

**Analyse immunologischer und
proteomischer Aspekte im Rahmen
der Glaukompathogenese**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der

Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

von

Nils Böhm

geboren in Lüdenscheid

Mainz, 26.04.2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Anmerkungen

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Dissertation wurden auf internationalen Kongressen vorgestellt, in Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. als Patent angemeldet:

Patentantrag:

Boehm N, Pfeiffer N, Grus FH (2010) Diagnostic method for glaucoma based on analysis of the autoimmune reactivity in body fluids. Eingereicht bei dem *European Patent Office* sowie dem *United States Patent and Trademark Office*.

Originalarbeiten

Kramann C, **Boehm N**, Lorenz K, Wiegel N, Stoffelns B, Pfeiffer N, Grus FH (2009) Effect of contact lenses on the protein composition in tear film: A protein chip study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (angenommen)

Thiel UE, Feltens R, Adryan B, Gieringer R, Mendler S, Schuon R, Fillies T, **Boehm N**, Grus FH, Mann WJ, Brieger J (2009) Analysis of differentially expressed Proteins in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) by MALDI-TOF MS. (in Begutachtung)

Boehm N, Thiel U, Lossbrandt U, Berneiser S, Wiegel N, Pfeiffer N, Grus FH (2009) Intra individual Comparison of Autoantibody patterns in Sera and Aqueous Humor of Glaucoma Patients and Healthy Subjects. *Ophthalmology* (in Begutachtung)

Joachim SC, Wax MB, **Boehm N**, Dirk D, Pfeiffer N, Grus FH (2010) Up-regulation of antibody response to heat shock proteins and tissue antigens in an ocular ischemia model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (in Begutachtung)

Boehm N, Wehrwein N, Berneiser S, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus F (2010) Detection of Dry Eye Biomarkers via Mass spectrometry in three independent studies. (in Vorbereitung)

Riechart AI *, **Boehm N***, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH (2010) Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry-eye patients by means of antibody-microarrays. (* beide Autoren tragen gleichwertig zu der Arbeit bei, in Vorbereitung)

Joachim SC, Jehle T, Dimitriu C, Gramlich OW, **Boehm N**, Dirk D, Lagreze WA, Pfeiffer N, Grus FH (2010) Effect of ischemia duration on antibody response in a model of retinal ischemia-reperfusion (in Vorbereitung)

Vorträge auf internationalen Konferenzen

Boehm N: Protein Biomarker im Tränenfilm bei Augenoberflächenerkrankungen.

Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, 2008, Berlin

Boehm N: Antikörper-Profilung mittels Protein-Microarrays beim Glaukom. *Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, 2008, Berlin*

Boehm N: Intraindividual Comparison of Antibody Patterns in Sera and Aqueous Humor of Glaucoma Patients and Healthy Subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, Fort Lauderdale, USA, 274/2076*

Boehm N: Comparison of Antibody Patterns in Sera and Aqueous Humor of Glaucoma Patients and Healthy Subjects by Means of Protein Microarrays. *Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, 2009, Leipzig*

Boehm N: Analysis of Complement Proteins in Retina and Sera of Glaucoma Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, Fort Lauderdale, USA, 509/5221 (angenommen)*

Posterbeiträge auf internationalen Konferenzen

Boehm N, Joachim SC, Pfeiffer N, Grus FH (2008) Protein Microarrays As An Effective Method For Antibody Profiling In Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci, Fort Lauderdale, USA, P 1570/A70*

Grus FH, Buhr D, Freeman-Cook L, Joachim SC, **Boehm N, Pfeiffer N (2008)** Immune Response Biomarker Profiling in Glaucoma Patients by Means of Protein Micro-Arrays (ProtoArray). *Invest Ophthalmol Vis Sci, Fort Lauderdale, USA, P 1569/A69*

Boehm N, Richter J, Rosfa S, Joachim SC, Pfeiffer N, Grus FH (2008) Automated Serum Phosphopeptide Profiling Of Glaucoma Patients. *HUPO Annual World Congress, Amsterdam, Niederlande*

Tschoerner F, **Boehm N, Kroll P, Blindert M, Pfeiffer N, Grus FH (2008)** Proteomics pipeline mainz (P²M) and profiling of mass spectrometry data. *HUPO Annual World Congress, Amsterdam, Niederlande*

Boehm N, Richter J, Joachim SC, Pfeiffer N, Grus FH (2008) Protein Microarrays As A Tool For Antibody Profiling In Glaucoma. *Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Mannheim, P 2/88*

- Boehm N**, Joachim SC, Pfeiffer N, Grus FH (2008) Antibody profiling in glaucoma via protein microarrays. *Symposium des Neurologischen Arbeitskreises*, Mainz
- Kramann CA, **Boehm N**, Stoffelns B, Pfeiffer N, Grus FH (2009) Proteomic Analysis of Tears in Patients With Dry and Exsudative Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Fort Lauderdale, USA, P 737/D791
- Eule C, Jurk S, **Boehm N**, Grus FH (2009) Tear Protein Pattern Detected via MALDI-TOF in Healthy Dogs and in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca (KCS). *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Fort Lauderdale, USA, P 2607/D1027
- Riechardt AI, **Boehm N**, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH (2009) Proinflammatory cytokine profiling of Schirmer strip elution in dry-eye patients by means of antibody-microarrays. *Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, Leipzig, P007
- Wiegand M, **Boehm N**, Berneiser S, Pfeiffer N, Grus FH (2009) Protein-biomarker-profiling via mass spectrometry in dry eye patients. *Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, Leipzig, P011
- Kramann CA, **Boehm N**, Stoffelns B, Pfeiffer N, Grus FH (2009) Proteomic analysis of tears in patients with dry and exsudative age-related macular degeneration. *Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, Leipzig, P275
- Boehm N**, Thiel U, Lossbrandt U, Pfeiffer N, Grus FH (2009) Autoantibody patterns in Sera and Aqueous Humor of Glaucoma Patients and Healthy Subjects. *Symposium des neurologischen Arbeitskreises*, Mainz, P015
- Ude KT, **Boehm N**, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH (2010) Dig Deeper Into the Tear Proteome: Advanced Protein Profiling in Dry Eye Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Fort Lauderdale, USA, P 4140/D691 (angenommen)
- Beck S, **Boehm N**, Schlich M, Pfirrmann K, Pfeiffer N, Grus FH (2010). Comparison of Anti-Ocular IgG and IgM Autoantibody Patterns in Glaucoma Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Fort Lauderdale, USA, P 4817/A49 (angenommen)
- Schlich M, Lorenz K, **Boehm N**, Kramann C, Pfeiffer N, Grus FH (2010). Analysis of IgM Autoantibody Patterns as Marker for Acute Phase Immunoreactions in Pseudoexfoliation Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Fort Lauderdale, USA, P4846/A78 (angenommen)

Grus FH, **Boehm N**, Beck S, Schlich M, Lossbrandt U, Pfeiffer N (2010) Autoantibody Profiles in Tear Fluid as a Diagnostic Tool in Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Fort Lauderdale, USA, P 6110/A492 (angenommen)

Lorenz K, Schlich M, **Boehm N**, Kramann C, Pfeiffer N, Grus FH (2010) Detection of Autoantibody Patterns in Sera of Patients with Pseudoexfoliation Syndrome, Pseudoexfoliation Glaucoma and Cataract (Control Group). *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Fort Lauderdale, USA, P 6111/A493 (angenommen)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | <u>EINLEITUNG</u> | 1 |
| 1.1 | DAS GLAUKOM | 1 |
| 1.2 | RISIKOFAKTOREN UND PATHOMECHANISMUS DES GLAUKOMS | 4 |
| 1.3 | DAS KOMPLEMENTSYSTEM IM RAHMEN DER GLAUKOMPATHOGENESE | 4 |
| 1.4 | AUTOANTIKÖRPER IM RAHMEN DER GLAUKOMPATHOGENESE | 6 |
| 1.5 | PROTEOMVERÄNDERUNGEN IN DER RETINA UND OXIDATIVER STRESS | 11 |
| 1.6 | ANALYSE VON ANTIKÖRPER-REAKTIONEN MITTELS PROTEIN-MICROARRAYS | 12 |
| 1.7 | PROTEINANALYSE MITTELS ANTIKÖRPER-MICROARRAYS | 15 |
| 1.8 | EXPLORATIVE PROTEOMANALYSEN UND MASSENSPEKTROMETRIE | 16 |
| 2 | <u>ZIELSETZUNG</u> | 23 |
| 3 | <u>MATERIAL UND METHODEN</u> | 26 |
| 3.1 | AUTOANTIKÖRPER-ANALYSE MITTELS PROTEIN-MICROARRAYS | 26 |
| 3.1.1 | PATIENTENPROBEN | 26 |
| 3.1.2 | AUFBEREITUNG DER ANTIGENE UND HERSTELLUNG VON PROTEIN-MICROARRAYS | 27 |
| 3.1.3 | INKUBATION DES PATIENTENMATERIALS AUF PROTEIN-MICROARRAYS | 28 |
| 3.1.4 | VISUALISIERUNG UND DIGITALISIERUNG DER AUTOANTIKÖRPER-ANTIGEN-REAKTIONEN | 29 |
| 3.1.5 | DATENVERARBEITUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG DER MICROARRAYDATEN | 30 |
| 3.1.6 | REPRODUZIERBARKEIT VON PROTEIN-MICROARRAYS | 33 |
| 3.1.7 | ANALYSE DER BIOLOGISCHEN FUNKTIONEN VON PROTEINEN/ANTIGENEN | 33 |
| 3.2 | PROTEIN-EXPRESSIONS-ANALYSEN MITTELS ANTIKÖRPER-MICROARRAYS | 34 |
| 3.2.1 | AUFBEREITUNG DER PATIENTENPROBEN FÜR DIE SERUMPROTEINANALYSE | 34 |
| 3.2.2 | AUFBEREITUNG VON HUMANER RETINA – GESAMTPROTEIN-ISOLIERUNG | 34 |
| 3.2.3 | LABELING DER PROBENPROTEINE MIT EINEM FLUOROPHOR | 35 |
| 3.2.4 | HERSTELLUNG DER ANTIKÖRPER-MICROARRAYS | 36 |
| 3.2.5 | INKUBATION DES PROBENMATERIALS | 36 |
| 3.2.6 | AUSWERTUNG DER ANTIKÖRPER-MICROARRAY-DATEN | 37 |
| 3.3 | MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE VON GEWEBEPROBEN | 37 |

