolgte ein Gradientenanstieg von 0% B auf 85% B von Minute 24 bis 25. 85% B wurde für 7 Minuten beibehalten, um die Säule zu reäquilibrieren.

Die Peptide wurden mittels ESI protoniert und kontinuierlich in ein elektrisches Feld gesprüht, mittels Elektrospray in die Gasphase übertragen und über den oben beschriebenen Spannungsgradienten durch eine Transferkapillare ins Massenspektrometer geleitet. Im LTQ-Orbitrap wurden MS/MS-Spektren in der linearen Ionenfalle detektiert. Die Spektren wurden in einem Massenbereich von 380-1600 m/z bei einer Auflösung von R=60000 (bei m/z400) aufgenommen. Die MS/MS-Analysen der fünf intensivsten Peptidionen pro Scan wurden im ‚centroid mode‘ erfasst. In der verwendeten Methode mit Xcalibur Software wurden positiv- und negativgeladene Peptide (ESI-Spannung für positivgeladene Peptide +4900V, für negativgeladene Peptide -4500V) gemessen, um basierend auf den ermittelten m/z-Verhältnissen die zugehörigen Proteine zu identifizieren (Filiou, Zhang et al. 2011, Webhofer, Gormanns et al. 2013).

Nach jeder vierten Probe wurde eine leere Probe gelesen, um eventuelle Peptidrückstände, die in Teilen des nano-HPLC-Systems wie der Trennsäule

stecken bleiben können, herauszuwaschen. Außerdem wurden die nummerierten Proteinpunkte nicht in Reihenfolge untersucht, sondern nur Proteinpunkte aufeinanderfolgend untersucht, die auf dem Gel weit voneinander lokalisiert waren. Zudem wurden die vier Proben, die nacheinander gemessen wurden, von niedrigster bis höchster Intensität angeordnet. All diese Maßnahmen dienten dazu, Fehlerquellen in der Identifizierung von Peptiden und deren Zuordnung zu den 2D-Spots zu minimieren.

Das System wurde regelmäßig über die Quantifizierung von hausinternen *Escherichia coli*-Bakterien auf Präzision überprüft.

3.3.6 Datenverarbeitung und Proteinidentifikation

Zuerst wurden die in Xcalibur gespeicherten unverarbeiteten MS Daten der Probenanalyse mit der Software Bioworks als MSn Scans und mzDataFiles gespeichert und im xml-Format exportiert (Eng, McCormack et al. 1994). Für die erstellten xml-Daten konnte die Proteindatenbanksuche von Mascot Daemon durchgeführt werden (Perkins, Pappin et al. 1999). Bei der Mascot-Datenbanksuche wurden standardmäßig die statische Modifikation Carbamidomethylierung von Cystein und die variablen Modifikationen Oxidation von Methionin, Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin, und Acetylierung von Lysin und dem N-terminus der Proteine ausgewählt. Da der In-Gel-Verdau mit Trypsin durchgeführt wurde, wurde als Enzymspezifität Trypsin verwendet und es wurden maximal zwei Fehlsplattungen (Misscleavages) zugelassen. Als Datenbank diente der Mascot-Suchmaschine SwissProt (TheUniprotConsortium 2017) mit zum Zeitpunkt der Datenanalyse 549215 geprüften Einträgen. Die Suchergebnisse wurden mit einer Signifikanzschwelle von $p < 0.05$, Ion score cut-off von 20 und maximaler Anzahl an Treffern sowohl als Peptid- als auch als Proteinliste exportiert. In der Peptidliste wurden die Modifikationen der Peptidsequenzen aufgeführt. Zum Vergleich der Proteoforme zwischen Vehikel- und Paroxetinmäusen wurde eine Liste mit allen relevanten Proteinergebnissen, die nach Gel und nach Nummern der Proteinpunkte sortiert war, erstellt.

3.3.7 Bestimmung des Turnovers von Proteinen

Nach der Identifizierung der Proteine wurden die mit MS erhobenen Daten zur Bestimmung des Turnovers verwendet. Mittels der unverarbeiteten Raw-Ordner der einzelnen Protein-Spots und der Ergebnisse aus der Mascot-Datenbanksuche konnte in der hausintern entwickelten ProTurnyzer Software der Turnover berechnet werden (Zhang, Reckow et al. 2011). Die ProTurnyzer Software nutzt die metabolische Markierung mit dem stabilen Isotop ^{15}N zur Errechnung des Turnovers. Sie berechnet die mit ^{15}N markierte Peptidfraktion (LPF) für jedes identifizierte Peptid und vergleicht sie mit der Menge an unmarkiertem Peptid. Die LPF ist dabei ein Maß für den Auf- und Abbau von Proteinen.

Nach Berechnung der LPF mit der ProTurnyzer Software wurden manuell Peptide herausgefiltert, die keine saubere isotopologische Verteilung der ^{14}N - und ^{15}N -Anteile aufwiesen. Da pro Protein mehrere Peptidsequenzen gefunden wurden, wurde für jedes Protein der Mittelwert der gefundenen partiell markierten Peptidfraktionen gebildet und das Ergebnis exportiert. Die Turnoverunterschiede zwischen der Vehikel- und der Paroxetingruppe wurden als Mittelwert \pm Standardfehler mittels ungepaartem einseitigem Student-T-Test in GraphPad Software berechnet und als Box-Diagramme dargestellt. Das Konfidenzintervall wurde auf 95% und der Signifikanzwert auf $p < 0.05$ festgesetzt.

3.3.8 Nachweis von Proteinen mit Western Blots

Mit Western Blots (WB) wurden einzelne Proteine, deren Proteoforme signifikante Turnoverunterschiede zeigte, in ihrer Gesamtquantität zwischen Vehikel- und Paroxetingruppe verglichen.

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Größe wurden 1,5 mm 12%-Acrylamidgele in Mini-Protean-Gel-Kassetten verwendet. Die Größe der Gele betrug 8,6 x 6,7 cm. Es wurden Kämme mit 15 Taschen in die Gele eingebracht. Zur vollständigen Polymerisation wurden die Gele einen Tag vor Gebrauch gegossen und in schützenden feuchten Tüchern im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ über Nacht aufbewahrt.

Die Elektrophoresekammer wurde mit TGS-Puffer gefüllt und die Gelkassetten eingebaut. Es wurden in jeweils eine Geltasche 30 μg des Proteingemischs der sechs verschiedenen Proben (drei Vehikel- und drei Paroxetinproben) auf das

Gel geladen. Zur Kontrolle der Größe der zu detektierenden Banden wurden in die Vertiefung am linken Rand 6 µl gefärbter Protein-Plus-Protein-Standardmarker hinzugegeben. Zunächst wurde eine Spannung von 50 Volt für eine halbe Stunde und danach von 180 Volt angelegt. Der Lauf wurde beendet, wenn die Proteine sich bis zum unteren Rand hin auf dem gesamten Gel verteilt hatten. Anschließend wurden die Proteine mittels Elektrophorese vom Gel auf eine PVDF-Transfermembran übertragen. Dazu wurde die Elektrophoresekammer mit Transferpuffer (12 g Tris Base, 60g Glycin, 800ml Methanol, 3200ml a.d.) gefüllt, das Gel und die Transfermembran in Whatman-Filterpapiere eingebettet und von Gelhaltekassetten zusammengepresst. Es wurde für etwa zwei Stunden eine Spannung von 200 Volt angelegt. Um starkes Überhitzen zu vermeiden, wurde die Kammer während des Transfers in eine mit Eis gefüllte Wanne gestellt. Anschließend wurde die PVDF-Membran für eine Stunde in 50 ml TBS-T-Lösung (50mM Tris Base, 150mM NaCl, HCl bis pH=7,6 beimischen, 0,05% Tween20) mit 5% Milchpulver sanft geschüttelt. Die Membran wurde mit dem ersten Antikörper gegen ausgewählte Proteine in den jeweiligen Konzentrationen in 10 ml TBS-T-Lösung mit 5% Milchpulver versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Membran dreimal kurz mit TBS-T-Lösung gewaschen und zweimal für jeweils eine Viertelstunde in TBS-T-Lösung geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend verworfen. Danach wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (gegen die Fc Region des ersten Antikörpers) in 10 ml TBS-T-Lösung mit 5% Milchpulver versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran den gleichen Waschschritten mit TBS-T wie bereits nach dem ersten Antikörper unterzogen. Anschließend wurde die Membran für etwa 60 Sekunden mit 4 ml Luminata Forte inkubiert und Bilder von der Proteinbande mit chemilumineszenten Signal im ChemiDoc Scanner mit ImageLab Software gemacht. Dazu wurden folgende Parameter verwendet: Chemi High Sensitivity, Signal Accumulation Mode: 12 pictures, 5 – 60 seconds. Die Proteinbande wurde in ein Foto der ganzen Membran eingefügt (Parameter: Colorimetric, 1 picture) und als .tif-Bild gespeichert.

Zur Normalisierung der Signalstärke der einzelnen Banden wurde die Membran für 30 Minuten in Coomassiefärbelösung (6,5% Isopropanol, 12,5% Essigsäure, 0,03% Coomassie stain) geschüttelt, kurz für ein paar Sekunden in Entfärbelösung (50% Methanol, 40% a.d., 10% Essigsäure) geschüttelt und mit

der Colorimetric-Einstellung im ChemiDoc fotografiert. Dadurch wurden alle Proteine der einzelnen Proben sichtbar gemacht und über die Signalstärke der Banden überprüft, dass von allen Mäusehippocampi die gleiche Proteinmenge genommen wurde.

Mit der Software ImageJ wurde das Verhältnis aus Intensität einer Proteinbande von einer Probe und Intensität der Gesamtproteinmenge, die durch die Anfärbung mit Coomassie berechnet werden konnte, gebildet. Dank dieser Normalisierung konnten die sechs Proben untereinander in ihrer Proteinmenge verglichen werden. Für beide Gruppen (Vehikel und Paroxetin) wurde so der Mittelwert \pm Standardfehler pro Bande berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Proteom-Analyse von Mäusehippocampi nach chronischer Paroxetingabe

Es wurden drei Hippocampi von mit Paroxetin behandelten Mäusen mit drei Hippocampi von Vehikelmäusen verglichen. Die Vehikelmäuse wurden als cv16.3, cv17.3 und cv20.3 bezeichnet, die mit Paroxetin behandelten Mäuse als cp8.3, cp24.3 und cp25.3. Insgesamt wurden jeweils 68 Protein-Spots gefunden, die auf allen 2D-Gelen vorhanden waren. Daraus ergaben sich bei der MS-Analyse der Spots 3375 Proteine aus Zytoplasma und Zellorganellen von Neuronen und Gliazellen. Davon hatten 43 Proteine Proteoforme. Pro Spot wurde meist eine Mehrzahl an unterschiedlichen Proteinen identifiziert.

Proteine und Proteoforme, die nicht in allen sechs Gelen mit mindestens zwei Peptidsequenzen gefunden wurden, wurden nicht weiter analysiert.

4.1.1 Proteindarstellung durch 2D-Gelelektrophorese

Insgesamt wurden sechs 2D-Gele erstellt, auf denen aus den jeweiligen Hippocampi extrahierte Proteine in Form von Spots dargestellt sind (siehe Anhang, Kapitel 8.1 2D-Gele der Vehikel und Paroxetinhippocampi). Je größer und intensiver angefärbt ein solcher Spot war, desto mehr Proteine beinhaltete er oder desto größer war die Menge eines Proteins an dieser Stelle auf dem Gel.



Abbildung 4: 2D-Gel des Hippocampus einer Paroxetinmaus

In der 2D-Gelelektrophorese wurde das gesamte Protein in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung mit einem 11 cm langen IPG-Strip mit einem pH-Gradienten von 4 bis 7 horizontal aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine entlang ihres molekularen Gewichts (in kDa) in einem 12%-Acrylamidgel separiert. Ein Proteinstandardmarker wurde zur Identifizierung des Molekulargewichts der Proteine verwendet. Die Intensität der angefärbten Protein-Spots korreliert mit der Menge des Proteins. Das 2D-Gel ist von Maus cp24.3.

In der 2D-PAGE wurden die Protein-Spots vertikal nach ihrem molekularen Gewicht (in kDa) und horizontal nach pH-Gradienten (von pH=4-7) aufgetrennt. Damit wurden Proteoforme sichtbar, die sich nebeneinander auf einer Höhe auf dem 2D-Gel befinden. Sie ähneln sich in ihrem molekularen Gewicht, aber unterscheiden sich durch ihre PTMs im pH-Wert.

Anhand der Position der Spots auf den 2D-Gelen wurden Proteoforme und einzelne Proteine zur weiteren MS-Analyse ausgewählt.

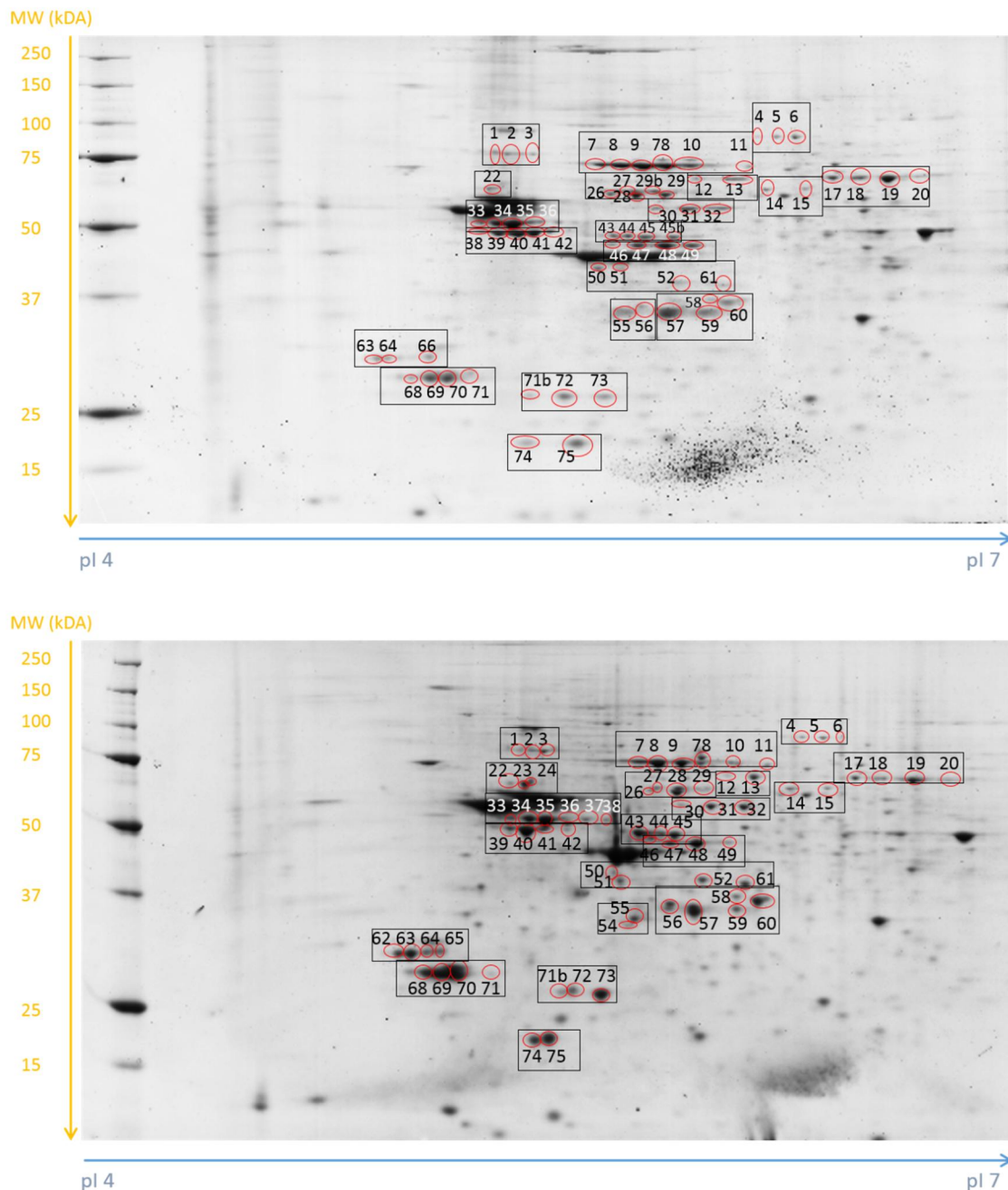


Abbildung 5: Markierte Protein-Spots der 2D-Gele einer Vehikel- und Paroxetinmaus

Auf dem oberen 2D-Gel sind die für die MS-Analyse ausgewählten Spots mit Proteoformen der Vehikelgruppe (Maus cv16.3), auf dem unteren die der Paroxetingruppe (Maus cp8.3) rot umrandet und nummeriert dargestellt (X-Achse: pI = isoelektrischer Punkt, Y-Achse: MW = Molekulares Gewicht in kDA). Links im Gel ist der ungefärbte Precision Plus Proteinstandardmarker als Markierung für das MW eingelassen. Nicht alle der hier dargestellten Spots brachten Ergebnisse, da mittels MS nicht für alle Spots jeden 2D-Gels Proteine identifiziert wurden. Insgesamt wurden nach Auswertung der Proteinergebnisse 68 Spots pro Gel erfolgreich in allen Gelen verglichen.

4.1.2 Massenspektrometrie-Analyse der Proteine

Die auf den 2D-Gelen gefundenen Protein-Spots wurden mittels MS analysiert. Die MS Daten wurden zur Identifikation der Proteine mit der MASCOT

Database Search Software untersucht. Um falsch erkannte oder unsichere Proteinergebnisse aus der Auswertung herauszufiltern, wurden in der Auswertung nur diejenigen Proteine berücksichtigt, die mit mindestens zwei Peptidsequenzen bei der Proteindatenbanksuche mit MASCOT Daemon gefunden wurden. Durch Kontamination mit humanen oder murinen Zellbestandteilen während der Probenprozessierung wurden in einigen Proben Kreatin gefunden, das nicht in die Auswertung mitaufgenommen wurde.

4.1.3 Nachweis von Proteinen durch Western Blots

Nach der Analyse der Daten wurden einzelne Proteine, deren Proteoforme signifikant unterschiedliche Turnoverergebnissen hatten, durch WB nachgewiesen. In den WB wurde die Gesamtmenge des zu bestimmenden Proteins gemessen und zwischen Vehikel- und Paroxetinmäusen verglichen. Proteoforme spielten dabei keine Rolle, da die Proteine eindimensional nach molekularem Gewicht aufgetrennt wurden. Die Ergebnisse der WB der Proteine 14-3-3 η , Mitofilin und Saures Gliafaserprotein werden im Kapitel 4.3 dargestellt.

4.2 Auswertung der post-translationalen Modifikationen und Unterschiede der Spotintensitäten

Unterschiede in den PTMs zwischen Vehikel- und Paroxetingruppe konnten bei Vergleich der in beiden Gruppen vorhandenen Proteoforme nicht identifiziert werden. Beim visuellen Abgleich der Spotintensitäten zur Detektion von quantitativen Unterschieden der Proteinexpression zwischen den Gruppen waren ebenfalls keine Unterschiede feststellbar.

4.3 Turnoverbestimmung von Proteoformen und einzelnen Proteinen

Insgesamt hatten nach der Analyse und Berechnung des Turnovers mit ProTurnyzer Software (Zhang, Reckow et al. 2011) zehn Proteine einen signifikanten Turnoverunterschied ($p < 0.05$) zwischen Vehikel- und Paroxetinmäusen in mindestens einer analysierten Proteoform.

Durch unvollständige Ergebnisse aus der ProTurnyzer-Analyse bei nicht ausreichender Markierung mit ^{15}N konnte für manche Proteine kein Turnover berechnet werden.

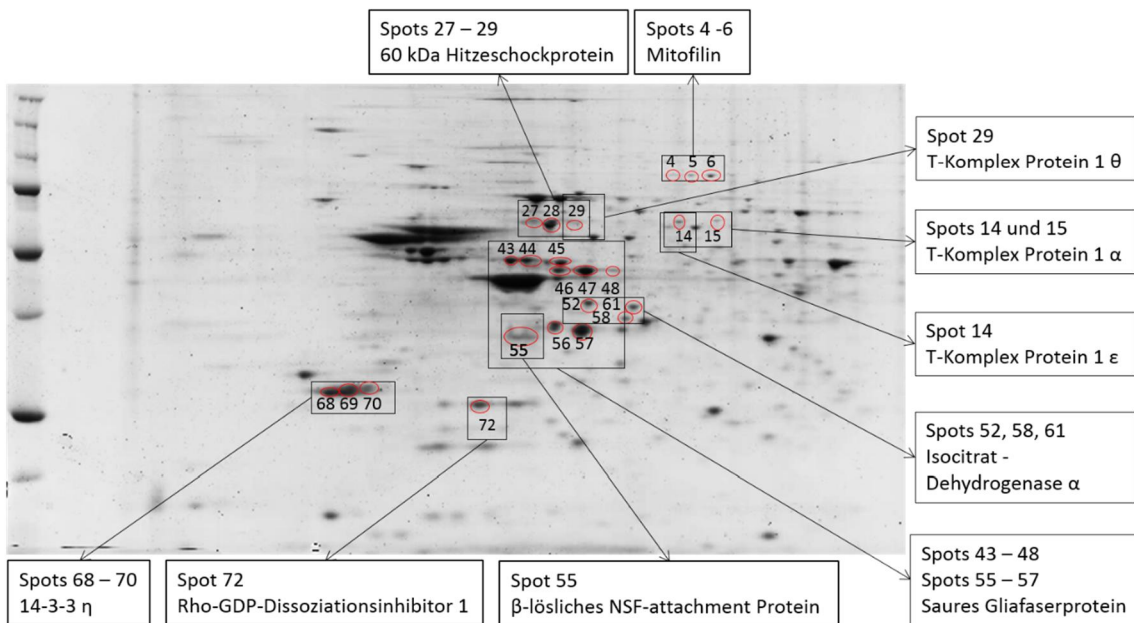
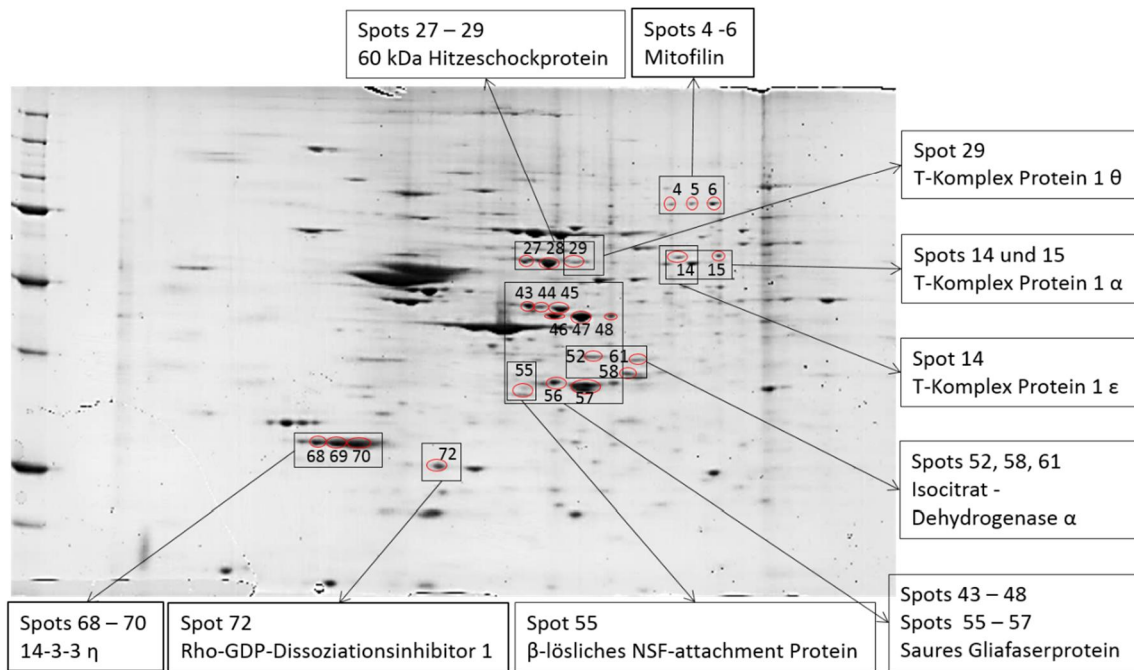


Abbildung 6: Übersicht über Protein-Spots auf 2D-Gelen mit signifikanten Turnoverunterschieden

Das obere Bild zeigt das 2D-Gel von Vehikelmaus cv20.3, das untere das von Paroxetinmaus cp25.3. Markiert sind die 2D-Spots mit Proteinen, die in mindestens einem Proteoform einen signifikanten Turnover zwischen Kontroll- und Paroxetingruppe zeigten. Die Proteine Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor 1 und β -lösliches NSF-attachment Protein wurden nur in einem Spot gefunden, das heißt zu diesen beiden Proteinen gibt es keine Proteoforme. Augenscheinliche Unterschiede in der Proteoformexpression zwischen Vehikel und Paroxetin auf diesen zwei Gelen konnten in den anderen 2D-Gelen nicht reproduziert werden.

<i>Protein</i>	<i>Kürzel</i>	<i>UniProt- Eintragungsnummer</i>	<i>Proteoforme gesamt / Proteoforme mit Turnoverunterschied</i>	<i>Theoret. MW (kDa) / pI</i>
Zellzyklus, -Überleben und Wachstum				
14-3-3 η	1433F	P68510	3 / 2	28.2 / 4.81
Mitofilin	IMMT	Q8CAQ8	3 / 1	83.9 / 6.18
Rho GDP- Dissoziationsinhibitor 1*	GDIR1	Q99PT1	1 / 1	23.4 / 5.10
Energiestoffwechsel				
Isocitrat- Dehydrogenase α	IDH3A	Q9D6R2	3 / 1	39.6 / 6.27
Chaperone				
60kDa Hitzeschockprotein T-Komplex Protein 1	CH60	P63038	3 / 2	61.0 / 5.91
Untereinheit α	TCPA2	P11983	2 / 1	60.4 / 5.82
Untereinheit ϵ^*	TCPE	P80316	1 / 1	59.6 / 5.71
Untereinheit θ^*	TCPQ	P42932	1 / 1	59.5 / 5.43
Neurotransmittertransport				
β -lösliches NSF- attachment Protein*	SNAB	P28663	1 / 1	33.6 / 5.32
Astrozytäre Aktivität				
Saures Gliafaserprotein	GFAP	P03995	9 / 2	49.9 / 5.28

Tabelle 8: Übersicht der Proteine mit Unterschieden im Turnover

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die zehn Proteine mit signifikanten Turnoverunterschieden zwischen Vehikel- und Paroxetinmäusen in mindestens einer Proteoform. Gezeigt werden Proteinname, Uniprot-Kürzel des Proteins, die Uniprot-Eintragungsnummer in der Datenbank, die Anzahl an gefundenen Proteoformen pro Protein und die Anzahl an Proteoformen mit signifikant unterschiedlichen Turnoverraten. Das theoretische Molekulargewicht (MW in kDa) und der isoelektrische Punkt (pI) für die Proteine wurden über das ‚Swiss-Prot compute pI/MW tool‘ berechnet (http://expasy.org/tools/pi_tool.html). Geringe Abweichungen der berechneten MW und pI von den Ergebnissen der 2D-Gele sind möglich. Die mit * gekennzeichneten Proteine haben keine Proteoforme, sondern wurden nur in einem Spot auf den 2D-Gelen gefunden.

