

# **Abschlussbericht zum Vorhaben**

## **„Prognostische Relevanz von Proteomveränderungen nach einem schweren Schädelhirntrauma (sSHT)“, FR 273**

### ***Laufzeit:***

**01.02.2018 – 31.07.2023**

**Bericht vom 31.10.2023**

### **Autoren:**

M. Sc. Miriam Paulat<sup>1</sup>

Prof. Dr. med. Ramón Martínez-Olivera MHBA<sup>1</sup>

M. Sc. Karin Schork<sup>2</sup>

Dr. Katalin Barkovits-Boeddinghaus<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Neurochirurgie und Wirbelsäulenchirurgie

BG Universitätsklinikum Bergmannsheil GmbH

Bürkle-de-la-Camp-Platz 1, 44789 Bochum

<sup>2</sup>Medizinisches Proteom-Center Ruhr Universität Bochum

Building ProDi E2.265, Gesundheitscampus 4, 44801 Bochum

# Inhalt

<b>Kurzfassung: Deutsch</b> .....	3
<b>Kurzfassung: Englisch</b> .....	4
<b>1. Forschungszweck/-ziel</b> .....	6
<b>3. Methodik</b> .....	8
<b>3.1 Patientenrekrutierung, sowie Probenentnahme und Aufnahme klinischer Daten</b> .	8
<b>3.2 Durchgeführte Arbeiten am MPC</b> .....	9
<b>3.3.1 Zeitliche Verzögerung durch Corona Pandemie</b> .....	10
<b>3.3.2 Fehlendes Hirngewebe als Kontrollproben</b> .....	10
<b>3.3.3 Änderung der Strategie zur Validierung von Biomarker</b> .....	11
<b>4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens</b> .....	12
<b>4.1 Patientenrekrutierung und Probenentnahme</b> .....	12
<b>4.2 Klinische Parameter</b> .....	14
<b>4.2.2 Elektrophysiologie</b> .....	15
<b>4.2.3 Sekundärhirnschäden und Einteilung „gute“ und „schlechte“ Prognose</b> .....	16
<b>4.2.4 Spätes Outcome 6 und 12 Monate nach SHT</b> .....	17
<b>4.3 Ergebnisse des MPC</b> .....	18
<b>4.3.1 Validierungsstudie (Parallel-Reaktion-Monitoring, PRM)</b> .....	18
<b>4.3.2 Vergleich zu Kontrollen und Zeitverlauf</b> .....	19
<b>4.3.3 Zusammenhang mit Prognose, ICP-Werte und SSEP- Ergebnissen</b> .....	22
<b>4.3.4 Vergleich mit Vorstudie (Discovery 1)</b> .....	24
<b>5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen</b> .....	25
<b>5.1 Proteomveränderungen in humanen Hirnproben</b> .....	25
<b>5.2 Proteomveränderungen im CSF und Blut</b> .....	26
<b>5.3 Massenspektrometrische Untersuchungen des Proteoms nach sSHT</b> .....	28
<b>6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen</b> .....	29
<b>7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan</b> .....	32
<b>8. Anhang/ Anhänge</b> .....	33
<b>Tabelle S1: Entnommene Proben der sSHT-Patienten</b> .....	33
<b>Tabelle S2: Spätes Outcome – Neurologische Scores nach 6 und 12 Monaten</b> .....	33

## Kurzfassung: Deutsch

**Ziele:** Das schwere Schädelhirntrauma (sSHT) stellt eine der häufigsten Ursachen für Morbidität, Mortalität und Arbeitsunfähigkeit der arbeitstätigen Population dar und ist aufgrund der schlechten Prognose und dem sich daraus ergebenden hohen medizinischen Aufwand eine relevante Kostenquelle für die gesetzlichen Unfallversicherungen. So tritt bei ca 1/3 aller sSHT-Patienten eine posttraumatische sekundäre Hirnschädigung (Ischämie, Hypoxie, malignes Hirnödem) auf, die mit der höchsten Morbi-Mortalität assoziiert ist. Bislang fehlen verlässliche Biomarker, die das Outcome frühzeitig vorhersagen und dadurch möglicherweise das Outcome verbessern könnten.

Ziel der hier vorliegenden Studie war es daher, neue prognostische Biomarker in Hirngewebe, Serum und Liquor von sSHT-Patienten aufzudecken, die bei einer frühzeitigen Identifizierung des Auftretens von sekundären Hirnschädigungen und Patienten mit schlechtem Verlauf beitragen können und diese mit Parametern von klinisch etablierten Verfahren wie der Elektrophysiologie und dem Neuromonitoring zu korrelieren.

**Aktivitäten/Methoden:** Innerhalb der ersten Woche nach sSHT wurde bei 32 sSHT-Patienten Liquor zu drei Zeitpunkten (Tag 0, Tag 3, und Tag 6) sowie Hirngewebe bei entsprechend indizierter Operation entnommen. In dieser Zeit wurden täglich routinemäßig erfasste Parameter wie Serum-, Vital- und Beatmungsparameter, sowie Ergebnisse des Neuromonitorings (ICP, CPP) dokumentiert. Des Weiteren wurde von 18 gesunden Kontrollpatienten Liquor zu einem beliebigen Zeitpunkt entnommen. Unter Verwendung quantitativer Massenspektrometrie-basierter Methoden wurden am medizinischen Proteom-Center (MPC) der Ruhr Universität Bochum Proteomprofile der Bioproben erstellt. Durch den Einsatz bioinformatischer und statistischer Methoden wurden die Proteomdaten umfassend in Bezug auf verschiedene o.g. Parameter differentiell ausgewertet. Zum einen wurden die Unterschiede von sSHT-Patienten zu Kontrollpatienten erfasst, aber auch der zeitliche Verlauf innerhalb der Patientenproben. Im Anschluss wurden die Proteomveränderungen mit klinischen Parametern wie dem intrakraniellen Druck (ICP), dem zerebralen Perfusionsdruck (CPP), der Elektrophysiologie (somatosensorische evozierte Potentialen, kurz SSEP, frühe akustisch evozierte Potentiale, kurz FAEP), sowie dem frühen- (bei Entlassung) und späten (nach 6 Monaten) klinischen Outcome der Patienten korreliert.

### Ergebnisse:

- Insgesamt wurden 32 sSHT-Patienten und 18 Kontroll-Patienten eingeschlossen.
- Von den 32 sSHT-Patienten konnten zu Zeitpunkt T0 (Aufnahme- und OP-Tag) 27 Liquorproben, zu Zeitpunkt T3 (Tag 3 nach SHT) 30 und zu Zeitpunkt T6 (Tag 6 nach SHT) 23 Liquorproben gesammelt werden.
- Desweiteren wurden bei 19 SHT-Patienten im Rahmen einer Operation wegen einer Hirnblutung Hirnproben asserviert. Die übrigen 13 SHT Patienten erhielten lediglich eine externe Ventrikeldrainage-OP zur Messung der ICP und ggf. Therapie beim Auftreten pathologischer ICP Werte.
- Im Vergleich zu den Kontrollpatienten waren bei den sSHT-Patienten zum Zeitpunkt T0 438, zu T3 382 und zu T6 350 Proteine signifikant differentiell reguliert, von denen die hochregulierten Proteine mit der funktionellen Proteingruppen (GO-Terms) der „Response to stress“ und „Regulation of complement activation“ assoziiert waren.
- Weiterhin veränderten sich 265 Proteine signifikant über die Zeit innerhalb der sSHT-Proben

- Es fand sich jedoch keine Korrelation zwischen dem frühem Outcome- oder dem Elektrophysiologie- Monitoring und den Proteomveränderungen.
- 3 Proteine korrelierten mit dem ICP-Wert bei Einteilung in ICP  $\leq 18$  mmHg (unauffällig) und ICP  $> 18$  mmHg (pathologisch), und zwar UCHL1, YWHAG und NPTXR.
- Eine erhöhte CSF-Konzentration von Protein CFHR1 zu Zeitpunkt T3 korrelierte signifikant mit einem schlechten Patienten Outcome gemessen am 6-monatigen GOS (1-2 Punkte).

### **Kurzfassung: Englisch**

**Aim:** Severe traumatic brain injury (sTBI) is one of the most devastating causes of morbidity, mortality and incapacity-to-work for the working population. Due to its poor prognosis, which leads to high medical efforts and interventions, it is a relevant source of costs for accident insurances. So far, well-established biomarkers are missing to assess patients' outcome with regard to secondary brain damages such as hypoxia, ischemia or malignant brain edema. The goal of the present study was to discover prognostic biomarkers in sTBI specific cerebrospinal fluid (CSF), blood and brain tissue that can identify the risk of occurrence of secondary brain damage and to identify patients with poor prognosis and to correlate these biomarkers with clinical well established methods such as neuromonitoring and electrophysiology.

**Methods:** Within the first week after sTBI, CSF and blood samples from 32 sTBI patients were collected on days 0, 3 and 6, as well as brain tissue in case operation was necessary due to brain haematoma. On a daily basis, routine parameters (laboratory and ventilation parameters, as well as neuromonitoring) were documented. Furthermore, CSF samples of 18 healthy control patients were collected at one time point. By terms of quantitative mass spectrometric methods, proteomic profiles of the collected samples were performed in the Medical Proteome-Center (MPC). Afterwards bioinformatics and statistical methods were used to evaluate the proteomic data with regard to the other parameters. First, the differences between patients and controls and the temporal course of proteins within the sTBI samples were analyzed. Then, the proteomic changes were correlated with clinical parameters such as the intracranial pressure (ICP), the cerebral perfusion pressure (CPP), electrophysiology data and the early (at discharge) and late (6 months post trauma) clinical outcome.

### **Results:**

- 32 sTBI patients and 18 control patients were included in the present study.
- In total, CSF samples were collected in 27 patients (day 0), in 30 patients (day 3) and in 23 patients (day 6) and brain samples in 19 patients.
- In comparison to control patients, 438 proteins on day 0, 382 proteins on day 3 and 350 proteins on day 6 were significant differently regulated in sTBI samples. Upregulated proteins were specifically associated with the GO-Terms „Response to stress“ und „Regulation of complement activation“.
- Furthermore, 265 proteins were significant differently regulated over the observation time in the sTBI samples.
- No correlation was found between the proteomic profiles and both SSEP/FAEP -data and the early clinical patient outcome.
- 3 proteins correlated with the ICP when grouped into the following values: ICP  $\leq 18$  mmHg (physiological range) and ICP  $> 18$  mmHg (pathological increased range): UCH-L1, YWHAG and NPTXR.

- Increased CSF concentrations of the CFHR1 protein on day 3 after trauma significantly correlated with poor patient`s outcome at 6 months assessed by GOS (1-2 scale points)

## 1. Problemstellung

Das schwere Schädel-Hirn-Trauma (sSHT) stellt in industrialisierten Ländern eine der Hauptursachen für Mortalität und Morbidität der Bevölkerung dar. Zudem ist es häufig mit permanenten neurologischen Defiziten assoziiert (Maas et al., 2008). Die Inzidenz eines sSHT liegt in Deutschland bei 33,5 Patienten auf 100.000 Einwohner, wobei ein großer Anteil aus Arbeitsunfällen resultiert (Haas et al., 2001). Das sSHT ist nicht nur aus medizinischer, sondern auch aus sozioökonomischer Sicht gesellschaftlich hoch relevant, da dieses mit einer schlechten Prognose, einer langjähriger Behandlungsdauer und Rehabilitation sowie von Arbeitsunfähigkeitstagen einhergeht (Sasse et al., 2013; Sasse et al., 2014). Die daraus resultierenden Kosten sind folglich enorm (Olesen 2012, Scholten 2015, www.who.int).

Trotz einer eindeutigen Optimierung der Akutversorgung dieser Patienten vor Ort durch Notarzteinsätze, aber auch beim Eintreffen im Krankenhaus durch eine genauere zerebrale Bildgebung und eine verbesserte Ausstattung im Operationssaal (moderneres Mikroskop, Neuronavigation usw.) und auf den Intensivstationen, hat sich die Prognose der sSHT-Patienten nur moderat verbessert. Dies liegt vor allem daran, dass Hirnschädigungen nicht nur zur Zeit der Verletzung, sondern häufig, und zwar in ca. 1/3 der Patienten, auch im späteren Verlauf von zwei Wochen (sog. sekundärer zerebraler Hirnschaden) auftreten und die Prognose der Patienten dramatisch verschlechtern.

Derzeit fehlen Biomarker, welche das Auftreten einer späteren Hirnschädigung vorsehen können. Die Identifizierung solcher Biomarker könnte zweifelsfrei zu einer Verbesserung des Outcomes von sSHT-Patienten beitragen.

### Literatur:

Haas T, Wolf O, Bartels P. Schwere Schädel-Hirn-Traumen nach Arbeits- und Freizeitunfällen. *Trauma und Berufskrankheit*, 2001;3(1):32-40.

Maas AI, Stochetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 2008;7(8):728-741.

Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jonsson B, group Cs, et al: The economic cost of brain disorders in *Europe*. *Eur J Neurol* 2012;19: 155-162.

Sasse N, Gibbons H, Wilson L, Martínez R, Sehmisch S, von Wild K, von Steinbüchel N. Coping strategies in individuals after traumatic brain injury: associations with health-related quality of life. *Disability and Rehabilitation* 2014;36: 2152-2160.