Verzeichnisse

| | | |
|--------|--|----|
| 3.3.1 | AUFTRENNUNG VON RETINAPROTEINEN MITTELS GELELEKTROPHORESE | 37 |
| 3.3.2 | TRYPsinVERDAU VON GELBANDEN | 38 |
| 3.3.3 | FRAKTIONIERUNG VON PEPTIDGEMISCHEN MITTELS C18-CHROMATOGRAPHIE | 40 |
| 3.3.4 | MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER PEPTIDFRAKTIONEN | 42 |
| 3.3.5 | KONVERTIERUNG DER ROHDATEN | 43 |
| 3.3.6 | VERWALTUNG DER DATEN UND DATENPROZESSIERUNG | 43 |
| 3.3.7 | IDENTIFIZIERUNG VON PROTEINEN | 45 |
| 3.3.8 | AUSWERTUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON PROBENPROTEINEN | 46 |
| 3.3.9 | CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMITTEL | 47 |
| 3.3.10 | LÖSUNGEN | 48 |
| 3.3.11 | SOFTWARE | 50 |
| 3.3.12 | GERÄTE | 51 |

4 ERGEBNISSE

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1 | METHODENENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG | 52 |
| 4.1.1 | ETABLIERUNG DES PROTEIN-MICROARRAY-VERFAHRENS | 52 |
| 4.1.2 | ETABLIERUNG DES ANTIKÖRPER-MICROARRAY-VERFAHRENS | 59 |
| 4.1.3 | MASSENSPEKTROMETRIE-BASIERENDE PROTEOMANALYSE | 60 |
| 4.2 | ERGEBNISSE DER ANALYSE VON PATIENTENPROBEN | 67 |
| 4.2.1 | ANALYSE DER AUTOANTIKÖRPERPROFILE VON GLAUKOMPATIENTEN | 67 |
| 4.2.2 | FOKUSSIERTER PROTEINANALYSE MITTELS ANTIKÖRPER-MICROARRAYS | 73 |
| 4.2.3 | MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE VON RETINAPROBEN | 77 |

5 DISKUSSION

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.1 | METHODISCHE ASPEKTE | 82 |
| 5.1.1 | PROTEIN MICROARRAYS | 82 |
| 5.1.2 | ANTI-KÖRPER-MICROARRAYS | 86 |
| 5.1.3 | MASSENSPEKTROMETRIE | 88 |
| 5.2 | ANALYSE VON PATIENTENPROBEN | 91 |
| 5.2.1 | AUTOANTIKÖRPER-PROFILING BEI GLAUKOMPATIENTEN | 91 |
| 5.2.2 | ANALYSE SPEZIFISCHER SERUM-UND-RETINAPROTEINE | 98 |
| 5.2.3 | RETINAPROTEOMANALYSE MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE | 105 |

Verzeichnisse

| | | |
|------------|----------------------------------|------------|
| 5.3 | FAZIT UND AUSBLICK | 109 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 112 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 114 |
| 8 | ANHANG | 135 |
| 9 | ABKÜRZUNGEN | 161 |
| 10 | EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG | 165 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|--|-----|
| 1. | AUFBAU DER RETINA | 1 |
| 2. | ZIRKULATION DES KAMMERWASSERS IM AUGE | 3 |
| 3. | STRUKTUR EINES IMMUNGLOBULINS (IgG) | 7 |
| 4. | AUFBAU EINER IONENFALLE, EINES ORBITRAP-MASSENANALYSATORS SOWIE EINES HYBRIDMASSENSPEKTROMETERS | 19 |
| 5. | SCHEMA EINES PROTEIN-MICROARRAY-VERSUCHS | 29 |
| 6. | SCHEMA EINES ANTIKÖRPER-MICROARRAY-VERSUCHS | 36 |
| 7. | PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE MASSENSPEKTROMETRIE | 39 |
| 8. | SOFTWARE-ANWENDUNGEN FÜR DIE AUSWERTUNG MASSENSPEKTROMETRISCHER DATEN | 44 |
| 9. | SPOT-MORPHOLOGIE VON PROTEIN-MICROARRAYS DIE MIT VERSCHIEDENEN TECHNOLOGIEN HERGESTELLT WURDEN | 53 |
| 10. | AUTOANTIKÖRPER-REAKTIONSMUSTER VON SERUM- UND KAMMERWASSERPROBEN | 54 |
| 11. | REPRODUZIERBARKEIT VON MICROARRAY-DATEN: CV UND SD | 55 |
| 12. | REPRODUZIERBARKEIT VON MICROARRAY-VERSUCHEN AN VERSCHIEDENEN TAGEN | 56 |
| 13. | AUSWIRKUNGEN DER VERSCHIEDENEN VERFAHREN ZUR NORMALISIERUNG VON MICROARRAY-DATEN | 58 |
| 14. | DARSTELLUNG EINES ANTIKÖRPER-MICROARRAY-REAKTIONSMUSTERS UND DIE AUSWIRKUNGEN VERSCHIEDENER ANTIKÖRPERKONZENTRATIONEN AUF DIE SIGNALINTENSITÄT | 59 |
| 15. | UNTERTEILUNG DES BEI DER MASSENSPEKTROMETRIE ERFASSTEN MASSENBEREICHS | 63 |
| 16. | EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER RESULTATE VON PEPTIDFRAGMENTIERUNGEN | 64 |
| 17. | AUSWIRKUNGEN DER MASSENABWEICHUNG AUF DEN MASCOT-SCORE UND DIE ANZAHL DER ZUGEORDNETEN FRAGMENTATIONEN | 65 |
| 18. | DARSTELLUNG DES ZUSAMMENHANGS ZWISCHEN DER ANZAHL ZUGEORDNETER FRAGMENTATIONEN, DER ANZAHL AN PROTEINZUORDNUNGEN PRO PEPTID UND DEM MASCOT-SCORE | 66 |
| 19. | ÜBERSICHTSPROFIL DER SERUM-AUTOANTIKÖRPER-REAKTIONEN VON GLAUKOMPATIENTEN IM VERGLEICH ZU GESUNDEN | 67 |
| 20. | STATISTISCHE DATEN DER SERUMANTIKÖRPER-ANALYSE (BEISPIELE) | 68 |
| 21. | KLASSIFIZIERUNG VON GLAUKOMPATIENTEN ANHAND VON ANTIKÖRPER-REAKTIONEN (ROC-KURVEN) | 69 |
| 22. | INTRAINDIVIDUELLER-VERGLEICH ANTIKÖRPER-REAKTIONEN IN SERUM-UND KAMMERWASSER VON GLAUKOMPATIENTEN UND GESUNDEN | 71 |
| 23. | ANALYSE DER BIOLOGISCHEN FUNKTION VON ANTIGENEN (GO-ANALYSE) | 72 |
| 24. | ANTI-KÖRPER-MICROARRAY-ANALYSE VON SERUMPROTEINEN BEI GLAUKOMPATIENTEN UND GESUNDEN | 74 |
| 25. | STATISTISCHE DATEN DER SERUMPROTEIN-ANALYSE (BEISPIELE) | 75 |
| 26. | ANALYSE SPEZIFISCHER RETINAPROTEINE BEI GLAUKOMPATIENTEN UND GESUNDEN | 76 |
| 27. | STATISTISCHE DATEN DER RETINAPROTEIN-ANALYSE (BEISPIELE) | 77 |
| 28. | INTERAKTIONEN UND WECHSELWIRKUNGEN VON RETINAPROTEINEN DIE MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE IDENTIFIZIERT WURDEN | 78 |
| 29. | FUNKTIONALE GRUPPEN IDENTIFIZIERTER RETINAPROTEINE | 79 |
| 30. | ERGEBNISSE DER QUANTIFIZIERUNG VON RETINAPROTEINEN | 80 |
| 31. | ANALYSE DER BIOLOGISCHEN FUNKTIONEN VON PROTEINEN FÜR DIE BEI GLAUKOMPATIENTEN VERÄNDERTE PROTEINMENGEN FESTGESTELLT WURDEN | 81 |
| 32. | MÖGLICHE WECHSELWIRKUNGEN DER VERSCHIEDENEN IN DIESER ARBEIT UNTERSUCHTEN KOMPONENTEN IM RAHMEN DER GLAUKOMPATHOGENESE | 110 |

Abbildungen des Anhangs:

| | | |
|----|---|-----|
| 1. | EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG VON PEPTIDMUSTERN NACH ERFOLGTER PROBEFRAKTIONIERUNG | 152 |
| 2. | VERGLEICH DER IgG-KONZENTRATION VON GLAUKOMPATIENTEN UND GESUNDEN IN SERUM- UND KAMMERWASSERPROBEN | 153 |
| 3. | STATISTISCHE DATEN DER SERUM AUTOANTIKÖRPER-ANALYSE | 154 |
| 4. | ÜBERSICHTSPROFIL DER KAMMERWASSER-ANTIKÖRPER-REAKTIONEN VON GLAUKOMPATIENTEN UND GESUNDEN | 155 |
| 5. | STATISTISCHE DATEN DER KAMMERWASSER-AUTOANTIKÖRPER-ANALYSE | 156 |
| 6. | STATISTISCHE DATEN DER SERUMPROTEINE DIE BEI GLAUKOMPATIENTEN SIGNIFIKANT VERÄNDERTE MENGEN AUFWIESEN | 157 |
| 7. | STATISTISCHE DATEN DER RETINAPROTEINE DIE BEI GLAUKOMPATIENTEN SIGNIFIKANT VERÄNDERTE MENGEN AUFWIESEN | 158 |
| 8. | VERTEILUNG DER VERSCHIEDENEN FUNKTIONALEN GRUPPEN AN DER GESAMTHEIT ALLER IDENTIFIZIERTEN PROTEINE | 159 |
| 9. | INTERAKTIONEN UND WECHSELWIRKUNGEN VON PROTEINEN FÜR DIE BEI GLAUKOMPATIENTEN VERÄNDERUNGEN DETEKTIERT WERDEN KONNTEN | 160 |

Tabellen

| | | |
|----|---|-----|
| 1. | AUFLISTUNG DER VERWENDETEN ANTIGENE | 135 |
| 2. | AUFLISTUNG DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER | 136 |
| 3. | PARAMETER DER PEPTIDMESSUNGEN MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE | 137 |
| 4. | PARAMETER DER MASCOT-DATENBANKSUCHE | 138 |
| 5. | ANZAHL DER PROTEIN-ZUORDNUNGEN PRO IDENTIFIZIERTEN PEPTID | 139 |
| 6. | AUFLISTUNG DER MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE IDENTIFIZIERTEN PROTEINE | 140 |

1 Einleitung

1.1 Das Glaukom

Zu den wichtigsten Sinnesorganen des Menschen gehört das Auge, über welches ca. 70-80% der gesamten Sinneswahrnehmungen erfolgen. Im Wesentlichen sind an der Verarbeitung von Lichtreizen die Netzhaut (Retina) mit ihren verschiedenen Bestandteilen, der Sehnerv sowie das Gehirn beteiligt. Eine zentrale Stellung in der Weiterleitung der Lichtreize nehmen die retinalen Ganglienzellen ein, welche ein Bindeglied zwischen der photosensitiven Zellschicht der Retina und den verarbeitenden Bereichen des Gehirns darstellen (Campbell et al. 1997). So werden die in der Photorezeptorschicht von den Sehpigmente Iodopsin (Zapfen) und Rhodopsin (Stäbchen) aufgefangenen Reize mittels einer zellulären Signaltransduktionskaskade an die Amakrin- und Bipolarzellen übermittelt, hier prozessiert und dann an die retinalen Ganglienzellen weitergereicht. Deren Axone bilden den Sehnerv, über den die Informationen der visuellen Reize an das Ganglion geniculatum laterale gesandt werden, eine Art erste Verschaltstation im Gehirn (Aufbau Retina vgl. Abb. 1) (Campbell et al. 1997).