Protein	Spot	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Score	Protein Coverage (%)	LPF (Par)	LPF (Veh)	Signifikanzwert	Turnoverunterschied (%)
Zellzyklus, -Überleben und Wachstum								
1433F	68	37	419	31	45	29	p=0.0041 **	54 ↑
	69	47	581	39	59	49	p>0.05	
	70	56	779	49	63	52	p=0.0155 *	20 ↑
IMMT	4	45	793	39				
	5	60	1106	43	15	2,9	p=0.0012 **	425 ↑
	6	49	838	39	14	13	p>0.05	
GDIR1	72	25	617	47	25	19	p=0.0169 *	29 ↑
Energiegewinnung								
IDH3A	52	109	2654	43				
	58	10	245	21	15	13	p>0.05	
	61	44	960	41	29	21	p=0.0186 *	33 ↑
Chaperone								
CH60	27	50	1326	48	4	5,6	p=0.0126 *	29 ↓
	28	123	3147	56	10	8,6	p=0.0184 *	15 ↑
	29	72	1874	49	8	6,6	p>0.05	
TCP1								
TCPA2	14	24	608	36	26	21	p=0.0156 *	24 ↑
	15	39	945	41	47	45	p>0.05	
TCPE	14	48	842	48	42	39	p=0.0318 *	6 ↑
TCPQ	29	13	355	22	47	38	p=0.025 *	25 ↑
Neurotransmittertransport								
SNAB	55	31	811	56	42	33	p=0.0018 **	28 ↑
Astrozytäre Aktivität								
GFAP	43	93	1821	60	34	11	p=0.0284 *	206 ↑
	44	35	723	44	39	12	p=0.0013 **	214 ↑
	45	29	635	29	25	19	p>0.05	
	46	33	658	47				
	47	14	304	25				
	48	17	344	32				
	55	18	413	27	27	10	p>0.05	
	56	9	227	16				
57	7	174	13					

Tabelle 9: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse der Proteine mit Turnoverunterschieden

Die Spots beziehen sich auf die Nummerierung der 2D-Gele und entsprechen der Anzahl der Proteoforme pro Protein. Anzahl identifizierter Peptide, Protein Score, Protein Coverage (%) und LPF sind jeweils der Mittelwert der sechs untersuchten Mäusehippocampi. Der Protein Score kombiniert alle erhobenen MS-Daten, die zu Aminosäuresequenzen eines Proteins passen. Je höher der Score ist, desto sicherer ist die Übereinstimmung der experimentellen MS Daten mit Datenbankeinträgen. Die Anzahl der identifizierten Peptide gibt die Zahl der gefundenen passenden Peptidsequenzen zum zugehörigen Protein an. Die Protein Coverage gibt in Prozent an, wie viel von der Proteinsequenz identifiziert wurde. Der Turnoverunterschied (%) gibt an, um wie viel Prozent der Paroxetinturnover im Vergleich zur Kontrollgruppe verändert ist. Die Pfeile beziehen sich darauf, ob der Turnover in Paroxetinmäusen erhöht oder erniedrigt ist. Signifikante Ergebnisse sind dunkelblau hervorgehoben (* p<0.05, ** p<0.01). Bei Proteoformen, für die die LPF nicht berechnet werden konnte, fehlt LPF, Signifikanzwert und Turnoverunterschied.

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse für die zehn Proteine 14-3-3 η , Mitofilin, Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor 1, Isocitrat-Dehydrogenase α , 60kDa Hitzeschockprotein, T-Komplex Proteine 1 α , ϵ und θ , β -lösliches NSF-attachment Protein und Saures Gliafaserprotein mit signifikanten Turnoverunterschieden in mindestens einem 2D-Spot detailliert dargestellt.

4.3.1 Zellzyklus, -Überleben und Wachstum

4.3.1.1 Protein 14-3-3 η

Das etwa 28 kDa große Protein 14-3-3 η (1433F) gehört zur Familie der 14-3-3 Proteine mit sieben Isoformen, die in jeder eukaryoten Zelle vorhanden sind. Das heißt, die hier gefundenen 14-3-3 Proteine können sowohl aus Neuronen als auch aus Gliazellen gewonnen sein. Die 14-3-3 Familie bindet an eine Vielzahl von Signalproteinen, reguliert den Zellzyklus und spielt eine anti-apoptotische Rolle (Fu, Subramanian et al. 2000, van Hemert, Steensma et al. 2001, Darling, Yingling et al. 2005). Auch in der hier vorliegenden Proteomuntersuchung wurden neben 14-3-3 η die Isoforme 14-3-3 β , γ , ϵ , σ , ζ und τ gefunden. Nur Isoform 14-3-3 η zeigte allerdings einen Unterschied im Turnover. Sie wird vor allem in Gehirngewebe exprimiert (Martin, Rostas et al. 1994). Unterschiede in PTMs in den Proteoformen von 14-3-3 η (beide Gruppen zeigten Acetylierungen) oder in der Intensität der Spots in Vehikel- oder Paroxetinmäusen konnten nicht detektiert werden. In der UniProt Datenbank sind keine Proteoforme zu 14-3-3 η bekannt (UniProt 2017).

Die Spots 68 bis 70 waren in allen Gelen sehr intensiv angefärbt und zeigten in ihrer Intensität keinen Unterschied zwischen Vehikel- und Paroxetingruppe. Da sich die Spots etwas verschmiert darstellten, wurden sie im zentralen Bereich ausgestochen, um falsche Ergebnisse durch Proteine aus den eng daneben liegenden Spots zu vermeiden.

Die Datenanalyse mit Mascot Database Search ergab für alle Spots ausreichend identifizierte Peptidsequenzen.

Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
1433F	cv16.3	68	829	45	40,2	25,955
1433F	cv17.3	68	56	3	10,6	29,1105
1433F	cv20.3	68	301	40	24,4	32,2387
1433F	cp8.3	68	376	56	41,1	43,8942
1433F	cp24.3	68	716	64	42,7	44,4884
1433F	cp25.3	68	237	12	28,5	46,2326
1433F	cv16.3	69	1671	94	55,3	44,8667
1433F	cv17.3	69	78	5	15,4	
1433F	cv20.3	69	468	51	45,9	53,4255
1433F	cp8.3	69	611	67	43,9	49,4101
1433F	cp24.3	69	360	35	31,3	
1433F	cp25.3	69	296	29	41,1	67,6594
1433F	cv16.3	70	1657	93	63,4	50,908
1433F	cv17.3	70	369	26	40,2	52,2018
1433F	cv20.3	70	512	67	43,5	53,9362
1433F	cp8.3	70	1138	79	65,9	68,1986
1433F	cp24.3	70	914	62	65	57,3354
1433F	cp25.3	70	85	8	14,2	63,4623

Tabelle 10: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von 1433F

Aus den MS-Daten der Spots 68 bis 70 konnten drei Proteoforme des Proteins 14-3-3 η in der MASCOT Database Search identifiziert werden. Protein Score, Anzahl identifizierter Peptide, Protein Coverage (%) und vorhandene ProTurnyzer-Turnoverdaten (LPF) sind angegeben.

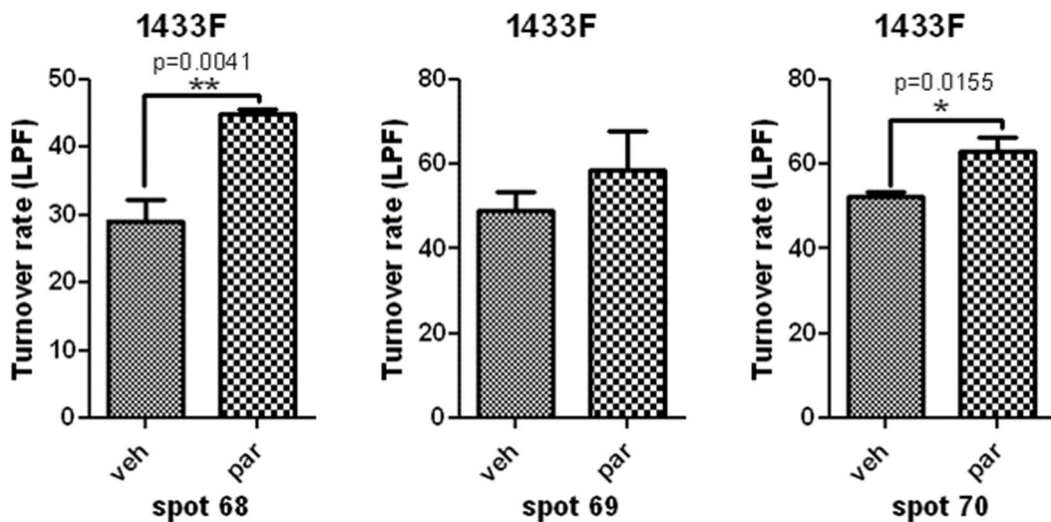


Abbildung 7: Turnover des Proteins 14-3-3 η

Die Turnover (LPF) der drei Proteoforme (Spots 68 bis 70) des Proteins 14-3-3 η sind als Säulendiagramm dargestellt. Die jeweils linke Säule bildet den Turnover der Vehikelmäuse (veh), die rechte Säule den Turnover der Paroxetinmäuse (par) ab. In Spot 68 und 70 zeigte sich ein jeweils signifikanter Unterschied (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). In allen drei Proteoformen war der Vehikel-Turnover leicht niedriger als der Paroxetin-Turnover.

Der Turnover der Paroxetinmäuse waren sowohl in Spot 68 mit $p=0.0041$ um 54% ($LPF(Par)=44.87\pm 0.7017$, $LPF(Veh)=29.10\pm 3.142$) als auch in Spot 70 mit $p=0.0155$ um 20% ($LPF(Par)=63.00\pm 3.144$, $LPF(Veh)=52.35\pm 0.8772$) signifikant erhöht. Der Turnover des Proteofoms aus Spot 69 hatte nur bei zwei Paroxetin- und zwei Vehikelmäusen Resultate im ProTurnyzer, die bei Berechnung keinen Unterschied in der Turnoverrate zeigten.

Im WB von 14-3-3 η (1433F-Antikörper mit Verdünnung 1:200, zweiter Antikörper Anti-Goat mit Verdünnung 1:2000) wurde eine relevante Bande bei 28 kDa detektiert. Das Ergebnis korreliert mit den gefundenen 2D-Spots. Es wurde der Anteil der 1433F-Menge im Vergleich zur Gesamtproteinmenge, die mit Hilfe von Coomassie angefärbt wurde, berechnet. Insgesamt zeigte sich kein quantitativer Unterschied in der Gesamtmenge an 14-3-3 η von Vehikel- und Paroxetinmäusen ($p=0.1703$, Ratio 1433F/Gesamtprotein von Vehikel: 0.950682 ± 0.051228 , von Paroxetin: 1.131185 ± 0.095201).

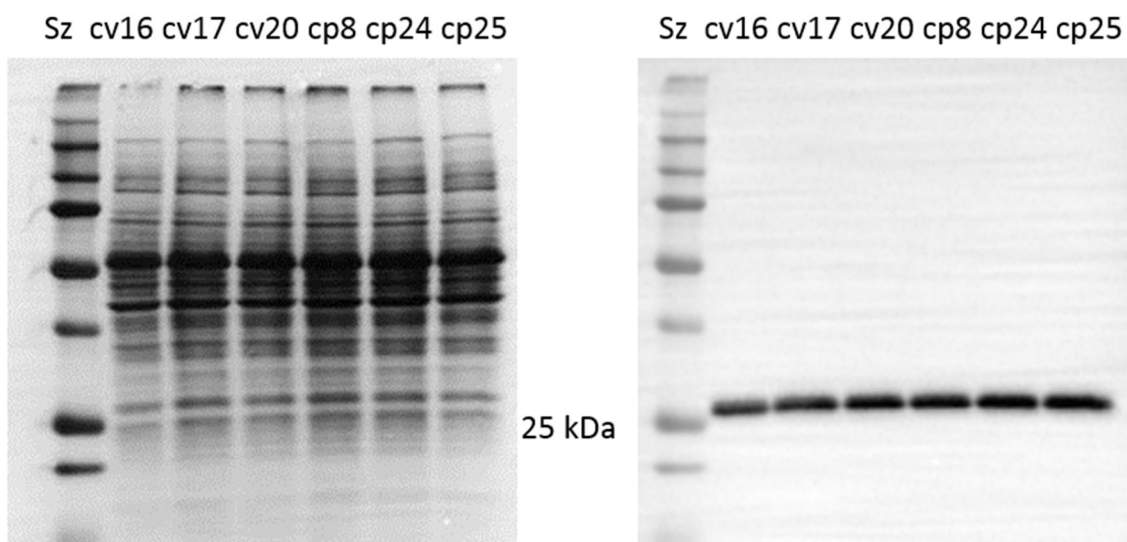


Abbildung 8: Western Blot von 14-3-3 η

Der WB zeigt die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht (in kDa), von links nach rechts wurden die Proben der Mäusehippocampi aufgetragen (Sz=Sizemarker zur Größenüberprüfung der angefärbten Proteine). Das linke Bild zeigt die Coomassie-Färbung mit Darstellung aller Proteine, das rechte Bild die 14-3-3 η -spezifische Anfärbung. Mit dem 1433F-Antikörper konnte eine relevante Bande bei etwa 28 kDa dargestellt werden. Quantitativ zeigte sich kein Unterschied in der Gesamtmenge an 14-3-3 η von Vehikel- und Paroxetinmäusen.

4.3.1.2 Mitofilin

Das Protein Mitofilin (IMMT, MIC60 oder inneres mitochondriales Membranprotein) wurde in drei Spots (4, 5, und 6) detektiert. IMMT ist ein etwa 88 kDa großes Protein der inneren mitochondrialen Membran und Teil des ‚mitochondrial contact site and cristae junction organizing system‘ MICOS, das

die mitochondriale Membranstruktur und Funktion erhält (John, Shang et al. 2005, Kozjak-Pavlovic 2017).

Die MASCOT Database Search zeigte eine ähnliche Anzahl an gefundenen Peptidsequenzen von IMMT in allen Spots. Maus cp24.3 hatte im Vergleich zu den anderen Mäusen in allen Spots die geringste Anzahl an identifizierten Peptiden, der Turnover dieser Maus unterschied sich allerdings nicht.

Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
IMMT	cv16.3	4	1398	60	52,2	
IMMT	cv17.3	4	550	36	33,9	
IMMT	cv20.3	4	468	38	37,3	
IMMT	cp8.3	4	1490	70	54	
IMMT	cp24.3	4	280	12	17,2	
IMMT	cp25.3	4	574	56	41	
IMMT	cv16.3	5	1676	75	53,9	3,3045
IMMT	cv17.3	5	1989	97	63,1	3,1709
IMMT	cv20.3	5	652	49	42,4	2,1515
IMMT	cp8.3	5	1180	66	45,4	18,5478
IMMT	cp24.3	5	265	11	11,6	12,8313
IMMT	cp25.3	5	873	61	44,1	13,964
IMMT	cv16.3	6	1810	90	62	13,7588
IMMT	cv17.3	6	1580	80	51,8	13,2838
IMMT	cv20.3	6	454	40	33,2	11,8866
IMMT	cp8.3	6	638	40	41,1	14,676
IMMT	cp24.3	6	203	6	10	13,643
IMMT	cp25.3	6	344	36	37,4	12,1852

Tabelle 11: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von IMMT

Aus den MS-Daten der Spots 4 bis 6 konnten drei Proteoforme des Proteins IMMT in der MASCOT Database Search identifiziert werden. Protein Score, Anzahl identifizierter Peptide, Protein Coverage (%) und vorhandene ProTurnyzer-Turnoverdaten (LPF) sind angegeben. Spot 4 lieferte keine Turnoverergebnisse. In Maus cp24.3 konnten im Vergleich weniger Matches gefunden werden. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit einer niedrigeren Turnoverrate in Maus cp24.3.

Der Turnover des Proteoforms der Paroxetinmäuse war in Spot 5 mit $p=0.0012$ um 425% signifikant erhöht ($LPF(\text{Par})=15.11\pm 1.748$, $LPF(\text{Veh})=2.876\pm 0.3641$), während das Proteoform aus Spot 6 keinen Unterschied in der Turnoverrate zeigte. Auf den 2D-Gels stellte sich Spot 5 in beiden Gruppen gleichermaßen als intensivster Spot der drei IMMT-Proteoforme dar. In der Uniprot Datenbank sind fünf Isoforme bekannt, die durch alternatives Splicing aus dem IMMT-Gen hervorgehen (UniProt 2017). Die Lokalisation von Spot 5 lässt vermuten, dass dieses Proteoform eine PTM erhalten hat, die seinen pH senkt, wie zum

Beispiel eine Phosphorylierung. Allerdings konnte mit MASCOT keine solche PTM gefunden werden.

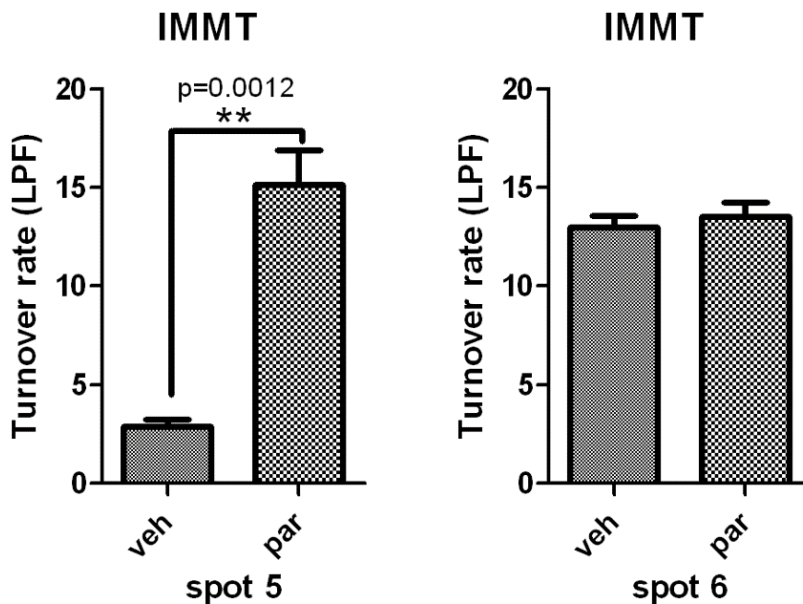


Abbildung 9: Turnover des Proteins Mitofilin

Die Turnover (LPF) der zwei Spots, von denen der Turnover von IMMT berechnet werden konnte, sind als Säulendiagramme dargestellt. Die jeweils linke Säule bildet den Turnover der Vehikelmäuse (veh), die rechte Säule den Turnover der Paroxetinmäuse (par) ab. Das Proteoform von Spot 5 zeigte einen signifikanten Unterschied (** $p < 0.01$).

Im WB von IMMT (IMMT-Antikörper mit Verdünnung 1:500, zweiter Antikörper Anti-Mouse mit Verdünnung 1:5000) wurde eine Bande bei etwa 90kDa angefärbt. Es zeigte sich kein quantitativer Unterschied zwischen der Gesamtmenge an IMMT von Vehikel- und Paroxetinmäusen ($p=0.1173$, Ratio IMMT/Gesamtprotein von Vehikel: 0.8697 ± 0.05669 , von Paroxetin: 0.9549 ± 0.02225).

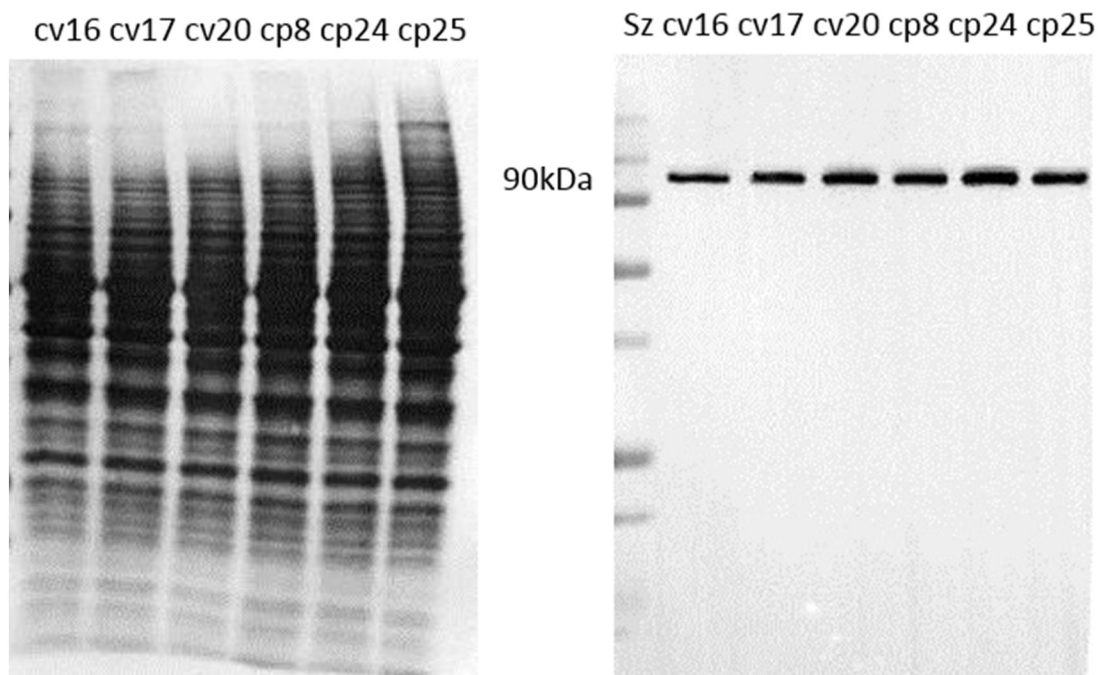


Abbildung 10: Western Blot von Mitofilin

Der WB zeigt die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht (in kDa), von links nach rechts wurden die Proben der Mäusehippocampi aufgetragen (Sz=Sizemarker zur Größenüberprüfung der angefärbten Proteinbande). Das linke Bild zeigt die Coomassie-Färbung mit Darstellung aller Proteine, das rechte Bild die Mitofilin-spezifische Anfärbung mit Darstellung einer relevanten Bande bei 90kDa, die sich in den beiden Gruppen nicht signifikant unterschied.

4.3.1.3 *Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor 1*

Der Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor 1 (GDIR1) mit einem Molekulargewicht von 23 kDa ist ein Protein, das nur in einem 2D-Spot, Spot 72, detektiert wurde und für das keine Proteoforme bekannt sind (UniProt 2017). Der Turnover der Paroxetingruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $p=0.0169$ um 29% signifikant erhöht ($LPF(\text{Par})=25.00\pm 1.203$, $LPF(\text{Veh})=19.34\pm 1.316$). Zu den Aufgaben des Proteins zählen die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der GTP/GDP-Austauschfaktoren in der Zelle, die Kontrolle von deren Recycling und Verteilung und die Verhinderung von deren Abbau (Boulter, Garcia-Mata et al. 2010). Es sind keine Proteoforme für GDIR1 bekannt (UniProt 2017).

Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
GDIR1	cv16.3	72	692	31	55,4	17,3284
GDIR1	cv17.3	72	181	7	33,3	18,8814
GDIR1	cv20.3	72	193	11	36,8	21,8165
GDIR1	cp8.3	72	1114	40	52	26,5685
GDIR1	cp24.3	72	1392	53	65,2	22,6365
GDIR1	cp25.3	72	132	7	36,3	25,8016

Tabelle 12: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von GDIR1

Bei der MS-Analyse des Spots 72 wurde GDIR1 in der MASCOT Database Search identifiziert. Protein Score, Anzahl identifizierter Peptide, Protein Coverage (%) und ProTurnyzer-Turnoverdaten (LPF) sind angegeben.

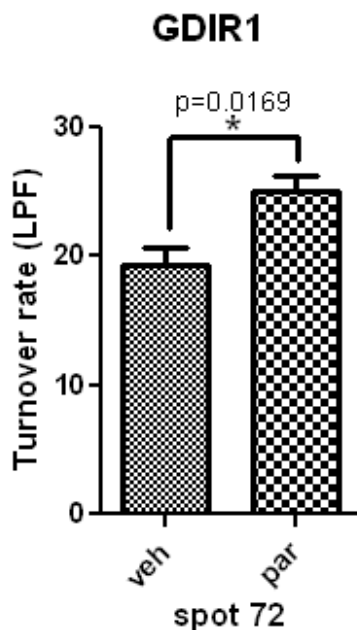


Abbildung 11: Turnover des Rho-GDP-Dissozationsinhibitor 1

Der signifikant unterschiedliche Turnover (LPF) von GDIR1 im Spot 72 ist als Säulendiagramm dargestellt (* $p < 0.05$). Die linke Säule bildet den Turnover der Vehikelmäuse (veh), die rechte Säule den höheren Turnover der Paroxetinmäuse (par) ab.

4.3.2 Energiestoffwechsel: Isocitrat-Dehydrogenase α

Das mitochondriale Enzym Isocitrat-Dehydrogenase, Untereinheit α , (IDH3A) ist Teil des Citratzyklus, in dem zur Gewinnung von Energie ATP gebildet wird (Krebs and Johnson 1980). In Säugetieren sind drei Isoforme der Isocitrat-Dehydrogenase bekannt (Nekrutenko, Hillis et al. 1998).

IDH3A wurde in drei Proteoformen mit variierendem Molekulargewicht und pI gefunden (Spots 52, 58 und 61) und zeigte in Spot 61 einen signifikant höheren Turnover in Paroxetinmäusen als in Vehikeln. In der UniProt Datenbank sind zwei Proteoforme durch alternatives Splicing mit einem Molekulargewicht von

31 und 39 kDa beschrieben (UniProt 2017). Das Proteoform mit 31 kDa entspricht Spot 58. Das Proteoform mit 39 kDa könnte sowohl Spot 52 oder 61 sein, die sich auf dem 2D-Gel nur durch ihren pH-Wert unterscheiden.