Sasse N, Gibbons H, Wilson L, Martínez-Olivera R, Schmidt H, Hasselhorn M, von Wild K, von Steinbüchel N. Self-Awareness and Health-Related Quality of Life after Traumatic Brain Injury. *J Head Trauma Rehabil* 2013;28: 464-472.

Scholten AC, Polinder S, Panneman MJ, van Beeck EF, Haagsma JA: Incidence and costs of bicycle-related traumatic brain injuries in the Netherlands. *Accid Anal Prev* 81:51-60, 2015

## 1. Forschungszweck/-ziel

Die hier vorgestellte Studie analysiert erstmals verschiedene Parameter in humanem Hirngewebe sowie in Plasma und Liquor mit dem primären Ziel, neue prognostische Biomarker zu identifizieren. Dabei sollen diese beitragen zur:

a) Erkennung von Patienten, bei denen im Verlauf ein Sekundärschaden auftritt, welcher das Outcome verschlechtert. Da der Primärschaden unbeeinflussbar bleibt, ist es das wichtigste Ziel der neuroprotektiven Therapien, den Sekundärschaden frühzeitig zu entdecken, um rechtzeitig mit einer therapeutischen Intervention beginnen zu können (siehe unten, frühes Outcome).

b) frühzeitigen Entdeckung von Patientengruppen, die von akuten Therapiemaßnahmen und von intensiveren Rehabilitationsmaßnahmen profitieren könnten (siehe unten, spätes Outcome). Im Prinzip ist es möglich, dass Patienten nicht während des stationären Aufenthaltes, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt eine klinische Besserung zeigen. Diese Patienten, welche besonders von einer Rehabilitation profitieren würden, bezeichnen wir als ‚späte Gewinner‘.

c) Korrelation der laborparametrischen Ergebnisse mit den Daten der routinemäßig durchgeführten Elektrophysiologie und des Neuromonitorings. Dies ermöglicht, kombinierte Profile aus laborparametrischen Untersuchungen und aus Messungen des intrakraniellen Drucks (ICP), des zerebralen Perfusionsdrucks (CPP), der somatosensorisch evozierten Potentiale zu definieren, welche mit dem Auftreten von Sekundärschäden assoziiert sind.

Als sekundäres Ziel wurde angestrebt, diagnostische Biomarker im Serum oder Liquor eines sSHT zu identifizieren, um Hinweise auf grundlegende zelluläre Pathomechanismen zu gewinnen.

Definition des unterschiedlichen Outcomes: Es wird ein frühes (Zeitpunkt der Entlassung/Verlegung des Patienten) Outcome von einem späten (6 und 12 Monate Follow-up) Outcome unterschieden.

a. **Frühes Outcome:** In die Subgruppe des günstigen Outcomes werden Patienten eingeteilt, welche während des stationären Aufenthaltes keinen Sekundärschaden entwickeln. Patienten mit Auftreten eines Sekundärschadens (z.B. malignes Hirnödem, Hirninfarkt, Hypoxie) werden als Patienten mit schlechtem Outcome eingestuft.

b. **Spätes Outcome:** Die Gruppeneinteilung wird anhand der Erfassung neurologischer Scores (GCS, GOS, mGOS, NIHSS, Barthel Index) erfolgen.

## Studienhypothesen:

### **a. Identifizierung neuer prognostischer Biomarker für das Auftreten von Sekundärhirnschäden nach einem sSHT**

Mittels einer Proteom-Analyse soll identifiziert werden, ob sich die Proteinzusammensetzung nach einem sSHT im betroffenen Hirngewebe oder Liquor verändert. Ziel ist es, durch ein Screening des gesamten Proteoms potentielle Proteine zu identifizieren, die in der Pathogenese der Sekundärschäden eines sSHT involviert sein könnten (globale Proteomanalyse). Hierfür wird bei allen Patienten dokumentiert, ob während des klinischen Aufenthaltes einer der folgenden als Sekundärschäden bezeichneten Zustände eintritt: malignes Hirnödem, Hypoxie/ Hirninfarkt. Die Patienten werden dementsprechend in „gute Prognose“ = kein Sekundärschaden und „schlechte Prognose“ = Sekundärschaden eingeteilt. Diese Prognosen werden dann mit den Proteomveränderungen korreliert. Sollten sich während der globalen Analyse differentiell regulierte Proteine bestätigen, wird deren Expression im Folgeschritt quantitativ bestimmt (targeted Proteomanalyse). Das Expressionsprofil von Proteinen, die bei Patienten mit sSHT über- oder unterexprimiert sind, könnte essentiell an der Pathophysiologie beteiligt sein.

### **b. Können neu identifizierte Biomarker durch statistische Korrelation mit den Ergebnissen des Neuromonitorings und der Elektrophysiologie die Voraussage der Patientenprognose ermöglichen?**

Im Rahmen der routinemäßigen Behandlung der sSHT Patienten werden, nach Anlage entsprechender Hirndruckmesssonden, ICP und CPP Werte erfasst und SSEP nach Stimulation des *Nervus medianus* sowie FAEP abgeleitet. Pathologische Werte des Neuromonitorings werden wie folgt definiert: ICP > 18 mmHg (> 20 Minuten), CPP < 50 mmHg (> 15 Minuten) trotz konservative Therapie, da nach dessen Überschreiten das Risiko für das Auftreten zerebraler Ischämien und Infarkte mit einem daraus resultierenden schlechteren klinischen Ergebnis überdurchschnittlich ansteigt.

Elektrophysiologisch werden die Patienten in unterschiedliche Gruppen entsprechend dem Ausmaß der Schädigung unterteilt, wobei die Antworten bezüglich der kortikalen SEP-Antworten in 0 = unauffällig und 1 = auffällig klassifiziert werden. Ziel ist es, einerseits das Outcome zwischen diesen Gruppen zu vergleichen und damit die Wertigkeit der SSEP als Prädiktor für das Outcome nach sSHT zu überprüfen. Die SSEPs sollen als Prognoseparameter hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität mit den in dieser Studie untersuchten Prognoseparametern verglichen werden. In analoger Weise erfolgen eine Gruppeneinteilung anhand des FAEP-Befundes und eine Evaluation der FAEP-Ergebnisse als prognostischer Parameter. Hierbei wird ein Fehlen der Wellen III bis V als Ausfall gewertet, da die Wellen I und II im Hörnerv generiert werden und daher keinen Rückschluss auf das Ausmaß der Gehirnschädigung erlauben.

Nach heutigem Kenntnisstand werden diese Daten erstmals auch mit Parametern im kontusionierten Hirngewebe und Liquor verglichen. Der Fokus liegt hierbei auf der Frage, ob

neu identifizierte Biomarker durch Kombination mit Methoden des Neuromonitorings und der Elektrophysiologie die Prognosemöglichkeiten erhöhen können.

### 3. Methodik

#### 3.1 Patientenrekrutierung, sowie Probenentnahme und Aufnahme klinischer Daten

Am Projekt beteiligten sich das Berufsgenossenschaftliche Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum, die Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannstrost Halle und die Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Murnau.

In zwei der beteiligten Kliniken (BG Bergmannsheil Universitätsklinikum Bochum und BG Unfallklinik Murnau) wurden zwischen 2018 und 2022 planmäßig sSHT-Patienten rekrutiert.

Abbildung 1 beschreibt den Arbeitsablauf innerhalb der Kliniken bei der Patientenrekrutierung, Probenentnahme, sowie bei der Aufnahme und Dokumentation der klinischen Daten.

Die Patienten mit sSHT werden meistens direkt nach dem Unfall durch den Notarzt in die Notfallaufnahme der beteiligten Krankenhäuser eingeliefert. Seltener werden sie von anderen peripheren Krankenhaus-Einrichtungen in den Krankenhäusern der Maximalversorgung zur Versorgung verlegt.

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte über die folgend beschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien:

#### Einschlusskriterien:

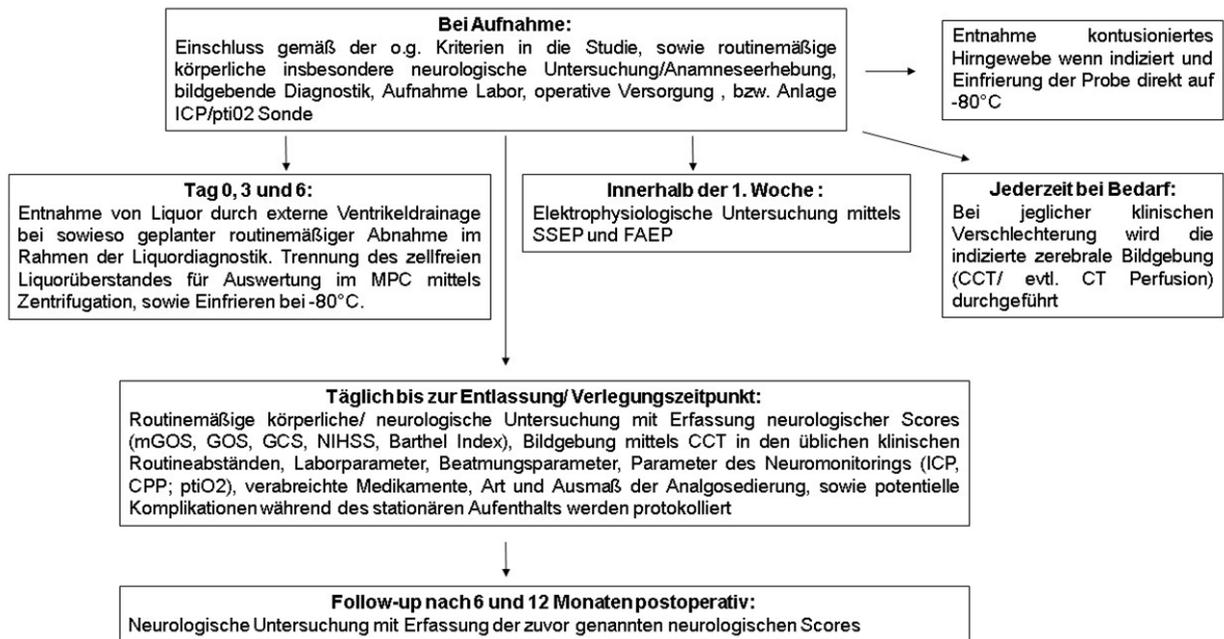
1. Komatöse Patienten mit sSHT (GCS < 8) und Hirnkontusionblutungen und/oder intraparenchymatöser Blutung im CCT, welche eine neurochirurgische Operation benötigen mit Notwendigkeit der Anlage einer Hirndruckmesssonde (in der Regel externe Ventrikeldrainage mit ICP-Messung).
2. SHT innerhalb von 24 Std. vor Aufnahme in der neurochirurgischen Klinik

#### Ausschlusskriterien:

1. Schwangere Patientinnen
2. Alter < 18 Jahre
3. Patienten mit beidseitig weiten Pupillen > 1 Std.
4. Kopfschussverletzungen
5. Kardiopulmonale Reanimation nach dem SHT
6. Nachweis von relevanten vorbestehenden zerebralen Pathologien (Hirnfarkt, maligner Hirntumor) im CCT
7. Koma bei Medikamenten-Intoxikation oder metabolischer Genese

#### Kontrollgruppe

Patienten, bei denen zum Ausschluss einer akuten oder chronischen Entzündung des ZNS eine Liquor- und Blutuntersuchung erfolgte und ein unauffälliger Befund in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Bergmannsheil Bochum gefunden wurde sowie Patienten, bei denen im Rahmen der Abklärung eines Hydrozephalus oder Spinalkanalstenose eine diagnostische Lumbalpunktion oder Myelographie erforderlich war, und bei denen ebenfalls keine weiteren Pathologien nachgewiesen wurden.



**Abbildung 1:** Arbeitszeitplan innerhalb der Kliniken zur Patientenrekrutierung, Probenentnahme und Dokumentation klinischer Parameter.

### 3.2 Durchgeführte Arbeiten am MPC

Die Generierung von proteomischen Daten unter Verwendung etablierter Massenspektrometrie-basierter Methoden erfolgte als Serviceauftrag am Medizinischen Proteom-Center der Ruhr Universität Bochum. Dabei wurden globale Proteomprofile für quantitative differenzielle Analysen erstellt sowie gezielte Proteomanalysen als Validierungsansatz durchgeführt.

Die Proteomik-Rohdaten wurden zunächst mit der Software MaxQuant (Version 2.3.1.0) ausgewertet, die Peptide in den gemessenen Massenspektren identifiziert und quantifiziert und diese auf Proteinebene zusammenfasst. Die erhaltenen Protein-Intensitäten wurden mithilfe der LOESS-Methode normalisiert und die Qualität der Daten mit Betrachtung von Boxplots und einer PCA (principal component analysis) sichergestellt.

Die Kontrollgruppe wurde jeweils mit den sSHT-Patienten zu den drei Zeitpunkten T0, T3 und T6 mit Hilfe von t-tests für jedes Protein mit mindestens 5 validen Werten pro Gruppe verglichen. Die resultierenden p-Werte wurden dann mit der Benjamini-Hochberg-Methode für multiples Testen adjustiert (p.FDR). Zusätzlich wurden Fold-Changes als Quotient der Mittelwerte der Proteinintensitäten der beiden Gruppen berechnet. P-Werte und Fold-Changes wurden mittels Volcano-Plots grafisch dargestellt. Als signifikant wurden alle Proteine angesehen, die einen adjustierten p-Wert  $p.FDR < 0.05$  sowie einen Fold Change  $\geq 2$  oder  $\leq 0.5$  erreichten (diese sind in den Volcano-Plots orange markiert). Von den signifikanten Proteinen wurden zusätzlich Heatmaps und Boxplots erstellt. Außerdem wurden on/off-Analysen angefertigt, die Proteine ausgeben, die in einer Gruppe kaum (weniger als 2-mal) und in der anderen Gruppe gehäuft (in mehr als 50% der Proben) quantifiziert werden konnten.