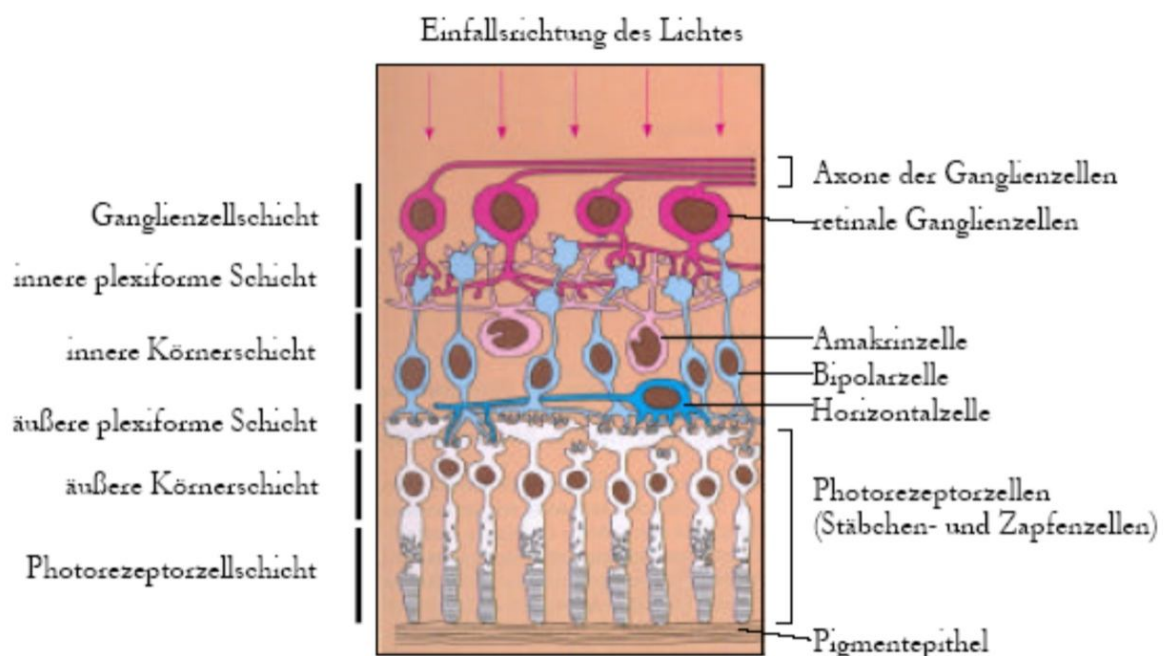


Abb. 1: Aufbau der humanen Retina. Dargestellt sind die verschiedenen Schichten der Retina sowie die sich darin befindenden Zelltypen (Campbell et al. 1997).

Einleitung

Eine heterogene Gruppe von okularen Erkrankungen wird unter dem Sammelbegriff Glaukom, im Volksmund auch „Grüner Star“ genannt, zusammengefasst (Pfeiffer 2005). Ihre Pathogenese ist durch einen langsamen, progradienten Untergang von retinalen Ganglienzellen und ihrer Axone gekennzeichnet. Die Degeneration der Ganglienzellen führt zu einer eingeschränkten Signalweiterleitung aus der photosensitiven Schicht der Retina zum Gehirn, woraus ein gradueller Verlust des Gesichtsfeldes (Skotom) resultiert (Grehn 2008). Das Glaukom muss daher als eine chronische neurodegenerative Erkrankung bezeichnet werden, in deren Folge es zu morphologischen Veränderungen der Retina und des Sehnervenkopfes (Papille) kommt (Grehn 2008). Weltweit gehören die Glaukomerkrankungen mit 12,3% nach dem Katarakt mit ca. 50% zur zweithäufigsten Ursache irreversibler Erblindung (Quigley 1996; Resnikoff et al. 2004). Insgesamt litten Mitte der 1990er Jahre nach Angaben der WHO (World Health Organisation) weltweit mehr als 66 Millionen Menschen unter dieser Gruppe von Erkrankungen (Quigley 1996). Potenziell können alle Altersgruppen betroffen sein, wobei das Risiko bei über 40-Jährigen deutlich ansteigt (Quigley et al. 2006). Deutschlandweit wird die Zahl der manifest erkrankten Menschen auf ca. 800.000 geschätzt, doch die Dunkelziffer dürfte sehr viel höher liegen, da die Glaukomerkrankungen durch ihren schleichenden Beginn in den meisten Fällen erst sehr spät diagnostiziert werden. Bei Auftreten von bemerkbaren Gesichtsfelddefekten sind oft bereits 20-40% der Ganglienzellen irreversibel geschädigt (Guo et al. 2008). Die Glaukomerkrankungen stellen somit ein wesentliches Gesundheitsrisiko und einen bedeutenden Wirtschaftsfaktor für die zunehmend alternde Gesellschaft dar.

Unterteilt werden die Glaukome in primäre und sekundäre Formen. Primäre Formen treten spontan mit einem anschließend chronischen Verlauf auf, wogegen sekundäre Formen stets als Begleiterscheinung einer anderen Augenerkrankung oder Allgemeinerkrankung anzusehen sind. Je nach Beschaffenheit des Kammerwinkels (Winkel zwischen Hornhaut (Cornea) und Iris, Abb. 2) und der Höhe des intraokularen Drucks (IOD) werden beide Glaukormarten in weitere, verschiedene Subgruppen unterteilt (Grehn 2008). Zu den primären Formen zählen das primäre Offenwinkelglaukom (POAG), das primäre Winkelblockglaukom, das Normaldruckglaukom (NTG) sowie das kongenitale Glaukom. Die häufigste Glaukomart stellt das primäre Offenwinkelglaukom dar, von dem ca. 90-95% aller Glaukom-Patienten betroffen sind (Hazin et al. 2009). Bei dieser Glaukomform liegt im Kammerwinkel eine Störung des Kammerwasserabflusses vor, wodurch sich der intraokulare Druck erhöht. Veränderungen des vorliegenden

Einleitung

Drucks werden also durch ein Missverhältnis zwischen Produktion und Abfluss des im Ziliarepithel gebildeten Kammerwassers verursacht, welches unter anderem für die Versorgung der gefäßlosen Linse und Hornhaut mit Nährstoffen verantwortlich ist (Abb. 2) (Grub et al. 2004). Trotz der Tatsache, dass nicht alle Patienten einen erhöhten Augeninnendruck aufweisen, zählt dieses Merkmal nach wie vor als Hauptrisikofaktor und Klassifizierungsmerkmal. Beim gesunden Menschen liegt der Augeninnendruck im Bereich von 10 bis 21mmHg, bei Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom in vielen Fällen weit darüber (teilweise über 40mmHg). Normaldruckglaukumpatienten weisen dagegen keinen erhöhten Augeninnendruck auf, so dass die Bestimmung des IOD nicht als alleiniges Diagnosekriterium angesehen werden kann.

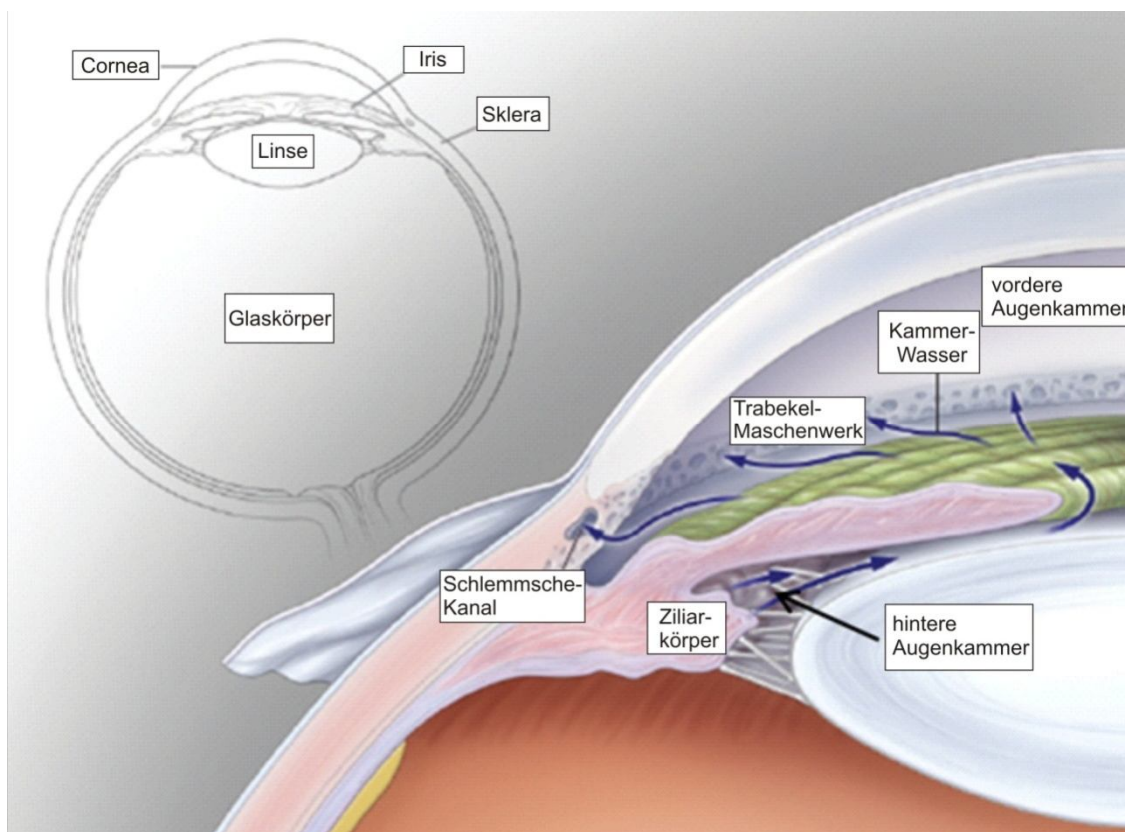


Abb. 2: Dargestellt ist die Zirkulation des Kammerwassers im menschlichen Auge. Im Ziliarepithel wird das Kammerwasser gebildet und fließt anschließend durch die hintere Augenkammer in die vordere Augenkammer. Hierbei übernimmt es die Versorgung der Linse sowie der Cornea mit Nährstoffen. Der Abfluss des Kammerwassers in das episclerale venöse System erfolgt über den Schlemmschen Kanal im Kammerwinkel (Alward 2003).