Die MS-Ergebnisse der Proteoforme von IDH3A variieren stark. In Spot 58 wurden am wenigsten Peptide gefunden. Der Turnover in Spot 61 war mit $p=0.0186$ um 33% höher ($LPF(\text{Veh})=21.25\pm 1.902$, $LPF(\text{Par})=28.66\pm 1.486$). Das Proteoform aus Spot 58 hatte nur in zwei Paroxetin- und zwei Vehikelmäusen verwertbare Daten im ProTurnzyzer, die sich nicht signifikant unterschieden.

Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
IDH3A	cv16.3	52	2974	102	40,7	
IDH3A	cv17.3	52	3432	147	54,9	
IDH3A	cv20.3	52	139	7	20,8	
IDH3A	cp8.3	52	4216	173	51,6	
IDH3A	cp24.3	52	4750	200	55,2	
IDH3A	cp25.3	52	411	26	37,4	
IDH3A	cv16.3	58	491	17	30,3	10,9109
IDH3A	cv17.3	58	450	21	39,1	
IDH3A	cv20.3	58	148	3	9	15,7371
IDH3A	cp8.3	58	220	13	29,2	15,1497
IDH3A	cp24.3	58	73	2	6,2	
IDH3A	cp25.3	58	88	6	13,9	14,8061
IDH3A	cv16.3	61	1837	72	46,7	17,7176
IDH3A	cv17.3	61	337	14	26,8	24,2408
IDH3A	cv20.3	61	409	24	43,4	21,7915
IDH3A	cp8.3	61	499	40	46,4	30,3765
IDH3A	cp24.3	61	2424	95	49,5	25,7051
IDH3A	cp25.3	61	251	21	35,8	29,9109

Tabelle 13: MASCOT- und ProTurnzyzer-Ergebnisse von IDH3A

Bei der MS-Analyse der Spots 52, 58 und 61 wurden drei Proteoforme des Proteins IDH3A in der MASCOT Database Search identifiziert. Protein Score, Anzahl identifizierter Peptide, Protein Coverage (%) und vorhandene ProTurnzyzer-Turnoverdaten (LPF) sind angegeben.

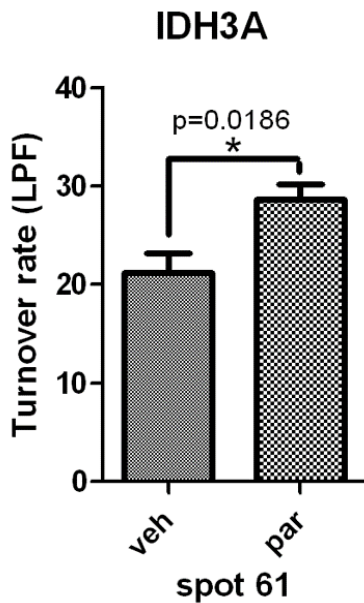


Abbildung 12: Turnover der Isocitratdehydrogenase α

Der Turnover (LPF) von Spot 61 ist als Säulendiagramm dargestellt. Die linke Säule bildet den Turnover der Vehikelmäuse (veh), die rechte Säule den höheren Turnover der Paroxetinmäuse (par) ab (* $p < 0.05$).

4.3.3 Chaperone

4.3.3.1 60kDa Hitzeschockprotein

Das 60kDa Hitzeschockprotein (CH60 oder HSP60) mit einem Molekulargewicht von etwa 60kDa wurde in drei Spots (Spots 27, 28 und 29) gefunden. CH60 ist ein Chaperon, das an der Faltung von Proteinen in Mitochondrien beteiligt ist (Macario, Lange et al. 1999).

In allen Proteoformen unterliegt CH60 in beiden Gruppen niedrigen Turnoverraten, auch wenn eine hohe Proteinmenge vorhanden war. Das heißt, CH60 wurde über den zweiwöchigen Zeitraum der ^{15}N -Markierung in nur geringem Maße auf- und abgebaut. Der Turnover des Proteoforms der Paroxetinmäuse war in Spot 27 mit $p=0.0126$ um 29% signifikant niedriger ($\text{LPF}(\text{Par})=4.003 \pm 0.3392$, $\text{LPF}(\text{Veh})=5.634 \pm 0.3214$), in Spot 28 mit $p=0.0184$ um 15% höher ($\text{LPF}(\text{Par})=9.855 \pm 0.3256$, $\text{LPF}(\text{Veh})=8.573 \pm 0.2587$). Das Proteoform aus Spot 29 wies keinen Unterschied in der Turnoverrate auf. Auf den 2D-Gels stellte sich Spot 28 in beiden Gruppen als intensivster Spot der drei CH60-Proteoforme dar. Proteoforme sind bisher nicht beschrieben (UniProt 2017). Der Vergleich der gefundenen PTMs ergab weder Unterschiede zwischen den Gruppen Vehikel/Paroxetin noch zwischen den einzelnen Proteoformen.

Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
CH60	cv16.3	27	1683	55	48	5,869
CH60	cv17.3	27	845	32	35,6	4,9977
CH60	cv20.3	27	687	35	37,9	6,0338
CH60	cp8.3	27	1941	73	56,2	4,446
CH60	cp24.3	27	1765	57	62,8	3,3367
CH60	cp25.3	27	1038	46	50,3	4,227
CH60	cv16.3	28	3214	109	57,8	8,0585
CH60	cv17.3	28	5742	193	57,6	8,8788
CH60	cv20.3	28	3240	150	59,3	8,7809
CH60	cp8.3	28	1572	52	51,8	10,4901
CH60	cp24.3	28	2785	107	51	9,6591
CH60	cp25.3	28	2328	128	55,8	9,4143
CH60	cv16.3	29	3971	145	67,4	8,4114
CH60	cv17.3	29	1567	64	52,4	4,696
CH60	cv20.3	29	650	36	38,9	6,7044
CH60	cp8.3	29	1372	46	45,4	9,1466
CH60	cp24.3	29	3078	113	56,4	8,8614
CH60	cp25.3	29	608	25	34,7	5,8979

Tabelle 14: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von CH60

Die MS-Daten der Spots 27 - 29 ergaben drei Proteoforme des Proteins CH60 in der MASCOT Database Search. Protein Score, Anzahl identifizierter Peptide, Protein Coverage (%) und ProTurnyzer-Turnoverdaten (LPF) sind angegeben.

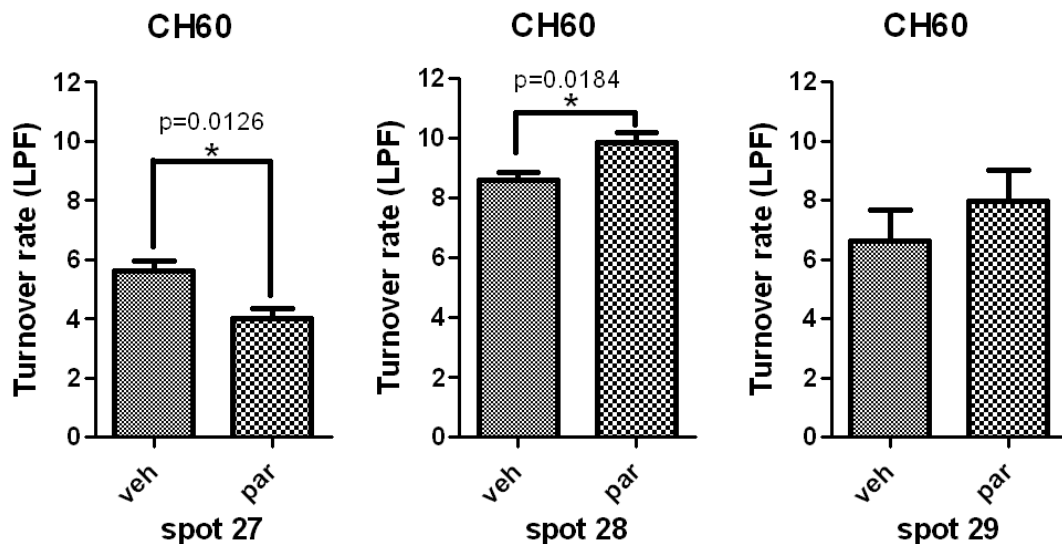


Abbildung 13: Turnover des 60kDa Hitzeschockproteins

Die Turnover (LPF) der drei Proteoforme sind als Säulendiagramme dargestellt. Die jeweils linke Säule bildet den Turnover der Vehikelmäuse (veh), die rechte Säule den Turnover der Paroxetinmäuse (par) ab. Das Proteoform aus Spot 27 zeigte einen niedrigeren Turnover, das aus Spot 28 einen höheren Turnover in der Paroxetingruppe (* p<0.05).

4.3.3.2 T-Komplex Protein 1

Das T-Komplex Protein 1 (TCP-1) bildet einen Ringkomplex bestehend aus acht verschiedenen Untereinheiten und faltet als ATP-abhängiges Chaperon zytoskelettale Proteine wie Aktin, Tubulin und andere Substrate (Frydman, Nimmegern et al. 1992, Gao, Thomas et al. 1992, Lewis, Hynes et al. 1992, Yaffe, Farr et al. 1992, Yam, Xia et al. 2008, Kabir, Uddin et al. 2011, Lopez, Dalton et al. 2015). Drei der acht Untereinheiten (α , θ und ϵ) des T-Komplex Protein 1, die alle etwa 60kDa groß sind, zeigten im Turnover Unterschiede zwischen Paroxetin- und Vehikelgruppe. Die Untereinheit α (TCPA2) wurde in Spot 14 und 15, θ (TCPQ) in Spot 29 und ϵ (TCPE) in Spot 14 gefunden. Für TCPA2 sind zwei Proteoforme durch alternatives Splicing bekannt, für die beiden anderen Untereinheiten sind keine Proteoforme beschrieben, was sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Untersuchung deckt (UniProt 2017). Die Turnoverrate wurde für beide gefundenen Proteoforme des Proteins TCPA2 berechnet. Der Turnover der Paroxetinmäuse war in Spot 14 mit $p=0.0156$ um 24% höher als in den Vehikelmäusen ($LPF(\text{Par})=25.74\pm 0.9685$, $LPF(\text{Veh})=20.82\pm 1.476$). Spot 15 ergab keinen signifikanten Unterschied. Ebenfalls in Spot 14 vorhanden war TCPE, dessen Paroxetinturnover mit $p=0.0318$ um 6% geringfügig höher als in den Vehikelmäusen war ($LPF(\text{Par})=41.68\pm 0.6642$, $LPF(\text{Veh})=39.47\pm 0.5545$). Der Paroxetinturnover von TCPQ war in Spot 29 mit $p=0.025$ um 25% höher als in den Vehikelmäusen ($LPF(\text{Par})=47.22\pm 0.4430$, $LPF(\text{Veh})=37.65\pm 2.177$).

Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
TCPA2	cv16.3	14	1056	29	43,3	22,5748
TCPA2	cv17.3	14	543	27	37,2	22
TCPA2	cv20.3	14	280	17	26,4	17,8879
TCPA2	cp24.3	14	823	33	48	27,6656
TCPA2	cp25.3	14	261	15	24,5	24,9495
TCPA2	cp8.3	14	683	24	35,8	24,6018
TCPA2	cv16.3	15	1749	65	59,5	42,3571
TCPA2	cv17.3	15	1583	61	52,5	40,0844
TCPA2	cv20.3	15	788	35	43,3	51,0853
TCPA2	cp24.3	15	145	6	11,2	44,7948
TCPA2	cp25.3	15	530	26	31,1	46,65
TCPA2	cp8.3	15	876	42	51,3	48,5017
Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
TCPE	cv16.3	14	1384	58	49,4	38,4747

TCPE	cv17.3	14	842	61	49,4	40,3898
TCPE	cv20.3	14	308	31	48,2	39,5598
TCPE	cp24.3	14	1161	60	59	42,9931
TCPE	cp25.3	14	428	28	34,4	41,1849
TCPE	cp8.3	14	930	51	48,8	40,8568
Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
TCPQ	cv16.3	29	321	12	22,8	35,4733
TCPQ	cv17.3	29	250	7	13,7	37,654
TCPQ	cv20.3	29	336	20	31,4	39,8282
TCPQ	cp24.3	29	186	4	8,8	46,7762
TCPQ	cp25.3	29	628	21	35	47,2249
TCPQ	cp8.3	29	408	12	18,2	47,6621

Tabelle 15: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von TCPA2, TCPE und TCPQ

Aus den MS-Daten der Spots 14, 15 und 29 wurden TCPA2, TCPE und TCPQ in der MASCOT Database Search identifiziert. Protein Score, Anzahl identifizierter Peptide, Protein Coverage (%) und ProTurnyzer-Turnoverdaten (LPF) sind angegeben.

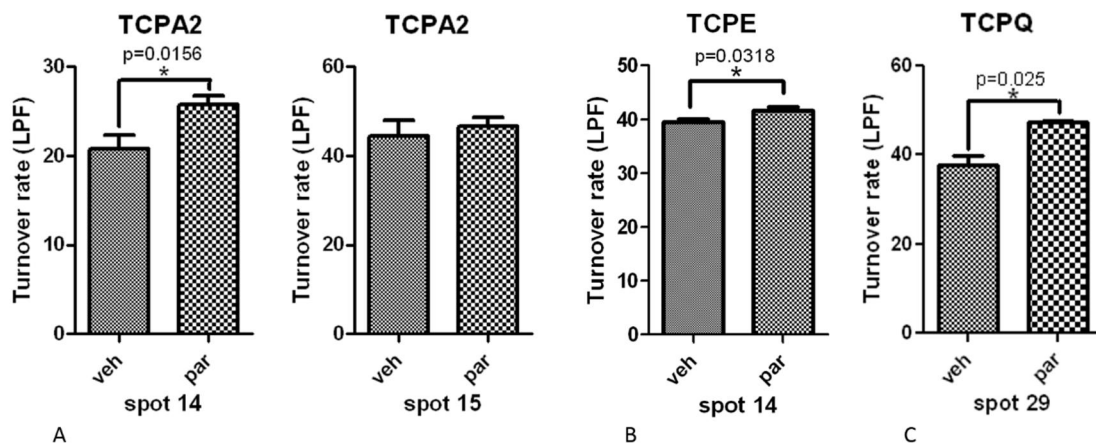


Abbildung 14: Turnover der T-Komplex Proteine 1 α , ϵ und θ

Die Turnover (LPF) der Untereinheiten des Komplex-Protein 1 sind als Säulendiagramme der jeweiligen Spots dargestellt (A: TCPA2, B: TCPE, C: TCPQ). Die jeweils linke Säule bildet den Turnover der Vehikelmäuse (veh), die rechte Säule den Turnover der Paroxetinmäuse (par) ab. Das TCPA2-Proteiform von Spot 14 zeigte einen signifikanten Unterschied (* $p < 0,05$), ebenso die Proteine TCPE in Spot 14 und TCPQ in Spot 29 (* $p < 0,05$).

4.3.4 Neurotransmittertransport: β -lösliches NSF-attachment Protein

In den 2D-Gelen wurde das etwa 34 kDa große β -lösliche NSF-attachment Protein (SNAB) im stark angefärbten Spot 55 gefunden. Es ist eine hirspezifische Isoform der Gruppe der SNARE-Proteine, die für die Fusion von Vesikeln mit Zielorganellen zuständig sind (Whiteheart, Griff et al. 1993, Stenbeck 1998). SNAB wird für den Transport der Vesikel zwischen Golgi-

Apparat und Endoplasmatischem Retikulum benötigt (Clary, Griff et al. 1990). Bisher sind keine Iso- oder Proteoforme von SNAB beschrieben (UniProt 2017).

Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
SNAB	cv16.3	55	430	15	53,4	32,254
SNAB	cv17.3	55	299	10	30,2	31,327
SNAB	cv20.3	55	556	25	63,1	34,5941
SNAB	cp8.3	55	1538	54	65,1	44,1268
SNAB	cp24.3	55	1650	64	78,2	40,0989
SNAB	cp25.3	55	394	20	43,6	41,7358

Tabelle 16: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von SNAB

Aus den MS-Daten des Spots 55 wurde SNAB in der MASCOT Database Search identifiziert. Protein Score, Anzahl identifizierter Peptide, Protein Coverage (%) und ProTurnyzer-Turnoverdaten (LPF) sind angegeben.

Der Turnover der Paroxetingruppe war in Spot 55 mit $p=0.0018$ um 28% signifikant erhöht ($LPF(Par)=41.99\pm 1.170$, $LPF(Veh)=32.76\pm 0.9646$).

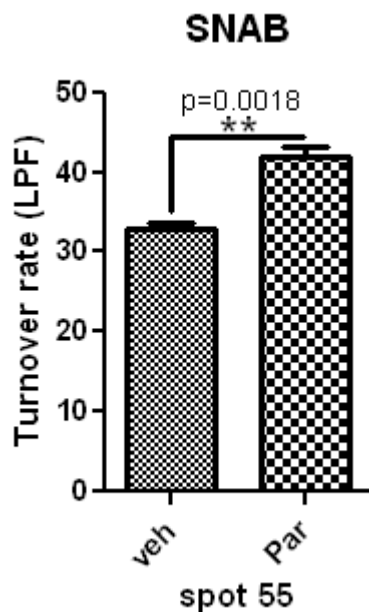


Abbildung 15: Turnover des β -lösliche NSF-attachment Protein

Der signifikant unterschiedliche Turnover (LPF) von SNAB im Spot 55 (** $p<0.01$) ist als Säulendiagramm dargestellt. Die linke Säule bildet den Turnover der Vehikelmäuse (veh), die rechte Säule den Turnover der Paroxetinmäuse (par) ab.

4.3.5 Astrozytäre Aktivität: Saures Gliafaserprotein

In den 2D-Gelen wurden neun Proteoforme des sauren Gliafaserproteins (GFAP) gefunden. Das Intermediärfilament GFAP kommt im Gehirn in reifen Astrozyten vor (Onteniente, Kimura et al. 1983). Für GFAP sind mehrere

Isoforme mit unterschiedlichen PTMs, beispielsweise Phosphorylierungen und Acetylierungen, mit einer Größe von etwa 50 kDa bekannt (Middeldorp and Hol 2011). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Astrozyten aus Gliazellen und beeinflusst die Aktivität und mechanische Stabilität von Astrozyten (McCall, Gregg et al. 1996, Menet, Gimenez y Ribotta et al. 2001).

Unterschiede in PTMs zwischen Proteoformen der Kontroll- und Paroxetingruppe oder in der Intensität der Spots in Vehikel- oder Paroxetinmäusen konnten nicht detektiert werden. Allerdings zeigten sich Spots mit GFAP bei etwa 50 kDa (der bekannten Größe von GFAP) und etwa 37 kDa (Spots 55, 56 und 57). Diese Größe von GFAP wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben (UniProt 2017).

In Spots 43 und 44, die auf den 2D-Gelen sehr intensiv und proteinreich erschienen, wurden über MASCOT Database Search dementsprechend die meisten Peptide gefunden.

Protein	Maus	Spot	Protein Score	Anzahl identifizierter Peptide	Protein Coverage (%)	Turnover (LPF)
GFAP	cv16.3	43	1929	85	65,6	11,5283
GFAP	cv17.3	43	146	12	22,8	8,694
GFAP	cv20.3	43	1291	80	60,7	13,5897
GFAP	cp8.3	43	1930	104	70	47,2479
GFAP	cp24.3	43	4019	172	72,8	18,0477
GFAP	cp25.3	43	1613	107	70	38,1093
GFAP	cv16.3	44	2141	87	66,3	14,3324
GFAP	cv17.3	44	248	12	15,3	13,3001
GFAP	cv20.3	44	374	23	43,3	9,739
GFAP	cp8.3	44	430	32	48,8	42,1858
GFAP	cp24.3	44	781	35	50,9	39,148
GFAP	cp25.3	44	363	22	40,7	36,1128
GFAP	cv16.3	45	946	36	57,7	10,303
GFAP	cv17.3	45	597	21	37,2	32,256
GFAP	cv20.3	45	482	27	48,6	13,324
GFAP	cp8.3	45	571	30	49,1	39,3113
GFAP	cp24.3	45	744	34	50,5	13,6985
GFAP	cp25.3	45	470	26	45,3	22,7004
GFAP	cv16.3	46	827	38	54,4	
GFAP	cv17.3	46	102	3	8,1	
GFAP	cv20.3	46	433	25	45,3	
GFAP	cp8.3	46	775	43	60,5	
GFAP	cp24.3	46	1145	44	61,9	
GFAP	cp25.3	46	667	44	51,9	
GFAP	cv16.3	47	254	10	21,6	
GFAP	cv17.3	47	206	8	16,7	
GFAP	cv20.3	47	237	12	24,2	
GFAP	cp8.3	47	161	9	15,3	

GFAP	cp24.3	47	692	30	46	
GFAP	cp25.3	47	273	12	26,3	
GFAP	cv16.3	48	281	14	29,3	
GFAP	cv17.3	48	156	7	8,6	
GFAP	cv20.3	48	93	6	10,7	
GFAP	cp8.3	48	194	14	24,7	
GFAP	cp24.3	48	1134	48	62,8	
GFAP	cp25.3	48	203	12	23,3	
GFAP	cv16.3	55	500	22	34,4	9,7008
GFAP	cv17.3	55	63	2	4,4	
GFAP	cv20.3	55	444	23	44,9	11,1842
GFAP	cp8.3	55	887	34	46	39,8598
GFAP	cp24.3	55	707	31	41,4	9,5984
GFAP	cp25.3	55	311	19	27,9	31,1161
GFAP	cv16.3	56	414	15	26,3	
GFAP	cv17.3	56	43	2	1,6	
GFAP	cv20.3	56	116	8	18,1	
GFAP	cp8.3	56	301	9	20	
GFAP	cp24.3	56	249	9	15,6	
GFAP	cp25.3	56	239	8	17	
GFAP	cv16.3	57	142	4	8,8	
GFAP	cv17.3	57	181	6	12,8	
GFAP	cv20.3	57	196	10	19,8	
GFAP	cp8.3	57	274	11	20,9	
GFAP	cp24.3	57	91	2	4,7	
GFAP	cp25.3	57	157	6	11,2	

Tabelle 17: MASCOT- und ProTurnyzer-Ergebnisse von GFAP

Aus den MS-Daten der Spots 43 bis 48 und 55 bis 57 wurden neun Proteoforme des Proteins GFAP in der MASCOT Database Search identifiziert. Protein Score, Anzahl identifizierter Peptide, Protein Coverage (%) und vorhandene ProTurnyzer-Turnoverdaten (LPF) sind angegeben.

Die Intensität der Spots zwischen den beiden Gruppen zeigte visuell auf den 2D-Gelen keinen Unterschied.

Der Turnover der Paroxetinmäuse war sowohl in Spot 43 mit $p=0.0284$ um 206% (LPF(Par)= 34.47 ± 8.624 , LPF(Veh)= 11.27 ± 1.419) als auch in Spot 44 mit $p=0.0013$ um 214% (LPF(Par)= 39.15 ± 3.036 , LPF(Veh)= 12.46 ± 1.391) signifikant erhöht. Der Turnover in Spot 45 und 55 variierte innerhalb der Paroxetin- und Vehikelgruppen sehr stark. In Spot 55 konnten der Turnover nur für zwei der drei Vehikelmäuse berechnet werden.

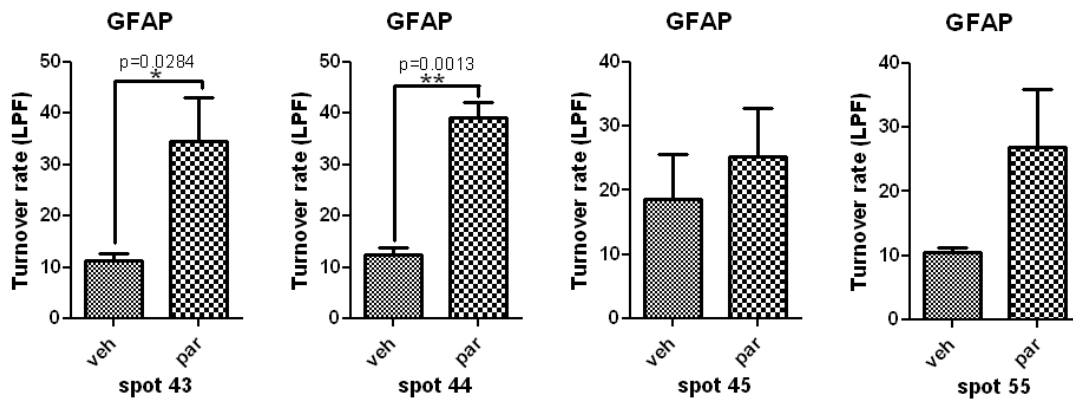


Abbildung 16: Turnover des sauren Gliafaserproteins

Die berechneten Turnover (LPF) der Proteoforme von GFAP sind als Säulendiagramme dargestellt. Die jeweils linke Säule bildet den Turnover der Vehikelmäuse (veh), die rechte Säule den Turnover der Paroxetinmäuse (par) ab. In Spot 43 und Spot 44 zeigte sich ein jeweils signifikanter Unterschied (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Spot 45 zeigte stark variable Ergebnisse in beiden Gruppen, die Vehikelergebnisse von Spot 55 sind nur von zwei der drei Mäuse.

Im WB von GFAP (GFAP-Antikörper mit Verdünnung 1:1000, zweiter Antikörper Anti-Rabbit mit Verdünnung 1:10000) sind zwei relevante Banden zwischen 50 und 37 kDa detektierbar. Die gefärbte Bande bei ca. 37kDa korreliert mit den gefundenen 2D-Spots 55, 56 und 57. Die zweite GFAP-Bande färbte sich bei etwa 50kDa stark an (Spots 43 bis 48). Maus cp24.3 hatte eine etwas geringere Menge an GFAP als die beiden anderen Paroxetinmäuse. Dennoch zeigte sich insgesamt nach Normalisierung mit Hilfe von Coomassie-Färbung kein quantitativer Unterschied zwischen der Gesamtmenge an GFAP von Vehikel- und Paroxetinmäusen ($p = 0.2270$, Verhältnis GFAP/Gesamtprotein von Vehikel: 0.892243 ± 0.02411 , von Paroxetin: 1.07685 ± 0.127198). Paroxetinmaus cp24.3 zeigt auch bei der Berechnung des Turnovers Abweichung gegenüber den anderen beiden Paroxetinmäusen, denn cp24.3 hatte auch niedrigere Turnoverraten in Spot 43, 45, 55 als cp3.3 und cp25.3 (siehe Tabelle 17).