Um den zeitlichen Verlauf der Proteine über die drei Zeitpunkte (T0, T3, T6) zu betrachten, wurde eine ANOVA für wiederholte Messungen (engl.: repeated measures ANOVA) berechnet. Die resultierenden p-Werte wurden mittels Benjamini-Hochberg-Methode für multiples Testen adjustiert. Als signifikant wurden dabei alle Proteine angesehen, die einen signifikanten ANOVA p-Wert ( $p.ANOVA.FDR < 0.05$ ) erhielten.

Die signifikanten Proteine wurden mit einer Gene-Ontology-Analyse in ihre Funktionen bzw. Lokalisationen eingeordnet. Dafür wurde StringDB (<https://string-db.org/>) verwendet.

Die klinischen Parameter Prognose („gut“ versus „schlecht“), ICP ( $\leq 18$  mmHg versus  $>18$  mmHg), SSEP-Elektrophysiologie (unauffällig/ auffällig) und GOS wurden ebenfalls mit Hilfe eines t-Tests behandelt, analog zum Vergleich Kontrollen gegen sSHT-Patienten oben. Bei kleineren Fallzahlen (z.B. bei GOS aufgrund von unvollständigen Informationen), wurde die minimale Probenzahl pro Gruppe für den Test auf 3 heruntergesetzt.

Die Datenauswertungen bzw. Grafiken wurden mit der Software R (version 4.3.0, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) erstellt unter Nutzung der folgenden Pakete: openxlsx, limma, ggplot2, tidyverse, complexHeatmap, multcomp, nlme.

### 3.3 Abweichungen von den geplanten Arbeits-Zeitabläufen, Auswertungsmethodik/Statistik

#### 3.3.1 Zeitliche Verzögerung durch Corona Pandemie

Aufgrund der Corona-Pandemie ist eine erhebliche Zeitverzögerung bei der Patientenrekrutierung und Durchführung der Laboruntersuchungen im Proteom-Centrum aufgetreten (2020 bis 2022), wie in Abbildung 2 dargestellt. Daher wurden bis 31.12.2022 sSHT-Patienten rekrutiert. In Absprache mit dem Proteom-Center wurde die Rekrutierung der Kontrollpatienten im September 2022 beendet, da alle bisher eingeschlossenen Kontrollen einheitliche, hochqualitative Ergebnisse lieferten.

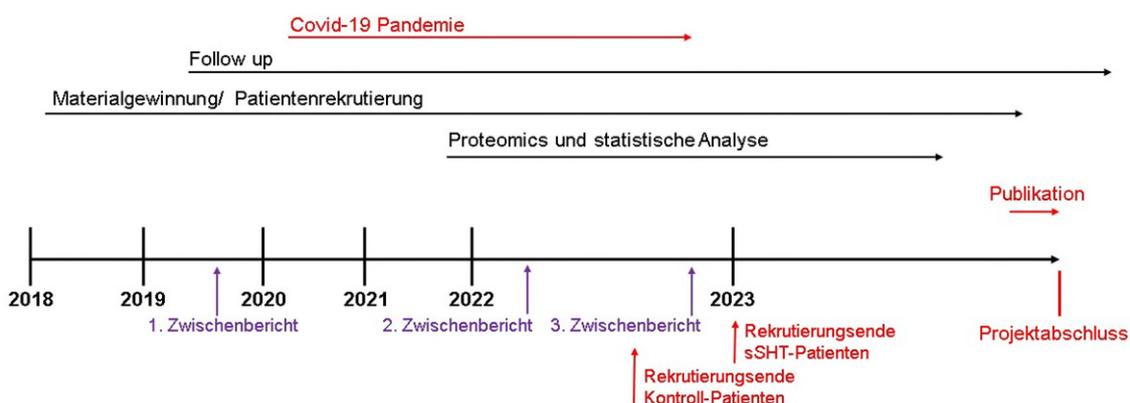


Abbildung 2: Tatsächlicher Zeitablauf der durchgeführten Arbeiten.

#### 3.3.2 Fehlendes Hirngewebe als Kontrollproben

Aufgrund von technischen Schwierigkeiten kam es zu keiner Übermittlung des Hirngewebes von Operationen bei Epilepsiepatienten aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie an der Technischen Universität Dresden.

### 3.3.3 Änderung der Strategie zur Validierung von Biomarker

Zur Verifizierung potentieller Markerproteine konnten keine zusätzlichen semiquantitativen Methoden wie Immunoassays und Western Blotting durchgeführt werden, da die Umsetzung dieser Analysen im Rahmen der Arbeiten aufgrund nicht vorhandener etablierter Ansätze für die im Rahmen dieser Studie identifizierten potentielle Markerproteine nicht realisierbar war. Speziell Immunoassay-basierte Analyse von nicht etablierten bzw. Standardmäßig genutzten Proteinen bedingt eine umfangreiche und kostenaufwendige Entwicklung. Zur Verifizierung/Validierung potentieller Markerproteine wurde daher ausschließlich die Methode der gezielten Massenspektrometrie-basierten Analyse (targeted Analyse) mittels Parallel Reaction Monitoring, kurz PRM genutzt, welche über eine höhere Aussagekraft als die o.g. semiquantitativen Methode verfügt. Somit hat der Evidenzgrad der vorliegenden Studie nicht an wissenschaftlicher Validität durch das gewählte Vorgehen eingebüßt.

Aufgrund der Verzögerung in der Patienten-Rekrutierung erfolgten die differenziellen Analysen ausschließlich unter Verwendung von Liquor- und Hirnproben. Die proteomische Analyse von Plasmaproben konnte in dem Zeitfenster nicht realisiert werden. Diese Proben stehen jedoch für weiterführende Analysen zur Verfügung.

### 3.4 Kooperationspartner und Zuordnung jeglicher Tätigkeit

**Univ.-Prof. Dr. med. T.A. Schildhauer** ist der Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik BG Bergmannsheil Bochum und stellte uns seine jahrelange Erfahrung in der chirurgischen Forschung zur Verfügung sowie die räumliche und personelle Unterstützung der unter seiner Leitung stehenden Abteilung für Chirurgische Forschung (s. unten).

**Prof. Dr. M. Köller** ist ehemaliger Leiter der Abteilung Chirurgische Forschung an der Universitätsklinik BG Bergmannsheil Bochum und weist jahrelange Erfahrung in Bezug auf die Verarbeitung von primärem Material (Blut, Gewebe und Liquor) auf, von dessen Expertise dieses Forschungsvorhaben stark profitiert hat.

**Univ.-Prof. Dr. med. M. Tegenthoff** (ehemaliger Direktor der Neurologischen Universitätsklinik BG Bergmannsheil Bochum) und **Prof. Dr. med. P. Schwenkkreis** (Oberarzt der Neurologischen Universitätsklinik BG Bergmannsheil Bochum, aktuell komm. Ko-Direktor der Klinik), übernahmen den Studienteil des neurologisch klinischen und elektrophysiologischen Monitorings der sSHT-Patienten und stellten die ermittelten Ergebnisse für die Korrelation mit potentiellen Biomarkern zur Verfügung. Beide weisen langjährige klinische und wissenschaftliche Erfahrung im Bereich der Neurotraumatologie auf.

**Univ.-Prof. Dr. med. V. Nicolas**, ehemaliger Direktor des Institutes für Radiologische Diagnostik, Interventionelle Radiologie und Nuklearmedizin der Universitätsklinik BG Bergmannsheil Bochum war zuständig für die bildgebenden Verfahren, die sowohl bei Aufnahme der Patienten als auch beim „follow-up“ erfolgten.

**PD Dr. med. U. Hamsen** aus der Universitätsklinik für Unfallchirurgie/ Orthopädie, Ko-Leiter der Chirurgischen Intensivstation der Universitätsklinik BG Bergmannsheil Bochum war für die Betreuung der Patienten auf der Intensivstation verantwortlich. Insbesondere war er für die

Datenerhebung der klinischen Routine-Analysen im Rahmen der im Zeitplan vorgesehenen Untersuchungen zuständig.

Von **Prof. Dr. K. Marcus** (Institutsdirektorin des MPC der Ruhr Universität Bochum) und **Dr. K. Barkovits-Boeddinghaus** (Gruppenleiterin der Arbeitsgruppe Medizinische Bioanalytik, MB, am MPC) wurden die globale sowie gerichtete Proteom-Analyse der Patienten- und Kontrollproben im Rahmen von Servicearbeiten durchgeführt und die Datensätze an die Arbeitsgruppe, Expressionanalyse der MB unter Leitung von **Prof. Dr. M. Eisenacher** zur Datenanalyse und Datenaufbereitung weitergeleitet. Folglich erfüllen diese Kooperations-Partner einen der wichtigsten Beiträge zum Gesamterfolg der Studie.

**Prof. Dr. med. H.-J. Meisel** (Direktor der Klinik für Neurochirurgie, BG Klinikum Bergmannstrost, Halle) und **Prof. Dr. med. M. Strowitzki** (Chefarzt der Abteilung für Neurochirurgie BG Unfallklinik Murnau) beteiligten sich mit **Dr. med. B. Pinteä** (Ltd. Oberarzt der Klinik für Neurochirurgie und Wirbelsäulenchirurgie der Universitätsklinik BG Bergmannsheil Bochum) an der Rekrutierung und Materialgewinnung von Patienten mit sSHT für diese Studie.

## 4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

### 4.1 Patientenrekrutierung und Probenentnahme

Insgesamt konnten 32 Patienten mit schweren Schädelhirntrauma und 18 Kontrollpatienten, bei denen Liquor entnommen wurde, in die vorliegende Studie eingeschlossen werden. Dabei konnten von den sSHT-Patienten 27 Liquorproben zu Zeitpunkt T0 (Aufnahme- und OP-Tag), 30 zu Zeitpunkt T3 (Tag 3 nach SHT) und 23 zu Zeitpunkt T6 (Tag 6 nach SHT) entnommen werden (Tabelle S1 im Anhang). Sechs Patienten mit schweren Schädelhirntrauma hatten einen schweren fatalen Verlauf (6/32, 18,75%), die restlichen Patienten einen positiven klinischen Verlauf.

Des Weiteren konnten von 19 sSHT-Patienten Hirnproben im Rahmen der erforderlichen Schädel-Operation zur Entfernung einer traumatischen Hirnblutung entnommen werden (Tabelle S1 im Anhang).

Von jedem Patienten wurden zudem Plasmaproben entnommen, die jedoch bislang nicht analysiert werden konnten (vergleiche auch Tabelle S1 im Anhang). Für den ersten Zeitpunkt konnte Plasma von 30 der 32 SHT-Patienten gewonnen werden, für den zweiten Zeitpunkt von allen 32 SHT-Patienten und zum letzten Zeitpunkt von 26 Patienten.

48 Patienten (30 SHT-Patienten, 18 Kontrollpatienten) vom BG Bergmannsheil Universitätsklinikum Bochum in der Klinik für Neurochirurgie und zwei Patienten aus der BG-Klinik Murnau Klinik für Neurochirurgie Klinik (Direktor: Prof. Dr. M. Strowitzki) wurden in die Studie eingeschlossen. Patienten aus der Klinik für Neurochirurgie, BG Klinik Halle Bergmannstrost (Direktor Prof. Dr. H.J. Meisel), wurden leider nicht eingeschlossen.

Die Daten der Patienten und Kontrollen wurden nach den Vorgaben des Studienprotokolls vollständig erfasst und anonymisiert protokolliert (Tabelle 1 und Tabelle 2).