Zu den sekundären Glaukomformen zählt beispielsweise das Pseudoexfoliationsglaukom (Ritch et al. 2001), das durch eine verstärkte Produktion und Ablagerung von extrazellulärem Material im Kammerwinkel und einer damit

einhergehenden Erhöhung des Abflusswiderstandes des Kammerwassers verursacht wird.

1.2 Risikofaktoren und Pathomechanismus des Glaukoms

Die Pathomechanismen der Glaukomerkrankungen sind komplex und mit ihren Wechselwirkungen bis heute nur unzureichend verstanden. Die mechanische Kompression der Retina durch einen erhöhten IOD gilt, wie oben geschildert, nach wie vor als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Erkrankungsprogression und als mögliche Erklärung für die apoptotischen Vorgänge in der retinalen Ganglienzellschicht sowie im Sehnerv (Sommer et al. 1991; Yan et al. 1994). Ein erhöhter IOD erklärt aber nicht alle Phänomene des Krankheitsbildes, wie sich neben Normaldruckglaukompatienten auch anhand von Personen mit einer okularen Hypertension (OHT) zeigt, die einen erhöhten Augeninnendruck, bislang aber keinen Glaukomschaden aufweisen. Als weitere Risikofaktoren sind sowohl genetische Prädispositionen (Stone et al. 1997), erhöhte Glutamatkonzentrationen (Shen et al. 2004) sowie Veränderungen im retinalen Stickoxidstoffwechsel (Galassi et al. 2004) der Patienten zu nennen. Ebenfalls spielen Gefäßveränderungen (Chung et al. 1999) eine mögliche Rolle, die zu einer retinalen Ischämie führen können sowie oxidative Schädigungen von Gewebebestandteilen durch reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Aslan et al. 2008). Der erhöhte Augeninnendruck ist möglicherweise selbst bereits ein Epiphänomen anderer Auslöser, wie geschädigter Trabekelmaschenwerkzellen (Ritch et al. 2003; Sacca et al. 2007), die den Abfluss des Kammerwassers regulieren (Abb. 2). Ebenfalls wird im Zusammenhang mit der Glaukompathogenese auch die Beteiligung einer autoimmunen Komponente bzw. eines fehlgesteuerten Immunsystems diskutiert (Grus et al. 2008a; Grus et al. 2008b) - Aspekte, die in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet werden.

1.3 Das Komplementsystem im Rahmen der Glaukompathogenese

Das Immunsystem des Menschen dient grundsätzlich dem Schutz gegenüber Krankheitserregern, um die Gesundheit des Organismus und dessen Integrität zu bewahren (Janeway et al. 2002). Zu den komplexen Mechanismen, die notwendig sind, um zwischen körpereigenen Bestandteilen und denen von Pathogenen zu unterscheiden, gehören neben zellulären Komponenten - wie den B- und T-Zellen - auch Antikörper (Immunglobuline), die Proteine des Komplementsystems oder auch Zytokine, welche zusammen die humorale Immunantwort darstellen (Tomlinson 1993; Luster 2002). Die Mehrheit der immunologischen Prozesse richtet sich gegen körperfremde Antigene, doch

Einleitung

neben diesen Reaktivitäten gibt es auch eine Vielzahl an Prozessen, die sich gegen körpereigene Strukturen richten und die unter dem Begriff „natürliche Autoimmunität“ zusammenfasst werden. Nach derzeitigem Forschungsstand können die meisten Komponenten des Immunsystems, wie das Komplementsystem, T-Zellen oder auch Antikörper, in diese autoimmunen Prozesse involviert sein, wobei ihre genaue Bedeutung für den Organismus bislang noch unklar ist (Lehmann et al. 1992; Adamus 2003; Schwartz et al. 2004).

Eine Komponente des Immunsystems, die im Rahmen der Glaukompathogenese und dem damit einhergehenden Untergang retinaler Ganglienzellen eine Rolle zu spielen scheint, ist das Komplementsystem. So liegen erste Hinweise für eine verstärkte Aktivität verschiedener Bestandteile des Komplementsystems in den Retinae von Patienten mit einem erhöhten intraokularen Druck vor (Kuehn et al. 2006).

Die Funktionsweise des Komplementsystems beruht auf der Destabilisierung von Zellmembranen der betroffenen Zellen - meist Pathogene - , woraus deren Lyse resultiert. Involviert sind hierbei bis zu 30 verschiedene globuläre, vorwiegend im Blut gelöste Proteine. Die Komplementkaskade kann auf verschiedenen Wegen aktiviert werden, zu denen der klassische Antikörper-vermittelte-Weg, der Lektin-Weg sowie der alternative Weg gehören (Janeway et al. 2002). Im Fall des klassischen Wegs erfolgt die Initialisierung der Kaskade durch die Anlagerung des Komplementfaktors C1, der sich in C1q, C1r und C1s unterteilt, an ein Antigen-gebundenes Immunglobulin. C1r und C1s stellen Serin-Proteasen dar, die in aktiviertem Zustand die Komplementfaktoren C2 und C4 spalten, wodurch die Fragmente C2a und C2b sowie C4a und C4b entstehen (Arlaud et al. 2002). C2a und C4b lagern sich anschließend als C4bC2a-Komplex zusammen und bilden dadurch den C3-Konvertase-Komplex, welcher auch bei dem alternativen sowie dem Lektin-Weg gebildet wird und somit als zentraler Punkt der Komplementkaskade anzusehen ist (Volanakis 1990). Im weiteren Verlauf der Kaskade bilden sich der C5-Konvertase-Komplex (Rawal et al. 2001) sowie der finale, für die Komplementkaskade charakteristische Membranangriffskomplex (MAK) C5b678poly9 (Scibek et al. 2002). Das Resultat des vollständig ausgebildeten Angriffskomplexes stellt eine Pore in der Plasmamembran der Zelle dar, die eine barrierefreie Diffusion von Molekülen erlaubt und somit den Zelltod herbeiführt (Bhakdi et al. 1991). Darüber hinaus wirken zahlreiche Fragmente, die durch die Spaltung von Komplementfaktoren entstanden sind als Anaphylatoxine (C3a, C4a, C5a), welche durch die Interaktion mit Granulozyten zu lokalen Entzündungsreaktionen führen (Kohl 2001). Die Anaphylatoxine

stellen somit ein Bindeglied zwischen der humoralen sowie der zellulären Immunantwort dar.

Von Kuehn et al. konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit einer okularen Hypertension erhöhte Transkriptionslevel von Komplementproteinen in der Retina vorliegen und dass es zu einer Ablagerung der Komplementfaktoren C1q und C3 in der retinalen Ganglienzellschicht kommt, die wiederum in der Bildung von Membranangriffskomplexen mündet (Kuehn et al. 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei Tieren mit einer künstlich herbeigeführten retinalen Ischämie eine Inhibierung der Komplementkaskade zu einer verminderten bzw. verzögerten Ganglienzelldegeneration führt (Kuehn et al. 2008).

Dass körpereigene Strukturen durch das Komplementsystem und seine Komponenten geschädigt werden, konnte auch bei klassischen Autoimmunerkrankungen wie dem Lupus erythematodes nachgewiesen werden (Ceribelli et al. 2009). Wie geschildert erfolgt die Initialisierung der Komplementkaskade in den meisten Fällen über den Antikörper-vermittelten Weg. Da, wie im folgenden Kapitel besprochen, bei Glaukoma Patienten auch stark veränderte Antikörper-Reaktionen gegen körpereigene Strukturen vorliegen, scheint eine zumindest partielle Beteiligung des Komplementsystems am retinalen Ganglienzelltod im Rahmen der Glaukoma Pathogenese durchaus wahrscheinlich.

1.4 Autoantikörper im Rahmen der Glaukoma Pathogenese

Zahlreiche Studien belegen, dass bei Glaukoma Patienten anormale Reaktivitäten von Immunglobulinen gegen körpereigene und im speziellen okuläre Strukturen vorliegen und möglicherweise eine bedeutende Rolle im Rahmen der Glaukoma Pathogenese einnehmen (Grus et al. 2008a; Grus et al. 2008b).

Immunglobuline im allgemeinen werden der humoralen Immunantwort zugeordnet, und ihre spezifische Bindung an ein Antigen stellt einen der grundlegendsten Mechanismen des Immunsystems bei der Beseitigung von in den Körper eingedrungenen Fremdkörpern dar.

Immunglobuline werden von B-Zellen produziert und können sowohl als membranständige Rezeptoren vorliegen als auch im Fall von ausdifferenzierten, aktivierten B-Zellen in die Umgebung sezerniert werden (DeFranco 1993; Reth 1994). Die Grundstruktur von Immunglobulinen besteht aus zwei einheitlichen, leichten Polypeptidketten (engl. *light chain*, L-Kette) sowie zwei identischen, schweren Polypeptidketten (engl. *heavy chain*,

Einleitung

H-Kette) und ermöglicht es dem Molekül, zwei Zielepitope gleichzeitig zu binden (Abb. 3) (Schütt et al. 2009).

Unterteilt werden Immunglobuline in die fünf verschiedene Klassen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Klasse wird anhand der C_H-Regionen (Abb. 3) bestimmt. Über physikalische Wechselwirkungen, wie van-der-Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen, erfolgt die Bindung an das Zielepitop des jeweiligen Antigens, wodurch ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht (Davies et al. 1988; Davies et al. 1996). Einmal an ihr Zielantigen gebunden, können Immunglobuline über verschiedenste Mechanismen dessen Beseitigung einleiten, z.B. mittels der Initialisierung der Komplementkaskade (s.o.) oder der verbesserten Pathogenerkennung durch Makrophagen (LoBuglio et al. 1967).

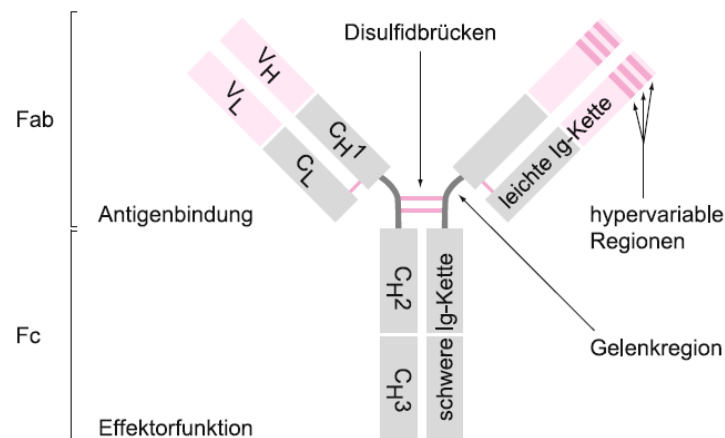


Abb. 3: Struktur eines Immunglobulins (Ig) (Schütt et al. 2009). Das Heterotetramer besteht aus vier paarweise identischen Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die schweren und leichten Ketten bestehen aus konstanten (C_H und C_L) und variablen (V_H und V_L) Regionen. Das für die Antigenbindung verantwortliche Fab-Fragment (engl. *fragment of antigen binding*) ist von dem Effektorfunktion ausübenden Fc-Teil (engl. *constant fragment*) des Immunglobulins durch eine Gelenkregion getrennt.