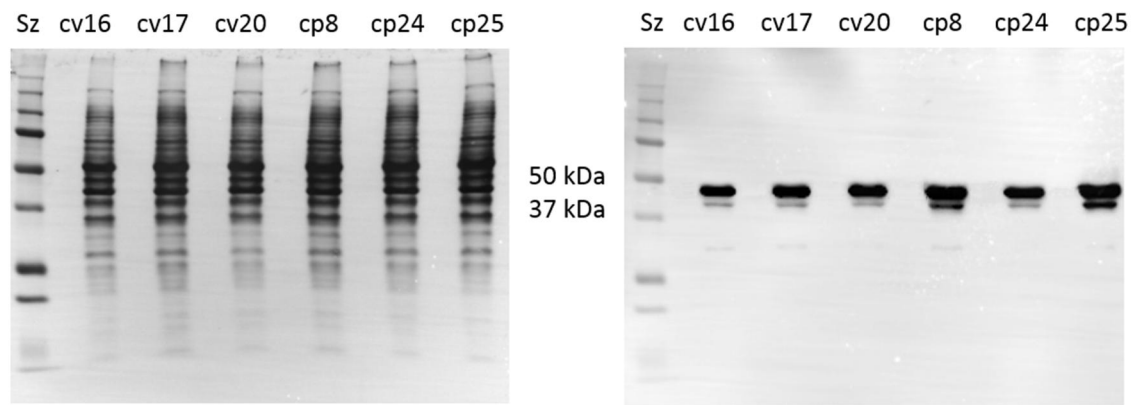


Abbildung 17: Western Blot vom sauren Gliafaserprotein

Der WB zeigt die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht (in kDa), von links nach rechts wurden die Proben der Mäusehippocampi aufgetragen (Sz=Sizemarker zur Größenüberprüfung der angefärbten Proteine). Das linke Bild zeigt die Coomassie-Färbung mit Darstellung aller Proteine, das rechte Bild die GFAP-spezifische Anfärbung. Mit dem GFAP-Antikörper konnten zwei relevante Banden zwischen 50 und 37 kDa detektiert werden, die obere Bande korreliert mit Spots 43-48, die untere mit 55-57. Bei Maus cp24.3 war das Signal weniger stark an als bei den anderen beiden Paroxetinmäusen cp8.3 und cp25.3. Es zeigte sich insgesamt kein quantitativer Unterschied zwischen der Gesamtmenge an GFAP von Vehikel- und Paroxetinmäusen.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Hippocampi von DBA/2-Ola-Mäusen, die unter standardisierten Bedingungen mit dem SSRI Paroxetin behandelt wurden, mittels Massenspektrometrie-Analyse auf Turnoverunterschiede in Proteoformen und in einzelnen Proteinen im Vergleich zu Vehikelmäusen untersucht. Das Ziel war, Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Paroxetin über serotonerge Veränderungen hinaus zu gewinnen und mögliche neue Ansatzpunkte für die Forschung zu bieten.

Die Wahl des Mausstamms fiel auf DBA/2-Ola-Mäuse, da diese besonders empfindlich mit einer Erhöhung der Kortisolspiegel auf Stress reagieren (Thoeringer, Sillaber et al. 2007) und ängstliche Verhaltensmuster zeigen (Ohl, Roedel et al. 2003). Das eingesetzte Antidepressivum Paroxetin ist ein repräsentatives und potentes SSRI, das im klinischen Alltag häufig eingesetzt wird (DGPPN 2015). Die Behandlung der Mäuse mit Paroxetin wurde in einem Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt, was im Mausmodell einer chronischen Behandlung entspricht. Im klinischen Alltag wird die Behandlung meist auf einen entsprechenden chronischen Zeitraum von mindestens vier bis sechs Monaten festgelegt, um eine ausreichende Wirkung der Antidepressiva zu gewährleisten und Rückfälle zu verhindern (Thase 1999, Nierenberg, Petersen et al. 2003).

Als zu untersuchendes Hirngewebe wurde Hippocampus gewählt, da der Hippocampus bei depressiven Patienten durch eine unterdrückte Neurogenese in seiner Funktion eingeschränkt ist (Schaaf, De Kloet et al. 2000, Wong and Licinio 2004, Duman and Monteggia 2006, Anacker 2014). Diese hippocampale Dysfunktion kann durch Antidepressiva positiv beeinflusst werden (Malberg, Eisch et al. 2000, Duman 2004, Alfonso, Frasch et al. 2005, Czeh and Lucassen 2007).

Proteinextrakte aus zerebralen Hippocampuszellen wurden analysiert, da sowohl Neurone als auch Astrozyten an der Pathologie der Depression beteiligt sind (Gos, Schroeter et al. 2013, Rajkowska and Stockmeier 2013, Peng, Verkhatsky et al. 2015, Cobb, O'Neill et al. 2016). Mit der gewählten Methodik wurden Proteine aus Zytoplasma und aus Zellorganellen wie zum Beispiel Mitochondrien gewonnen. Da das Nervensystem hauptsächlich aus sauren und neutralen Proteinen besteht (Yang, Czeh et al. 2004, Witzmann, Arnold et al.

2005), wurde für die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension ein IPG-Strip im Bereich pH=4-7 gewählt. Zur Darstellung von Proteoformen wurden in der zweiten Dimension die Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt.

Das Hybridmassenspektrometer LTQ Orbitrap XL mit vorgeschalteter HPLC liefert hochpräzise Daten von Proteingemischen, so dass keine hohen Fallzahlen nötig sind, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten (Eng, McCormack et al. 1994, Yates, Cociorva et al. 2006), mit denen sich der Turnover und damit die Dynamik des Proteoms berechnen lassen (Doherty and Whitfield 2011). Eine Fallzahl von n=3 war in der hier vorliegenden Studie ausreichend. Insgesamt wurden 3375 Proteine, davon 43 mit Proteoformen, analysiert. Die hohe Anzahl der identifizierten Proteine erklärt sich dadurch, dass pro Spot meist mehrere unterschiedliche Proteine gefunden wurden. Wenn sich Proteine sowohl in ihrem isoelektrischen Punkt als auch in ihrem Molekulargewicht ähneln, befinden sie sich im gleichen Spot auf dem 2D-Gel. Angefärbt wurden die Proteinspots mit Coomassie Blue G-Färbung, welche bereits Proteine ab einer Menge von 30ng mit hoher Sensitivität detektieren kann (Neuhoff, Arold et al. 1988).

Die Protein-Turnoverraten wurden in partiell ¹⁵N-markierten Hippocampi mit der hausinternen Software ProTurnyzer berechnet (Zhang, Reckow et al. 2011). Zehn Proteine zeigten einen signifikanten Turnoverunterschied zwischen Paroxetin- und Vehikelgruppe in mindestens einem Proteoform. Bei nicht ausreichender Markierung mit ¹⁵N konnte für manche Proteine kein Turnover berechnet werden. Dies war vor allem bei Proteinen der Fall, die nur in kleinen Mengen vorhanden waren und die durch einen langsamen Turnover eine geringe Isotopeninkorporation aufwiesen (Zhang, Reckow et al. 2011, Reckow and Webhofer 2014). Deswegen wurde nicht für alle in den Spots gefundenen 3375 Proteine der Turnover berechnet.

Unterschiede der post-translationalen Modifikationen, zum Beispiel Phosphorylierungen, Acetylierungen oder Glykosylierungen (Gooley and Packer 1997, Smith and Kelleher 2013), haben Auswirkungen auf Proteinaktivität, Signaltransduktion, Proteinlokalisierung in der Zelle und Proteinabbau (Gao, Qi et al. 2013, Pantazatos, Andrews et al. 2015, Sehgal, Mannan et al. 2015, Wagner, Hartmann et al. 2015). Mit Hilfe der MASCOT Database Search Software wurde nach PTMs, die die unterschiedliche Position der Proteoformen

im 2D Gel erklären könnten, und nach PTM-Unterschieden zwischen den Proteoformen der Vehikel- und Paroxetingruppe gesucht. Mit PTMs können Proteoforme von Proteinen genauer charakterisiert werden. Die Auswertungen der PTMs brachten keine detektierten Unterschiede. Da im Vergleich zu Peptiden ohne PTMs, modifizierte Peptide meist in kleinerer Menge vorhanden sind, ist ihre MS-Identifikation erschwert (Mann and Jensen 2003, Olsen and Mann 2013).

Für drei Proteine mit Unterschieden im Turnover einzelner Proteoforme - GFAP, 1433F und IMMT - wurden zusätzlich zu 2D-PAGE WBs durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Gesamtmenge eines Proteins aufzudecken. Die 2D-Spots der einzelnen Proteoforme dieser Proteine zeigten keinen Unterschied in der Intensität im WB. Erst die Berechnung des Turnovers ergab Unterschiede in der Aktivität der Proteoforme zwischen Vehikel- und Paroxetinhippocampi. Mit Hilfe der WBs waren ebenso wenig quantitative Unterschiede in der Gesamtmenge der Proteine festzustellen. Die Ergebnisse zeigen, dass die angewandte aufwendige Methodik - die Berechnung der Turnoverraten – notwendig ist, um dynamische Veränderungen im Proteom aufzudecken. Zum Verständnis der Wirkung von Paroxetin auf das Proteom reicht eine rein quantitative Untersuchung nicht aus, da weder mit WBs noch mit 2D-PAGE die Veränderungen der Proteinaktivität darstellbar sind.

Bisherige Proteomikstudien zu Antidepressiva führten die reine Quantifizierung von Proteinen durch, wandten Metabolomik an (Khawaja, Xu et al. 2004, Berton and Nestler 2006, McHugh, Rogers et al. 2010, Webhofer, Gormanns et al. 2013, Ge, Zhu et al. 2015) oder untersuchten die Transkription von Isoformen (Vialou, Thibault et al. 2015). Die in dieser Arbeit durchgeführte Kombination von Proteinexpression, -quantifizierung und Berechnung des Turnovers von Proteoformen in Mäusehippocampi ist eine neue Herangehensweise zur Untersuchung der Wirkung Paroxetins.

5.1 Proteine mit signifikanten Turnoververänderungen

Bei der Berechnung des Turnovers stand die zentrale Frage, ob nach Gabe von Paroxetin Proteoforme eines Proteins verändert synthetisiert werden. In der medizinischen Forschung können über die Berechnung des Turnovers neue Informationen über Biomarker gewonnen werden, die über die reine Proteinquantifizierung hinausgehen, da Veränderungen der Protein-Expression

schneller und genauer über den Turnover gemessen werden kann (Zhang, Reckow et al. 2011). Ein höherer Turnover von Proteinen in den mit Paroxetin behandelten Mäusen im Vergleich zu Vehikelmäusen weist darauf hin, dass das Protein durch die Behandlung vermehrt synthetisiert wird.

Alternativ zur Berechnung des Turnovers, könnte direkt das Transkriptom, also die mRNA-Transkripte als Vorstufe der Proteinexpression, nachgewiesen und quantifiziert werden, um die dynamischen Änderungen des Proteoms darzustellen. Allerdings besteht zwischen Konzentration an mRNA-Transkripten und Proteinexpression häufig keine direkte Korrelation. Ob mRNA translatiert wird, hängt von diversen Faktoren ab. Dazu zählt vor allem die ribosomale Aktivität (Anderson and Seilhamer 1997, Chen, Gharib et al. 2002, Mehra, Lee et al. 2003). Die Bestimmung der Turnoverraten ist aufgrund der ungenügenden Korrelation zwischen mRNA-Level und Menge an Proteintranslation die Methode der Wahl, um dynamische Änderungen der Proteinexpression unter Paroxetinbehandlung darzustellen.

Im folgenden Abschnitt werden die Proteine mit signifikanten Turnoververänderungen und ihre Rolle im Krankheitsbild der Depression diskutiert.

5.1.1 Astrozytäre Aktivität

Das Intermediärfilament Saure Gliafaserprotein aus Astrozyten zeigte in der hier vorliegenden Studie in zwei von neun gefundenen Proteoformen einen um etwa 200% höheren Turnover in der Paroxetingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Literatur sind bisher acht Isoforme von GFAP beschrieben, deren Bedeutung allerdings noch nicht ausreichend verstanden wird (Middeldorp and Hol 2011). Zu den beiden Proteoformen, die in dieser Studie einen signifikant erhöhten Turnover zeigten, kann deswegen leider noch keine befriedigende Erklärung abgegeben werden. Dazu benötigt es weitere Untersuchungen zu den einzelnen Iso- und Proteoformen. Es bleibt außerdem noch zu beantworten, welche Rolle die 37kDa schweren Proteoforme von GFAP spielen, da in der Literatur bisher nur die Proteoforme mit etwa 50kDa beschrieben sind (UniProt 2017). Die leichteren GFAP-Proteoforme könnten beispielsweise durch alternatives Splicing entstanden sein. Sie wurden sowohl bei Vehikel- als auch bei Paroxetinmäusen gefunden und der Turnover dieser

drei Proteoforme unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Das heißt, sie scheinen nicht spezifisch von Paroxetin moduliert zu werden.

Auch ohne klinische Einordnung der einzelnen Proteoforme, deuten die Ergebnisse der signifikanten Turnoverunterschiede in zwei Proteoformen darauf hin, dass Paroxetin nicht nur auf neuronaler, sondern auch auf astrozytärer Ebene Veränderungen bewirkt. Der Turnover von GFAP als astrozytärer Marker in den Paroxetinmäusen lässt auf eine verstärkte astrozytäre Modulation nach Paroxetineinnahme folgern. Ob auf den 2D-Gelen und im WB auch noch ein quantitativer Unterschied nach einer längeren Phase der Paroxetingabe aufgefallen wäre, muss noch untersucht werden.

GFAP wird als astrozytärer Zellmarker verwendet (Sofroniew and Vinters 2010), spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Astrozyten aus Gliazellen, beeinflusst als zytoskelettales Protein die mechanische Stabilität von Astrozyten (McCall, Gregg et al. 1996, Menet, Gimenez y Ribotta et al. 2001, Simard, Arcuino et al. 2003) und führt so zu einer schnelleren Regeneration der Nervenzellen (Triolo, Dina et al. 2006). Astrozyten sind nicht nur ein statisches Zellskelett im zentralen Nervensystem, sondern aktiv an der Plastizität des Gehirns beteiligt. Neurone sind in ihrer Funktionalität auf die Zusammenarbeit mit Astrozyten angewiesen, denn Astrozyten regulieren unter anderem den Glucose-Metabolismus, die Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke und der Synapsen (Simard, Arcuino et al. 2003, Pascual, Casper et al. 2005, Theodosis, Poulain et al. 2008, Kimelberg and Nedergaard 2010, Blumenthal, Hermanson et al. 2014, Jha, Lee et al. 2016) und den Neurotransmitter-Uptake, vor allem von Glutamat (Hughes, Maguire et al. 2004). Astrozyten koordinieren die neuroinflammatorische Antwort auf Traumata oder zerebrären Stress (Faulkner, Herrmann et al. 2004). Studien zu den Aufgaben der Astrozyten im neuronalen Kontext kommen zu dem Schluss, dass Astrozyten eine wesentliche Rolle beim Prozess von neuronalen Erkrankungen spielen, zum Beispiel bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (Mayo, Trauger et al. 2014) oder Morbus Alzheimer (Blumenthal, Hermanson et al. 2014). Während in neurodegenerativen Erkrankungen eine reaktive Astroglie mit hohen GFAP-Werten als Zeichen der Reaktion auf Neuroinflammation stattfindet, zeigen sich in post-mortem Studien zur Depression keine Astroglie, eine Verringerung der Expression von GFAP (Muller, Lucassen et al. 2001, Gosselin, Gibney et al. 2009, Rajkowska and Stockmeier 2013) und im

Hippocampus eine Reduktion der Astrozytendichte (Gos, Schroeter et al. 2013). In einem Review von Czeh et al. wird gesagt, dass Antidepressiva Astrozyten in ihrer Funktion als Stabilisatoren der Synapsen aktivieren und an hippocampaler Neurogenese beteiligt sind (Czeh and Di Benedetto 2013), so auch das trizyklische Antidepressivum Imipramin, das SSRI Fluoxetin und das SNRI Venlafaxin (Cabras, Saba et al. 2010, Iwata, Shirayama et al. 2011).

Die Auswirkung von Antidepressiva auf die GFAP-Expression wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei nicht mit Antidepressiva behandelten Patienten mit einer Depression reduzierte sich die Anzahl der GFAP-positiven Astrozyten im Hippocampus, während nach Behandlung mit Antidepressiva die Astrozytendichte der Kontrollgruppe glich (Cobb, O'Neill et al. 2016). In der Studie von Cobb bleibt die Frage offen, ob die Antidepressiva die Reduktion der Astrozytendichte verhinderten oder sie wieder aufbauten. Araya-Callis et al. untersuchten den Effekt des SSRIs Citalopram auf Mäuse, die chronischem Stress ausgesetzt waren. GFAP wurde wie zu erwarten in den chronisch gestressten Mäusen herunterreguliert. Citalopram konnte diesen Effekt nicht verhindern (Araya-Callis, Hiemke et al. 2012). Allerdings wurde hier nur quantitativ mittels WB die GFAP-Expression verglichen und nicht der Turnover bestimmt.

In Studien, in denen der Effekt von Paroxetin auf Stammzellen untersucht wurde, wurde eine Expressionsreduktion von GFAP beobachtet (McHugh, Rogers et al. 2008, Jahromi, Razavi et al. 2016). Diese beiden Studien sind nur bedingt mit der vorliegenden Untersuchung vergleichbar, da sie nicht mit Mäusen sondern Stammzellen durchgeführt wurden und somit keinen in vivo Effekt von Paroxetin nachweisen. In Studien zu GFAP-knockout Mäusen war die neuronale Regeneration im Hippocampus nach einem Trauma beachtlich besser als im GFAP-Wildtyp (Ribotta, Menet et al. 2004, Wilhelmsson, Li et al. 2004). Allerdings geht es in diesen Studien um traumatische Läsionen und nicht um Erkrankungen aus dem psychiatrischen Formenkreis. Es bedarf weiterer Forschung zur Pathologie der Astrozyten in der Depression, um zu klären, inwieweit reaktive Astrozyten für umgebende Neurone schädlich oder von Vorteil sind.

Um die astrozytäre Reaktion auf Paroxetin genauer einordnen zu können, sollte in zukünftigen Studien nach weiteren Veränderungen in astrozytären Proteinen wie zum Beispiel dem Intermediärfilament Vimentin (Dahl and Bignami 1985)

oder S100B (Gos, Schroeter et al. 2013), die nicht in allen der hier untersuchten Mäuse ausreichend quantitativ erfasst werden konnten, gesucht werden.

5.1.2 Rolle der Mitochondrien

Neben Turnoververänderungen in zytoplasmatischen Proteinen, wurden Veränderungen in drei mitochondrialen Proteinen gefunden. Mitofilin, 60kDa Hitzeschockprotein und Isocitrat-Dehydrogenase α zeigten signifikant höhere Turnover in Paroxetinmäusen. Andere Studien konnten aktivierende Effekte auf Mitochondrien bei Behandlung mit Antidepressiva unterschiedlicher Substanzklassen feststellen. Mit dem gleichen Mausstamm DBA/2-Ola wie in der hier vorliegenden Studie konnten Webhofer et al. mit Metabolomik-Untersuchungen unter anderem erniedrigte Spiegel von Metaboliten des Citratzyklus und eine Erhöhung der Energielevel der Neuronen nach chronischer Verabreichung von Paroxetin nachweisen (Webhofer, Gormanns et al. 2013). Glombik et al. zeigten im Rattenmodell ebenfalls eine quantitative Hochregulierung verschiedener mitochondrialer Enzyme, darunter IDH3A, bei Behandlung mit Tianeptin, einem atypischem Antidepressivum (Glombik, Stachowicz et al. 2016). Scaini et al. wiesen eine Aktivierung der mitochondrialen Atmungskette in Mäusen nach, denen für 15 Tage das TCA Nortryptilin, das SNRI Venlafaxin oder das SSRI Paroxetin zugeführt wurden (Scaini, Maggi et al. 2011). Es bleibt zu klären, ob die mitochondrialen Veränderungen das therapeutische Ziel der Antidepressiva sind oder ob sie Begleiterscheinungen spezifischer Antidepressiva sind.

Das mitochondriale Protein IMMT ist essentiell für die Funktion der Neuronen (Van Laar, Berman et al. 2016). Es ist Teil des ‚mitochondrial contact site and cristae junction organizing system‘ MICOS, das die mitochondriale Membranstruktur und Funktion erhält und an der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist (Kozjak-Pavlovic 2017). An der inneren Membran ist IMMT an der Bildung von Invaginationen, den Cristae, beteiligt, die die Oberfläche der Mitochondrienmembran erhöhen und dadurch eine vermehrte oxidative Phosphorylierung und ATP-Synthese zur Energie-gewinnung der Zelle ermöglichen (Gilkerson, Selker et al. 2003, John, Shang et al. 2005). Gleichzeitig bildet IMMT Kontaktstellen mit der äußeren Membran, über die es mit Proteinen im Zytoplasma kommuniziert (Hessenberger, Zerbes et al. 2017).

Die Herunterregulation von IMMT bewirkt die Bildung von strukturell instabilen Riesenmitochondrien, die eine reduzierte Funktion besitzen und weniger Energie für die Zelle gewinnen (Bohnert, Wenz et al. 2012, Ott, Dorsch et al. 2015, Yang, Sun et al. 2015, Li, Ruan et al. 2016). Durch diese abnorme mitochondriale Funktion bei der Herunterregulation von IMMT ist die zelluläre Proliferation vermindert und die Apoptoserate erhöht. Während Mutationen von IMMT durch veränderte Bindung an andere Proteine mit neurodegenerativen Erkrankungen wie dem familiären Parkinson-Syndrom in Verbindung stehen (Wang, Winter et al. 2011), ist bisher kein Zusammenhang zur Depression oder zu Antidepressiva bekannt. In den hier durchgeführten Experimenten zeigte IMMT in einer von drei Proteoformen einen signifikant um 435% erhöhten Turnover in den mit Paroxetin behandelten Mäusen. Quantitativ war kein Unterschied nachzuweisen. Eine Erhöhung des Turnovers von IMMT unter Paroxetingabe deutet auf eine Modulation der mitochondrialen Aktivität in hippocampalen Zellen hin. Dafür sprechen auch Studienergebnisse aus Metabolomik-Untersuchungen, in denen erniedrigte Spiegel von Enzymen der oxidativen Phosphorylierung mit einem Shift zur aeroben Energiegewinnung unter antidepressiver Therapie von Mäusen festgestellt wurden (Filiou, Webhofer et al. 2012, Webhofer, Gormanns et al. 2013).

Um IMMT und seine Modulation durch Paroxetin besser verstehen zu können, müssten IMMTs Interaktionen mit Proteinen, die an neurodegenerativen Vorgängen und an mitochondrialen Abläufen wie dem Signalweg des mitochondrial induzierten Zelltods in Folge von Stress beteiligt sind, näher erforscht werden.

Das mitochondriale Chaperonin CH60 gehört zu der Familie der Hitzeschockproteine (Macario, Lange et al. 1999). HSPs spielen eine neuroprotektive Rolle, da sie in ihrer Funktion als Chaperone neuronale Plastizität fördern (Nedivi, Hevroni et al. 1993, Hong, Li et al. 2004). Durch den Abbau falsch gefalteter Proteine schützen sie Zellen vor dem Zelltod durch oxidativen Stress, Hitze, Toxine, Infektionen, Traumata, Ischämien und anderen Stressoren (Lindquist and Craig 1988, Morimoto and Santoro 1998, Lin, Lin et al. 2001, Arya, Mallik et al. 2007). In der hier vorliegenden Untersuchung unterliegt CH60 in beiden Gruppen einem niedrigen Turnover. In einer Proteoform war der Turnover der Vehikelgruppe um 29% niedriger als in der

Paroxetingruppe, in einer anderen Proteoform um 15% höher. Da die Aufgaben und Unterschiede der Proteoforme von CH60 nicht bekannt sind, können zum aktuellen Zeitpunkt die Unterschiede in den Turnoverraten der einzelnen Proteoforme noch in keinen klinischen Kontext eingeordnet werden. Allgemein verhindert das Protein CH60 Proteindenaturierung und fördert die Neufaltung von geschädigten Proteinen nach zellulärem Stress (Bozner, Wilson et al. 2002, Boyd-Kimball, Sultana et al. 2005, Chan, Cheng et al. 2007). CH60 bildet einen Komplex mit HSP10, der essentiell für das Überleben von Neuronen ist (Bottinger, Oeljeklaus et al. 2015). So konnte bei Alzheimer-Patienten post-mortem eine erniedrigte CH60-Expression festgestellt werden (Yoo, Kim et al. 2001). Die Spiegel von CH60 können als Reaktion auf Stressbedingungen wie neoplastischen oder autoimmunen Vorgängen in der Zelle ansteigen (Nakamura and Minegishi 2013). Bei Patienten mit bipolarer Störung wird die Erhöhung der Serumspiegel von HSPs in der akuten Krankheitsphase als Zeichen der Immunaktivierung gewertet (Stertz, Fries et al. 2015). Allerdings ist der genaue Zusammenhang von HSPs und psychiatrischen Erkrankungen noch nicht ausreichend untersucht.

5.1.3 Paroxetins Wirkung auf neuronales Überleben

Neben den mitochondrialen Proteinen waren in weiteren Proteinen, die positive Auswirkungen auf das Zellüberleben haben, veränderte Turnoverraten vorhanden. Die Proteine 14-3-3 η , Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor 1, β -lösliches NSF-attachment Protein und die Untereinheiten α , ϵ und θ des Chaperons T-Komplex Protein 1 sind alle am Wachstum und Überleben der Zellen beteiligt. Die erhöhten Turnoverraten unter Paroxetingabe zeigen Paroxetins modulatorische Wirkung auf zellzyklus-fördernde Proteine.