**Tabelle 1:** sSHT-Patienten

Nummer	Einschlussdatum	Geschlecht	Alter	Blutungslokalisierung
1	04.12.2018	m	52	rechts frontal
2	06.03.2019	w	46	bifrontal
3	08.06.2019	m	37	bifrontal
4	21.06.2019	m	73	links frontal
5	29.06.2019	w	74	zerebellär
6	18.09.2019	m	49	rechts frontal
7	27.09.2019	m	76	links frontal
8	17.10.2019	m	62	links frontal
9	31.10.2019	m	60	bifrontal
10	09.11.2019	m	66	bifrontal
11	16.11.2019	m	66	subdural links
12	15.12.2019	m	33	links temporal
13	03.01.2020	w	82	subdural links
14	07.11.2020	w	83	bifrontal
15	12.08.2021	m	74	bifrontoparietal
16	16.09.2021	m	60	bifrontal
17	20.09.2021	m	77	rechts subdural
18	08.10.2021	m	53	links frontal
19	31.08.2020	m	65	links frontal
20	09.07.2021	w	81	links temporal
21	05.03.2022	m	47	links temporal
22	11.03.2022	m	55	rechts fronto-temporal
23	17.05.2022	m	74	fronto-temporo-parietal bds.
24	21.05.2022	m	67	bifrontal, biparietal, bitemporal
25	09.07.2022	w	32	rechts frontal
26	16.07.2022	m	36	fronto-temporo-parietal bds.
27	17.07.2022	m	63	links parietal
28	10.09.2022	w	77	rechts subdural
29	21.09.2022	m	65	fronto-parietal rechts
30	29.09.2022	m	31	fronto-parietal rechts ,intraventrikulär
31	15.10.2022	m	75	links subdural
32	10.11.2022	m	36	links parietal

**Tabelle 2:** Kontrollpatienten

Nummer	Einschlussdatum	Geschlecht	Alter	Diagnose
1	02.08.2019	w	80	Normaldruckhydrocephalus
2	16.08.2019	m	76	Normaldruckhydrocephalus
3	05.09.2019	m	51	Hydrocephalus/Liquoristel
4	18.10.2019	w	63	Verschlusshydrocephalus
5	24.12.2019	w	27	Hydrocephalus
6	06.01.2020	m	82	Normaldruckhydrocephalus
7	20.01.2020	w	82	Normaldruckhydrocephalus
8	21.01.2020	m	76	Normaldruckhydrocephalus

9	04.02.2020	m	81	Normaldruckhydrocephalus
10	11.05.2020	m	66	Normaldruckhydrocephalus
11	14.05.2020	m	76	Normaldruckhydrocephalus
12	15.05.2020	w	79	Hydrocephalus/Liquorfistel
13	03.06.2020	m	82	Diagnostische Myelographie
14	09.06.2020	m	85	Normaldruckhydrocephalus
15	23.07.2020	w	69	Normaldruckhydrocephalus
16	27.10.2020	w	77	Normaldruckhydrocephalus
17	20.11.2020	w	56	Diagnostische Myelographie
18	21.04.2022	m	68	Normaldruckhydrocephalus

## 4.2 Klinische Parameter

Im Folgenden werden die in der BG Bergmannsheil Bochum erfassten klinischen Parameter beschrieben, die im Anschluss mittels statistischer Auswertung mit der Proteomanalyse korreliert wurden (ab Abschnitt 4.3). Zu den relevanten Parametern zählen der intrakranielle Druck (ICP) und der zerebrale Perfusionsdruck (CPP, s. 4.2.1), die elektrophysiologischen Untersuchungen (s. 4.2.2), das Auftreten von Sekundärschäden zur Einteilung in „gute“ und „schlechte“ Prognose (s. 4.2.3) sowie das späte Outcome (s. 4.2.4).

### 4.2.1 Intrakranieller Druck (ICP) und Zerebraler Perfusionsdruck (CPP)

Über die medizinisch indizierte ICP/EVD-Hirnmesssonde wurden während der ersten Woche nach Trauma oder bis zur Entfernung der Sonde innerhalb der ersten Woche täglich kontinuierlich monitoriert, der minimale zerebrale Perfusionsdruck (CPP min.) und der maximale intrakranielle Druck (ICP max.) wurden dokumentiert. Im allgemein gilt der Ausgleich  $CPP = MAP - ICP$ , wobei MAP der mittlere arterielle Druck ist, welche kontinuierlich bei gemonitorten Patienten mittels eines arteriellen Zugangs gemessen wird. Der CPP-Normbereich liegt dabei zwischen 60-80 mmHg. Für die nach der Proteomanalyse folgende statistische Auswertung wurden diese Werte in Gruppen eingeteilt:

1. Binäre Einteilung des **ICP in die Gruppen mit Werten >18 mmHg oder ≤18 mmHg**. ICP-Werte größer 18 mmHg > 20 Min. wurden als negativ für den Krankheitsverlauf angesehen.
2. Binäre Einteilung einer **Gesamtbewertung von ICP und CPP in auffällig und unauffällig**. In die Gruppe „auffällig“ konnten 7 Patienten eingeordnet und in die Gruppe „unauffällig“ 25 Patienten werden.

**Tabelle 3:** Einteilung der Hirndrücke für die statistische Auswertung

Nummer	ICP > 18 mmHg oder ≤ 18 mmHg			Gesamtbewertung ICP/CPP
	T0	T3	T6	
1	> 18	≤18	> 18	auffällig

Nummer	ICP > 18 mmHg oder ≤ 18 mmHg			Gesamtbewertung ICP/ CPP
	> 18	≤18	≤18	
2	> 18	≤18	≤18	auffällig
3	≤18	≤18	≤18	unauffällig
4	≤18	≤18	≤18	unauffällig
5	N/A	N/A	N/A	unauffällig
6	≤18	N/A	N/A	unauffällig
7	N/A (T2=5)	≤18	≤18	unauffällig
8	≤18	≤18	≤18	unauffällig
9	≤18	≤18	≤18	unauffällig
10	≤18		N/A	auffällig
11	≤18	≤18	≤18	unauffällig
12	≤18	≤18	N/A (T5=10)	unauffällig
13	≤18	> 18	N/A	unauffällig
14	≤18	≤18	N/A (T5=11)	unauffällig
15	≤18	≤18	≤18	unauffällig
16	> 18	≤18	≤18	unauffällig
17	≤18	≤18	≤18	unauffällig
18	≤18	≤18	≤18	unauffällig
19	≤18	≤18	≤18	unauffällig
20	≤18	> 18	> 18	auffällig
21	≤18	≤18	≤18	unauffällig
22	≤18	≤18	≤18	unauffällig
23	> 18	> 18	> 18	unauffällig
24	N/A	> 18	N/A	auffällig
25	> 18	> 18	≤18	auffällig
26	≤18	≤18	> 18	unauffällig
27	> 18	> 18	> 18	unauffällig
28	> 18	> 18	N/A	unauffällig
29	≤18	≤18	N/A	unauffällig
30	≤18	≤18	≤18	unauffällig
31	N/A	> 18	N/A	auffällig
32	≤18	≤18	N/A	unauffällig

Bei Zeitpunkten, bei denen N/A eingetragen ist, konnte kein Wert abgelesen werden. Ein Grund hierfür war z.B. ein medizinisch indiziertes Entfernen der ICP/EDV Sonde.

#### 4.2.2 Elektrophysiologie

Innerhalb der ersten Woche nach sSHT wurden bei den Patienten somatosensorisch evozierte Potentiale (SSEP) nach Stimulation des *Nervus medianus* und akustisch evozierte Potentiale (FAEP) gemessen. In Tabelle 4 ist die Gesamtbewertung der Potentiale dargestellt mit einer Einteilung in „unauffällig“ = 0 und „auffällig“ = 1. Diese binäre Einteilung wurde im Anschluss ebenfalls für die statistische Auswertung der Proteomanalyse genutzt. Bei Patienten, bei denen N/A eingetragen ist, konnten technisch bedingt keine EP abgeleitet werden.

**Tabelle 4:** Gesamtbewertung der evozierten Potentiale (SSEP und FAEP)

Nummer	Gesamtbewertung SSEP (0=unauffällig; 1=auffällig)	Gesamtbewertung FAEP (0=unauffällig; 1=auffällig)
1	1	1
2	0	1
3	1	1
4	0	1
5	0	0
6	N/A	N/A
7	1	1
8	1	1
9	1	0
10	1	1
11	0	0
12	0	0
13	1	0
14	0	1
15	N/A	N/A
16	0	N/A
17	0	N/A
18	0	1
19	1	0
20	N/A	N/A
21	0	0
22	1	0
23	N/A	N/A
24	N/A	N/A
25	N/A	N/A
26	N/A	N/A
27	N/A	N/A
28	0	1
29	0	1
30	1	N/A
31	N/A	N/A
32	N/A	N/A

#### 4.2.3 Sekundärhirnschäden und Einteilung „gute“ und „schlechte“ Prognose

Das Auftreten von Sekundärhirnschäden während des stationären Aufenthalts wurde benutzt, um die Patienten in die Gruppen „gute Prognose“ (kein Auftreten von Sekundärschäden) und „schlechte Prognose“ (Auftreten von Sekundärschäden) einzuteilen. Die Gruppe der „guten Prognose“ bestand aus 18 Patienten und die der „schlechten Prognose“ aus 14 Patienten. Zu den Sekundärschäden zählten: Hypoxie, Ischämie/ Hirninfarkt, und malignes Hirnödem. Die Einteilung erfolgte erneut binär in 0 = kein Sekundärschaden und 1 = Sekundärschaden, wie in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Auftreten von Sekundärschäden und Einteilung in gute und schlechte Prognose

Nummer	Sekundärer Hirnschaden (0=nein; 1=ja)	„Gute“ oder „schlechte“ Prognose
1	0	Gut
2	1	Schlecht
3	1	Schlecht
4	1	Schlecht
5	1	Schlecht
6	0	Gut
7	1	Schlecht
8	0	Gut
9	0	Gut
10	1	Schlecht
11	0	Gut
12	0	Gut
13	1	Gut
14	0	Gut
15	0	Gut
16	0	Gut
17	0	Gut
18	1	Schlecht
19	1	Schlecht
20	0	Schlecht
21	1	Gut
22	1	Schlecht
23	0	Gut
24	1	Schlecht
25	1	Schlecht
26	0	Gut
27	0	Gut
28	0	Gut
29	0	Gut
30	1	Schlecht
31	1	Schlecht
32	0	Gut

#### 4.2.4 Spätes Outcome 6 und 12 Monate nach SHT

Zur Einteilung des späten Patientenoutcomes in gutes und in schlechtes Outcome, wurden die Patienten nach 6 und 12 Monaten erneut im BG Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum vorstellig und durch eine körperliche und neurologische Untersuchung in verschiedene neurologische Scores unterteilt (mGOS, GOS, GCS, NIHSS, Barthel Index; Tabelle S2 im Anhang). Bisher liegen von 22 Patienten das vollständige Outcome für alle Zeitpunkte für den GOS-Score vor, bei 3 Patienten fehlt das Outcome nach 12 Monaten und bei 10 Patienten, fehlen beide Zeitpunkte (Stand:15.10.2023). Auf Grund der verlängerten Patientenrekrutierung bis 31.12.2022 konnte das 12-Monate-Outcome von 4 Patienten plangemäß erst in der zweiten Jahreshälfte dieses Jahrs ermittelt werden. Als eine Schwierigkeit erwies sich zudem die Erreichbarkeit der Patienten für die Follow-up Untersuchungen. Viele Patienten wurden initial über weite Strecken nach dem Trauma vom Unfallort entfernt per Hubschrauber

eingeliefert und dementsprechend auch im Anschluss heimatnah verlegt. Diese Patienten waren vor allem für die klinikgebundenen Untersuchungen schwer zu erreichen. Diese Patienten oder deren Caretaker werden weiterhin telefonisch kontaktiert.

Für eine vorläufige Einschätzung wurde dennoch das Outcome nach 6 Monaten, ermittelt über den GOS mit den Proteom-Analysedaten korreliert. Hierfür wurden die Patienten in „gutes“ und „schlechtes“ Outcome unterteilt. In Bezug auf den Glasgow Outcome Score (GOS) erfolgte die Gruppierung wie folgt: „gute Prognose“: GOS = 3-5 Punkte; „schlechte Prognose“: GOS = 1-2 Punkte, wie es zuvor schon von Tang et al. 2021 beschrieben. Mit dieser Einteilung erhalten wir zum derzeitigen Punkt 10 Patienten für die Gruppe „gute Prognose“ und 12 Patienten für die Gruppe „schlechte Prognose“.

#### **Literatur:**

Tang Z, Yang R, Zhang J, Huang Q, Zhou X, Wei W, Jiang Q. Outcomes of Traumatic Brain-Injured Patients with Glasgow Coma Scale < 5 and Bilateral Dilated Pupils Undergoing Decompressive Craniectomy. *Front Neurol.* 2021 May 25;12: 656369.

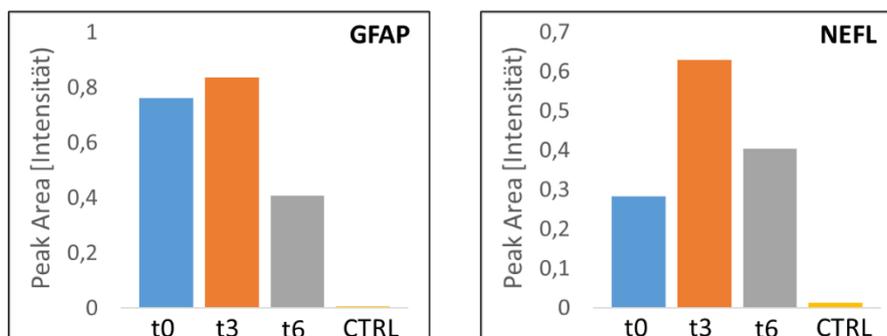
### **4.3 Ergebnisse des MPC**

Im Rahmen unseres SHT-Projektes wurden in einer Vorstudie differentielle Proteine im CSF identifiziert, die für eine anschließende Validierungsstudie in die Etablierung eines zielgerichteten, Massenspektrometrie-basierten Messverfahrens (PRM, Parallel Reaction Monitoring) eingeschlossen wurden. Aus analytischer Sicht erfordert die Durchführung von PRM-Analysen die Bewertung der massenspektrometrischen Methode, was die Auswahl geeigneter Peptide pro Proteinkandidat und deren Bewertung im Hinblick auf eine empfindliche und reproduzierbare Detektion beinhaltet. Die etablierte PRM-Methode wurde zur Validierung ausgewählter Protein-Kandidaten in Liquor-Proben einer Teil-Patientenpopulation verwendet. Parallel zur gezielten Validierung potentieller Markerproteine wurden final alle gesammelten Patientenproben für eine globale quantitative Proteomanalyse eingeschlossen. Dieser unabhängige Datensatz ermöglichte aufgrund der größeren Fallzahl zum einen die Evaluierung der in der Vorstudie identifizierten potentiellen Markerproteine und zum anderen die Identifizierung von potentiellen Markerproteinen mit einer höheren statistischen Wertigkeit.