Immunglobuline, welche gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, werden als Autoantikörper bezeichnet - ihre Produktion erfolgt im Gegensatz zu der von „normalen“ Antikörpern durch B-Zellen, die zuvor nicht durch externe Antigene stimuliert wurden (Schwartz-Albiez et al. 2009). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass jeder humane Organismus solche autoreaktiven Antikörper in sich trägt, was darauf schließen lässt, dass sie normalerweise keine schädigende Wirkung ausüben (Schwartz-Albiez et al. 2009). Bei Personen mit Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes (Berden et al. 1989; Kaburaki et al. 1995; Kaburaki et al. 1997), dem Sjögren-Syndrom

Einleitung

(Venables et al. 1983; Haneji et al. 1997) oder der Myasthenia gravis (Cojocarú et al. 2000; Suzuki et al. 2009) konnten jedoch veränderte Autoantikörper-Reaktionen nachgewiesen und deren Involvierung in den jeweiligen Pathomechanismus belegt werden.

Hinsichtlich der Glaukomerkrankungen wurde 1994 erstmals von Wax et al. gezeigt, dass auch hier im Serum der Patienten veränderte Autoantikörper-Reaktionen gegen verschiedene Antigene, wie das Sjögren-Syndrom-A-Antigen, vorliegen. Daraus schloss die Arbeitsgruppe, dass bei der optischen Neuropathie von Glaukompatienten humorale, immunologische Mechanismen eine Rolle spielen könnten (Wax et al. 1994). In den darauffolgenden Jahren wurden verstärkt die Autoantikörper-Reaktionen von Patienten mit verschiedenen Glaukomformen, wie dem primären Offenwinkelglaukom (Wax et al. 2001; Grus et al. 2006), dem Normaldruckglaukom (Wax et al. 1998; Wax et al. 2001; Grus et al. 2006) oder dem Pseudoexfoliationsglaukom (Joachim et al. 2007c) gegen diverse Antigene untersucht. In all diesen Studien konnten veränderte Autoantikörper-basierende Immunreaktionen bei Glaukompatienten festgestellt werden, wobei sich die einzelnen Glaukomgruppen hierbei teilweise deutlich voneinander unterschieden (Wax et al. 2001; Joachim et al. 2007c; Joachim et al. 2008a). So zeigte sich, dass Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom vor allem verstärkte Antikörper-Reaktionen gegen Proteine der Retina aufweisen, Patienten mit einem Normaldruckglaukom dagegen erhöhte Reaktionen gegen Bestandteile des Sehnervkopfes (Joachim et al. 2005).

Da das Glaukom als eine auf das Auge beschränkte Erkrankung verstanden wird, wurden neben Serumproben auch Kammerwasserproben von Glaukompatienten bezüglich ihrer Autoantikörper-Reaktionen untersucht. Diesen Proben kommt eine besondere Bedeutung zu, da das Kammerwasser im Gegensatz zum Blut des Patienten, welches über die Blut-Hirn-Schranke bzw. die Blut-Retina-Schranke räumlich von den neuronalen Geweben getrennt ist, in direktem Kontakt mit der Retina und somit dem Ort der Glaukopathogenese steht. Die Analyse der Kammerwasserproben zeigte, dass in dieser okularen Flüssigkeit ebenfalls veränderte Autoantikörper-Reaktionen bei Glaukompatienten zu detektieren sind (Joachim et al. 2007b; Joachim et al. 2007c) - Ergebnisse, die mit der dem Kammerwasser zugeschriebenen Kompetenz zur Eigenmodulation von immunologischen Vorgängen (Immunprivileg des Auges) in Übereinstimmung stehen (Niederhorn 1999; Mochizuki et al. 2000).

Zumeist wurden im Rahmen der Untersuchungen von Serum- und Kammerwasserproben erhöhte Antikörperreaktionen gegen körpereigene Gewebe bzw. deren Proteine nachgewiesen. Als betroffene Antigene konnten unter anderem

verschiedene Hitzeschockproteine (HSP27, HSP60, HSP70, α -Crystallin) (Tezel et al. 1998; Wax et al. 1998; Wax et al. 2001), die Glutathion S-Transferase (GST) (Yang et al. 2001), die neuronenspezifische γ -Enolase (Maruyama et al. 2000), verschiedene Glykosaminoglykane des Sehnervenkopfes (Tezel et al. 1999), α -Fodrin (Tezel et al. 1999) und das Myelin-basisches Protein (MBP) (Joachim et al. 2008b) identifiziert werden. Die Funktionen vieler dieser Antigene stehen in direktem Zusammenhang mit der Abwehr von Stresssituationen, wie z.B. die der verschiedenen Hitzeschockproteine oder auch die der GST, welche die Konjugation von Glutathion und ROS katalysiert (Hayes et al. 1995) und so bei der Beseitigung von radikalen Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle einnimmt. Andere Proteine wie α -Fodrin oder MBP stellen zentrale Proteine neuronaler Gewebe dar. Gegen sie gerichtete Autoantikörper nehmen, zumindest im Fall von MBP, auch in der Pathogenese anderer neurodegenerativer Krankheiten, wie z.B. der Multiplen Sklerose, eine bedeutende Rolle ein (Panitch et al. 1980; Linthicum et al. 1981). Das Vorliegen von erhöhten Autoantikörper-Reaktionen suggeriert ein autoaggressives Verhalten dieser Immunglobuline und damit eine mögliche kausale Involvierung der Antikörper in den Pathomechanismus der jeweiligen Krankheit. Andere Arbeitsgruppen gehen jedoch davon aus, dass diesen Prozessen ursprünglich protektive Funktionen zukommen, die aufgrund einer Fehlregulation des Immunsystems schädigend wirken (Shoenfeld et al. 2005).

In das Bild der protektiven Autoimmunität passen sich auch Studien unserer Arbeitsgruppe ein, in denen bei Glaukumpatienten neben den erhöhten Reaktionen erstmals auch verminderte Autoantikörper-Reaktionen gefunden wurden, die einen Bezug zur Pathogenese der Krankheit zu haben scheinen, aber offensichtlich keine autoaggressive Wirkweise aufzeigen. Zu den hiervon betroffenen Antigenen gehören z.B. das saure Gliafaserprotein (GFAP) (Joachim et al. 2008a) oder Vimentin (Joachim et al. 2008a), zwei Intermediärfilamentproteine, die in Stresssituationen vermehrt gebildet werden (Lewis et al. 1989). Die pathomechanistische Bedeutung dieser geminderten Antikörper-Reaktionen ist bislang unklar, allerdings ist unter Berücksichtigung der These einer protektiven Autoimmunität (Tezel et al. 2004; Schwartz et al. 2005; Shoenfeld et al. 2005) möglicherweise von einem „Verlust“ dieser schützenden Mechanismen auszugehen, der die Progression schadhafter Prozesse begünstigt.

Die Frage, ob veränderte Autoantikörper-Reaktionen tatsächlich als Auslöser einer Glaukomerkrankung anzusehen sind oder erst epiphänomenal als Antwort auf den fortschreitenden Krankheitsprozess entstehen, ist nicht geklärt. Tezel und Wax ziehen

Einleitung

einerseits aus ihren Studien den Schluss, dass beispielsweise ein erhöhter HSP27-Autoantikörpertiter bei Glaukomerkrankungen aus einer allgemeinen Reaktion auf Gewebeschädigungen und Gewebestress resultieren könnte und damit lediglich zur Erkrankungsprogression beiträgt (Tezel et al. 1998; Wax et al. 1998). Andererseits zeigen ihre Studien, dass die Behandlung von retinalem Gewebe mit anti-HSP27 Antikörpern in apoptotischen Vorgängen von retinalen Zellen mündet (Tezel et al. 2000b), wodurch eine kausale Beteiligung an der Glaukopathogenese suggeriert wird. Yang et al. merken an, dass ein erhöhter Autoantikörpertiter gegen GST bei Glaukompatienten eine generelle Antwort auf den Stress durch neurodegenerative Prozesse und daher ein Sekundärfaktor sein könnte, der sich aber förderlich auf die optische Neuropathie auswirkt und damit die Erkrankung verstärkt (Yang et al. 2001). Maruyama et al. hingegen untersuchten die Wirkung der neuronenspezifischen γ -Enolase im Tiermodell und konnten nach der intravitrealen Injektion reiner anti- γ -Enolase-Antikörper eine deutlich erhöhte Apoptoserate von retinalen Ganglienzellen (engl. *retinal ganglion cells*, RGCs) nachweisen, was, wie auch in anderen Studien zu sehen ist (Tezel et al. 2000b), auf eine kausale Rolle der Antikörper hinweist (Maruyama et al. 2002b). Unterstützt wird die Theorie einer kausalen Bedeutung der Autoantikörper durch die Arbeit von Joachim et al., die anhand eines experimentellen, autoimmunen Glaukom-Tiermodells zeigen konnten, dass die Immunisierung von Ratten mit verschiedenen okularen Antigenen zu einem graduellen Verlust an retinalen Ganglienzellen führt (Joachim et al. 2009). Darüber hinaus konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass sich nicht nur die Antikörperreaktionen gegen dasjenige Antigen verändern, mit dem immunisiert wurde, sondern auch zahlreiche Reaktionen gegen andere Antigene.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass anhand zahlreicher Studien eindeutig Veränderungen der natürlichen, Antikörper-basierenden Autoimmunität bei Glaukompatienten belegt werden konnten. Es kann aber nicht von einer „klassischen“ Autoimmunkrankheit ausgegangen werden, die sich durch ausschließlich erhöhte Antikörper-Reaktionen auszeichnet, da auch geminderte Reaktionen festgestellt werden konnten. Die detektierten Veränderungen konnten sowohl im Blut der Patienten nachgewiesen werden als auch in einer okularen Flüssigkeit, dem Kammerwasser. Inwieweit diese beiden Körperflüssigkeiten hinsichtlich ihrer Antikörper-basierenden Immunprozesse Gemeinsamkeiten aufweisen, ist bislang ungeklärt. Desweiteren ist ungeklärt, ob die anormalen Autoantikörper-Reaktionen mit Veränderungen im Retinaproteom der Patienten korrelieren, da diese die Immunreaktionen möglicherweise

beeinflussen und eventuell begünstigen. Die wenigen bislang vorliegenden Erkenntnisse zu Proteomveränderungen in der Retina von Glaukompatienten werden im folgenden Kapitel besprochen.