In zwei der vier Proteoformen des Proteins 14-3-3 η war der Turnover der Paroxetingruppe um 54% und um 20% signifikant erhöht. 14-3-3 η gehört zur Familie der 14-3-3 Proteine, die ebenfalls über zahlreiche Interaktionen mit anderen Proteinen anti-apoptotisch und zellzyklus-fördernd wirken (Fu, Subramanian et al. 2000, van Hemert, Steensma et al. 2001, Darling, Yingling et al. 2005) und eine wichtige Rolle bei hippocampaler Langzeitpotenzierung und Konsolidierung von Gedächtnisinhalten zu spielen scheinen (Qiao, Foote et al. 2014). Die Isoforme der 14-3-3 Proteine sind sich alle sehr ähnlich und bis

jetzt wurden nur wenige spezifische Funktionen der einzelnen Isoforme entdeckt, so dass noch nicht klar ist, warum die Zellen so viele Isoforme besitzen (Dougherty and Morrison 2004). Die Proteoforme der einzelnen 14-3-3 Proteine sind in ihrer Funktion nicht erforscht. Hirngewebe hat die höchste Konzentration an 14-3-3 Proteinen. Sie machen etwa 1% aller löslichen Hirnproteine aus (Moore 1967). Dadurch kann man sie auch im Liquor bestimmen, was man sich diagnostisch bei Prionenerkrankungen wie Creutzfeldt-Jakob zu Nutze macht (Hsich, Kenney et al. 1996, Baxter, Fraser et al. 2002, Green 2002). Generell sind Dysregulationen der 14-3-3 Proteine durch post-translationale Phosphorylierung, die deren Aktivität herabsetzt, mit weiteren neurodegenerativen Erkrankungen, unter anderem der Alzheimer Demenz, assoziiert (Dougherty and Morrison 2004). Spezifisch für 14-3-3 η ist bekannt, dass die Depletion von 14-3-3 η pro-apoptotisch wirkt (Park, Han et al. 2014). Es reguliert sowohl alpha-Synuclein als auch Parkin, die beide bei Dysfunktion zum familiären Parkinson führen (Sato, Chiba et al. 2006, McFerrin, Chi et al. 2017). Ein Zusammenhang mit der Wirkung von Antidepressiva ist bisher nicht beschrieben.

Für Protein GDIR1 wurden keine Proteoforme identifiziert, da es nur in einem Spot gefunden wurde. Der Turnover war um knapp 30% höher in Paroxetin- als in Vehikelmäusen. GDIR1 fällt eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der Rho-Proteine, der sogenannten Guaninnukleotid-(GTP/GDP)-Austauschfaktoren, zu, denn es kontrolliert deren Recycling und Verteilung und verhindert deren Abbau (Boulter, Garcia-Mata et al. 2010). Rho-Proteine kontrollieren verschiedene Zellaktivitäten wie Migration, Polarität, Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen (Etienne-Manneville and Hall 2002, Burridge and Wennerberg 2004, Cernuda-Morollon and Ridley 2006). Carboni et al. wiesen nach, dass das Gen ARHGDI1, das GDIR1 kodiert, unter chronischer Behandlung mit dem SSRI Fluoxetin hochreguliert wird (Carboni, Vighini et al. 2006). McHugh et al. zeigten mittels 2D-PAGE eine vermehrte Expression von GDIR1 in Rattenhippocampi nach Paroxetinbehandlung (McHugh, Rogers et al. 2010). Allerdings wurden in McHughs Studie nur visuelle Unterschiede in der Spotintensität zwischen Kontroll- und Paroxetingruppe und nicht der Turnover berechnet. Die rein visuellen Spotintensitätsunterschiede konnten in der hier durchgeführten Studie

nicht nachgewiesen werden, da sich der Spot mit GDIR1 in seiner Anfärbeintensität nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen unterschied. Erst bei Berechnung des Turnovers zeigte sich ein erhöhter Turnover von GDIR1 in den Paroxetinmäusen.

Neben dem Chaperon CH60 zeigte das Chaperon T-Komplex Protein 1 in drei Untereinheiten Unterschiede im Turnover. TCP-1 bildet einen Ringkomplex bestehend aus acht verschiedenen Untereinheiten und faltet als ATP-abhängiges Chaperon zytoskeletale Proteine wie Aktin, Tubulin und andere Substrate (Frydman, Nimmegern et al. 1992, Gao, Thomas et al. 1992, Lewis, Hynes et al. 1992, Yaffe, Farr et al. 1992, Yam, Xia et al. 2008, Kabir, Uddin et al. 2011, Lopez, Dalton et al. 2015). Es nimmt dadurch eine schützende Rolle durch Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und Verhindern der Anhäufung falsch gefalteter Proteine bei oxidativem Stress ein (Kane, Konu et al. 2004). Mutationen des TCP1-Komplexes sind mit Alzheimer und Parkinson als Proteinaggregationskrankheiten assoziiert (Lopez Salon, Morelli et al. 2000, McNaught and Jenner 2001, Schuller, Gulesserian et al. 2001). Die Ergebnisse der Turnoverraten zeigen in den untersuchten Paroxetinmäusen zwar in allen Untereinheiten von TCP-1 höhere Turnoverraten, allerdings ist die Signifikanz des Unterschiedes zwischen Vehikel- und Paroxetingruppe mit $p=0.038$ bei TCPE und $p=0.025$ bei TCPQ nicht sehr hoch. Mit der Depression wurde dieses Protein bisher nicht in Zusammenhang gebracht.

Der Turnover von SNAB in Paroxetinmäusen war um 28% höher als in der Kontrollgruppe. Paroxetin scheint somit zu einer vermehrten Aktivität von SNAB im Hippocampusgewebe zu führen. SNAB gehört zur Familie der SNARE-Proteine und wird für den Transport der Vesikel zwischen Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum benötigt (Clary, Griff et al. 1990). Außerdem kann es bei hoher Synapsenaktivität das Recycling der Vesikel nach Neurotransmitter-Release an der Präsynapse beschleunigen, was zu einer schnelleren Fusion neuer Neurotransmitter-Vesikel mit der Synapse führt (Burgalossi, Jung et al. 2010). Im Tierversuch mit Ratten, die über sieben Wochen chronischem Stress ausgesetzt waren, wurde SNAB mit Stressresilienz assoziiert. Die gestressten Ratten, die weniger depressive Symptome wie Anhedonie unter Dauerstress zeigten, also stressresistent

waren, zeigten eine erhöhte SNAB-Expression im ventralen Hippocampus (Bisgaard, Jayatissa et al. 2007). Andere Proteine aus der Familie des SNARE-Komplexes stehen bereits mit der Depression in Verbindung, zum Beispiel Genvarianten des Proteins SNAP25 (Wang, Wang et al. 2015). Die Herunterregulation von SNAB lässt sich in neurodegenerativen Erkrankungen wie Prionenerkrankungen (Lin, Zhao et al. 2015), Morbus Alzheimer und dem Down-Syndrom (Yoo, Cairns et al. 2001) nachweisen. SNAB ist somit ein weiteres Protein, das eine wichtige Rolle im Überleben von Neuronen spielt und von Paroxetin in seiner Aktivität beeinflusst wird.

Eine erhöhte Expression von drei der hier gefundenen Proteine wurde in einer Studie zu körperlicher Aktivität festgestellt. Der Turnover wurde dabei allerdings nicht bestimmt. Körperliches Training besitzt einen bekannten antidepressiven und Neurogenese fördernden Effekt (Ernst, Olson et al. 2006, Wegner, Helmich et al. 2014, Kandola, Hendrikse et al. 2016, Netz 2017, Schuch, Deslandes et al. 2017). Ding et al. führten eine Studie zu körperlichem Training von Ratten durch (Ding, Vaynman et al. 2006). In der Studie waren das astrozytäre Protein GFAP und die Chaperone TCP-1 und CH60, welche alle drei mit Neuroplastizität in Verbindung stehen, im Rattenhippocampus nach freiwilligem sportlichen Training im Hamsterrad über einen Zeitraum von fünf Tagen erhöht exprimiert. Das SSRI Paroxetin und körperliches Training scheinen eine zumindest teilweise Überlappung der Modulationsveränderungen im hippocampalen Proteom zu besitzen.

5.2 Ausblick

Die Ergebnisse der Turnoverberechnungen zeigen, dass Paroxetin für das Zellüberleben essentielle Proteine in ihrer Aktivität moduliert. Als nächster Schritt wäre interessant zu untersuchen, ob die erhöhten Turnoverraten der gefundenen Proteine mit einem Erfolg der Therapie korrelieren. Bei Mäusen könnte man das zum Beispiel mit der Durchführung eines Forced Swim Tests (FST) herausfinden (Porsolt, Bertin et al. 1977). Dabei teilt man die Mäuse je nach Verhalten im FST in Low Responder und High Responder ein (Park, Dournes et al. 2016). Wenn die behandelten Mäuse im FST im Vergleich zu vor der Behandlung besser abschneiden (also High Responder sind) und sich in ihren Hippocampi wieder erhöhte Turnoverraten der hier identifizierten Proteine

detektieren lassen, so ließe sich daraus folgern, dass die erhöhten Turnoverraten, ob generell oder nur in einer bestimmten Proteoform, als ein Erfolgsmarker der Therapie herangezogen werden könnten.

Als Nachteil der hier vorliegenden Studie kann die niedrige Zahl an untersuchten Mäusen angebracht werden (n=3). Für eine höhere Signifikanz und Einordnung der Ergebnisse könnten weitere Studien mit höherer Anzahl an Mäusen durchgeführt werden. Außerdem wurden nur Hippocampi von männlichen Mäusen verwendet (Webhofer, Gormanns et al. 2013). Da die Depression bei Frauen häufiger auftritt (Kessler 2003, Kuehner 2003), wäre interessant zu untersuchen, ob bei weiblichen Mäusen die gleichen Ergebnisse gefunden werden. Darüber hinaus könnten die Untersuchungen auf andere an der Pathogenese der Depression beteiligten Hirnregionen, wie zum Beispiel dem präfrontalen Kortex (Koenigs and Grafman 2009) oder dem Nucleus accumbens (Shirayama and Chaki 2006), erweitert werden, um zu klären, ob die Ergebnisse spezifisch für den Hippocampus sind.

Darüber hinaus wäre es möglich, unter ähnlich standardisierten Labor- und Behandlungskonditionen andere Psychopharmaka wie SNRIs und TCAs oder andere Therapieformen auf Turnoververänderungen zu untersuchen und mit den hier vorliegenden Ergebnissen von Paroxetin zu vergleichen.

Ob die gefundenen Unterschiede in den Turnoverraten auch bei Untersuchungen am Menschen aufweisbar sind, lässt sich bei Übertragung des Mausmodells auf den Menschen nur post-mortem feststellen, da Hippocampusgewebe entnommen werden müsste. Es müsste getestet werden, ob die Proteine stattdessen aus Blut oder Liquor extrahierbar wären. Das wäre notwendig, um sie als Biomarker in der Therapie anwenden zu können. In der Vergangenheit wurden zum Beispiel mit Erfolg Proteine aus Thrombozyten depressiver Patienten extrahiert. So konnte ein erniedrigter Proteinspiegel von T-Komplex Protein 1 β in Thrombozyten depressiver Patienten nachgewiesen werden (Huang, Sung et al. 2014), eine Untereinheit des Proteins, die im Gegensatz zu anderen Untereinheiten in der hier durchgeführten Untersuchung nicht auffällig war. Die Untersuchung von Thrombozyten depressiver Patienten unter Antidepressiva-Therapie könnte ein Ansatz sein, um Turnoververänderungen von Proteinen zu detektieren, die auch zentral eine Rolle spielen, und um diese Daten mit dem klinischen Erfolg der Therapie zu korrelieren.

Mit der hier vorliegenden Studie wurden durch Paroxetin ausgelöste bisher unbekannte Turnoverunterschiede in Proteoformen aufgedeckt. Die Aufgaben der einzelnen Proteoforme der Proteine sind bislang nicht geklärt. Die Möglichkeit einer genaueren klinischen Einordnung der Proteoforme wäre wünschenswert, um Paroxetins Wirkung noch besser zu verstehen. Bisher fokussiert sich die Interpretation der Ergebnisse auf die Proteine selbst und weniger auf die Proteoforme, die in zukünftiger Forschung zu charakterisieren sind. Weitere Studien zu Turnoververänderungen in Proteinen und Proteoformen können das Wissen um die Wirkung antidepressiver Therapien auf die Proteom-Dynamik zerebraler Zellen erweitern. Mit der Anwendung von Proteomik in der psychiatrischen Forschung durch Untersuchungen mit etablierten standardisierten Mausmodellen können neue Hypothesen der Ätiologie der Depression und der Wirkung von Medikamenten mit potentiellen neuen Zielmolekülen entwickelt werden. Von neuen Biomarkern, mit denen der Therapieerfolg frühzeitig eingeschätzt werden kann, könnten Patienten durch die Möglichkeit einer zügigen Therapieanpassung profitieren. Die hier durchgeführte Studie ist dabei ein Schritt zum besseren Verständnis der durch Paroxetin hervorgerufenen molekularen und zellulären Prozesse, die über die Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmung hinausgehen.

6 Zusammenfassung

Die Depression ist eine weit verbreitete psychische Erkrankung, die Betroffene in ihrer Lebensqualität stark beeinträchtigt. Die Psychopharmakotherapie der unipolaren Depression wird häufig mit Antidepressiva, die eine Hemmung der Serotonin-Wiederaufnahme im synaptischen Spalt bewirken, durchgeführt. Das therapeutische Ansprechen tritt erst verzögert nach zwei bis vier Wochen nach Therapiebeginn ein, wodurch der Leidensdruck der Patienten sehr hoch ist. Neben der Erhöhung des Serotoninspiegels setzen Antidepressiva weitere noch unzureichend verstandene Langzeiteffekte und Anpassungsvorgänge auf genetischer Ebene und über Second-Messenger-Systeme in Zellen in Gang, die den späten therapeutischen Effekt erklären könnten. In der vorliegenden Studie wurden Veränderungen von dynamischen molekularen und zellulären Prozessen in DBA/2-Ola-Mäusen, die das repräsentative SSRI Paroxetin erhielten, mit Hilfe von Proteomik-Hochleistungstechnologie untersucht. Auf der Suche nach Unterschieden in der Expression von Proteoformen und im Turnover wurde Hippocampusgewebe von über einen Zeitraum von 28 Tagen chronisch mit Paroxetin behandelten Mäusen mit denen von Vehikelmäusen verglichen. Auf den 2D-Gelen war keine veränderte Expression der Proteoforme nachweisbar. Zur Berechnung des Turnovers wurde die metabolische in vivo Markierung mit dem stabilen Isotop ^{15}N mit MS-Technologien und der ProTurnyzer Software kombiniert. Zehn Proteine zeigten signifikante Unterschiede im Turnover. Die Proteine GFAP, 1433F, IMMT, IDH3A und TCPA2 hatten in mindestens einer Proteoform höhere Turnover in der Paroxetingruppe. Bei CH60 hatte eine Proteoform einen höheren Vehikel- und eine eine höhere Paroxetinturnover. Die vier Proteine GDIR1, SNAB, TCPE und TCPQ ohne Proteoforme hatten ebenfalls höhere Turnover in der Paroxetingruppe. Die neuen Erkenntnisse zu veränderten Turnover in den mit Paroxetin behandelten Mäusen zeigen, dass Paroxetin zytoplasmatische und mitochondriale Proteine moduliert, die essentiell für die Funktion und das Wachstum von Neuronen und Astrozyten sind. Die hier durchgeführte Studie führt zu einem besseren Verständnis der durch Paroxetin hervorgerufenen dynamischen Veränderungen des hippocampalen Proteoms. Es bedarf weiterer Studien, um die Aufgaben der einzelnen Proteoforme und ihre klinische Rolle als mögliche Drug Targets von SSRIs genauer charakterisieren zu können.

7 Literaturverzeichnis

- Alfonso, J., A. C. Frasch and G. Flugge (2005). "Chronic stress, depression and antidepressants: effects on gene transcription in the hippocampus." Rev Neurosci **16**(1): 43-56.
- Anacker, C. (2014). "Adult hippocampal neurogenesis in depression: behavioral implications and regulation by the stress system." Curr Top Behav Neurosci **18**: 25-43.
- Anderson, I. M. (2000). "Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability." J Affect Disord **58**(1): 19-36.
- Anderson, L. and J. Seilhamer (1997). "A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver." Electrophoresis **18**(3-4): 533-537.
- Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri and P. G. Haydon (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." Trends Neurosci **22**(5): 208-215.
- Araya-Callis, C., C. Hiemke, N. Abumaria and G. Flugge (2012). "Chronic psychosocial stress and citalopram modulate the expression of the glial proteins GFAP and NDRG2 in the hippocampus." Psychopharmacology (Berl) **224**(1): 209-222.
- Arbelaez, J. J., A. A. Ariyo, R. M. Crum, L. P. Fried and D. E. Ford (2007). "Depressive Symptoms, Inflammation, and Ischemic Stroke in Older Adults: A Prospective Analysis in the Cardiovascular Health Study." Journal of the American Geriatrics Society **55**(11): 1825-1830.
- Arroll, B., C. R. Elley, T. Fishman, F. A. Goodyear-Smith, T. Kenealy, G. Blashki, N. Kerse and S. Macgillivray (2009). "Antidepressants versus placebo for depression in primary care." Cochrane Database Syst Rev(3): Cd007954.
- Arya, R., M. Mallik and S. C. Lakhota (2007). "Heat shock genes - integrating cell survival and death." J Biosci **32**(3): 595-610.
- Azevedo, F. A., L. R. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. Ferretti, R. E. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent and S. Herculano-Houzel (2009). "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain." J Comp Neurol **513**(5): 532-541.
- Bantscheff, M., S. Lemeer, M. M. Savitski and B. Kuster (2012). "Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present." Anal Bioanal Chem **404**(4): 939-965.
- Bantscheff, M., M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick and B. Kuster (2007). "Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review." Anal Bioanal Chem **389**(4): 1017-1031.
- Barres, B. A. (2008). "The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease." Neuron **60**(3): 430-440.
- Battle, C. L., L. Uebelacker, M. A. Friedman, E. V. Cardemil, C. G. Beevers and I. W. Miller (2010). "Treatment goals of depressed outpatients: a qualitative investigation of goals identified by participants in a depression treatment trial." J Psychiatr Pract **16**(6): 425-430.
- Baxter, H. C., J. R. Fraser, W. G. Liu, J. L. Forster, S. Clokie, P. Steinacker, M. Otto, E. Bahn, J. Wiltfang and A. Aitken (2002). "Specific 14-3-3 isoform detection and immunolocalization in prion diseases." Biochem Soc Trans **30**(4): 387-391.
- Belanoff, J. K., K. Gross, A. Yager and A. F. Schatzberg (2001). "Corticosteroids and cognition." J Psychiatr Res **35**(3): 127-145.
- Bertelsen, A., B. Harvald and M. Hauge (1977). "A Danish twin study of manic-depressive disorders." Br J Psychiatry **130**: 330-351.
- Berton, O. and E. J. Nestler (2006). "New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines." Nat Rev Neurosci **7**(2): 137-151.
- Bisgaard, C. F., M. N. Jayatissa, J. J. Enghild, C. Sanchez, R. Artemychyn and O. Wiborg (2007). "Proteomic investigation of the ventral rat hippocampus links DRP-2 to escitalopram treatment resistance and SNAP to stress resilience in the chronic mild stress model of depression." J Mol Neurosci **32**(2): 132-144.

Bloch, R. G., A. S. Dooneief, A. S. Buchberg and S. Spellman (1954). "The clinical effect of isoniazid and iproniazid in the treatment of pulmonary tuberculosis." Ann Intern Med **40**(5): 881-900.

Blumenthal, N. R., O. Hermanson, B. Heimrich and V. P. Shastri (2014). "Stochastic nanoroughness modulates neuron-astrocyte interactions and function via mechanosensing cation channels." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(45): 16124-16129.

Bohnert, M., L. S. Wenz, R. M. Zerbes, S. E. Horvath, D. A. Stroud, K. von der Malsburg, J. M. Muller, S. Oeljeklaus, I. Perschil, B. Warscheid, A. Chacinska, M. Veenhuis, I. J. van der Klei, G. Daum, N. Wiedemann, T. Becker, N. Pfanner and M. van der Laan (2012). "Role of mitochondrial inner membrane organizing system in protein biogenesis of the mitochondrial outer membrane." Mol Biol Cell **23**(20): 3948-3956.

Bottinger, L., S. Oeljeklaus, B. Guiard, S. Rospert, B. Warscheid and T. Becker (2015). "Mitochondrial heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp10 cooperate in the formation of Hsp60 complexes." J Biol Chem **290**(18): 11611-11622.

Boulter, E., R. Garcia-Mata, C. Guilluy, A. Dubash, G. Rossi, P. J. Brenwald and K. Burrige (2010). "Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1." Nat Cell Biol **12**(5): 477-483.

Bourin, M., P. Chue and Y. Guillon (2001). "Paroxetine: a review." CNS Drug Rev **7**(1): 25-47.

Boyd-Kimball, D., R. Sultana, H. F. Poon, B. C. Lynn, F. Casamenti, G. Pepeu, J. B. Klein and D. A. Butterfield (2005). "Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease." Neuroscience **132**(2): 313-324.

Bozner, P., G. L. Wilson, N. M. Druzhyna, T. K. Bryant-Thomas, S. P. LeDoux, G. L. Wilson and M. A. Pappolla (2002). "Deficiency of chaperonin 60 in Down's syndrome." J Alzheimers Dis **4**(6): 479-486.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Bremner, J. D., M. Vythilingam, E. Vermetten, G. Anderson, J. W. Newcomer and D. S. Charney (2004). "Effects of glucocorticoids on declarative memory function in major depression." Biol Psychiatry **55**(8): 811-815.

Brunello, N., P. Blier, L. L. Judd, J. Mendlewicz, C. J. Nelson, D. Souery, J. Zohar and G. Racagni (2003). "Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies." Int Clin Psychopharmacol **18**(4): 191-202.

Burgalossi, A., S. Jung, G. Meyer, W. J. Jockusch, O. Jahn, H. Taschenberger, V. M. O'Connor, T. Nishiki, M. Takahashi, N. Brose and J. S. Rhee (2010). "SNARE protein recycling by alphaSNAP and betaSNAP supports synaptic vesicle priming." Neuron **68**(3): 473-487.

Burrige, K. and K. Wennerberg (2004). "Rho and Rac take center stage." Cell **116**(2): 167-179.

Busch, M. A., U. E. Maske, L. Ryl, R. Schlack and U. Hapke (2013). "Prävalenz von depressiver Symptomatik und diagnostizierter Depression bei Erwachsenen in Deutschland." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz **56**(5-6): 733-739.

Byrne, E. M., T. Carrillo-Roa, A. K. Henders, L. Bowdler, A. F. McRae, A. C. Heath, N. G. Martin, G. W. Montgomery, L. Krause and N. R. Wray (2013). "Monozygotic twins affected with major depressive disorder have greater variance in methylation than their unaffected co-twin." Transl Psychiatry **3**: e269.

Cabras, S., F. Saba, C. Reali, M. L. Scorciapino, A. Sirigu, G. Talani, G. Biggio and V. Sogos (2010). "Antidepressant imipramine induces human astrocytes to differentiate into cells with neuronal phenotype." Int J Neuropsychopharmacol **13**(5): 603-615.

Campbell, S. and G. MacQueen (2006). "An update on regional brain volume differences associated with mood disorders." Curr Opin Psychiatry **19**(1): 25-33.

Campbell, S., M. Marriott, C. Nahmias and G. M. MacQueen (2004). "Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis." Am J Psychiatry **161**(4): 598-607.

Carboni, L., M. Vighini, C. Piubelli, L. Castelletti, A. Milli and E. Domenici (2006). "Proteomic analysis of rat hippocampus and frontal cortex after chronic treatment with fluoxetine or putative novel antidepressants: CRF1 and NK1 receptor antagonists." Eur Neuropsychopharmacol **16**(7): 521-537.

Carroll, B. J., F. Cassidy, D. Naftolowitz, N. E. Tatham, W. H. Wilson, A. Iranmanesh, P. Y. Liu and J. D. Veldhuis (2007). "Pathophysiology of hypercortisolism in depression." Acta Psychiatr Scand Suppl(433): 90-103.

Cecconi, D., S. Mion, H. Astner, E. Domenici, P. G. Righetti and L. Carboni (2007). "Proteomic analysis of rat cortical neurons after fluoxetine treatment." Brain Res **1135**(1): 41-51.

Celada, P., M. Puig, M. Amargos-Bosch, A. Adell and F. Artigas (2004). "The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression." J Psychiatry Neurosci **29**(4): 252-265.

Cernuda-Morollon, E. and A. J. Ridley (2006). "Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells." Circ Res **98**(6): 757-767.

Chan, J. Y., H. L. Cheng, J. L. Chou, F. C. Li, K. Y. Dai, S. H. Chan and A. Y. Chang (2007). "Heat shock protein 60 or 70 activates nitric-oxide synthase (NOS) I- and inhibits NOS II-associated signaling and depresses the mitochondrial apoptotic cascade during brain stem death." J Biol Chem **282**(7): 4585-4600.

Charney, D. S. (1998). "Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression." J Clin Psychiatry **59 Suppl 14**: 11-14.

Chen, G., T. G. Gharib, C. C. Huang, J. M. Taylor, D. E. Misek, S. L. Kardia, T. J. Giordano, M. D. Iannettoni, M. B. Orringer, S. M. Hanash and D. G. Beer (2002). "Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas." Mol Cell Proteomics **1**(4): 304-313.

Chourbaji, S., C. Zacher, C. Sanchis-Segura, C. Dormann, B. Vollmayr and P. Gass (2005). "Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice." Brain Res Brain Res Protoc **16**(1-3): 70-78.

Clary, D. O., I. C. Griff and J. E. Rothman (1990). "SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast." Cell **61**(4): 709-721.

Claydon, A. J., M. D. Thom, J. L. Hurst and R. J. Beynon (2012). "Protein turnover: measurement of proteome dynamics by whole animal metabolic labelling with stable isotope labelled amino acids." Proteomics **12**(8): 1194-1206.

Cobb, J. A., K. O'Neill, J. Milner, G. J. Mahajan, T. J. Lawrence, W. L. May, J. Miguel-Hidalgo, G. Rajkowska and C. A. Stockmeier (2016). "Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder." Neuroscience **316**: 209-220.

Compton, W. M., K. P. Conway, F. S. Stinson and B. F. Grant (2006). "Changes in the prevalence of major depression and comorbid substance use disorders in the United States between 1991-1992 and 2001-2002." Am J Psychiatry **163**(12): 2141-2147.

Conti, B., R. Maier, A. M. Barr, M. C. Morale, X. Lu, P. P. Sanna, G. Bilbe, D. Hoyer and T. Bartfai (2007). "Region-specific transcriptional changes following the three antidepressant treatments electro convulsive therapy, sleep deprivation and fluoxetine." Mol Psychiatry **12**(2): 167-189.