#### **4.3.1 Validierungsstudie (Parallel-Reaktion-Monitoring, PRM)**

Zu den ausgewählten Proteinen für die Validierung mittels Parallel-Reaktion-Monitoring gehörten sowohl bekannt Trauma-assoziierte Proteine als auch Proteine, die in der CSF-Vorstudie identifiziert wurden. Die anfängliche Datenanalyse konzentrierte sich auf die Bewertung der Qualität und den Nachweis des Prinzips für die ausgewählten Proteine. Es zeigte sich, dass die empfindliche und spezifische Analyse mit gezielter Massenspektrometrie die Datenvollständigkeit für fast alle ausgewählten Proteine auf 100 % erhöhte. Für bekannte Marker konnten die im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zur Kontrollgruppe identifizierten differentiellen Unterschiede im Rahmen der Validierungsstudie bestätigt werden, wie z.B. für die Proteine GFAP und Neurofilament light-Protein. Die Abundanz dieser Proteine war bei den Patienten mit sSHT signifikant erhöht (Abbildung 3). Zudem zeigten die Ergebnisse, dass für

GFAP bereits zu t0 eine deutlich erhöhte Abundanz im CSF nachgewiesen werden kann. Für das Neurofilament light Protein stieg die Abundanz deutlich von t0 zu t3. Die Abundanz beider Proteine nahm zu t6 bereits ab, jedoch war sie im Vergleich zur Kontrollgruppe weiterhin stark erhöht. Dieser Proteomics Verlauf ist für diese beiden Proteine in Bezug zu sSHT bereits bekannt und veröffentlicht und bestätigt somit die Validität der in der vorliegenden Studie durchgeführten Proteomanalysen.



**Abbildung 3:** Zeit-bezogene gezielte proteomische Profile von GFAP und NEFL. Dargestellt sind die quantitativen Häufigkeiten von GFAP und NEFL im Verhältnis zu den Zeitpunkten t0, t3 und t6 und zusätzlich zu den gesunden Kontrollen (CTRL).

Zusätzlich zu den bekannten Markerproteinen zeigten sich in der Verifizierungsstudie Biomarker, die eine potentielle Aussage über die Prognose machen können, wie das Protein ALDOA und verschiedene Tubuline, jedoch ohne eindeutige statistische Signifikanz.

#### 4.3.2 Vergleich zu Kontrollen und Zeitverlauf

Zunächst wurde die Kontrollgruppe jeweils mit den sSHT-Patienten zu den drei verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Tabelle 6 zeigt die Anzahl hoch- und herunterregulierter Proteine im Vergleich zur Kontrollgruppe, sowie die Ergebnisse einer on/off-Analyse.

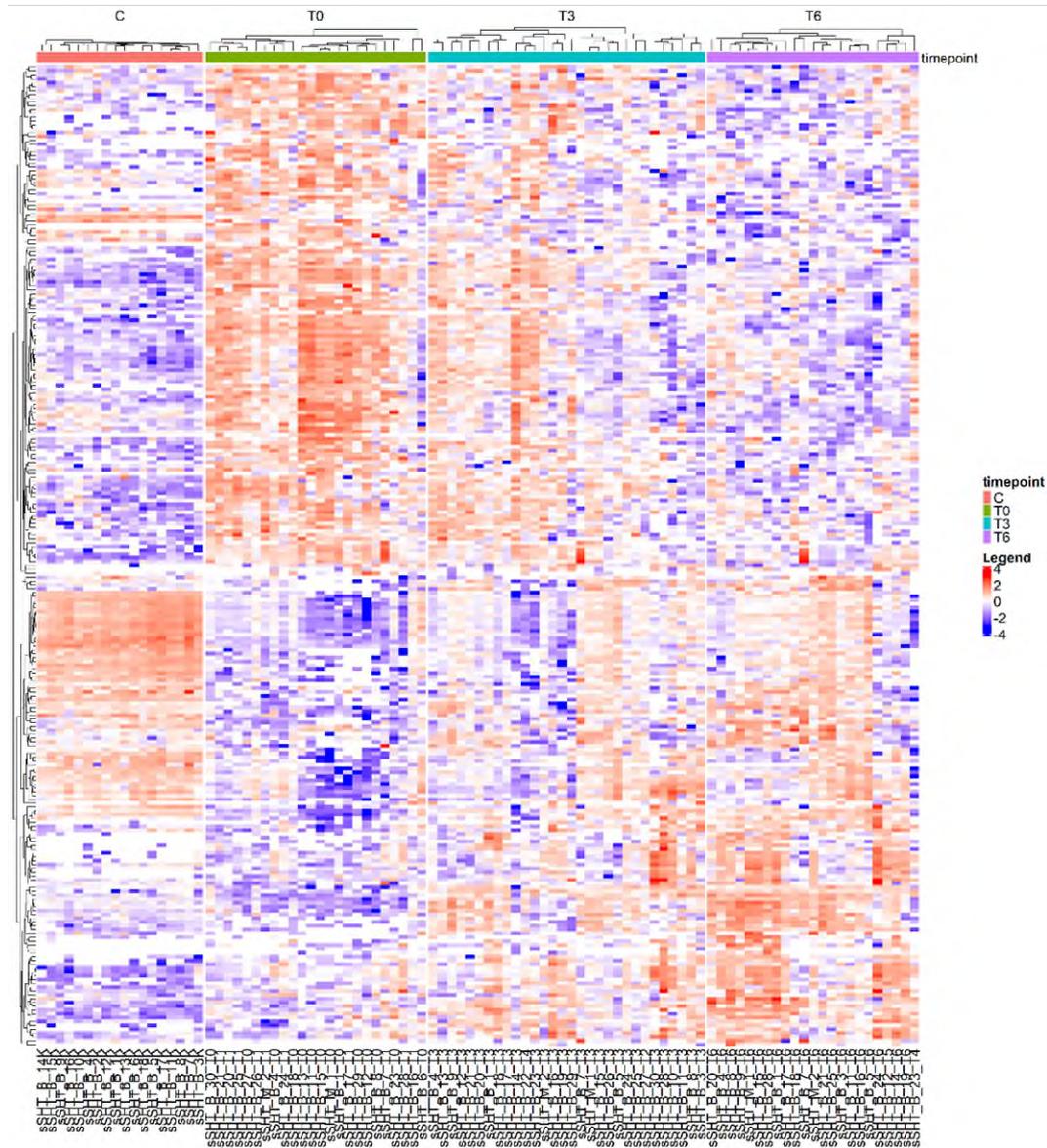
**Tabelle 6:** Ergebnisse der differentiellen Proteomanalyse beim Vergleich von Kontrollen gegen sSHT-Patienten

	Kontrolle vs. T0	Kontrolle vs. T3	Kontrolle vs. T6
Signifikant hochreguliert	174	158	137
Signifikant herunterreguliert	135	130	104
On	57	77	94
Off	72	17	15
Gesamt	438	382	350

In Abbildung 4 ist beispielhaft der Volcano Plot und die Heatmap zum Vergleich zwischen T0 und Kontrolle zu sehen. Es ist zu erkennen, dass das schwere Schädel-Hirn-Trauma einen großen Einfluss auf die Protein-Zusammensetzung des CSF hat.



Gehirn über 1500 Proteine enthält, die nicht im CSF gefunden wurden. Des Weiteren gibt es zusammengerechnet 147 Proteine, die im CSF der sSHT-Patienten und im Gehirn, aber nicht im CSF der Kontrollgruppe gefunden wurden. Dies unterstützt die Vermutung, dass Hirngewebe-Proteine durch die Hirnparenchym-Verletzung ins CSF/ Ventrikelsystem gelangen.

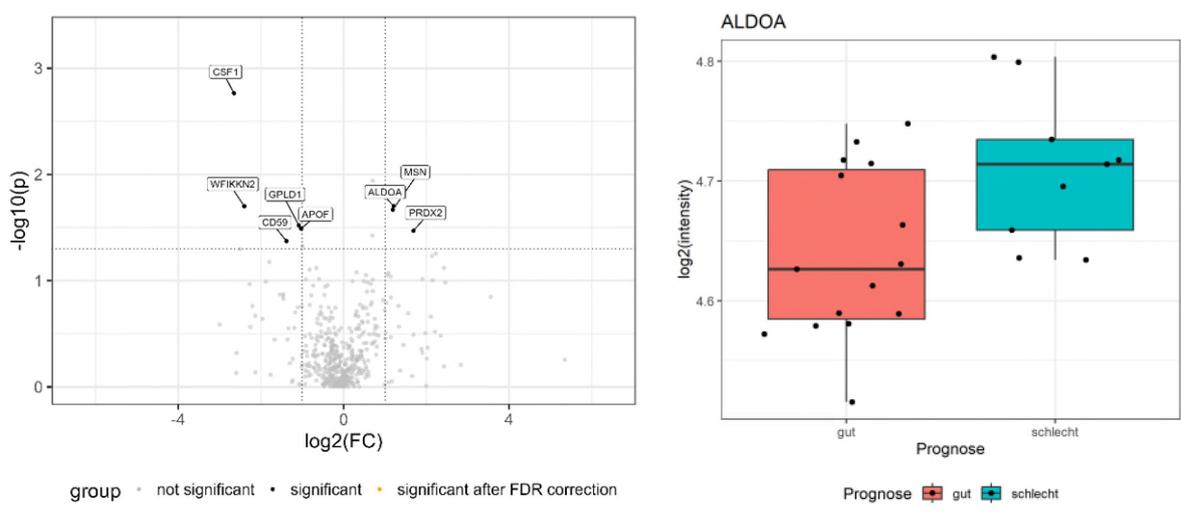


**Abbildung 6:** Heatmap der signifikant veränderten Proteine über die drei Zeitpunkte T0, T3 und T6

Darüber hinaus wurde der zeitliche Verlauf der Proteom-Veränderungen mithilfe einer ANOVA untersucht (Vergleich zwischen T0, T3 und T6). Die 265 sich signifikant verändernden Proteine sind in der Heatmap in Abbildung 5 zu sehen. Dabei sind zwei Typen von Proteinen zu erkennen, die, die mit der Zeit abnehmen (oben) und die, die mit der Zeit zunehmen (unten). Insbesondere zum Zeitpunkt T3 wird die Heterogenität zwischen den sSHT-Patienten deutlich.

### 4.3.3 Zusammenhang mit Prognose, ICP-Werte und SSEP- Ergebnissen

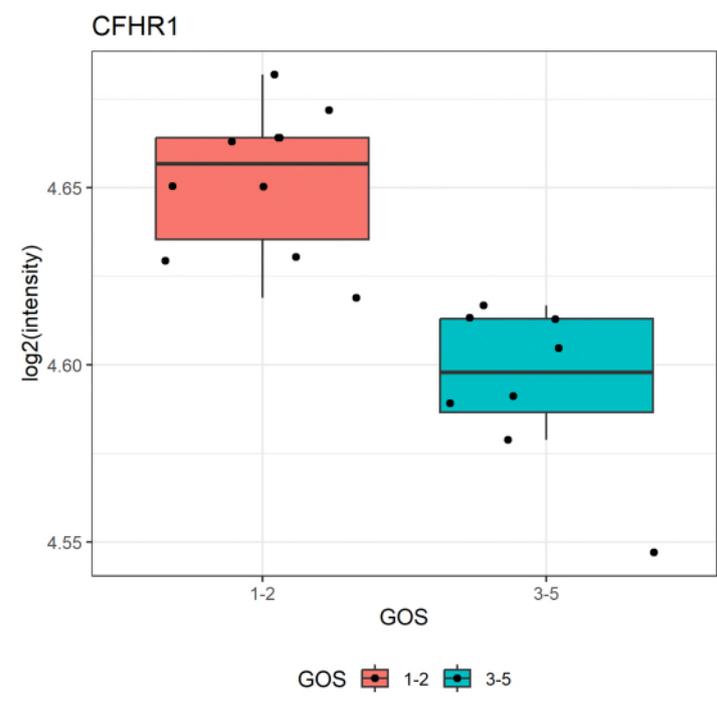
Zu jedem der drei Zeitpunkte (T0, T3 und T6) wurde mit Hilfe von t-Tests nach potenziellen Biomarkern für eine schlechte Prognose der Patienten gesucht. Dabei wurde zunächst die Definition von „schlechter Prognose“ aus Tabelle 5 verwendet. Nach der p-Wert-Korrektur war kein Protein signifikant unterschiedlich, was auf die hohe Variabilität unter den sSHT-Patienten sowie die geringe Fallzahl zurückzuführen ist. Im Vergleich zur CSF-Vorstudie konnten lediglich ALDOA zu Zeitpunkt T0 als signifikant vor der Korrektur bestätigt werden (Abbildung 6).



**Abbildung 7:** Links: Volcano-Plot für den Vergleich von guter und schlechter Prognose zum Zeitpunkt T0. Rechts: Boxplots des Proteins ALDOA im Zusammenhang mit der Prognose an Zeitpunkt T0.