1.5 Proteomveränderungen in der Retina und oxidativer Stress

Die Pathogenese des Glaukoms ist neben den besprochenen immunologischen Aspekten sehr wahrscheinlich auch mit Proteinexpressionsunterschieden bzw. anderweitigen Proteomveränderungen der betroffenen Gewebe (der Retina und dem Sehnervkopf) assoziiert (Tezel et al. 2005). Definiert ist der Begriff „Proteom“ als die Proteinzusammensetzung eines biologischen Materials unter einem spezifischen Umstand. Er kann sich sowohl auf einzelne Zelle beziehen als auch auf ein Gewebe oder auch einen gesamten Organismus (Wasinger et al. 1995; Wilkins et al. 1996a; Wilkins et al. 1996b; Wilkins et al. 1996c). Das Retinaproteom umfasst somit die Gesamtheit aller in diesem Gewebe vorliegenden Proteine.

Die Retinaproteomveränderungen bei Glaukompatienten sind vermutlich zum Teil auf die progradienten apoptotische Prozesse zurückzuführen, könnten potenziell aber auch kausal an der retinalen Neurodegeneration beteiligt sein. So könnten Veränderungen in der Expressionsrate bestimmter Schlüsselproteine vorliegen, die einen starken Einfluss auf die Integrität der jeweiligen Zelle bzw. des Gewebes haben. Auch sind Veränderungen denkbar, welche den Status der posttranslationalen Proteinmodifikationen betreffen. Posttranslationale Modifikationen (PTMs) sind Protein- bzw. Aminosäureveränderungen, die entweder nach der Translation gezielt angebracht werden, aber zum Teil auch willkürlich, z.B. durch krankheitsbedingte Prozesse oder Umwelteinflüsse, auftreten. Sie können eine Veränderung der Proteinstruktur, der Bindungseigenschaften und der Aktivität der betroffenen Proteine (Lipton et al. 2007) sowie auch eine Veränderung von Antikörperaffinitäten bewirken, welche eine potenzielle Immunantwort stark beeinflussen kann (Doyle et al. 2001). Als Urheber möglicher, für die Pathogenese des Glaukoms relevanter, PTMs liegt ein besonderes Augenmerk bei den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die in vielen Fällen für krankheitsassoziierte posttranslationale Proteinmodifikationen verantwortlich sind und denen gerade bei Alterungsprozessen eine bedeutende Rolle zufällt. ROS werden in verstärktem Maße als Nebenprodukte des Zellstoffwechsels in den Mitochondrien gebildet, wenn eine Unterversorgung des Gewebes vorliegt - ein Phänomen, das auch in der Retina auftreten kann, speziell im Zusammenhang mit glaukomatösen Erkrankungen (Flammer et al. 2002). Obwohl ROS essentielle Funktionen in der Zellkommunikation

übernehmen, können sie beim Vorliegen erhöhter Konzentrationen zelluläre Makromoleküle wie DNA, Proteine und Lipide schädigen und somit eine pathogene Wirkung entfalten. In Verbindung mit der Entstehung neurodegenerativer (Andersen 2004; Lipton et al. 2007; Reynolds et al. 2007) und autoimmuner (Kurien et al. 2006) Erkrankungen wird dieses Phänomen verstärkt diskutiert und mittlerweile auch zunehmend mit der Neurodegeneration retinaler Ganglienzellen in Verbindung gebracht. Hier wird als Konsequenz des oxidativen Stresses vor allem eine oxidative Schädigung von Proteinen vermutet, die in einer Verstärkung apoptotischer Vorgänge in der Retina und einem damit einhergehenden RGC-Verlust liegt (Tezel 2006).

Eine weitere Form der posttranslationalen Modifikation, die in den letzten Jahren in Zusammenhang mit der Initialisierung und Progression von Krankheiten gebracht wurde, stellen Glykosylierungen dar, hier speziell Autoimmunerkrankungen, wie z.B. die rheumatischen Arthritis (Axford et al. 2003; Alavi et al. 2008a; Alavi et al. 2008b). Die Arten der Glykomodifikationen sind divers und können innerhalb der Pathomechanismen von Erkrankungen von kausaler Bedeutung sein (Alavi et al. 2008a). So können Glykomodifikationen z.B. neue Autoantigene hervorbringen oder auch Antigene maskieren, die ansonsten vom Immunsystem erkannt würden (Chui et al. 2001; Doyle et al. 2001). Im Hinblick auf die Glaukomerkrankungen liegen hierzu bislang nur wenige Erkenntnisse vor, die aber auf das verstärkte Auftreten von Glykomodifikationen in den Retinae von Glaukompatienten hinweisen (Tezel et al. 2007a).

Auch hinsichtlich der Analyse von Proteinexpression in den Retinae von Glaukompatienten liegen bislang nur wenige Erkenntnisse zu möglichen Veränderungen vor, die darüber hinaus fast ausschließlich anhand von tierexperimentellen Studien generiert wurden. Bislang wurde jedoch in keiner Studie ein umfassender Vergleich der Proteinzusammensetzung der Retinae von Glaukompatienten und gesunden Probanden durchgeführt, so dass bis auf wenige Einzeldaten keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche Prozesse sich tatsächlich im humanen Auge während der Glaukopathogenese auf Ebene des Proteoms abspielen.

1.6 Analyse von Antikörper-Reaktionen mittels Protein-Microarrays

Hinsichtlich der vermuteten autoimmunen Komponente bei der Pathogenese des Glaukoms stand in den vergangenen Jahren vor allem die Untersuchung von Autoantikörper-Reaktionen im Fokus zahlreicher Studien (vgl. 1.4). Die Analyse dieser Antikörper-basierender Immunprozesse in Körperflüssigkeiten bedarf dabei einer

Einleitung

Methodik, mit deren Hilfe die Reaktionen zwischen Antigenen und Antikörpern visualisiert werden können. Als klassischer Ansatz gilt das in den 1970er bzw. den frühen 1980er Jahren entwickelte (Towbin et al. 1979; Burnette 1981) Western-Blotting, bei dem eine zuvor mittels Gelelektrophorese aufgetrennte Proteinprobe auf eine Membran überführt und somit immobilisiert wird. Im Anschluss kann eine Beprobung mit antikörperhaltigen Lösungen erfolgen, die beispielsweise dazu dient, Patientenproben, wie Blut oder Kammerwasser, hinsichtlich ihrer Antikörper-Reaktionen zu untersuchen (Elkon et al. 1984; Joachim et al. 2007b). Eine weitere Methode zur Analyse von Antikörper-Reaktionen, die bereits in den frühen 1970er Jahren entwickelt wurde, stellt der Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) dar, der einem ähnlichen Funktionsprinzip unterliegt wie der Western-Blot, bei dem jedoch aufgereinigte Antigene verwendet werden (Tsuruya et al. 1991; Geen et al. 2004). Sowohl das Western-Blot-Verfahren, als auch das des ELISAs weist jedoch entscheidende Nachteile auf, welche die Nutzung dieser Methoden für den Einsatz in klinischen Studien mit hohen Patientenzahlen unattraktiv werden lässt. So kann mittels des ELISA-Verfahrens immer nur eine Antigen-Antikörperreaktion pro Ansatz untersucht werden, wodurch ein breit angelegtes Screening nach einer Vielzahl von Autoantikörper-Reaktionen nur unter hohem Laboraufwand sowie einem hohen Verbrauch an Probenmaterial durchführbar ist. Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens ist es zwar möglich, innerhalb eines Versuchsansatzes komplexe Probengemische hinsichtlich ihrer Reaktivität mit Autoantikörpern aus Patientenproben zu analysieren, die Identifizierung der jeweiligen Antigene kann jedoch wiederum nur durch den Einsatz anderer laborintensiver Methoden wie der Massenspektrometrie erfolgen. Da hier zusätzlich die Zuordnung der identifizierten Antigene zu den jeweiligen Banden des Western-Blots eine gewisse Problematik darstellt, entbehrt der Western-Blot-Ansatz einer hohen Spezifität, wie sie bei der Verwendung des ELISA-Verfahrens gegeben ist.

Als Ausweg bietet sich der in den letzten Jahren verstärkt für die Analyse von Antikörper-basierenden autoimmunen Prozessen verwendete Protein-Microarray an. Die Methodik des Microarrays wurde in den 1990er Jahren etabliert (Schna et al. 1995) und seitdem für die Durchführung von zahlreichen Genomstudien genutzt. Der Vorteil der Arraytechnologie besteht darin, dass große Anzahlen verschiedener Analyten (bis zu mehreren Hunderttausend) auf eine Objektträgeroberfläche aufgebracht und dadurch simultan getestet werden können. Der Verbrauch an Probenmaterial sowie der Laboraufwand werden hierdurch stark reduziert (Schna et al. 1995). Zu Beginn des neuen

Einleitung

Jahrtausends wurde dieses Verfahren auch für die Analyse von Antigen-Antikörper-Reaktionen adaptiert (Joos et al. 2000; Haab 2001; Haab et al. 2001). Bei dieser Technologie werden die zu untersuchenden Antigene auf einer Objektträgeroberfläche immobilisiert und anschließend mit der zu untersuchenden Probe inkubiert, so dass die Probenantikörper an ihre Zielstrukturen binden können. Die Detektion der an die Antigene gebundenen Antikörper erfolgt über einen Zweitantikörper, an den in den meisten Fällen kovalent ein Fluorophor gebunden ist, z.B. Cyanin 3 oder Cyanin 5. Diese Substanzen emittieren nach Anregung bei jeweils definierten Wellenlängen Licht und machen durch die Verwendung von geeigneten Geräten (z.B. einem konfokalen Laserscanner) die Dokumentation der auftretenden Fluoreszenzsignale möglich.

Das methodische Prinzip, welches dem Protein-Microarray-Verfahren zugrundeliegt, ist somit sehr stark an die Verfahren des Western-Blots oder des ELISAs angelehnt. Es bietet jedoch den Vorteil, dass im Vergleich zum Western-Blot spezifische Antigene analysiert und im Vergleich zum ELISA eine große Anzahl von Antigenen simultan hinsichtlich ihrer Reaktivitäten mit Antikörpern untersucht werden kann. Aufgrund dieser Vorteile rückte die Technologie sehr schnell in den Fokus von Arbeitsgruppen, die sich mit der Analyse von Autoimmunerkrankungen befassen (Robinson et al. 2002a; Robinson et al. 2002b). Die vielen Beiträge und Diskussionen, die seitdem zu diesem Thema entstanden sind, zeigen, welche Bedeutung dieser methodischen Alternative zu den klassischen Verfahren beigemessen wird und welche Perspektiven darin gesehen werden (Cahill 2001; Liotta et al. 2003; Hultschig et al. 2006). Genutzt wurde die Technologie mittlerweile für die Autoantikörperanalyse und Identifizierung von Biomarkern bei verschiedensten Erkrankungen. So untersuchte man mit dieser Methode unter anderem Serumproben von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie dem Lupus erythematodes (Li et al. 2007) oder rheumatoider Arthritis (Hueber et al. 2005), aber auch Proben von Tumorpatienten, die beispielsweise an einem Kolonkarzinom (Nam et al. 2003), an Prostatakrebs (Bouwman et al. 2003; Forrester et al. 2007) oder einem Ovarialkarzinom (Hudson et al. 2007) leiden.