Coppen, A. (1967). "The biochemistry of affective disorders." Br J Psychiatry **113**(504): 1237-1264.

Cuijpers, P., A. van Straten, G. Andersson and P. van Oppen (2008). "Psychotherapy for depression in adults: a meta-analysis of comparative outcome studies." J Consult Clin Psychol **76**(6): 909-922.

Czeh, B. and B. Di Benedetto (2013). "Antidepressants act directly on astrocytes: evidences and functional consequences." Eur Neuropsychopharmacol **23**(3): 171-185.

Czeh, B. and P. J. Lucassen (2007). "What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?" Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **257**(5): 250-260.

Czeh, B., M. Simon, M. G. van der Hart, B. Schmelting, M. B. Hesselink and E. Fuchs (2005). "Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist." Neuropsychopharmacology **30**(1): 67-79.

- Dahl, D. and A. Bignami (1985). "Intermediate filaments in nervous tissue." Cell Muscle Motil **6**: 75-96.
- Darling, D. L., J. Yingling and A. Wynshaw-Boris (2005). "Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development." Curr Top Dev Biol **68**: 281-315.
- Davidson, R. J., D. Pizzagalli, J. B. Nitschke and K. Putnam (2002). "Depression: perspectives from affective neuroscience." Annu Rev Psychol **53**: 545-574.
- de Kloet, E. R., M. Joels and F. Holsboer (2005). "Stress and the brain: from adaptation to disease." Nat Rev Neurosci **6**(6): 463-475.
- De Leenheer, A. P., M. F. Lefevre, W. E. Lambert and E. S. Colinet (1985). "Isotope-dilution mass spectrometry in clinical chemistry." Adv Clin Chem **24**: 111-161.
- DGPPN, B., KBV, AWMF (Hrsg.) für die Leitliniengruppe Unipolare Depression (2015). S3-Leitlinie/Nationale VersorgungsLeitlinie Unipolare Depression – Langfassung. 2. Auflage. Version 5., AWMF.
- Ding, Q., S. Vaynman, P. Souda, J. P. Whitelegge and F. Gomez-Pinilla (2006). "Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis." Eur J Neurosci **24**(5): 1265-1276.
- Doherty, M. K. and R. J. Beynon (2006). "Protein turnover on the scale of the proteome." Expert Rev Proteomics **3**(1): 97-110.
- Doherty, M. K. and P. D. Whitfield (2011). "Proteomics moves from expression to turnover: update and future perspective." Expert Rev Proteomics **8**(3): 325-334.
- Dougherty, M. K. and D. K. Morrison (2004). "Unlocking the code of 14-3-3." Journal of Cell Science **117**(10): 1875-1884.
- Duman, R. S. (2004). "Depression: a case of neuronal life and death?" Biol Psychiatry **56**(3): 140-145.
- Duman, R. S. and L. M. Monteggia (2006). "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." Biol Psychiatry **59**(12): 1116-1127.
- Eagle, H., K. A. Piez, R. Fleischman and V. I. Oyama (1959). "Protein turnover in mammalian cell cultures." J Biol Chem **234**(3): 592-597.
- Eastman, C. I., M. A. Young, L. F. Fogg, L. Liu and P. M. Meaden (1998). "Bright light treatment of winter depression: a placebo-controlled trial." Arch Gen Psychiatry **55**(10): 883-889.
- Ehlert, U., J. Gaab and M. Heinrichs (2001). "Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis." Biol Psychol **57**(1-3): 141-152.
- Eng, J. K., A. L. McCormack and J. R. Yates (1994). "An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database." J Am Soc Mass Spectrom **5**(11): 976-989.
- Erdjument-Bromage, H., M. Lui, L. Lacomis, A. Grewal, R. S. Annan, D. E. McNulty, S. A. Carr and P. Tempst (1998). "Examination of micro-tip reversed-phase liquid chromatographic extraction of peptide pools for mass spectrometric analysis." J Chromatogr A **826**(2): 167-181.
- Ernst, C., A. K. Olson, J. P. Pinel, R. W. Lam and B. R. Christie (2006). "Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis?" J Psychiatry Neurosci **31**(2): 84-92.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.
- Faulkner, J. R., J. E. Herrmann, M. J. Woo, K. E. Tansey, N. B. Doan and M. V. Sofroniew (2004). "Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury." J Neurosci **24**(9): 2143-2155.
- Ferentinos, P., A. Koukounari, R. Power, M. Rivera, R. Uher, N. Craddock, M. J. Owen, A. Korszun, L. Jones, I. Jones, M. Gill, J. P. Rice, M. Ising, W. Maier, O. Mors, M. Rietschel, M. Preisig, E. B. Binder, K. J. Aitchison, J. Mendlewicz, D. Souery, J. Hauser, N. Henigsberg, G. Breen, I. W. Craig, A. E. Farmer, B. Muller-Myhsok, P. McGuffin and C. M. Lewis (2015). "Familiality and SNP heritability of age at onset and episodicity in major depressive disorder." Psychol Med **45**(10): 2215-2225.

Filiou, M. D. (2015). "Can proteomics-based diagnostics aid clinical psychiatry?" Proteomics Clin Appl.

Filiou, M. D. and C. W. Turck (2011). "General overview: biomarkers in neuroscience research." Int Rev Neurobiol **101**: 1-17.

Filiou, M. D., C. Webhofer, P. Gormanns, Y. Zhang, S. Reckow, B. Bisle, L. Teplytska, E. Frank, M. S. Kessler, G. Maccarrone, R. Landgraf and C. W. Turck (2012). "The (15)N isotope effect as a means for correlating phenotypic alterations and affected pathways in a trait anxiety mouse model." Proteomics **12**(15-16): 2421-2427.

Filiou, M. D., Y. Zhang, L. Teplytska, S. Reckow, P. Gormanns, G. Maccarrone, E. Frank, M. S. Kessler, B. Hamsch, M. Nussbaumer, M. Bunck, T. Ludwig, A. Yassouridis, F. Holsboer, R. Landgraf and C. W. Turck (2011). "Proteomics and metabolomics analysis of a trait anxiety mouse model reveals divergent mitochondrial pathways." Biol Psychiatry **70**(11): 1074-1082.

Frank, E., M. S. Kessler, M. D. Filiou, Y. Zhang, G. Maccarrone, S. Reckow, M. Bunck, H. Heumann, C. W. Turck, R. Landgraf and B. Hamsch (2009). "Stable Isotope Metabolic Labeling with a Novel (15)N-Enriched Bacteria Diet for Improved Proteomic Analyses of Mouse Models for Psychopathologies." PLoS ONE **4**(11): e7821.

Frydman, J., E. Nimmesgern, H. Erdjument-Bromage, J. S. Wall, P. Tempst and F. U. Hartl (1992). "Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits." Embo j **11**(13): 4767-4778.

Fu, H., R. R. Subramanian and S. C. Masters (2000). "14-3-3 proteins: structure, function, and regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 617-647.

Fuchs, E. (2005). "Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder." CNS Spectr **10**(3): 182-190.

Gao, S. F., X. R. Qi, J. Zhao, R. Balesar, A. M. Bao and D. F. Swaab (2013). "Decreased NOS1 expression in the anterior cingulate cortex in depression." Cereb Cortex **23**(12): 2956-2964.

Gao, Y., J. O. Thomas, R. L. Chow, G. H. Lee and N. J. Cowan (1992). "A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding." Cell **69**(6): 1043-1050.

Gatt, J. M., K. L. Burton, L. M. Williams and P. R. Schofield (2015). "Specific and common genes implicated across major mental disorders: a review of meta-analysis studies." J Psychiatr Res **60**: 1-13.

Ge, L., M. M. Zhu, J. Y. Yang, F. Wang, R. Zhang, J. H. Zhang, J. Shen, H. F. Tian and C. F. Wu (2015). "Differential proteomic analysis of the anti-depressive effects of oleamide in a rat chronic mild stress model of depression." Pharmacol Biochem Behav **131**: 77-86.

Geddes, J. R. and A. Cipriani (2004). "Selective serotonin reuptake inhibitors." BMJ **329**(7470): 809-810.

Geschwind, D. H. and G. Konopka (2009). "Neuroscience in the era of functional genomics and systems biology." Nature **461**(7266): 908-915.

Gilkerson, R. W., J. M. Selker and R. A. Capaldi (2003). "The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation." FEBS Lett **546**(2-3): 355-358.

Glombik, K., A. Stachowicz, R. Olszanecki, J. Slusarczyk, E. Trojan, W. Lason, M. Kubera, B. Budziszewska, M. Spedding and A. Basta-Kaim (2016). "The effect of chronic tianeptine administration on the brain mitochondria: direct links with an animal model of depression." Mol Neurobiol **53**(10): 7351-7362.

Goldberg, D. (2011). "The heterogeneity of "major depression"." World Psychiatry **10**(3): 226-228.

Golden, R. N., B. N. Gaynes, R. D. Ekstrom, R. M. Hamer, F. M. Jacobsen, T. Suppes, K. L. Wisner and C. B. Nemeroff (2005). "The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: a review and meta-analysis of the evidence." Am J Psychiatry **162**(4): 656-662.

Gooley, A. A. and N. H. Packer (1997). The Importance of Protein Co- and Post-Translational Modifications in Proteome Projects. Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. M. R. Wilkins, K. L. Williams, R. D. Appel and D. F. Hochstrasser. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 65-91.

Gos, T., M. L. Schroeter, W. Lessel, H. G. Bernstein, H. Dobrowolny, K. Schiltz, B. Bogerts and J. Steiner (2013). "S100B-immunopositive astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampus are differentially afflicted in unipolar and bipolar depression: a postmortem study." J Psychiatr Res **47**(11): 1694-1699.

Gosselin, R. D., S. Gibney, D. O'Malley, T. G. Dinan and J. F. Cryan (2009). "Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression." Neuroscience **159**(2): 915-925.

Gould, E., P. Tanapat, B. S. McEwen, G. Flugge and E. Fuchs (1998). "Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3168-3171.

Gould, T. D. and H. K. Manji (2002). "Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders." J Psychosom Res **53**(2): 687-697.

Green, A. J. (2002). "Use of 14-3-3 in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease." Biochem Soc Trans **30**(4): 382-386.

Gundersen, V., J. Storm-Mathisen and L. H. Bergersen (2015). "Neuroglial Transmission." Physiol Rev **95**(3): 695-726.

Gygi, S. P., B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb and R. Aebersold (1999). "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags." Nat Biotechnol **17**(10): 994-999.

Haenisch, B. and H. Bonisch (2011). "Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters." Pharmacol Ther **129**(3): 352-368.

Hammen, C. (2005). "Stress and depression." Annu Rev Clin Psychol **1**: 293-319.

He, F. and Y. E. Sun (2007). "Glial cells more than support cells?" Int J Biochem Cell Biol **39**(4): 661-665.

Hees, H. L., G. de Vries, M. W. Koeter and A. H. Schene (2013). "Adjuvant occupational therapy improves long-term depression recovery and return-to-work in good health in sick-listed employees with major depression: results of a randomised controlled trial." Occup Environ Med **70**(4): 252-260.

Heine, V. M., S. Maslam, J. Zareno, M. Joels and P. J. Lucassen (2004). "Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible." Eur J Neurosci **19**(1): 131-144.

Hessenberger, M., R. M. Zerbes, H. Rampelt, S. Kunz, A. H. Xavier, B. Purfurst, H. Lilie, N. Pfanner, M. van der Laan and O. Daumke (2017). "Regulated membrane remodeling by Mic60 controls formation of mitochondrial crista junctions." Nat Commun **8**: 15258.

Hollon, S. D., M. E. Thase and J. C. Markowitz (2002). "Treatment and Prevention of Depression." Psychol Sci Public Interest **3**(2): 39-77.

Holsboer, F. (2000). "The corticosteroid receptor hypothesis of depression." Neuropsychopharmacology **23**(5): 477-501.

Holsboer, F. (2001). "Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy." J Affect Disord **62**(1-2): 77-91.

Holsboer, F. and N. Barden (1996). "Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation." Endocr Rev **17**(2): 187-205.

Hong, S. J., H. Li, K. G. Becker, V. L. Dawson and T. M. Dawson (2004). "Identification and analysis of plasticity-induced late-response genes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2145-2150.

Hsich, G., K. Kenney, C. J. Gibbs, K. H. Lee and M. G. Harrington (1996). "The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies." N Engl J Med **335**(13): 924-930.

Huang, T. L., M. L. Sung and T. Y. Chen (2014). "2D-DIGE proteome analysis on the platelet proteins of patients with major depression." Proteome Sci **12**(1): 1.

Hughes, E. G., J. L. Maguire, M. T. McMinn, R. E. Scholz and M. L. Sutherland (2004). "Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking." Brain Res Mol Brain Res **124**(2): 114-123.

Iwata, M., Y. Shirayama, H. Ishida, G. I. Hazama and K. Nakagome (2011). "Hippocampal astrocytes are necessary for antidepressant treatment of learned helplessness rats." Hippocampus **21**(8): 877-884.

Jahromi, M., S. Razavi, N. Amirpour and Z. Khosravizadeh (2016). "Paroxetine Can Enhance Neurogenesis during Neurogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells." Avicenna J Med Biotechnol **8**(4): 152-158.

Jansen, R., B. W. Penninx, V. Madar, K. Xia, Y. Milaneschi, J. J. Hottenga, A. R. Hammerschlag, A. Beekman, N. van der Wee, J. H. Smit, A. I. Brooks, J. Tischfield, D. Posthuma, R. Schoevers, G. van Grootheest, G. Willemsen, E. J. de Geus, D. I. Boomsma, F. A. Wright, F. Zou, W. Sun and P. F. Sullivan (2016). "Gene expression in major depressive disorder." Mol Psychiatry **21**(3): 339-347.

Jha, M. K., W. H. Lee and K. Suk (2016). "Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders." Biochem Pharmacol **103**: 1-16.

John, G. B., Y. Shang, L. Li, C. Renken, C. A. Mannella, J. M. Selker, L. Rangell, M. J. Bennett and J. Zha (2005). "The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology." Mol Biol Cell **16**(3): 1543-1554.

Kabir, M. A., W. Uddin, A. Narayanan, P. K. Reddy, M. A. Jairajpuri, F. Sherman and Z. Ahmad (2011). "Functional Subunits of Eukaryotic Chaperonin CCT/TRiC in Protein Folding." J Amino Acids **2011**: 843206.

Kandola, A., J. Hendrikse, P. J. Lucassen and M. Yucel (2016). "Aerobic Exercise as a Tool to Improve Hippocampal Plasticity and Function in Humans: Practical Implications for Mental Health Treatment." Front Hum Neurosci **10**: 373.

Kane, J. K., O. Konu, J. Z. Ma and M. D. Li (2004). "Nicotine coregulates multiple pathways involved in protein modification/degradation in rat brain." Brain Res Mol Brain Res **132**(2): 181-191.

Kendler, K. S., L. M. Karkowski and C. A. Prescott (1999). "Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression." American Journal of Psychiatry **156**(6): 837-841.

Kendler, K. S., R. C. Kessler, E. E. Walters, C. MacLean, M. C. Neale, A. C. Heath and L. J. Eaves (1995). "Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women." Am J Psychiatry **152**(6): 833-842.

Kesner, R. P. and E. T. Rolls (2015). "A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments." Neurosci Biobehav Rev **48**: 92-147.

Kessler, R. C. (2003). "Epidemiology of women and depression." J Affect Disord **74**(1): 5-13.

Kessler, R. C., M. Angermeyer, J. C. Anthony, D. E. G. R, K. Demyttenaere, I. Gasquet, D. E. G. G, S. Gluzman, O. Gureje, J. M. Haro, N. Kawakami, A. Karam, D. Levinson, M. E. Medina Mora, M. A. Oakley Browne, J. Posada-Villa, D. J. Stein, C. H. Adley Tsang, S. Aguilar-Gaxiola, J. Alonso, S. Lee, S. Heeringa, B. E. Pennell, P. Berglund, M. J. Gruber, M. Petukhova, S. Chatterji and T. B. Ustun (2007). "Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative." World Psychiatry **6**(3): 168-176.

Khawaja, X., J. Xu, J. J. Liang and J. E. Barrett (2004). "Proteomic analysis of protein changes developing in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment: Implications for depressive disorders and future therapies." J Neurosci Res **75**(4): 451-460.

Kim, J. J. and D. M. Diamond (2002). "The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories." Nat Rev Neurosci **3**(6): 453-462.

Kim, S. and M. J. Webster (2009). "Postmortem brain tissue for drug discovery in psychiatric research." Schizophr Bull **35**(6): 1031-1033.

Kimelberg, H. K. and M. Nedergaard (2010). "Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets." Neurotherapeutics **7**(4): 338-353.

Klose, J. (1975). "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals." Humangenetik **26**(3): 231-243.

Klose, J. and U. Kobalz (1995). "Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome." *Electrophoresis* **16**(6): 1034-1059.

Knol, M. J., J. W. Twisk, A. T. Beekman, R. J. Heine, F. J. Snoek and F. Pouwer (2006). "Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis." *Diabetologia* **49**(5): 837-845.

Koenigs, M. and J. Grafman (2009). "The functional neuroanatomy of depression: Distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex." *Behavioural brain research* **201**(2): 239-243.

Kozjak-Pavlovic, V. (2017). "The MICOS complex of human mitochondria." *Cell Tissue Res* **367**(1): 83-93.

Krebs, H. A. and W. A. Johnson (1980). "The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues." *FEBS Lett* **117 Suppl**: K1-10.

Krishnan, V. and E. J. Nestler (2011). "Animal Models of Depression: Molecular Perspectives." *Current Topics in Behavioral Neurosciences* **7**: 121-147.

Kuehner, C. (2003). "Gender differences in unipolar depression: an update of epidemiological findings and possible explanations." *Acta Psychiatr Scand* **108**(3): 163-174.

Kuhn, R. (1958). "The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride)." *Am J Psychiatry* **115**(5): 459-464.

Kuhs, H. and R. Tolle (1991). "Sleep deprivation therapy." *Biol Psychiatry* **29**(11): 1129-1148.

Lahr, D., T. Beblo and W. Hartje (2007). "Cognitive performance and subjective complaints before and after remission of major depression." *Cogn Neuropsychiatry* **12**(1): 25-45.

Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczyk, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowki, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A.

Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y. J. Chen and J. Szustakowki (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.

Lau, J. Y. and T. C. Eley (2010). "The genetics of mood disorders." *Annu Rev Clin Psychol* **6**: 313-337.

Lee, S. H., S. Ripke, B. M. Neale, S. V. Faraone, S. M. Purcell, R. H. Perlis, B. J. Mowry, A. Thapar, M. E. Goddard, J. S. Witte, D. Absher, I. Agartz, H. Akil, F. Amin, O. A. Andreassen, A. Anjorin, R. Anney, V. Anttila, D. E. Arking, P. Asherson, M. H. Azevedo, L. Backlund, J. A. Badner, A. J. Bailey, T. Banaschewski, J. D. Barchas, M. R. Barnes, T. B. Barrett, N. Bass, A. Battaglia, M. Bauer, M. Bayes, F. Bellivier, S. E. Bergen, W. Berrettini, C. Betancur, T. Bettecken, J. Biederman, E. B. Binder, D. W. Black, D. H. Blackwood, C. S. Bloss, M. Boehnke, D. I. Boomsma, G. Breen, R. Breuer, R. Bruggeman, P. Cormican, N. G. Buccola, J. K. Buitelaar, W. E. Bunney, J. D. Buxbaum, W. F. Byerley, E. M. Byrne, S. Caesar, W. Cahn, R. M. Cantor, M. Casas, A. Chakravarti, K. Chambert, K. Choudhury, S. Cichon, C. R. Cloninger, D. A. Collier, E. H. Cook, H. Coon, B. Cormand, A. Corvin, W. H. Coryell, D. W. Craig, I. W. Craig, J. Crosbie, M. L. Cuccaro, D. Curtis, D. Czamara, S. Datta, G. Dawson, R. Day, E. J. De Geus, F. Degenhardt, S. Djurovic, G. J. Donohoe, A. E. Doyle, J. Duan, F. Dudbridge, E. Duketis, R. P. Ebstein, H. J. Edenberg, J. Elia, S. Ennis, B. Etain, A. Fanous, A. E. Farmer, I. N. Ferrier, M. Flickinger, E. Fombonne, T. Foroud, J. Frank, B. Franke, C. Fraser, R. Freedman, N. B. Freimer, C. M. Freitag, M. Friedl, L. Frisen, L. Gallagher, P. V. Gejman, L. Georgieva, E. S. Gershon, D. H. Geschwind, I. Giegling, M. Gill, S. D. Gordon, K. Gordon-Smith, E. K. Green, T. A. Greenwood, D. E. Grice, M. Gross, D. Grozeva, W. Guan, H. Gurling, L. De Haan, J. L. Haines, H. Hakonarson, J. Hallmayer, S. P. Hamilton, M. L. Hamshere, T. F. Hansen, A. M. Hartmann, M. Hautzinger, A. C. Heath, A. K. Henders, S. Herms, I. B. Hickie, M. Hipolito, S. Hoefels, P. A. Holmans, F. Holsboer, W. J. Hoogendijk, J. J. Hottenga, C. M. Hultman, V. Hus, A. Ingason, M. Ising, S. Jamain, E. G. Jones, I. Jones, L. Jones, J. Y. Tzeng, A. K. Kahler, R. S. Kahn, R. Kandaswamy, M. C. Keller, J. L. Kennedy, E. Kenny, L. Kent, Y. Kim, G. K. Kirov, S. M. Klauck, L. Klei, J. A. Knowles, M. A. Kohli, D. L. Koller, B. Konte, A. Korszun, L. Krabbendam, R. Krasucki, J. Kuntsi, P. Kwan, M. Landen, N. Langstrom, M. Lathrop, J. Lawrence, W. B. Lawson, M. Leboyer, D. H. Ledbetter, P. H. Lee, T. Lencz, K. P. Lesch, D. F. Levinson, C. M. Lewis, J. Li, P. Lichtenstein, J. A. Lieberman, D. Y. Lin, D. H. Linszen, C. Liu, F. W. Lohoff, S. K. Loo, C. Lord, J. K. Lowe, S. Lucae, D. J. MacIntyre, P. A. Madden, E. Maestrini, P. K. Magnusson, P. B. Mahon, W. Maier, A. K. Malhotra, S. M. Mane, C. L. Martin, N. G. Martin, M. Mattheisen, K. Matthews, M. Mattingdal, S. A. McCarroll, K. A. McGhee, J. J. McGough, P. J. McGrath, P. McGuffin, M. G. McInnis, A. McIntosh, R. McKinney, A. W. McLean, F. J. McMahon, W. M. McMahon, A. McQuillin, H. Medeiros, S. E. Medland, S. Meier, I. Melle, F. Meng, J. Meyer, C. M. Middeldorp, L. Middleton, V. Milanova, A. Miranda, A. P. Monaco, G. W. Montgomery, J. L. Moran, D. Moreno-De-Luca, G. Morken, D. W. Morris, E. M. Morrow, V. Moskvina, P. Muglia, T. W. Muhleisen, W. J. Muir, B. Muller-Myhsok, M. Murtha, R. M. Myers, I. Myin-Germeys, M. C. Neale, S. F. Nelson, C. M. Nievergelt, I. Nikolov, V. Nimgaonkar, W. A. Nolen, M. M. Nothen, J. I. Nurnberger, E. A. Nwulia, D. R. Nyholt, C. O'Dushlaine, R. D. Oades, A. Olincy, G. Oliveira, L. Olsen, R. A. Ophoff, U. Osby, M. J. Owen, A. Palotie, J. R. Parr, A. D. Paterson, C. N. Pato, M. T. Pato, B. W. Penninx, M. L. Pergadia, M. A. Pericak-Vance, B. S. Pickard, J. Pimm, J. Piven, D. Posthuma, J. B. Potash, F. Poustka, P. Propping, V. Puri, D. J. Quedsted, E. M. Quinn, J. A. Ramos-Quiroga, H. B. Rasmussen, S. Raychaudhuri, K. Rehnstrom, A. Reif, M. Ribases, J. P. Rice, M. Rietschel, K. Roeder, H. Roeyers, L. Rossin, A. Rothenberger, G. Rouleau, D. Ruderfer, D. Rujescu, A. R. Sanders, S. J. Sanders, S. L. Santangelo, J. A. Sergeant, R. Schachar, M. Schalling, A. F. Schatzberg, W. A. Scheftner, G. D. Schellenberg, S. W. Scherer, N. J. Schork, T. G. Schulze, J. Schumacher, M. Schwarz, E. Scolnick, L. J. Scott, J. Shi, P. D. Shilling, S. I. Shyn, J. M. Silverman, S. L. Slager, S. L. Smalley, J. H. Smit, E. N. Smith, E. J. Sonuga-Barke, D. St Clair, M. State, M. Steffens, H. C. Steinhausen, J. S. Strauss, J. Strohmaier, T. S. Stroup, J. S. Sutcliffe, P. Szatmari, S. Szelinger, S. Thirumalai, R. C. Thompson, A. A. Todorov, F. Tozzi, J. Treutlein, M. Uhr, E. J. van den Oord, G. Van Grootheest, J. Van Os, A. M. Vicente, V. J.

Vieland, J. B. Vincent, P. M. Visscher, C. A. Walsh, T. H. Wassink, S. J. Watson, M. M. Weissman, T. Werge, T. F. Wienker, E. M. Wijsman, G. Willemsen, N. Williams, A. J. Willsey, S. H. Witt, W. Xu, A. H. Young, T. W. Yu, S. Zammit, P. P. Zandi, P. Zhang, F. G. Zitman, S. Zollner, B. Devlin, J. R. Kelsoe, P. Sklar, M. J. Daly, M. C. O'Donovan, N. Craddock, P. F. Sullivan, J. W. Smoller, K. S. Kendler and N. R. Wray (2013). "Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs." *Nat Genet* **45**(9): 984-994.

Leibenluft, E. and T. A. Wehr (1992). "Is sleep deprivation useful in the treatment of depression?" *Am J Psychiatry* **149**(2): 159-168.

Leon-Carrion, J., A. M. Atutxa, M. A. Mangas, A. Soto-Moreno, A. Pumar, A. Leon-Justel, J. F. Martin-Rodriguez, E. Venegas, M. R. Dominguez-Morales and A. Leal-Cerro (2009). "A clinical profile of memory impairment in humans due to endogenous glucocorticoid excess." *Clin Endocrinol (Oxf)* **70**(2): 192-200.

Lewis, V. A., G. M. Hynes, D. Zheng, H. Saibil and K. Willison (1992). "T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol." *Nature* **358**(6383): 249-252.