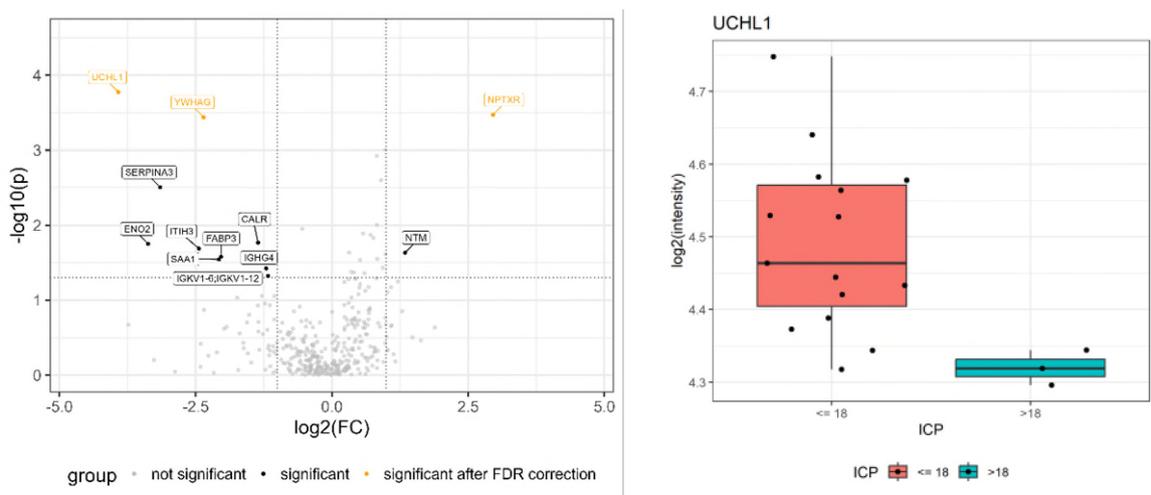
Um die Proteine mit der Langzeitprognose der Patienten in Verbindung zu bringen, wurde ein T-test zwischen den Patienten mit einem niedrigen GOS (1-2 GOS-Punkte, d.h. schlechte Prognose) mit einem hohen GOS (3-5 GOS-Punkte, d.h. gute Prognose) nach 6 Monaten durchgeführt. Zu Zeitpunkt T3 wurde mit CFHR1 ein potenzieller Marker identifiziert ( $p.fdr = 0.02$ ), der mit einem Fold Change von 0.503 knapp oberhalb der Grenze liegt. Dabei ist eine höhere Proteinintensität mit einer schlechteren langfristigen Prognose assoziiert (Abbildung 7).

Die Studie von Shultz et al. 2022 untersuchte eine ähnliche Fragestellung. Wie in Kapitel 5.3 erklärt, ergeben sich dort 7 Proteine, die mit dem GOSE assoziiert sind. In unserer Studie konnten zum Zeitpunkt T3 drei dieser Marker mit p-Werten um die 0.05 (ohne Adjustierung) mit relativ hohen Fold-Changes gefunden werden: GM2A T3  $p = 0.056$ ,  $p.fdr = 0.4$ ,  $FC = 2.4$ ; CLSTN1 T3  $p = 0.04$ ,  $p.fdr = 0.37$ ,  $FC = 1.9$ ; NPTX1 T3:  $p = 0.052$ ,  $p.fdr = 0.4$ ,  $FC = 1.9$ . Dies lässt vermuten, dass diese Marker sich auch in unserer Studie mit erhöhter Fallzahl nach Vervollständigung der 6 Monats-Follow-up gegebenenfalls nachweisen lassen.



**Abbildung 8:** Boxplot des CFHR1 Proteins im Zusammenhang mit dem GOS zu Zeitpunkt T3

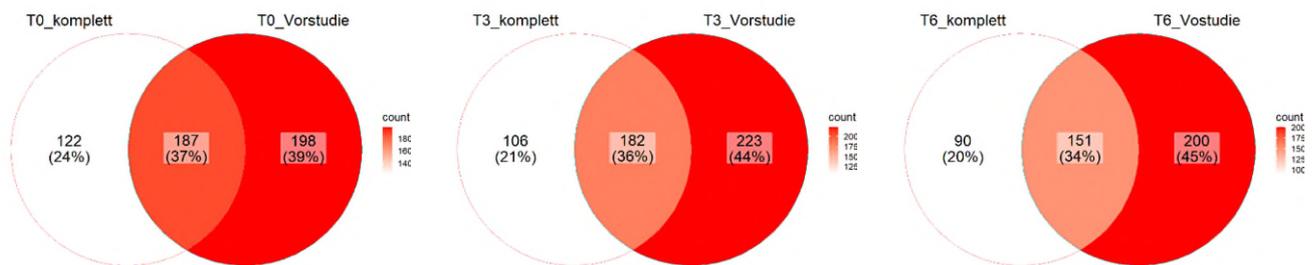
Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen den Proteinen und dem ICP und SSEP/FAEP untersucht. Dabei wurde der ICP/ CPP und der EP in unauffällig/auffällig, sowie der ICP in  $\leq 18$  mmHg und über 18 mmHg eingeteilt (siehe Tabelle 3 und 4). Es ergaben sich auch hier keine signifikanten Proteine nach der p-Wert-Adjustierung, außer zu Zeitpunkt T6 beim Vergleich von ICP  $\leq 18$  mmHg gegen ICP  $>18$  mmHg, bei dem die Proteine UCHL1, YWHAG und NPTXR signifikant reguliert waren (Abbildung 9). In Abbildung 9 rechts sind beispielhaft die Boxplots des Proteins UCHL1 dargestellt, dessen Intensität und Häufigkeit des Vorkommens in Patienten mit einem hohen ICP stark reduziert sind.



**Abbildung 9:** Links: Volcano-Plot für den Vergleich von ICP  $\leq 18$  mmHg und ICP  $>18$  mmHg zum Zeitpunkt T6. Rechts: Boxplots des Proteins UCHL1 im Zusammenhang mit ICP an Zeitpunkt T6.

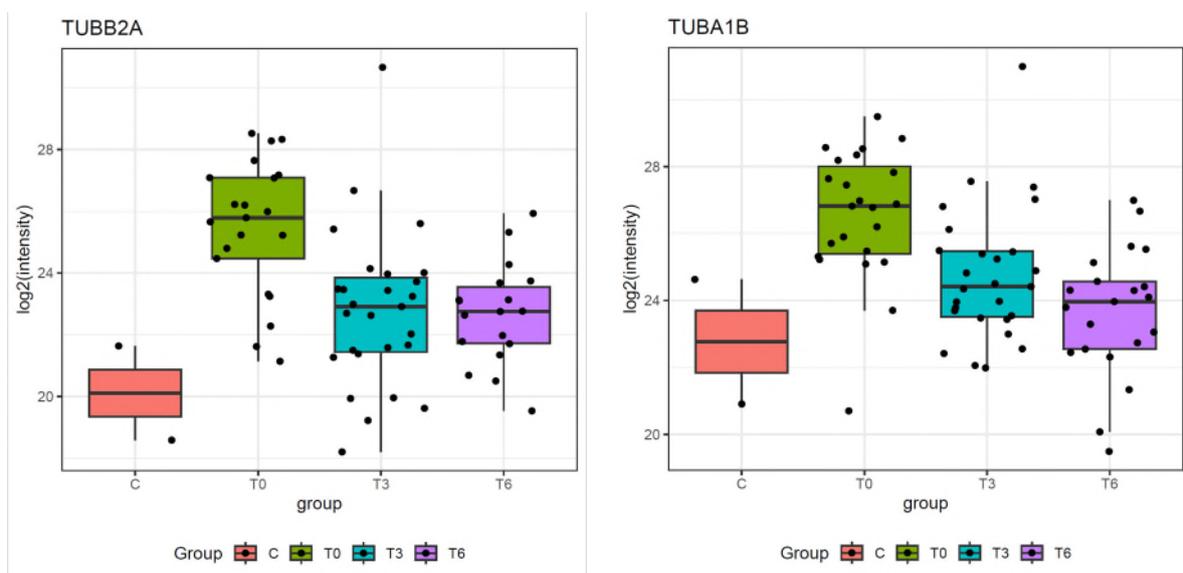
### 4.3.4 Vergleich mit Vorstudie (Discovery 1)

In der CSF Vorstudie als auch der nachfolgenden Komplettestudie wurden die Kontrollproben gegen Proben von Patienten mit sSHT zu den verschiedenen Zeitpunkten T0, T3 und T6 verglichen (siehe Abschnitt 4.3.2). In Abbildung 10 ist jeweils der Vergleich der signifikanten Proteine zwischen der Vorstudie und der Komplettestudie zu sehen. Es lässt sich erkennen, dass je nach Zeitpunkt zwischen 151 und 187 in beiden Studien signifikant waren. Dies kann einen Hinweis auf die Zuverlässigkeit der gefundenen Marker geben, da sie sich in der größeren Studie bestätigt haben.



**Abbildung 10:** Venn-Diagramme für den Vergleich der Vorstudie zur Komplettestudie. Gezeigt sind pro Zeitpunkt jeweils die signifikanten Proteine der sSHT-Proben zu den Kontrollproben.

In der Vorstudie wurden außerdem 38 Proteine identifiziert, die sich signifikant über die 3 Zeitpunkte in ihrer Intensität verändert haben und gleichzeitig in weniger als 2 Kontrollproben vorkamen. Von diesen 38 Proteinen konnten bei 15 die entsprechenden zeitlichen Veränderungen in der Komplettestudie bestätigt werden. Darunter sind auch die Tubuline TUBA1B und TUBB2A, deren Intensität an T0 im Vergleich zu den Kontrollen stark erhöht war und mit der Zeit abnahm. Diese sind demnach frühe Marker für eine Schädigung des Gehirns.



**Abbildung 11:** Boxplots der Tubuline TUBB2A und TUBA1B

## Literatur:

Shultz, S.R., Shah, A.D., Huang, C. *et al.* Temporal proteomics of human cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* **19**, 291 (2022).

## 5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

### 5.1 Proteomveränderungen in humanen Hirnproben

Über humane Hirnproben nach Schädelhirntraumata sind drei Arbeiten (Cherry et al. 2018 und Hamdeh et al. 2018, Xu et al. 2016) und eine Review-Arbeit (Sowers et al. 2018) bisher erschienen. Die erste Arbeit von Cherry et al. 2018 beschreibt Proteinveränderungen an *postmortem* Hirngewebe von Patienten mit wiederholten Traumata am Schädel. Die zweite Arbeit von Hamdeh et al. 2018 untersucht nicht traumatisiertes Hirngewebe nach Schädelhirntrauma.

Die Arbeit von Cherry et al. 2018 beschreibt eine Häufung von sog. „detergent- insolublen“ Proteinen, die ähnlich wie bei der Alzheimer Erkrankung vermehrt auftreten. Am auffälligsten war die Häufung von sog. NQO1 Protein, ein Protein, welches beim oxidativen Stress der Zellen eine Rolle spielt.

Die Arbeit von Hamdeh et al. 2018 ist vor allem auf Grund der sehr reduzierten Patientenzahl nicht eindeutig; diese suggeriert jedoch eine molekulare Heterogenität zwischen den verschiedenen Subtypen eines Schädelhirntraumas.

Xu et al. 2016 untersuchten post-sSHT-Hirngewebe von 12 Patienten über Tandem-Massenspektrometrie und verglichen das Proteom mit dem von 8 post-mortem Hirnproben gesunder Patienten aus einer Biobank. Sie konnten zeigen, dass bei sSHT Proben im Vergleich zu Kontrollen insgesamt 165 Proteine signifikant differentiell reguliert waren, darunter 160 Proteine hochreguliert und 5 runterreguliert. Assoziierte Mechanismen waren vor allem Gliazell-Differenzierung (myelin basic protein, myelin-associated glycoprotein, etc.), Komplementaktivierung (complement C3, complement C7, complement C9, etc.) und Apolipoprotein-Katalyse im Striatin-Pathway (APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC2 und APOC3). Limitiert wird diese Studie durch eine geringe Patienten- und Kontrollzahl und dadurch, dass die Kontrollen nicht an das Geschlecht der Patientenproben angepasst werden konnten. Zudem ist unklar, aus welcher Hirnregion die Proben stammten, da es auch hier zu signifikanten Abweichungen kommen kann.

Aus diesen Arbeiten konnte geschlossen werden, dass bei der Verarbeitung und Auswertung der Gewebeproben mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen werden sollen, die durch sog. „detergent- insoluble“ Proteine entstehen, sowie dass für signifikante Befunde eine Population von mehr als 10 Patienten nach Schädelhirntrauma und von mehr als 10 Vergleichspatienten notwendig ist.

## Literatur:

Sowers JL, Wu P, Zhang K, DeWitt DS, Prough DS Proteomic changes in traumatic brain injury: experimental approaches *Curr Opin Neurol* 2018, 31:709-717

Cherry JD, Zeineddin A, Dammer EB, et al. Characterization of detergent insoluble proteome in chronic traumatic encephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018:40-49

Hamdeh SA, Shevchenko G, Mi J, Musunuri S. Proteomic differences between focal and diffuse traumatic brain injury in human brain tissue. *Sci Rep* 2018; 8:6807.

## 5.2 Proteomveränderungen im CSF und Blut

Obwohl in den letzten Jahren in vielfältiger Weise über die proteomischen Veränderungen im CSF, sowie Serum und Plasma nach SHT geforscht wurde, ist es bislang nicht gelungen, diagnostische und prognostische Marker in der Klinik zu etablieren. Bei einer Vielzahl dieser Studien ist die Aussagekraft durch die geringe Patientenzahl oder eine hohe Heterogenität in den angewandten Methoden reduziert. Des Weiteren erscheinen viele Untersuchungen auf die hier dargestellte Frage irrelevant, da diese überwiegend in Patienten mit mildem SHT durchgeführt wurden.