Es kann festgehalten werden, dass Protein-Microarrays ein zukunftssträchtiges Verfahren darstellen, mit dem unter vergleichsweise geringem labortechnischen Aufwand große Probenaufkommen gegen eine Vielzahl von potenziellen Antigenen getestet werden können. Die Nutzung dieses Verfahrens für die Bearbeitung der Fragestellungen, die sich hinsichtlich der Autoantikörper-basierenden Immunprozesse im Rahmen der Glaukompathogenese ergeben, ist somit naheliegend.

1.7 Proteinanalyse mittels Antikörper-Microarrays

Eine weitere Microarray-Technologie, die für die Erforschung des Glaukoms und seine möglichen Pathomechanismen interessante Möglichkeiten bietet, stellt der Antikörper-Microarray dar. Mit dieser Methode können gezielt die Mengen zahlreicher, spezifischer Proteine simultan bestimmt werden (Cahill 2001). In Bezug zu den angesprochenen Proteomveränderungen in der Retina von Glaukompatienten bietet sich so die Möglichkeit, die Parameter interessant scheinender Proteine fokussiert zu erfassen und eine Aussage über deren mögliche Relevanz für die Pathogenese zu treffen.

Prinzipiell ist der Antikörper-Microarray dem Protein-Microarray sehr ähnlich, nur dass hier auf der Objektträgeroberfläche keine Antigene zur Anwendung kommen, sondern Antikörper, mit deren Hilfe die Zielproteine aus einem Proteingemisch isoliert werden (Schweitzer et al. 2002). Wie bei den Protein-Microarrays ist es auch bei den Antikörper-Microarrays möglich, zahlreiche verschiedene Analyte gleichzeitig hinsichtlich ihrer Abundanz zu untersuchen. Dies stellt einen grundsätzlichen Unterschied zu dem herkömmlichen ELISA-Verfahren dar. Um die „eingefangenen“ Proteine zu detektieren, können verschiedene Strategien verfolgt werden, die auf der indirekten oder der direkten Visualisierung der gebundenen Proteine basieren. Für die indirekte Visualisierung wird der Microarray nach erfolgter Probeninkubation mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern versetzt, welche gegen diejenigen Proteine gerichtet sind, die mittels des Microarrays analysiert werden sollen (Haab et al. 2004). Hierbei ist darauf zu achten, dass der Zweitantikörper ein anderes Epitop des Zielproteins erkennt als der auf dem Objektträger aufgebrachte Antikörper, der für das „Einfangen“ der Proteine zuständig ist. Dadurch wird ein Konkurrieren der Antikörper um die Bindestelle verhindert. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die meist höhere Sensitivität im Vergleich zu direkten Detektionsverfahren (Haab et al. 2004).

Die Notwendigkeit eines Zweitantikörpers kann mittels der Strategie der direkten Detektion umgangen werden. Bei diesem Verfahren werden die Probenproteine vor der Inkubation auf dem Array über eine kovalente Bindung (z.B. über einen N-Hydroxysuccinimide-Ester) mit einem Fluorophor versehen, wodurch deren Detektion möglich ist (Angenendt 2005). Als Vorteile dieses Verfahrens sind im Vergleich zu der indirekten Visualisierung die Kostenersparnis durch die Vermeidung spezifischer Zweitantikörper sowie der geringere Zeitaufwand zu nennen.

Die Antikörper-Microarrays stellen folglich eine Methode dar, mit denen die fokussierte Analyse von Probenproteinen durchgeführt werden kann. Neben der Bestimmung von

Proteinmengen ermöglicht dieses Verfahren beispielsweise die Detektion von posttranslationalen Modifikationen (Kodadek 2002) oder auch die Analyse von Kinasesubstraten und somit die Entschlüsselung von Signaltransduktionskaskaden (Nielsen et al. 2003). Limitiert wird die Methode durch die Verfügbarkeit von geeigneten Antikörpern. So ist beispielsweise zur Zeit kein Array verfügbar, der die Analyse des gesamten humanen Proteoms erlaubt (Hober et al. 2008), sondern nur spezifischer Subproteome, deren Proteine beispielsweise in die Steuerung des Zellzykluses involviert sind (Kopf et al. 2005). Hinsichtlich des Glaukoms liegen bislang keine Proteinexpressions-Daten vor, die mittels Antikörper-Microarray generiert wurden - weder die von tierexperimentellen, noch von humanen Proben.

1.8 Explorative Proteomanalysen und Massenspektrometrie

Eine Ergänzung zu der fokussierten Proteinanalyse stellt die explorative Proteinanalyse dar, die fast ausschließlich durch massenspektrometrische Verfahren erfolgt. Hierbei steht nicht die spezifische Analyse einzelner Komponenten und ihrer jeweiligen Funktion im Vordergrund, sondern die detaillierte Erfassung des Gesamtbildes bestimmter Makromoleküle eines Organismus (Patterson et al. 2003). Für die Untersuchung von Vorgängen auf Proteinebene in der Retina von Glaukompatienten bietet dieser Ansatz somit die Möglichkeit, eine Proteinanalyse ohne subjektive Beeinflussung des Experimentators, wie z.B. die Auswahl der zu untersuchenden Proteine beim Antikörper-Array, durchzuführen. Hierdurch wird der Faktor eines möglichen Übersehens von relevanten Proteinen vermindert.

Der Ursprung der explorativen Herangehensweise an die verschiedensten Fragestellungen ist grundsätzlich in der Fachrichtung der Genomik zu suchen, jedoch wurde dieser Ansatz im Laufe der Zeit auch auf die Ebene des Proteoms ausgedehnt (MacCoss et al. 2001). Im Gegensatz zum Genom, welches unter biophysikalischen Gesichtspunkten überwiegend als relativ starres und konstantes Gebilde anzusehen ist und somit in jeder Zelle eines Organismus mehr oder weniger identisch vorliegt, weist das Proteom eine vielfach höhere Diversität auf. So können durch zelluläre Vorgänge zu denen u.a. das Alternative-Spleißen bei der Transkription oder posttranslationale Modifikationen zählen, verschiedenste Formen eines Proteins generiert werden, die auf nur eine DNA-Sequenz zurückzuführen sind (Harrison et al. 2002). Desweiteren werden in funktional unterschiedlichen - z.B. epidermalen oder neuronalen - Zellen zum Teil völlig unterschiedliche Proteine exprimiert, so dass sich innerhalb eines Organismus eine Vielzahl spezifischer Subproteome ergibt.

Verfahren der Probenaufbereitung

In bioanalytischer Hinsicht stellt die enorme Komplexität des Proteoms eine besondere Herausforderung für die durchzuführenden Analysen dar. So stellen beispielsweise im Blutplasma einige wenige Proteine, wie Immunglobuline, Albumin oder Transferrin, mehr als 95% der Proteingesamtmenge - bei einer Gesamtzahl von bis zu 50.000 Proteinen und Peptiden (Anderson et al. 2002). Dadurch liegt neben den wenigen hoch abundanten Proteinen auch eine sehr hohe Anzahl an Proteinen vor, welche in extrem geringen Konzentrationen vorhanden sind (Anderson et al. 2002; Hortin et al. 2009). Ihre Signale würden bei der Analyse einer nativen Probe unweigerlich von denen der hoch-abundanten „überstrahlt“ (Steel et al. 2003). Um dieser Problematik Rechnung zu tragen, kommt für die Analyse von komplexen Proteingemischen in den meisten Fällen ein zweistufiger Ansatz zur Anwendung, bei dem zuerst eine Isolierung und Fraktionierung der Probenproteine erfolgt und anschließend deren Identifizierung.

Einen der erfolgreichsten Ansätze zur Fraktionierung von komplexen Proteinproben stellt die zweidimensionale Gel-Elektrophorese dar, bei der Proteine sowohl nach ihrer Ladung als auch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Klose 1975; O'Farrell 1975). Mit diesem Ansatz kann die Vereinzelung und Detektion von mehreren tausend Proteinen erreicht werden (Gorg et al. 1988; Rabilloud 1996; Gorg et al. 1997). Ein Problem dieses Verfahrens für die Durchführung von Studien mit hohem Probenaufkommen stellt jedoch nach wie vor die fehlende Reproduzierbarkeit der Auftrennungen dar.

Ein weiterer sehr verbreiteter Ansatz liegt in der sogenannte Shotgun Proteomics vor, bei der das Probenmaterial zuerst vollständig proteolytisch verdaut wird und im Anschluss die resultierenden Peptide mittels eines multidimensionalen Verfahrens (z.B. 2D-HPLC, engl. *high pressure liquid chromatography*) aufgetrennt werden (Link et al. 1999; Wolters et al. 2001). Ein Vergleich verschiedener Proben erfolgt hierbei also nicht mehr auf der Ebene des intakten Proteoms, sondern auf der Ebene des daraus resultierenden Peptidoms. Als Vorteil dieser Methodik ist die bemerkenswert hohe Auflösung bzw. Separation der einzelnen Peptide anzusehen, die sich in der Anzahl der identifizierten und quantifizierten Proteine niederschlägt (Zanivan et al. 2008). Negativ wirkt sich jedoch auch hier die mangelnde Reproduzierbarkeit der Daten sowie der hohe Labor- und Zeitaufwand aus, wodurch die Bearbeitung von Studien mit hohen Probenanzahlen stark beeinträchtigt und erschwert wird.