Li, H., Y. Ruan, K. Zhang, F. Jian, C. Hu, L. Miao, L. Gong, L. Sun, X. Zhang, S. Chen, H. Chen, D. Liu and Z. Song (2016). "Mic60/Mitofilin determines MICOS assembly essential for mitochondrial dynamics and mtDNA nucleoid organization." *Cell Death Differ* **23**(3): 380-392.

Lin, K. M., B. Lin, I. Y. Lian, R. Mestrlil, I. E. Scheffler and W. H. Dillmann (2001). "Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation." *Circulation* **103**(13): 1787-1792.

Lin, Z., D. Zhao, Y. Wang, W. Zhao, X. Yin, X. Zhou, Z. Zhang and L. Yang (2015). "Downregulation of beta-Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein: Proteomics-Based Identification in Early-Stage Prion Disease." *Neurodegener Dis* **15**(4): 193-201.

Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). "The heat-shock proteins." *Annu Rev Genet* **22**: 631-677.

Lopez Salon, M., L. Morelli, E. M. Castano, E. F. Soto and J. M. Pasquini (2000). "Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease." *J Neurosci Res* **62**(2): 302-310.

Lopez, T., K. Dalton and J. Frydman (2015). "The Mechanism and Function of Group II Chaperonins." *J Mol Biol* **427**(18): 2919-2930.

Lubke, G. H., J. J. Hottenga, R. Walters, C. Laurin, E. J. de Geus, G. Willemsen, J. H. Smit, C. M. Middeldorp, B. W. Penninx, J. M. Vink and D. I. Boomsma (2012). "Estimating the genetic variance of major depressive disorder due to all single nucleotide polymorphisms." *Biol Psychiatry* **72**(8): 707-709.

Lupien, S. J., M. de Leon, S. de Santi, A. Convit, C. Tarshish, N. P. V. Nair, M. Thakur, B. S. McEwen, R. L. Hauger and M. J. Meaney (1998). "Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits." *Nat Neurosci* **1**(1): 69-73.

Macario, A. J., M. Lange, B. K. Ahring and E. Conway de Macario (1999). "Stress genes and proteins in the archaea." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(4): 923-967, table of contents.

Magarinos, A. M., B. S. McEwen, G. Flugge and E. Fuchs (1996). "Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews." *J Neurosci* **16**(10): 3534-3540.

Malberg, J. E. (2004). "Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action." *J Psychiatry Neurosci* **29**(3): 196-205.

Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler and R. S. Duman (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J Neurosci* **20**(24): 9104-9110.

Manji, H. K., W. C. Drevets and D. S. Charney (2001). "The cellular neurobiology of depression." *Nat Med* **7**(5): 541-547.

Mann, M. and O. N. Jensen (2003). "Proteomic analysis of post-translational modifications." *Nat Biotechnol* **21**(3): 255-261.

Martin, H., J. Rostas, Y. Patel and A. Aitken (1994). "Subcellular localisation of 14-3-3 isoforms in rat brain using specific antibodies." *J Neurochem* **63**(6): 2259-2265.

Mathers, C. D. and D. Loncar (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." PLoS Med **3**(11): e442.

Mayer, J. L., L. Klumpers, S. Maslam, E. R. de Kloet, M. Joels and P. J. Lucassen (2006). "Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis." J Neuroendocrinol **18**(8): 629-631.

Mayo, L., S. A. Trauger, M. Blain, M. Nadeau, B. Patel, J. I. Alvarez, I. D. Mascanfroni, A. Yeste, P. Kivisakk, K. Kallas, B. Ellezam, R. Bakshi, A. Prat, J. P. Antel, H. L. Weiner and F. J. Quintana (2014). "Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation." Nat Med **20**(10): 1147-1156.

McCall, M. A., R. G. Gregg, R. R. Behringer, M. Brenner, C. L. Delaney, E. J. Galbreath, C. L. Zhang, R. A. Pearce, S. Y. Chiu and A. Messing (1996). "Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6361-6366.

McFerrin, M. B., X. Chi, G. Cutter and T. A. Yacoubian (2017). "Dysregulation of 14-3-3 proteins in neurodegenerative diseases with Lewy body or Alzheimer pathology." Ann Clin Transl Neurol **4**(7): 466-477.

McHugh, P. C., G. R. Rogers, D. M. Glubb, P. R. Joyce and M. A. Kennedy (2010). "Proteomic analysis of rat hippocampus exposed to the antidepressant paroxetine." J Psychopharmacol **24**(8): 1243-1251.

McHugh, P. C., G. R. Rogers, B. Loudon, D. M. Glubb, P. R. Joyce and M. A. Kennedy (2008). "Proteomic analysis of embryonic stem cell-derived neural cells exposed to the antidepressant paroxetine." J Neurosci Res **86**(2): 306-316.

McNaught, K. S. and P. Jenner (2001). "Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease." Neurosci Lett **297**(3): 191-194.

Mehra, A., K. H. Lee and V. Hatzimanikatis (2003). "Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. Theoretical considerations." Biotechnol Bioeng **84**(7): 822-833.

Menet, V., M. Gimenez y Ribotta, N. Chauvet, M. J. Drian, J. Lannoy, E. Colucci-Guyon and A. Privat (2001). "Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression." J Neurosci **21**(16): 6147-6158.

Middeldorp, J. and E. M. Hol (2011). "GFAP in health and disease." Prog Neurobiol **93**(3): 421-443.

Molloy, M. P. (2000). "Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients." Anal Biochem **280**(1): 1-10.

Montgomery, S. A., J. Henry, G. McDonald, T. Dinan, M. Lader, I. Hindmarch, A. Clare and D. Nutt (1994). "Selective serotonin reuptake inhibitors: meta-analysis of discontinuation rates." Int Clin Psychopharmacol **9**(1): 47-53.

Moore, B. (1967). "Specific acidic proteins of the nervous system." Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integratin: 343-359.

Morimoto, R. I. and M. G. Santoro (1998). "Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection." Nat Biotech **16**(9): 833-838.

Mowla, A., M. Mosavinasab and A. Pani (2007). "Does fluoxetine have any effect on the cognition of patients with mild cognitive impairment? A double-blind, placebo-controlled, clinical trial." J Clin Psychopharmacol **27**(1): 67-70.

Muller, M. B., P. J. Lucassen, A. Yassouridis, W. J. Hoogendijk, F. Holsboer and D. F. Swaab (2001). "Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus." Eur J Neurosci **14**(10): 1603-1612.

Murray, C. J., T. Vos, R. Lozano, M. Naghavi, A. D. Flaxman, C. Michaud, M. Ezzati, K. Shibuya, J. A. Salomon, S. Abdalla, V. Aboyans, J. Abraham, I. Ackerman, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. K. Ali, M. Alvarado, H. R. Anderson, L. M. Anderson, K. G. Andrews, C. Atkinson, L. M. Baddour, A. N. Bahalim, S. Barker-Collo, L. H. Barrero, D. H. Bartels, M. G. Basanez, A. Baxter, M. L. Bell, E. J.

Benjamin, D. Bennett, E. Bernabe, K. Bhalla, B. Bhandari, B. Bikbov, A. Bin Abdulhak, G. Birbeck, J. A. Black, H. Blencowe, J. D. Blore, F. Blyth, I. Bolliger, A. Bonaventure, S. Boufous, R. Bourne, M. Boussinesq, T. Braithwaite, C. Brayne, L. Bridgett, S. Brooker, P. Brooks, T. S. Brugha, C. Bryan-Hancock, C. Bucello, R. Buchbinder, G. Buckle, C. M. Budke, M. Burch, P. Burney, R. Burstein, B. Calabria, B. Campbell, C. E. Canter, H. Carabin, J. Carapetis, L. Carmona, C. Cella, F. Charlson, H. Chen, A. T. Cheng, D. Chou, S. S. Chugh, L. E. Coffeng, S. D. Colan, S. Colquhoun, K. E. Colson, J. Condon, M. D. Connor, L. T. Cooper, M. Corriere, M. Cortinovis, K. C. de Vacarro, W. Couser, B. C. Cowie, M. H. Criqui, M. Cross, K. C. Dabhadkar, M. Dahiya, N. Dahodwala, J. Damsere-Derry, G. Danaei, A. Davis, D. De Leo, L. Degenhardt, R. Dellavalle, A. Delossantos, J. Denenberg, S. Derrett, D. C. Des Jarlais, S. D. Dharmaratne, M. Dherani, C. Diaz-Torne, H. Dolk, E. R. Dorsey, T. Driscoll, H. Duber, B. Ebel, K. Edmond, A. Elbaz, S. E. Ali, H. Erskine, P. J. Erwin, P. Espindola, S. E. Ewoigbokhan, F. Farzadfar, V. Feigin, D. T. Felson, A. Ferrari, C. P. Ferri, E. M. Fevre, M. M. Finucane, S. Flaxman, L. Flood, K. Foreman, M. H. Forouzanfar, F. G. Fowkes, M. Fransen, M. K. Freeman, B. J. Gabbe, S. E. Gabriel, E. Gakidou, H. A. Ganatra, B. Garcia, F. Gaspari, R. F. Gillum, G. Gmel, D. Gonzalez-Medina, R. Gosselin, R. Grainger, B. Grant, J. Groeger, F. Guillemin, D. Gunnell, R. Gupta, J. Haagsma, H. Hagan, Y. A. Halasa, W. Hall, D. Haring, J. M. Haro, J. E. Harrison, R. Havmoeller, R. J. Hay, H. Higashi, C. Hill, B. Hoen, H. Hoffman, P. J. Hotez, D. Hoy, J. J. Huang, S. E. Ibeanusi, K. H. Jacobsen, S. L. James, D. Jarvis, R. Jasrasaria, S. Jayaraman, N. Johns, J. B. Jonas, G. Karthikeyan, N. Kassebaum, N. Kawakami, A. Keren, J. P. Khoo, C. H. King, L. M. Knowlton, O. Kobusingye, A. Koranteng, R. Krishnamurthi, F. Laden, R. Lalloo, L. L. Laslett, T. Lathlean, J. L. Leasher, Y. Y. Lee, J. Leigh, D. Levinson, S. S. Lim, E. Limb, J. K. Lin, M. Lipnick, S. E. Lipshultz, W. Liu, M. Loane, S. L. Ohno, R. Lyons, J. Mabweijano, M. F. MacIntyre, R. Malekzadeh, L. Mallinger, S. Manivannan, W. Marcenes, L. March, D. J. Margolis, G. B. Marks, R. Marks, A. Matsumori, R. Matzopoulos, B. M. Mayosi, J. H. McAnulty, M. M. McDermott, N. McGill, J. McGrath, M. E. Medina-Mora, M. Meltzer, G. A. Mensah, T. R. Merriman, A. C. Meyer, V. Miglioli, M. Miller, T. R. Miller, P. B. Mitchell, C. Mock, A. O. Mocumbi, T. E. Moffitt, A. A. Mokdad, L. Monasta, M. Montico, M. Moradi-Lakeh, A. Moran, L. Morawska, R. Mori, M. E. Murdoch, M. K. Mwaniki, K. Naidoo, M. N. Nair, L. Naldi, K. M. Narayan, P. K. Nelson, R. G. Nelson, M. C. Nevitt, C. R. Newton, S. Nolte, P. Norman, R. Norman, M. O'Donnell, S. O'Hanlon, C. Olives, S. B. Omer, K. Ortblad, R. Osborne, D. Ozgediz, A. Page, B. Pahari, J. D. Pandian, A. P. Rivero, S. B. Patten, N. Pearce, R. P. Padilla, F. Perez-Ruiz, N. Perico, K. Pesudovs, D. Phillips, M. R. Phillips, K. Pierce, S. Pion, G. V. Polanczyk, S. Polinder, C. A. Pope, 3rd, S. Popova, E. Porrini, F. Pourmalek, M. Prince, R. L. Pullan, K. D. Ramaiah, D. Ranganathan, H. Razavi, M. Regan, J. T. Rehm, D. B. Rein, G. Remuzzi, K. Richardson, F. P. Rivara, T. Roberts, C. Robinson, F. R. De Leon, L. Ronfani, R. Room, L. C. Rosenfeld, L. Rushton, R. L. Sacco, S. Saha, U. Sampson, L. Sanchez-Riera, E. Sanman, D. C. Schwebel, J. G. Scott, M. Segui-Gomez, S. Shahraz, D. S. Shepard, H. Shin, R. Shivakoti, D. Singh, G. M. Singh, J. A. Singh, J. Singleton, D. A. Sleet, K. Sliwa, E. Smith, J. L. Smith, N. J. Stapelberg, A. Steer, T. Steiner, W. A. Stolk, L. J. Stovner, C. Sudfeld, S. Syed, G. Tamburlini, M. Tavakkoli, H. R. Taylor, J. A. Taylor, W. J. Taylor, B. Thomas, W. M. Thomson, G. D. Thurston, I. M. Tleyjeh, M. Tonelli, J. A. Towbin, T. Truelsen, M. K. Tsilimbaris, C. Ubeda, E. A. Undurraga, M. J. van der Werf, J. van Os, M. S. Vavilala, N. Venketasubramanian, M. Wang, W. Wang, K. Watt, D. J. Weatherall, M. A. Weinstock, R. Weintraub, M. G. Weisskopf, M. M. Weissman, R. A. White, H. Whiteford, N. Wiebe, S. T. Wiersma, J. D. Wilkinson, H. C. Williams, S. R. Williams, E. Witt, F. Wolfe, A. D. Woolf, S. Wulf, P. H. Yeh, A. K. Zaidi, Z. J. Zheng, D. Zonies, A. D. Lopez, M. A. AlMazroa and Z. A. Memish (2012). "Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet* **380**(9859): 2197-2223.

Musselman, D. L., E. Betan, H. Larsen and L. S. Phillips (2003). "Relationship of depression to diabetes types 1 and 2: epidemiology, biology, and treatment." *Biological Psychiatry* **54**(3): 317-329.

Musselman, D. L., D. L. Evans and C. B. Nemeroff (1998). "The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment." Arch Gen Psychiatry **55**(7): 580-592.

Nakamura, H. and H. Minegishi (2013). "HSP60 as a drug target." Curr Pharm Des **19**(3): 441-451.

Nakatani, N., H. Aburatani, K. Nishimura, J. Semba and T. Yoshikawa (2004). "Comprehensive expression analysis of a rat depression model." Pharmacogenomics J **4**(2): 114-126.

Nedivi, E., D. Hevroni, D. Naot, D. Israeli and Y. Citri (1993). "Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning." Nature **363**(6431): 718-722.

Nekrutenko, A., D. M. Hillis, J. C. Patton, R. D. Bradley and R. J. Baker (1998). "Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family." Mol Biol Evol **15**(12): 1674-1684.

Nestler, E. J., M. Barrot, R. J. DiLeone, A. J. Eisch, S. J. Gold and L. M. Monteggia (2002). "Neurobiology of depression." Neuron **34**(1): 13-25.

Netz, Y. (2017). "Is the Comparison between Exercise and Pharmacologic Treatment of Depression in the Clinical Practice Guideline of the American College of Physicians Evidence-Based?" Front Pharmacol **8**: 257.

Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-262.

Ngounou Wetie, A. G., A. G. Woods and C. C. Darie (2014). "Mass spectrometric analysis of post-translational modifications (PTMs) and protein-protein interactions (PPIs)." Adv Exp Med Biol **806**: 205-235.

Nierenberg, A. A., T. J. Petersen and J. E. Alpert (2003). "Prevention of relapse and recurrence in depression: the role of long-term pharmacotherapy and psychotherapy." J Clin Psychiatry **64 Suppl 15**: 13-17.

Nöthen, M. M., M. Rietschel, P. Propping and W. Maier (2004). "Psychiatrische Genetik: Fortschritte in der Ursachenforschung affektiver und schizophrener Störungen." Dtsch Arztebl International **101**(49): 3343-.

Nutt, D. J. (2008). "Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder." J Clin Psychiatry **69 Suppl E1**: 4-7.

O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." J Biol Chem **250**(10): 4007-4021.

Oda, Y., K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn and B. T. Chait (1999). "Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6591-6596.

Oeljeschläger, B. and B. Müller-Oerlinghausen (2004). "Wege zur Optimierung der individuellen antidepressiven Therapie." Dtsch Arztebl International **101**(19): 1337.

Ohl, F., A. Roedel, E. Binder and F. Holsboer (2003). "Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice." Eur J Neurosci **17**(1): 128-136.

Olsen, J. V. and M. Mann (2013). "Status of Large-scale Analysis of Post-translational Modifications by Mass Spectrometry." Molecular & Cellular Proteomics **12**(12): 3444-3452.

Ong, S. E., B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey and M. Mann (2002). "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." Mol Cell Proteomics **1**(5): 376-386.

Onteniente, B., H. Kimura and T. Maeda (1983). "Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry." J Comp Neurol **215**(4): 427-436.

Ostergaard, S. D., A. J. Rothschild, P. Uggerby, P. Munk-Jorgensen, P. Bech and O. Mors (2012). "Considerations on the ICD-11 classification of psychotic depression." Psychother Psychosom **81**(3): 135-144.

Ott, C., E. Dorsch, M. Fraunholz, S. Straub and V. Kozjak-Pavlovic (2015). "Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits." PLoS One **10**(3): e0120213.

Pantazatos, S. P., S. J. Andrews, J. Dunning-Broadbent, J. Pang, Y. Y. Huang, V. Arango, P. L. Nagy and J. John Mann (2015). "Isoform-level brain expression profiling of the spermidine/spermine N1-Acetyltransferase1 (SAT1) gene in major depression and suicide." Neurobiol Dis **79**: 123-134.

Park, D. I., C. Dournes, I. Sillaber, M. Uhr, J. M. Asara, N. C. Gassen, T. Rein, M. Ising, C. Webhofer, M. D. Filiou, M. B. Muller and C. W. Turck (2016). "Purine and pyrimidine metabolism: Convergent evidence on chronic antidepressant treatment response in mice and humans." Sci Rep **6**: 35317.

Park, G. Y., J. Y. Han, Y. K. Han, S. D. Kim, J. S. Kim, W. S. Jo, S. H. Chun, D. H. Jeong, C. W. Lee, K. Yang and C. G. Lee (2014). "14-3-3 eta depletion sensitizes glioblastoma cells to irradiation due to enhanced mitotic cell death." Cancer Gene Ther **21**(4): 158-163.

Pascual, O., K. B. Casper, C. Kubera, J. Zhang, R. Revilla-Sanchez, J. Y. Sul, H. Takano, S. J. Moss, K. McCarthy and P. G. Haydon (2005). "Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks." Science **310**(5745): 113-116.

Peng, L., A. Verkhratsky, L. Gu and B. Li (2015). "Targeting astrocytes in major depression." Expert Rev Neurother **15**(11): 1299-1306.

Pennington, S. R., M. R. Wilkins, D. F. Hochstrasser and M. J. Dunn (1997). "Proteome analysis: from protein characterization to biological function." Trends Cell Biol **7**(4): 168-173.

Peretti, S., R. Judge and I. Hindmarch (2000). "Safety and tolerability considerations: tricyclic antidepressants vs. selective serotonin reuptake inhibitors." Acta Psychiatr Scand Suppl **403**: 17-25.

Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy and J. S. Cottrell (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." Electrophoresis **20**(18): 3551-3567.

Porsolt, R. D., A. Bertin and M. Jalfre (1977). "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants." Arch Int Pharmacodyn Ther **229**(2): 327-336.

Purgato, M., D. Papola, C. Gastaldon, C. Trespidi, L. R. Magni, C. Rizzo, T. A. Furukawa, N. Watanabe, A. Cipriani and C. Barbui (2014). "Paroxetine versus other anti-depressive agents for depression." Cochrane Database Syst Rev(4): Cd006531.

Qiao, H., M. Foote, K. Graham, Y. Wu and Y. Zhou (2014). "14-3-3 proteins are required for hippocampal long-term potentiation and associative learning and memory." J Neurosci **34**(14): 4801-4808.

Rajkowska, G. and J. J. Miguel-Hidalgo (2007). "Gliogenesis and glial pathology in depression." CNS Neurol Disord Drug Targets **6**(3): 219-233.

Rajkowska, G. and C. A. Stockmeier (2013). "Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue." Curr Drug Targets **14**(11): 1225-1236.

Rastad, C., L. Wetterberg and C. Martin (2017). "Patients' Experience of Winter Depression and Light Room Treatment." Psychiatry J **2017**: 6867957.

Reckow, S. and C. Webhofer (2014). "Analysis of individual protein turnover in live animals on a proteome-wide scale." Methods Mol Biol **1156**: 147-154.

Reppermund, S., J. Zihl, S. Lucae, S. Horstmann, S. Kloiber, F. Holsboer and M. Ising (2007). "Persistent cognitive impairment in depression: the role of psychopathology and altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) system regulation." Biol Psychiatry **62**(5): 400-406.

Reynolds, K. J., X. Yao and C. Fenselau (2002). "Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: evaluation of endoprotease Glu-C as the catalytic agent." J Proteome Res **1**(1): 27-33.

Ribotta, M. G., V. Menet and A. Privat (2004). "Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice." Acta Neurochir Suppl **89**: 87-92.

Rosenfeld, J., J. Capdevielle, J. C. Guillemot and P. Ferrara (1992). "In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis." Anal Biochem **203**(1): 173-179.

Ross, P. L., Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlett-Jones, F. He, A. Jacobson and D. J. Pappin (2004). "Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents." Mol Cell Proteomics **3**(12): 1154-1169.

Ruhe, H. G., N. S. Mason and A. H. Schene (2007). "Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies." Mol Psychiatry **12**(4): 331-359.

Sabunciyan, S., M. J. Aryee, R. A. Irizarry, M. Rongione, M. J. Webster, W. E. Kaufman, P. Murakami, A. Lessard, R. H. Yolken, A. P. Feinberg and J. B. Potash (2012). "Genome-wide DNA methylation scan in major depressive disorder." PLoS One **7**(4): e34451.

Sanchez, C. and J. Hyttel (1999). "Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding." Cell Mol Neurobiol **19**(4): 467-489.

Sanchez, C., E. H. Reines and S. A. Montgomery (2014). "A comparative review of escitalopram, paroxetine, and sertraline: Are they all alike?" Int Clin Psychopharmacol **29**(4): 185-196.

Sato, S., T. Chiba, E. Sakata, K. Kato, Y. Mizuno, N. Hattori and K. Tanaka (2006). "14-3-3eta is a novel regulator of parkin ubiquitin ligase." Embo j **25**(1): 211-221.

Scaini, G., D. D. Maggi, B. T. De-Nes, C. L. Goncalves, G. K. Ferreira, B. P. Teodorak, G. D. Bez, G. C. Ferreira, P. F. Schuck, J. Quevedo and E. L. Streck (2011). "Activity of mitochondrial respiratory chain is increased by chronic administration of antidepressants." Acta Neuropsychiatr **23**(3): 112-118.

Schaaf, M. J., E. R. De Kloet and E. Vreugdenhil (2000). "Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation." Stress **3**(3): 201-208.

Schene, A. H., M. W. Koeter, M. J. Kikkert, J. A. Swinkels and P. McCrone (2007). "Adjuvant occupational therapy for work-related major depression works: randomized trial including economic evaluation." Psychol Med **37**(3): 351-362.

Schildkraut, J. J. (1965). "The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence." Am J Psychiatry **122**(5): 509-522.

Schmaal, L., D. J. Veltman, T. G. van Erp, P. G. Samann, T. Frodl, N. Jahanshad, E. Loehrer, H. Tiemeier, A. Hofman, W. J. Niessen, M. W. Vernooij, M. A. Ikram, K. Wittfeld, H. J. Grabe, A. Block, K. Hegenscheid, H. Volzke, D. Hoehn, M. Czisch, J. Lagopoulos, S. N. Hatton, I. B. Hickie, R. Goya-Maldonado, B. Kramer, O. Gruber, B. Couvy-Duchesne, M. E. Renteria, L. T. Strike, N. T. Mills, G. I. de Zubicaray, K. L. McMahon, S. E. Medland, N. G. Martin, N. A. Gillespie, M. J. Wright, G. B. Hall, G. M. MacQueen, E. M. Frey, A. Carballo, L. S. van Velzen, M. J. van Tol, N. J. van der Wee, I. M. Veer, H. Walter, K. Schnell, E. Schramm, C. Normann, D. Schoepf, C. Konrad, B. Zurovski, T. Nickson, A. M. McIntosh, M. Papp, H. C. Whalley, J. E. Sussmann, B. R. Godlewska, P. J. Cowen, F. H. Fischer, M. Rose, B. W. Penninx, P. M. Thompson and D. P. Hibar (2016). "Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group." Mol Psychiatry **21**(6): 806-812.

Schmidt, A., J. Kellermann and F. Lottspeich (2005). "A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels." Proteomics **5**(1): 4-15.

Schuch, F. B., A. C. Deslandes, B. Stubbs, N. P. Gosmann, C. Silva and M. P. A. Fleck (2017). "Factors that influence the neurobiological effects of exercise likely extend beyond age and intensity in people with major depression." Neurosci Biobehav Rev **77**: 301-302.

Schuller, E., T. Gulesserian, R. Seidl, N. Cairns and G. Lube (2001). "Brain tau-complex polypeptide 1 (TCP- 1) related to its natural substrate beta1 tubulin is decreased in Alzheimer's disease." Life Sci **69**(3): 263-270.

Schulz, R., S. R. Beach, D. G. Ives, L. M. Martire, A. A. Ariyo and W. J. Kop (2000). "Association between depression and mortality in older adults: The cardiovascular health study." Archives of Internal Medicine **160**(12): 1761-1768.

Schumacher, J., S. Cichon, M. Rietschel, M. M. Nothen and P. Propping (2002). "[Genetics of bipolar affective disorders. Current status of research for identification of susceptibility genes]." Nervenarzt **73**(7): 581-592; quiz 593-584.

Sehgal, S. A., S. Mannan, S. Kanwal, I. Naveed and A. Mir (2015). "Adaptive evolution and elucidating the potential inhibitor against schizophrenia to target DAOA (G72) isoforms." Drug Des Devel Ther **9**: 3471-3480.

Seligman, M. E., R. A. Rosellini and M. J. Kozak (1975). "Learned helplessness in the rat: time course, immunization, and reversibility." J Comp Physiol Psychol **88**(2): 542-547.

Seligman, M. E., J. Weiss, M. Weinraub and A. Schulman (1980). "Coping behavior: learned helplessness, physiological change and learned inactivity." Behav Res Ther **18**(5): 459-512.