Zu den relevanteren Untersuchungen zählt unter anderem die Arbeit von Thelin et al. 2019, die 6 häufig untersuchte Biomarker im Serum von überwiegend schweren SHT-Patienten zu 3 Zeitpunkten nach dem Unfall untersucht haben. Sie konnten zeigen, dass akut erhöhte Serumlevel der Biomarker S100B, UCH-L1, GFAP und tau die Prognosen für das Outcome nach 12 Monaten verbessert, ebenso wie das NfL-Level die Mortalität. Die Hauptaussage dieser Arbeit ist, dass die Kombination von Biomarkern verschiedenen zellulären Ursprungs die Aussagekraft bestehender Prognose-Modelle verbessert.

Des Weiteren hat die Arbeit von Lindblad et al. 2021 den Zusammenhang von Veränderungen des CSF-Proteoms und dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke bezogen auf das langfristige Outcome untersucht. Hier wurde festgestellt, dass neuroinflammatorische Prozesse, gemessen an 40 überwiegend ZNS-spezifischen Proteinen, direkt auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke schließen lassen, und, dass beide Faktoren als unabhängige Marker eine ~10 % zusätzliche Varianz zu von den Autoren erstellten statistischen Prognose-Tabellen addieren.

Ein weiterer Mechanismus, der beim SHT auftritt, ist die Apoptose. Jiang et al. 2020 haben in ihrer Studie gezeigt, dass im CSF von sSHT-Patienten die apoptotischen Marker sFAS, Cytochrom-C, Caspase-3, sowie Caspase-9 erhöht sind und eventuell mit dem steigenden ICP korrelieren. Sie beschreiben, dass besonders Caspase-3 und ICP, vor allem gesamt betrachtet, als prognostische Marker für das Outcome nach 6 Monaten dienen können.

Aus den genannten sowie ähnlichen Studien lässt sich schließen, dass die proteomischen Veränderungen nach einem schweren SHT sehr komplex sind und einzelne Faktoren nicht als prognostische und diagnostische Marker genutzt werden können. Des Weiteren wird deutlich, dass die Aufdeckung von Korrelationen zu bereits bestehenden Diagnoseverfahren (ICP-,

CPP-, ptiO<sub>2</sub>-Messungen) essenziell ist, um die klinisch anwendbare Verbesserung der Prognose zu erreichen.

Seit unserem letzten Studienbericht wurden weitere Studien zu Biomarkern nach SHT veröffentlicht. Unter anderem untersuchten Halbgebauer et al. 2022 die kombinierte Nutzung der bekannten Marker GFAP, NfL, sowie dem neuen präsynaptischen Protein beta-Synuclein in Patienten mit Polytraumata. Dabei fand er, dass eine Kombination von initialen Plasma GFAP und beta-Synuclein Konzentrationen zwischen Traumapatienten mit SHT und solchen ohne SHT unterscheiden kann. Aussagen bezüglich des Outcomes wurden hier nur im Vergleich von generellem Trauma (mit und ohne SHT) und Kontrollen getroffen und bedürfen weiterer Untersuchung. Trotz der geringen Patientenzahl kann aus dieser Studie die Wichtigkeit eines kombinatorischen Einsatzes von Biomarkern geschlossen werden. In diesem Zusammenhang wurde von Wilde et al. 2022 ein Review veröffentlicht, das die aktuellen Biomarker zusammenfasst und neben „Biofluid“ Biomarkern (CSF, Blut) auch digitale, neurophysiologische und neuroimaging Biomarker miteinbezieht. Anhand dieser Arbeit wird deutlich, dass Kombinationen verschiedener Arten von Biomarkern in Zukunft einen essentiellen Beitrag in der SHT-Forschung liefern werden, um die komplexe Pathophysiologie nach SHT aufzudecken. Des Weiterhin wird deutlich, dass es weiterhin an zuverlässigen prognostischen Markern mangelt. Anhand dieser Arbeiten kann die Relevanz der hier vorliegenden Studie geschlossen werden.

Des Weiteren zeigten Santacruz et al. 2022 proteomische Veränderung im CSF bei Patienten mit akuten Hirnschaden, der sowohl aus SHT als auch nicht-traumatischen Schädigungen besteht. Unter 96 veränderten Proteinen zwischen traumatischem und nicht-traumatischem Hirnschaden zeigten sich Complement component C8 gamma chain (Membran-Attacke-Komplex) und Apolipoprotein B signifikant erhöht. Außerdem korrelierten 39 Proteine signifikant mit einem ICP  $\geq$  30 mmHg.

#### **Literatur:**

Jiang W, Jin P, Wei W, Jiang Wei Apoptosis cerebrospinal fluid as outcome predictors in severe traumatic brain injury: An observational study. *Medicine*. 2020; 99:26 (e20922).

Lindblad C, Pin E, Just D, Al-Nimer F, Nilsson P, Bellander BM, Svensson M, Piehl F, Thelin EP Fluid proteomics of CSF and serum reveal important neuroinflammatory proteins in blood-brain barrier disruption and outcome prediction following severe traumatic brain injury: a prospective, observational study. *CritCare*. 2021; 25:103.

Thelin EP, Al-Nimer F, Frostell A, Zetterberg H, Blennow K, Nystrom H, Svensson M, Bellander BM, Piehl F, Nelson DW A serum protein biomarker panel improves outcome prediction in human traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2019; 36:2850-62.

Halbgebauer R, Halbgebauer S, Oeckl P, Steinacker P, Weihe E, Schafer MK, Roselli F, Gebhard F, Huber-Lang M, Otto M. Neurochemical Monitoring of Traumatic Brain Injury by the Combined Analysis of Plasma Beta-Synuclein, NfL, and GFAP in Polytraumatized Patients. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 25;23(17):9639

Wilde EA, Wanner IB, Kenney K, Gill J, Stone JR, Disner S, Schnakers C, Meyer R, Prager EM, Haas M, Jeromin A. A Framework to Advance Biomarker Development in the Diagnosis, Outcome Prediction, and Treatment of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2022 Apr;39(7-8):436-457.

Santacruz, C.A., Vincent, J.L., Duitama, J. et al. The Cerebrospinal Fluid Proteomic Response to Traumatic and Nontraumatic Acute Brain Injury: A Prospective Study. *Neurocrit Care* 37, 463–470 (2022).

### 5.3 Massenspektrometrische Untersuchungen des Proteoms nach sSHT

Im September 2022 wurde eine Review-Arbeit (Creech et al. 2022) veröffentlicht, die den derzeitigen Stand der massenspektrometrischen Untersuchungen zur Entdeckung von Biomarkern nach Schädel-Hirn-Trauma beschreibt. Anhand dieser Arbeit wird deutlich, dass obwohl die Anwendung von Massenspektrometrie in der SHT-Forschung noch in ihren Anfängen steckt, diese eine verbesserte Methode zur Entdeckung und Validierung von Biomarkern im Vergleich zu herkömmlichen Immunassays darstellt. Neben den globalen Messungen können targeted Proteomanalysen ergänzend fungieren und quantitative Ergebnisse liefern, vor allem, wenn keine antikörper-spezifischen Methoden zur Verfügung stehen.

Dieses Review bezieht unter anderem die zuvor genannte Studie von Hamdeh et al. 2018 mit ein und hebt hervor, dass bei massenspektrometrischen Untersuchungen die meisten Probenarten (Gehirn, Plasma, Serum, CSF) genutzt werden können und so eine verbesserte Darstellung des Krankheitsbildes gewährleistet werden kann.

Des Weiteren wurde im November 2022 von Shultz et al. eine retrospektive Studie veröffentlicht, die massenspektrometrisch das CSF nach sSHT von 16 Patienten innerhalb der ersten 10 Tage nach SHT untersuchten. Hier zeigte sich eine starke Abweichung des Proteoms der sSHT-Patienten im Vergleich zu Kontroll-Patienten (n = 11), mit 1083 differentiell regulierten Proteinen. Die am stärksten hochregulierten Proteinen konnten Prozessen der Neutrophilen- Aktivierung, -Rekrutierung, und –Degranulation zugeordnet werden, während den runterregulierten Proteinen eine Funktion in der Entwicklung des Nervensystems zuzuschreiben ist. Zudem konnte hier eine Korrelation von 7 differentiell regulierten Proteinen (Ganglioside GM2 activator (GM2A), Calyntenin-1, FAT Atypical Cadherin 2 (FAT2), Glucosidase II Alpha Subunit (GANAB), Lumican (LUM), neuronal pentraxin-1 (NPTX1), Secreted Frizzled Related Protein 2 (SFRP2)) zu schlechtem Outcome (genutzter Score war hier GOSE) nach 6 Monaten beschrieben werden. Aufgrund der geringen Patientenzahl und fehlender Werte ist die statistische Aussagekraft jedoch gering und Bedarf weiterer Analysen.

#### Literatur:

Creech, M., Carvalho, L., McCoy, H. et al. Mass Spectrometry-Based Approaches for Clinical Biomarker Discovery in Traumatic Brain Injury. *Curr Treat Options Neurol* 24, 605–618 (2022).

Shultz, S.R., Shah, A.D., Huang, C. et al. Temporal proteomics of human cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 19, 291 (2022).

## 6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

In der hier vorgestellten Studie wurde Liquor von sSHT-Patienten aus der ersten Woche zu drei Zeitpunkten (T0, T3 und T6 nach Trauma) nach Trauma massenspektrometrisch und zunächst Hypothesen-frei untersucht. Es konnte in Bezug auf vorausgegangene Studien bestätigt werden, dass signifikante Unterschiede des Proteoms von sSHT-Patienten zu Kontrollpatienten zu allen drei Zeitpunkten innerhalb nach Trauma vorliegen (Shultz et al. 2021).

Über eine GO-Analyse konnten wir zeigen, dass Prozesse der Stress- und Verletzungsantwort sowie der Komplementaktivierung und der Blutgerinnung zu T0 im Vergleich zu Kontrollen hochreguliert waren, was auf die initiale Verletzung hindeutet. Im weiteren Verlauf zu T3 und T6 waren vor allem noch Prozesse der Immunantwort (Komplementaktivierung und Leukozyten) hochreguliert. Wie zuvor in zahlreichen Studien beschrieben, bestätigt dies die verheerende Überregulation der Neuroinflammation nach einem Trauma (Review-Arbeit von Xiong et al. 2018).

In Bezug auf die Verletzung des Gehirns konnten wir zudem mittels On/Off- Analyse nachweisen, dass vor allem Tubulin-Ketten in sSHT-Liquorproben auftreten, was auf eine Beschädigung der Neuronenaxone hindeutet. Zudem müssen diese Proteine aus dem Hirngewebe über die Beschädigung in den Liquor gelangen. Dies wird durch unseren Befund unterstützt, dass es Überschneidungen zwischen dem Proteom aus den Hirnproben und dem Patienten-Liquor gab, die in keiner der Kontroll-Liquorproben gefunden wurden (Tubuline TUBB2A und TUBA1B)

Die Stärke unserer Studie liegt vor allem zusätzlich darin, dass zahlreiche klinische Parameter (wie frühes- und spätes Outcome, ICP, CPP, SSEP) in verschiedenen Patienten-Gruppen in Bezug auf die Proteomveränderungen untersucht wurden, um so neue Korrelationen aufzudecken und das Verständnis über das sSHT zu verbessern. Wie folgend beschrieben, konnten Korrelationen zu dem ICP-Wert bei einer Einteilung in Werte  $\leq 18$  mmHg und  $> 18$  mmHg und dem späten Outcome nach 6 Monaten mittels Einteilung in „gut“ (GOS 3-5 Punkte) und „schlecht“ (GOS 1-2 Punkte) identifiziert werden. Keine Korrelation fand sich zwischen dem EP elektrophysiologischen Monitoring (unauffällig gegen auffällig) und dem frühen Patienten Outcome (Aufreten von Sekundärhirnschäden) bei Verlegung.

In Bezug auf den intrakraniellen Druck (ICP), der in der klinischen Routine ein wichtiger Neuromonitoring-Parameter nach SHT darstellt, konnten nach unserem Wissen erstmalig eine signifikante Korrelation mit Proteomics Veränderungen von 3 Proteinen zum Zeitpunkt T6 nachgewiesen werden, und zwar von UCHL1, YWHAG und NPTXR (Abb. 9)

Darüber hinaus gab es weitere 9 Proteine, die jedoch einem weiteren bioinformatischen Test (FDR-Korrektur) nicht standhalten konnten, was vor allem an fehlenden Werten gelegen haben mag. Diese Proteine sollten jedoch noch nicht als Marker ausgeschlossen werden, da eventuell mit weiteren sensitiveren und gezielteren Methoden die Vollständigkeit der gemessenen Werte erhöht und dadurch auch weitere Proteine eine Signifikanz mit allen Qualitätssicherungen erreichen könnten.