Shih, R. A., P. L. Belmonte and P. P. Zandi (2004). "A review of the evidence from family, twin and adoption studies for a genetic contribution to adult psychiatric disorders." International Review of Psychiatry **16**(4): 260-283.

Shirayama, Y. and S. Chaki (2006). "Neurochemistry of the Nucleus Accumbens and its Relevance to Depression and Antidepressant Action in Rodents." Current Neuropharmacology **4**(4): 277-291.

Sillaber, I., M. Panhuysen, M. S. Henniger, F. Ohl, C. Kuhne, B. Putz, T. Pohl, J. M. Deussing, M. Paez-Pereda and F. Holsboer (2008). "Profiling of behavioral changes and hippocampal gene expression in mice chronically treated with the SSRI paroxetine." Psychopharmacology (Berl) **200**(4): 557-572.

Simard, M., G. Arcuino, T. Takano, Q. S. Liu and M. Nedergaard (2003). "Signaling at the gliovascular interface." J Neurosci **23**(27): 9254-9262.

Smith, L. M. and N. L. Kelleher (2013). "Proteoform: a single term describing protein complexity." Nat Methods **10**(3): 186-187.

Sobocki, P., B. Jonsson, J. Angst and C. Rehnberg (2006). "Cost of depression in Europe." J Ment Health Policy Econ **9**(2): 87-98.

Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 7-35.

Song, F., N. Freemantle, T. A. Sheldon, A. House, P. Watson, A. Long and J. Mason (1993). "Selective serotonin reuptake inhibitors: meta-analysis of efficacy and acceptability." BMJ **306**(6879): 683-687.

Steen, H. and M. Mann (2004). "The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(9): 699-711.

Stenbeck, G. (1998). "Soluble NSF-attachment proteins." Int J Biochem Cell Biol **30**(5): 573-577.

Stertz, L., G. R. Fries, A. R. Rosa, M. Kauer-Sant'anna, P. Ferrari, A. V. Paz, C. Green, A. B. Cunha, F. Dal-Pizzol, C. Gottfried and F. Kapczinski (2015). "Damage-associated molecular patterns and immune activation in bipolar disorder." Acta Psychiatr Scand **132**(3): 211-217.

Sugimoto, Y., M. Yamamoto, N. Tagawa, Y. Kobayashi, K. Mitsui-Saitoh, Y. Hotta and J. Yamada (2011). "Differences between mice strains in response to paroxetine in the forced swimming test: involvement of serotonergic or noradrenergic systems." Eur J Pharmacol **672**(1-3): 121-125.

Sullivan, P. F., C. Fan and C. M. Perou (2006). "Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **141B**(3): 261-268.

Sullivan, P. F., M. C. Neale and K. S. Kendler (2000). "Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis." American Journal of Psychiatry **157**(10): 1552-1562.

Taurines, R., E. Dudley, J. Grassl, A. Warnke, M. Gerlach, A. N. Coogan and J. Thome (2011). "Proteomic research in psychiatry." J Psychopharmacol **25**(2): 151-196.

Thase, M. E. (1999). "Redefining antidepressant efficacy toward long-term recovery." J Clin Psychiatry **60 Suppl 6**: 15-19.

Theodosios, D. T., D. A. Poulain and S. H. Oliek (2008). "Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions." *Physiol Rev* **88**(3): 983-1008.

TheUniProtConsortium (2017). "UniProt: the universal protein knowledgebase." *Nucleic Acids Research* **45**(D1): D158-D169.

Thoeringer, C. K., I. Sillaber, A. Roedel, A. Erhardt, M. B. Mueller, F. Ohl, F. Holsboer and M. E. Keck (2007). "The temporal dynamics of intrahippocampal corticosterone in response to stress-related stimuli with different emotional and physical load: an in vivo microdialysis study in C57BL/6 and DBA/2 inbred mice." *Psychoneuroendocrinology* **32**(6): 746-757.

Triolo, D., G. Dina, I. Lorenzetti, M. Malaguti, P. Morana, U. Del Carro, G. Comi, A. Messing, A. Quattrini and S. C. Previtali (2006). "Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage." *J Cell Sci* **119**(Pt 19): 3981-3993.

Turck, C. W., G. Maccarrone, E. Sayan-Ayata, A. M. Jacob, C. Ditzen, H. Kronsbein, I. Birg, C. C. Doertbudak, K. Haegler, M. Lebar, L. Teplytska, N. Kolb, N. Uwaje and R. Zollinger (2005). "The quest for brain disorder biomarkers." *J Med Invest* **52** Suppl: 231-235.

Uher, R. (2009). "The role of genetic variation in the causation of mental illness: an evolution-informed framework." *Mol Psychiatry* **14**(12): 1072-1082.

UK-ECT-Review-Group (2003). "Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis." *Lancet* **361**(9360): 799-808.

UniProt. (2017, 27/09/2017). "UniProtKB results." Version UniProtKB/Swiss-Prot 2017_09. Retrieved 29/09/2017, from <http://www.uniprot.org/uniprot/>.

van Hemert, M. J., H. Y. Steensma and G. P. van Heusden (2001). "14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis." *Bioessays* **23**(10): 936-946.

Van Laar, V. S., S. B. Berman and T. G. Hastings (2016). "Mic60/mitofilin overexpression alters mitochondrial dynamics and attenuates vulnerability of dopaminergic cells to dopamine and rotenone." *Neurobiol Dis* **91**: 247-261.

Vaswani, M., F. K. Linda and S. Ramesh (2003). "Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**(1): 85-102.

Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreira, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T.

Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu (2001). "The sequence of the human genome." *Science* **291**(5507): 1304-1351.

Vialou, V., M. Thibault, S. Kaska, S. Cooper, P. Gajewski, A. Eagle, M. Mazei-Robison, E. J. Nestler and A. J. Robison (2015). "Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress." *Neuropharmacology* **99**: 28-37.

Videbech, P. and B. Ravnkilde (2004). "Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies." *Am J Psychiatry* **161**(11): 1957-1966.

Vollmayr, B., D. Bachteler, V. Vengeliene, P. Gass, R. Spanagel and F. Henn (2004). "Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning." *Behav Brain Res* **150**(1-2): 217-221.

Vollmert, C., H. Tost, S. Brassens, A. Jatzko and D. F. Braus (2004). "Depression und moderne Bildgebung." *Fortschr Neurol Psychiatr* **72**(08): 435-445.

Vos, T., A. D. Flaxman, M. Naghavi, R. Lozano, C. Michaud, M. Ezzati, K. Shibuya, J. A. Salomon, S. Abdalla, V. Aboyans, J. Abraham, I. Ackerman, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. K. Ali, M. Alvarado, H. R. Anderson, L. M. Anderson, K. G. Andrews, C. Atkinson, L. M. Baddour, A. N. Bahalim, S. Barker-Collo, L. H. Barrero, D. H. Bartels, M. G. Basanez, A. Baxter, M. L. Bell, E. J. Benjamin, D. Bennett, E. Bernabe, K. Bhalla, B. Bhandari, B. Bikbov, A. Bin Abdulhak, G. Birbeck, J. A. Black, H. Blencowe, J. D. Blore, F. Blyth, I. Bolliger, A. Bonaventure, S. Boufous, R. Bourne, M. Boussinesq, T. Braithwaite, C. Brayne, L. Bridgett, S. Brooker, P. Brooks, T. S. Brugha, C. Bryan-Hancock, C. Bucello, R. Buchbinder, G. Buckle, C. M. Budke, M. Burch, P. Burney, R. Burstein, B. Calabria, B. Campbell, C. E. Canter, H. Carabin, J. Carapetis, L. Carmona, C. Cella, F. Charlson, H. Chen, A. T. Cheng, D. Chou, S. S. Chugh, L. E. Coffeng, S. D. Colan, S. Colquhoun, K. E. Colson, J. Condon, M. D. Connor, L. T. Cooper, M. Corriere, M. Cortinovis, K. C. de Vaccaro, W. Couser, B. C. Cowie, M. H. Criqui, M. Cross, K. C. Dabhadkar, M. Dahiya, N. Dahodwala, J. Damsere-Derry, G. Danaei, A. Davis, D. De Leo, L. Degenhardt, R. Dellavalle, A. Delossantos, J. Denenberg, S. Derrett, D. C. Des Jarlais, S. D. Dharmaratne, M. Dherani, C. Diaz-Torne, H. Dolk, E. R. Dorsey, T. Driscoll, H. Duber, B. Ebel, K. Edmond, A. Elbaz, S. E. Ali, H. Erskine, P. J. Erwin, P. Espindola, S. E. Ewoigbokhan, F. Farzadfar, V. Feigin, D. T. Felson, A. Ferrari, C. P. Ferri, E. M. Fevre, M. M. Finucane, S. Flaxman, L. Flood, K. Foreman, M. H. Forouzanfar, F. G. Fowkes, R. Franklin, M. Fransen, M. K. Freeman, B. J. Gabbe, S. E. Gabriel, E. Gakidou, H. A. Ganatra, B. Garcia, F. Gaspari, R. F. Gillum, G. Gmel, R. Gosselin, R. Grainger, J. Groeger, F. Guillemin, D. Gunnell, R. Gupta, J. Haagsma, H. Hagan, Y. A. Halasa, W. Hall, D. Haring, J. M. Haro, J. E. Harrison, R. Havmoeller, R. J. Hay, H. Higashi, C. Hill, B. Hoen, H. Hoffman, P. J. Hotez, D. Hoy, J. J. Huang, S. E. Ibeanusi, K. H. Jacobsen, S. L. James, D. Jarvis, R. Jasrasaria, S. Jayaraman, N. Johns, J. B. Jonas, G. Karthikeyan, N. Kassebaum, N. Kawakami, A. Keren, J. P. Khoo, C. H. King, L. M. Knowlton, O. Kobusingye, A. Koranteng, R. Krishnamurthi, R. Laloo, L. L. Laslett, T. Lathlean, J. L. Leasher, Y. Y. Lee, J. Leigh, S. S. Lim, E. Limb, J. K. Lin, M. Lipnick, S. E. Lipshultz, W. Liu, M. Loane, S. L. Ohno, R. Lyons, J. Ma, J. Mabweijano, M. F. MacIntyre, R. Malekzadeh, L. Mallinger, S. Manivannan, W. Marcenes, L. March, D. J. Margolis, G. B. Marks, R. Marks, A. Matsumori, R. Matzopoulos, B. M. Mayosi, J. H. McAnulty, M. M. McDermott, N. McGill, J. McGrath, M. E. Medina-Mora, M. Meltzer, G. A. Mensah, T. R. Merriman, A. C. Meyer, V. Miglioli, M. Miller, T. R. Miller, P. B. Mitchell, A. O. Mocumbi, T. E. Moffitt, A. A. Mokdad, L. Monasta, M. Montico, M. Moradi-Lakeh, A. Moran, L. Morawska, R. Mori, M. E. Murdoch, M. K. Mwaniki, K. Naidoo, M. N. Nair, L. Naldi, K. M. Narayan, P. K. Nelson, R. G. Nelson, M. C. Nevitt, C. R. Newton, S. Nolte, P. Norman, R. Norman, M. O'Donnell, S. O'Hanlon, C. Olives, S. B. Omer, K. Ortblad, R.

Osborne, D. Ozgediz, A. Page, B. Pahari, J. D. Pandian, A. P. Rivero, S. B. Patten, N. Pearce, R. P. Padilla, F. Perez-Ruiz, N. Perico, K. Pesudovs, D. Phillips, M. R. Phillips, K. Pierce, S. Pion, G. V. Polanczyk, S. Polinder, C. A. Pope, 3rd, S. Popova, E. Porrini, F. Pourmalek, M. Prince, R. L. Pullan, K. D. Ramaiah, D. Ranganathan, H. Razavi, M. Regan, J. T. Rehm, D. B. Rein, G. Remuzzi, K. Richardson, F. P. Rivara, T. Roberts, C. Robinson, F. R. De Leon, L. Ronfani, R. Room, L. C. Rosenfeld, L. Rushton, R. L. Sacco, S. Saha, U. Sampson, L. Sanchez-Riera, E. Sanman, D. C. Schwebel, J. G. Scott, M. Segui-Gomez, S. Shahrzad, D. S. Shepard, H. Shin, R. Shivakoti, D. Singh, G. M. Singh, J. A. Singh, J. Singleton, D. A. Sleet, K. Sliwa, E. Smith, J. L. Smith, N. J. Stapelberg, A. Steer, T. Steiner, W. A. Stolk, L. J. Stovner, C. Sudfeld, S. Syed, G. Tamburlini, M. Tavakkoli, H. R. Taylor, J. A. Taylor, W. J. Taylor, B. Thomas, W. M. Thomson, G. D. Thurston, I. M. Tleyjeh, M. Tonelli, J. A. Towbin, T. Truelsen, M. K. Tsilimbaris, C. Ubeda, E. A. Undurraga, M. J. van der Werf, J. van Os, M. S. Vavilala, N. Venketasubramanian, M. Wang, W. Wang, K. Watt, D. J. Weatherall, M. A. Weinstock, R. Weintraub, M. G. Weisskopf, M. M. Weissman, R. A. White, H. Whiteford, S. T. Wiersma, J. D. Wilkinson, H. C. Williams, S. R. Williams, E. Witt, F. Wolfe, A. D. Woolf, S. Wulf, P. H. Yeh, A. K. Zaidi, Z. J. Zheng, D. Zonies, A. D. Lopez, C. J. Murray, M. A. AlMazroa and Z. A. Memish (2012). "Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet* **380**(9859): 2163-2196.

Wagner, K. V., J. Hartmann, C. Labermaier, A. S. Hausl, G. Zhao, D. Harbich, B. Schmid, X. D. Wang, S. Santarelli, C. Kohl, N. C. Gassen, N. Matosin, M. Schieven, C. Webhofer, C. W. Turck, L. Lindemann, G. Jaschke, J. G. Wettstein, T. Rein, M. B. Muller and M. V. Schmidt (2015). "Homer1/mGluR5 activity moderates vulnerability to chronic social stress." *Neuropsychopharmacology* **40**(5): 1222-1233.

Wagstaff, A. J., S. M. Cheer, A. J. Matheson, D. Ormrod and K. L. Goa (2002). "Paroxetine: an update of its use in psychiatric disorders in adults." *Drugs* **62**(4): 655-703.

Walsh, B. T., S. N. Seidman, R. Sysko and M. Gould (2002). "Placebo response in studies of major depression: variable, substantial, and growing." *Jama* **287**(14): 1840-1847.

Wang, Q., Y. Wang, W. Ji, G. Zhou, K. He, Z. Li, J. Chen, W. Li, Z. Wen, J. Shen, Y. Qiang, J. Ji, Y. Wang, Y. Shi, Q. Yi and Y. Wang (2015). "SNAP25 is associated with schizophrenia and major depressive disorder in the Han Chinese population." *J Clin Psychiatry* **76**(1): e76-82.

Wang, X., D. Winter, G. Ashrafi, J. Schlehe, Y. L. Wong, D. Selkoe, S. Rice, J. Steen, M. J. LaVoie and T. L. Schwarz (2011). "PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility." *Cell* **147**(4): 893-906.

Webhofer, C., P. Gormanns, S. Reckow, M. Lebar, G. Maccarrone, T. Ludwig, B. Putz, J. M. Asara, F. Holsboer, I. Sillaber, W. Ziegler and C. W. Turck (2013). "Proteomic and metabolomic profiling reveals time-dependent changes in hippocampal metabolism upon paroxetine treatment and biomarker candidates." *J Psychiatr Res* **47**(3): 289-298.

Webhofer, C., P. Gormanns, V. Tolstikov, W. Ziegler, I. Sillaber, F. Holsboer and C. W. Turck (2011). "Metabolite profiling of antidepressant drug action reveals novel drug targets beyond monoamine elevation." *Transl Psychiatry* **1**: e58.

Wegner, M., I. Helmich, S. Machado, A. E. Nardi, O. Arias-Carrion and H. Budde (2014). "Effects of exercise on anxiety and depression disorders: review of meta-analyses and neurobiological mechanisms." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **13**(6): 1002-1014.

Weissman, M. M., K. R. Merikangas, P. Wickramaratne, K. K. Kidd, B. A. Prusoff, J. F. Leckman and D. L. Pauls (1986). "Understanding the clinical heterogeneity of major depression using family data." *Arch Gen Psychiatry* **43**(5): 430-434.

Whiteheart, S. W., I. C. Griff, M. Brunner, D. O. Clary, T. Mayer, S. A. Buhrow and J. E. Rothman (1993). "SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform." *Nature* **362**(6418): 353-355.

Whooley, M. A., A. L. Avins, J. Miranda and W. S. Browner (1997). "Case-finding instruments for depression. Two questions are as good as many." *J Gen Intern Med* **12**(7): 439-445.

Wilhelmsson, U., L. Li, M. Pekna, C. H. Berthold, S. Blom, C. Eliasson, O. Renner, E. Bushong, M. Ellisman, T. E. Morgan and M. Pekny (2004). "Absence of glial fibrillary acidic protein and

vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration." *J Neurosci* **24**(21): 5016-5021.

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." *Biotechnol Genet Eng Rev* **13**: 19-50.

Wirz-Justice, A. and R. H. Van den Hoofdakker (1999). "Sleep deprivation in depression: what do we know, where do we go?" *Biol Psychiatry* **46**(4): 445-453.

Witzmann, F. A., R. J. Arnold, F. Bai, P. Hrnairova, M. W. Kimpel, Y. S. Mechref, W. J. McBride, M. V. Novotny, N. M. Pedrick, H. N. Ringham and J. R. Simon (2005). "A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes." *Proteomics* **5**(8): 2177-2201.

Wong, M. L. and J. Licinio (2004). "From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression." *Nat Rev Drug Discov* **3**(2): 136-151.

World-Health-Organization (1993). *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders : diagnostic criteria for research*. Geneva, Geneva : World Health Organization.

Yaffe, M. B., G. W. Farr, D. Miklos, A. L. Horwich, M. L. Sternlicht and H. Sternlicht (1992). "TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis." *Nature* **358**(6383): 245-248.

Yam, A. Y., Y. Xia, H. T. Lin, A. Burlingame, M. Gerstein and J. Frydman (2008). "Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies." *Nat Struct Mol Biol* **15**(12): 1255-1262.

Yamada, M., M. Yamada and T. Higuchi (2005). "Antidepressant-elicited changes in gene expression: remodeling of neuronal circuits as a new hypothesis for drug efficacy." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**(6): 999-1009.

Yamagata, H., S. Uchida, K. Matsuo, K. Harada, A. Kobayashi, M. Nakashima, M. Nakano, K. Otsuki, N. Abe-Higuchi, F. Higuchi, T. Watanuki, T. Matsubara, S. Miyata, M. Fukuda, M. Mikuni and Y. Watanabe (2017). "Identification of commonly altered genes between in major depressive disorder and a mouse model of depression." *Sci Rep* **7**(1): 3044.

Yang, J. W., T. Czech and G. Lubec (2004). "Proteomic profiling of human hippocampus." *Electrophoresis* **25**(7-8): 1169-1174.

Yang, R. F., L. H. Sun, R. Zhang, Y. Zhang, Y. X. Luo, W. Zheng, Z. Q. Zhang, H. Z. Chen and D. P. Liu (2015). "Suppression of Mic60 compromises mitochondrial transcription and oxidative phosphorylation." *Sci Rep* **5**: 7990.

Yates, J. R., D. Cociorva, L. Liao and V. Zabrouskov (2006). "Performance of a linear ion trap-Orbitrap hybrid for peptide analysis." *Anal Chem* **78**(2): 493-500.

Yoo, B. C., N. Cairns, M. Fountoulakis and G. Lubec (2001). "Synaptosomal proteins, beta-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (beta-SNAP), gamma-SNAP and synaptotagmin I in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease." *Dement Geriatr Cogn Disord* **12**(3): 219-225.

Yoo, B. C., S. H. Kim, N. Cairns, M. Fountoulakis and G. Lubec (2001). "Deranged expression of molecular chaperones in brains of patients with Alzheimer's disease." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(1): 249-258.

Young, E. A., R. F. Haskett, V. Murphy-Weinberg, S. J. Watson and H. Akil (1991). "Loss of glucocorticoid fast feedback in depression." *Archives of General Psychiatry* **48**(8): 693-699.

Zhang, Y., S. Reckow, C. Webhofer, M. Boehme, P. Gormanns, W. M. Egge-Jacobsen and C. W. Turck (2011). "Proteome scale turnover analysis in live animals using stable isotope metabolic labeling." *Anal Chem* **83**(5): 1665-1672.

8 Anhang

8.1 2D-Gele der Vehikel- und Paroxetinhippocampi



Abbildung 18: 2D-Gel der Vehikelmaus cv16.3



Abbildung 19: 2D-Gel der Vehikelmaus cv17.3



Abbildung 20: 2D-Gel der Vehikelmaus cv20.3

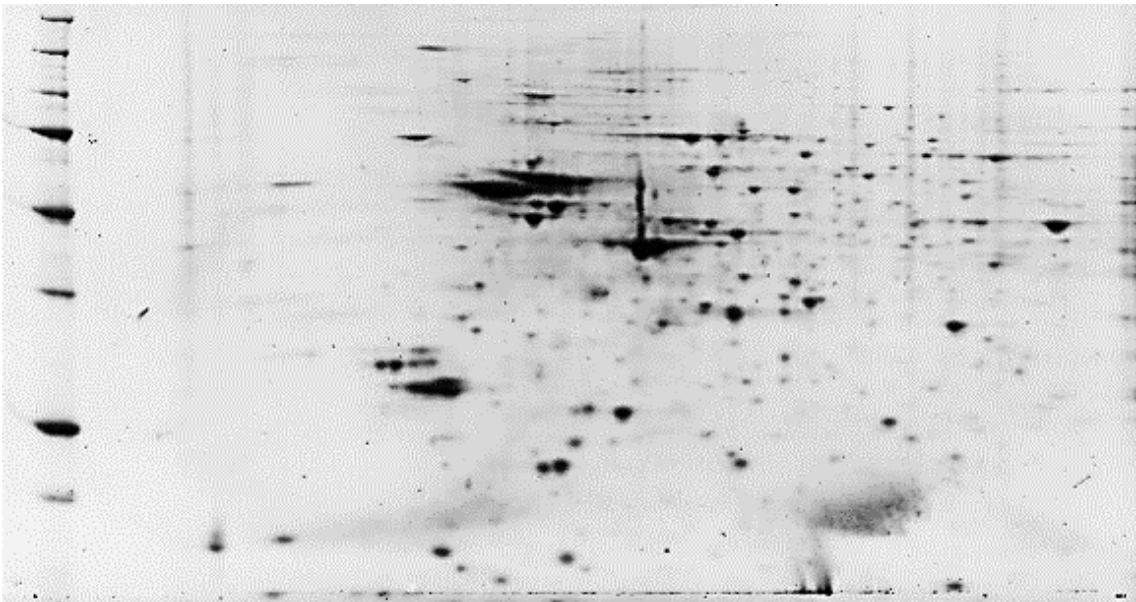


Abbildung 21: 2D-Gel der Paroxetinmaus cp8.3



Abbildung 22: 2D-Gel der Paroxetinmaus cp24.3

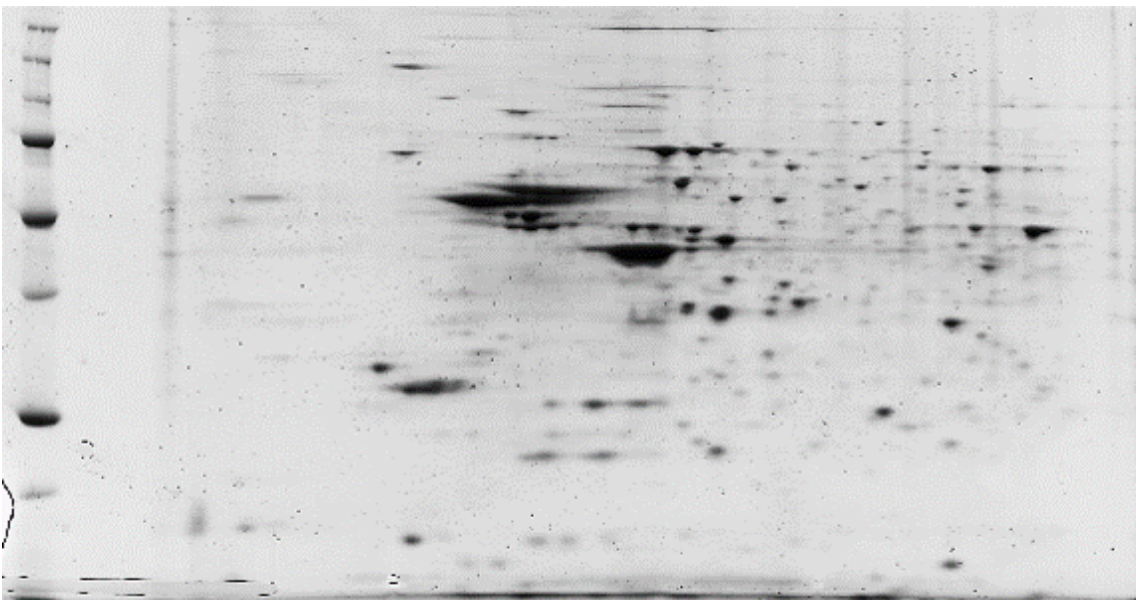


Abbildung 23: 2D-Gel der Paroxetinmaus cp25.3

9 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Prof Dr. Chris Turck für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Projektes, sein offenes Ohr und seine unendliche Geduld mit mir als Medizinstudentin und ‚Laborneuling‘!

Herzlichen Dank an die gesamte Research Group ‚Proteomik und Biomarker‘, die mich sehr unterstützt und nicht nur bei Labmeetings hilfreiches Feedback gegeben hat. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Giuseppina Maccarone, die mir sehr beim Ablauf der Experimente, bei der Behebung sämtlicher Fehlermeldungen des Massenspektrometers und beim Vorgehen zum Auswerten der Daten geholfen hat. Mein besonderer Dank gilt auch TA Christiane Rewerts, die mir die Labortechniken beigebracht hat und die auf alle Fragen bezüglich der Methodik prompt eine Antwort wusste. Ihre sehr gute Organisation des Labors hat mich beeindruckt.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stalla.

Großer Dank gilt meiner Mutter und meiner Schwester, die mir immer viel Mut zu sprechen und an mich glauben.

10 Eidesstattliche Versicherung

Palleis, Carla Teresa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Bestimmung des Turnovers von Proteoformen in
murinem Hippocampusgewebe nach chronischer
Gabe von Paroxetin**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.06.2019

Ort, Datum

Carla T. Palleis

Unterschrift Doktorandin/Doktorand