Vor allem das Protein Ubiquitin C-terminal Hydrolase-L1 (UCH-L1) ist ein bereits erforschter Marker im Bereich der Diagnose und Prognose nach sSHT. Bei der Einteilung des ICP in die beschriebenen 2 Gruppen geht man davon aus, dass ICP Werte >18 mmHg mit einem schlechteren Outcome verbunden sind. In dieser Studie wurde gezeigt, dass bei Patienten mit einem hohen ICP-Wert > 18mmHg die Liquor-Konzentration von UCH-L1 signifikant sinkt. Dabei sind unsere Daten im Gegensatz zu Studien, die einen Anstieg der UCH-L1 Konzentration in CSF (Mondello et al. 2012) oder in Serum (Mondello et al. 2012, Takala et al. 2016, Thelin et al. 2019) in Korrelation mit einem schlechten Outcome beschrieben haben. Allerdings ist hier zu bedenken, dass keine der genannten Studien einen ICP-Wert als Parameter für eine Korrelation in Betracht gezogen hat. Da dies unseres Wissens nach in dieser Form noch nie durchgeführt wurde, könnten also andere Mechanismen unserem Ergebnis zu Grunde liegen, so zum Beispiel, dass der ICP zu Tag 6 nach sSHT anders von UCH-L1 beeinflusst wird als der generelle Outcome. Des Weiteren bestand die Gruppe von Patienten mit ICP >18 mmHg lediglich aus 3 Patienten. Obwohl dies für eine statistische Aussagekraft gering erscheint, konnten wir zeigen, dass diese 3 Patienten innerhalb ihrer Proteomveränderungen sehr homogen waren und ähnliche Regulationen derselben Proteine aufwiesen. Daher kann trotz der unterschiedlichen Gruppengröße die Korrelation der genannten Proteine mit dem ICP als sicherer Hinweis gedeutet werden, der sich eventuell durch weitere Messungen mittels sensitiverer Methoden oder im Rahmen von Validierungsuntersuchungen an größeren Patientenkollektiven bestätigen wird.

Hinsichtlich des späten Outcomes nach 6 Monaten (ermittelt über den GOS-Score) konnten wir in Bezug auf die Arbeit von Shultz et al. 2021 wie zuvor beschrieben (s. Abschnitt 5.3) 3 der 7 bereits beschriebene Proteine, die mit dem 6-Monate GOSE korrelieren, auch in unseren Probenanalyse nachweisen (vergleiche Abschnitt 4.3.3). Hier zeigt sich zwar keine Signifikanz nach FDR-Korrektur, aber aufgrund der hohen Fold-Changes lässt dies vermuten, dass diese Marker sich auch in unserer Studie mit erhöhter Fallzahl nach Vervollständigung der 6 Monats-Follow-Ups nachweisen lassen. Hierdurch zeigt sich die qualitative Vergleichbarkeit unserer Studien mit bisherigen Veröffentlichungen in renommierten Fachjournalen.

Eine Neuheit der vorliegenden Studie liegt jedoch in der Identifizierung von Complement factor H-related protein 1 (CFHR1) als einem signifikant korrelierenden Marker, der bei Patienten mit schlechtem 6-Monats-Outcome (GOS 1-2 Punkte) im Liquor erhöht vorlag. CFHR1 ist ein bislang nicht beschriebenes Protein im Zusammenhang mit einem schweren SHT. Generell wird CFHR1 in seiner Funktion innerhalb der angeborenen Immunantwort heftig diskutiert. Eine Review-Arbeit von Skerka et al. 2020 beschreibt die kontroverse Rolle des Proteins in der Komplementaktivierung und Inflammation. CFHR1 steht dem Complement factor H-like 1 (CFHL1) Protein mit seiner Komplement-regulierenden Funktion gegenüber, indem es ebenfalls an die gleiche Bindungsstelle von C3b bindet und so die Komplementaktivierung reguliert.

In dem o.g. Review wird aufgezeigt, dass CFHR1 über zwei mögliche Wege interagieren könnte, indem es die Komplementaktivierung bei Bindung an gesunden Oberflächen eindämmend reguliert, während es zu einer verstärkten Aktivierung von Komplement und Inflammation bei Bindung auf nekrotischen Oberflächen führt. So haben zwei in dem Review beschriebenen Arbeiten CFHR1 als Biomarker für eine frühzeitige Diagnose von Nekrosen nach Lebertransplantation und Tuberkulose beschrieben (Chen et al. 2020, Jiang et al. 2019), während eine weitere Arbeit von Shi et al. 2016 anführt, dass CFHR1 neurale Stammzellen in einem Mausmodell gegen Astrozyten-induzierten Schaden schützen kann. Es wird deutlich,

dass die derzeitige Datenlage noch keine eindeutige Antwort auf die Funktion von CFRH1 zulässt und weitere Forschung nötig ist.

Dennoch ist das CFRH1-Protein in physiologischen Prozessen involviert, die nach sSHT aktiviert werden, weswegen unser Ergebnis vielversprechend ist und im weiteren Verlauf mit einer vollständigen Patientenzahl für das Langzeit-Outcome (auch für 12 Monate) CFRH1 als möglicher Prognosemarker bestätigt werden könnte. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass bei einer Vervollständigung der Outcome-Daten größere Patientenkollektive weitere Proteine eine Signifikanz erreichen und somit zusätzliche Prognosemarker identifiziert werden könnten.

Die hier beschriebenen Ergebnisse tragen somit dazu bei, die Ablaufprozesse von schweren Schädel-Hirn-Traumata zu verstehen und helfen bei der Entdeckung von Biomarkern, die zu der Identifikation von schweren Traumata-Verläufen, insbesondere von solchen, bei denen sekundäre Hirnschaden auftreten, beitragen können.

Sofern die hier beschriebenen Biomarker, vor allem der Prognosemarker CFHR1 und die Biomarker UCHL1, YWHAG und NPTXR in weiteren Studien bestätigt werden, könnten möglicherweise Assays entwickelt werden, die in der Routine dazu beitragen, besser über Therapiemaßnahmen entscheiden zu können und somit die Prognose der Patienten zu verbessern.

#### Literatur:

Chen X, Jia X, Lei H, Wen X, Hao Y, Ma Y, Ye J, Wang C, Gao J. Screening and identification of serum biomarkers of osteoarticular tuberculosis based on mass spectrometry. *J Clin Lab Anal.* 2020 Jul;34(7):e23297.

Jiang Q, Ru Y, Yu Y, Li K, Jing Y, Wang J, Li G. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals potential early diagnostic markers in serum of acute cellular rejection after liver transplantation. *Transpl Immunol.* 2019 Apr;53:7-12.

Kaibin Shi, Zhen Wang, Yuanchu Liu, Ye Gong, Ying Fu, Shaowu Li, Kristofer Wood, Junwei Hao, Guang-Xian Zhang, Fu-Dong Shi, Yaping Yan; CFHR1-Modified Neural Stem Cells Ameliorated Brain Injury in a Mouse Model of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *J Immunol* 1 November 2016; 197 (9): 3471–3480.

Mondello S, Linnet A, Buki A, Robicsek S, Gabrielli A, Tepas J, Papa L, Brophy GM, Tortella F, Hayes RL, Wang KK. Clinical utility of serum levels of ubiquitin C-terminal hydrolase as a biomarker for severe traumatic brain injury. *Neurosurgery.* 2012 Mar;70(3):666-75.

Skerka C, Pradel G, Halder LD, Zipfel PF, Zipfel SLH, Strauß O. Factor H-related protein 1: a complement regulatory protein and guardian of necrotic-type surfaces. *Br J Pharmacol.* 2021 Jul;178(14):2823-2831.

Takala RS, Posti JP, Runtti H, Newcombe VF, Outtrim J, Katila AJ, Frantzén J, Ala-Seppälä H, Kyllönen A, Maanpää HR, Tallus J, Hossain MI, Coles JP, Hutchinson P, van Gils M, Menon DK, Tenovuo O. Glial Fibrillary Acidic Protein and Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1 as Outcome Predictors in Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg.* 2016 Mar;87:8-20.

Thelin E, Al Nimer F, Frostell A, Zetterberg H, Blennow K, Nyström H, Svensson M, Bellander BM, Piehl F, Nelson DW. A Serum Protein Biomarker Panel Improves Outcome Prediction in Human Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2019 Oct 15;36(20):2850-2862.

Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Current understanding of neuroinflammation after traumatic brain injury and cell-based therapeutic opportunities. *Chin J Traumatol*. 2018 Jun;21(3):137-151.

## 7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

- Unter Punkt 4 sind die derzeit wichtigsten Ergebnisse dieser Studie dargestellt. Die aufgenommenen Daten und gesammelten Proben bieten jedoch weitere Möglichkeiten, sukzessiv weitere Auswertungen und Analysen durchzuführen.
- Es ist geplant, eine englischsprachige Publikation der wichtigsten Ergebnisse der Studie zu erstellen und bei einer renommierten internationalen Fachzeitschrift einzureichen.
- Die in der vorliegenden Studie bestätigten Biomarker könnten in den schon vorliegenden Plasmaproben untersucht werden, sodass auch durch weniger invasive Methoden Bioproben untersucht werden könnten.
- Die hier gewonnenen sSHT-spezifischen Proben bieten eine wertvolle Biobank für schwer erreichbare Proben, die zusammen mit den klinischen Daten als Ausgang für zukünftige Studien dienen können.
- Die vorliegende Studie soll als Grundlage für weitere Projekte zum Thema schweres Schädel-Hirn-Trauma dienen.
- Am MPC der Ruhr Univ. Bochum konnte im Rahmen eines eigenem Großgeräteantrags ein neues Massenspektrometer angeschafft werden (tims TOF Pro 2 der Fa. Bruker), durch welches die Proteomabdeckung für biologische Proben aufgrund einer 4. Dimension deutlich erhöht wird. Um weitere differenzielle Proteine zu identifizieren und zudem die Signifikanz der bereits beschriebenen potentiellen Markerproteine basierend auf der hohen Sensitivität des neuen Massenspektrometers zu erhöhen, wurden zusätzliche proteomische Daten aus der gesamten Studienpopulation einbezogen, wobei die Auswertung voraussichtlich bis Mitte November 2023 abgeschlossen sein wird. Die anschließende statistische Analyse in Bezug auf die Patienten Prognose wird voraussichtlich bis Dezember 2023 abgeschlossen sein.

## 8. Anhang/ Anhänge

**Tabelle S1:** Entnommene Proben der sSHT-Patienten

Nummer	Liquorproben				Plasmaproben				Hirnprobe
	T0	T3	T6	Zusätzlich	T0	T3	T6	Zusätzlich	
1	x	x	x		x	x	x		x
2	fehlt	fehlt	fehlt	T23	T1	T5	T7		x
3	fehlt	x	x		x	x	x		x
4	x	x	x		x	x	x		x
5	fehlt	x	x		x	x	x		x
6	x	fehlt	fehlt	T14	x	T2	fehlt	T14	fehlt
7	T2	x	x		T2	x	x		x
8	x	x	T7	T1	x	x	fehlt	T1	x
9	x	T4	x		x	T4	x		x
10	fehlt	T2	fehlt		x	T2	fehlt		x
11	x	x	x		x	x	x		x
12	x	x	T5		x	x	T5		fehlt
13	x	x	fehlt		x	x	x		x
14	x	x	T5		x	x	T5		x
15	T1	T4	T7		T1	T4	T7		x
16	T1	x	x		T1	x	x		fehlt
17	T1	x	x		T1	x	x		fehlt
18	x	x	x		x	x	x		x
19	x	x	x		x	x	x		x
20	x	x	x		x	x	x		x
21	fehlt	x	x		fehlt	x	x		fehlt
22	T1	x	x		T1	x	x		fehlt
23	T1	x	x		T1	x	x		fehlt
24	fehlt	T4	fehlt		fehlt	T4	fehlt		x
25	x	x	fehlt	T4	x	x	fehlt	T4	x
26	T1	x	x		T1	x	x		fehlt
27	T1	x	T5		T1	x	T5		fehlt
28	T1	x	fehlt		T1	x	x		fehlt
29	x	T2	fehlt		x	T2	x	T1	fehlt
30	T1	x	x		T1	x	x		fehlt
31	x	x	fehlt		x	x	fehlt		x
32	x	x	fehlt		x	x	x		fehlt

**Tabelle S2:** Spätes Outcome – Neurologische Scores nach 6 und 12 Monaten

Nummer	mGOS		GOS		GCS		NIHSS		Barthel Index	
	6	12	6	12	6	12	6	12	6	12
1	5	5	5	5	15	15	1	0	100	100
2	3	3	3	3	13	14	8	8	35	50
3	5	5	5	5	15	15	5	3	100	100
4	2	1	2	1	3	3	42	42	-275	-275
5	4	1	4	1	15	3		42		-275
6										
7	1	1	1	1	3	3	42	42	-275	-275
8	4		4		15		5		90	
9										
10	1	1	1	1	3	3	42	42	-275	-275

Nummer Monate	mGOS		GOS		GCS		NIHSS		Barthel Index	
	6	12	6	12	6	12	6	12	6	12
11	3		3		12		20		30	
12	5		5		15		3		100	
13	3	1	3	1		3		42		-275
14	2	2	2	2						
15	3	3	3	3						
16										
17										
18	2	2	2	2						
19	1	1	1	1	3	3	42	42	-275	-275
20	1	1	1	1	3	3	42	42	-275	-275
21										
22	1	1	1	1	3	3	42	42	-275	-275
23	1	1	1	1	3	3	42	42	-275	-275
24	1	1	1	1	3	3	42	42	-275	-275
25	1	1	1	1	3	3	42	42	-275	-275
26										
27										
28										
29	3		3							
30										
31	1	1	1	1	3	3	42	42	-275	-275
32										