Massenspektrometrie

Die Identifikation der jeweils interessanten Proteine erfolgt heutzutage fast ausschließlich über massenspektrometrische Ansätze. Das Prinzip dieser Technologie beruht darauf, die zu analysierenden Makromoleküle (z.B. Peptide, Proteine) zu ionisieren, in einem elektrischen Feld zu beschleunigen und ihre Massen mit Hilfe eines Detektors zu ermitteln. Im Anschluss können die detektierten Massen mit einer Datenbank abgeglichen werden, woraus im Idealfall die eindeutige Identifizierung des jeweiligen Proteins hervorgeht. Sowohl für die Ionisierung als auch für die räumliche Separation und Detektion der Massen stehen dabei verschiedene Technologien zur Verfügung. Als Ionisierungsquellen sind u.a. die MALDI-Technologie (engl. *matrix assisted laser desorption ionization*) sowie das ESI-Verfahren (engl. *electrospray ionization*) zu nennen, welches auf der Einspritzung einer liquiden Probe in ein elektrisches Feld basiert (Fenn et al. 1989). Die 1989 zeitgleich von Karas (Karas et al. 1988) und Tanaka (Tanaka et al. 1988) entwickelte MALDI-Technologie beruht darauf, die zu analysierenden Moleküle durch Kokristallisation mit einer Matrixsubstanz in einen Kristall einzubetten und nach Laserbeschuss in die Gasphase zu desorbieren. Als Matrixsubstanzen werden dabei Moleküle verwendet, die zum einen zur Kokristallisation befähigt sind und zum anderen UV-absorbierende Eigenschaften sowie eine Säurefunktion aufweisen. Häufig verwendete Matrixmoleküle stellen beispielsweise die α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA) oder die Sinapinsäure dar (Kraj et al. 2008). Nach erfolgter Kristallisation kommt es durch den Beschuss mit einem UV-Laser (N_2 -Laser, 337 nm) zu einer Anregung des π -Elektronensystems der Matrixmoleküle, deren Absorptionsmaximum bei der eingestrahlten Wellenlänge liegt. Die gespeicherte Energie wird dann durch eine Relaxierung in das Festkörpergitter des Matrix-Analytkristalls übertragen, wodurch es zu einer explosionsartigen Freisetzung der Matrix und der Analytmoleküle in die Gasphase kommt. Zusätzlich erfolgt bei diesem Desorptionsvorgang die Übertragung eines Wasserstoffatoms der protonierten Matrixmoleküle auf die Analytmoleküle, so dass in der Regel einfach geladene Ionen entstehen. Die in der Gasphase vorliegenden Analyt- und Matrixionen werden anschließend in einem elektrischen Feld von 100 bis zu mehreren 1000 V beschleunigt und so dem nachfolgenden Teil des Massenspektrometers zugeführt (Lottspeich et al. 1998).

Ein Verfahren der Massendetektion, das häufig mit der MALDI-Ionisation kombiniert wird, stellt die Ionenfalle dar. Bei diesem Verfahren erfolgt die räumliche Separation der einzelnen Analyten eines Analytgemisches über die Stabilität der Resonanzfrequenzen

der Analytione, die sich in einem oszillierenden elektrischen Feld befinden (Paul et al. 1953). Aufgebaut ist die Ionenfalle aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen, an denen eine Wechselspannung angelegt wird, wobei die Endkappen jeweils eine kleine Öffnung aufweisen, die dem Ein- und Austritt der Ionen dient (Abb. 4A). Die Analytione werden aus der Ionenquelle in die Ionenfalle injiziert, hier aufgrund der anliegenden Gleich- und Wechselspannungen auf einer stabilen Flugbahn gehalten und somit im elektrischen Feld „eingefangen“ (Lottspeich et al. 1998).

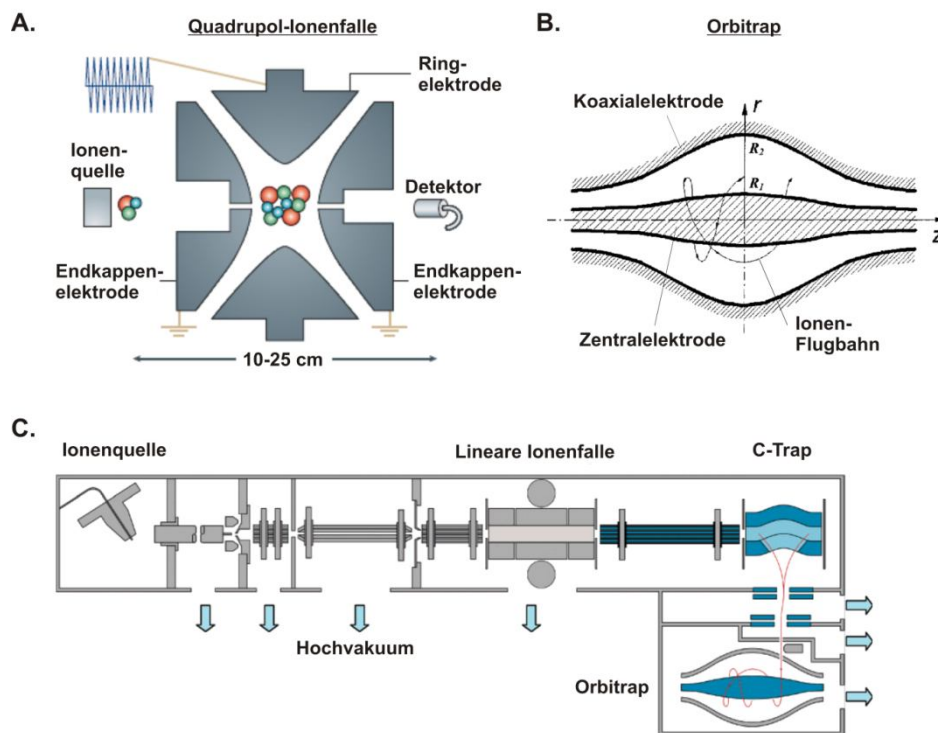


Abb. 4A: Schematische Darstellung einer Ionenfalle (Glish et al. 2003); **B)** Aufbau eines Orbitrap-Massenspektrometers (Makarov 2000); **C)** Schema des LTQ-Orbitrap Massenspektrometers. Als Ionisationsquelle dient in dieser Abbildung eine ESI-Quelle. Die Ionen werden nach Verlassen der Ionenquelle in einem Oktapol gebündelt und der linearen Ionenfalle zugeführt. Um den zweiten Massenanalysator des Hybridmassenspektrometers zu nutzen, werden die Ionen an die C-Trap weitergeleitet, hier gebündelt und an die Orbitrap übergeben (Yates et al. 2006).

Zur Ermittlung der Molekülmassen werden die Analytmoleküle mit ansteigendem Molekulargewicht aus der Ionenfalle injiziert und mittels eines Elektronenvervielfachers nachgewiesen. Die Ejektion der Ionen kann durch eine Steigerung der in der Ionenfalle anliegenden Wechselspannung erreicht werden, durch welche die Ionen aus ihren Flugbahnen gedrängt werden und somit die Ionenfalle verlassen. Eine schnellere Methode stellt die Kopplung bzw. die Überlagerung des quadrupolaren Feldes der Ringelektrode mit dem dipolaren Feld der Endkappen dar, wodurch ein sogenanntes Multipolfeld entsteht. Innerhalb dieses Multipolfeldes können die Analytione resonant

Einleitung

Energie aufnehmen, so dass sie zu größeren Schwingungen befähigt werden, extrem schnell ihre stabile Flugbahn verlassen und damit aus der Ionenfalle katapultiert werden (Schwartz et al. 2002a). Bei beiden Varianten erfolgt die Bestimmung der Molekülmasse anhand der angelegten Spannung, welche für die Ejektion des Analyts notwendig ist. Die für die Ejektion einer spezifischen Masse notwendige Voltzahl wird im Rahmen der Gerätekalibrierung ermittelt (Lottspeich et al. 1998).

Eine Weiterentwicklung der Ionenfallen-basierenden Massenspektrometrie stellt die von Makarov entwickelte Orbitrap dar (Makarov 2000). Bei diesem Massenspektrometer handelt es sich um eine elektrostatische Ionenfalle, bei der die Fourier Transformation für die Generierung der Massenspektren angewandt wird. Zentrale Bestandteile dieses Analysators sind eine spindelförmige Elektrode sowie eine diese umgebende koaxiale Elektrode. Ionen, die durch eine Öffnung in der äußeren Elektrode tangential in das elektrostatische Feld eingeführt werden, bewegen sich aufgrund der elektrostatischen Anziehung auf verschlungenen Kreisbahnen (Orbits) oszillierend entlang der Z-Achse um die zentrale Elektrode (Abb. 4B) (Makarov 2000).

Die Schwingungen der Ionen erzeugen dabei in den Detektorplatten Signale, welche mittels Fourier Transformation zur Bestimmung der Molekülmasse bzw. der Masse/Ladungsverhältnisse genutzt werden (Hu et al. 2005). Ein großer Vorteil der Orbitrap-basierenden Massenspektrometrie ist die sehr hohe Auflösung, welche die der Ionenfallen oder anderer Massenanalysatoren um ein Vielfaches übertrifft (Hu et al. 2005; Makarov et al. 2006). Hierdurch wird eine wesentlich genauere Massenbestimmung der Analytionen ermöglicht, deren Abweichung für Standardpeptide bei lediglich 1-3 ppm liegt (Yates et al. 2006). Ein Nachteil dieses Verfahrens liegt in der geringeren Sensitivität gegenüber dem zuvor beschriebenen Verfahren, so dass mehr Analytionen zur Erstellung der Massenspektren benötigt werden. Desweiteren liegt die Messzeit pro Zyklus bei solch hoch auflösenden Messungen weit über derjenigen, welche für eine Ionenfallennmessung benötigt wird (Yates et al. 2006). Aus diesem Grund werden Orbitrap-Massenspektrometer in den meisten Fällen mit einer vorgeschalteten Ionenfalle versehen. Der Vorteil dieses Hybridmassenspektrometers besteht darin, dass für die Messungen einerseits die hohe Auflösung des Orbitrap-Analysators und andererseits die sensitive und schnelle Massendetektion der Ionenfalle zu Verfügung stehen. Das Prinzip dieses Hybridmassenspektrometers ist in Abb. 4C veranschaulicht.

Die hier vorgestellten Verfahren der Massenspektrometrie erlauben die exakte Massenbestimmung von Analytmolekülen. Da dies allein jedoch für die Identifizierung eines

Einleitung

Proteins nicht ausreichend ist, werden diese häufig vor der Messung mit spezifischen Proteasen, z.B. Trypsin, hydrolysiert und die Molekulargewichte der generierten Peptide massenspektrometrisch ermittelt (MS-Analyse). Das Muster der detektierten Peptidmassen stellt den für jedes Protein spezifischen *peptide mass fingerprint* (PMF) dar (Schachner et al. 1971; James et al. 1993), über welchen durch Abgleich mit einer geeigneten Datenbank, wie z.B. Swiss-Prot (Boeckmann et al. 2003), eine Identifizierung des Proteins möglich wird.

Eine weitere Möglichkeit der Proteinidentifizierung ist durch eine Form der massenspektrometrische Sequenzierung tryptischer Peptide gegeben (MS/MS-Analyse). Hierbei werden die Ziel-Peptidionen vom Rest des Analytgemisches separiert, fragmentiert und anschließend die Massen der entstandenen Bruchstücke ermittelt. Anhand der Peptidfragmentmassen kann über verschiedene Software-Algorithmen die genaue Aminosäuresequenz des Peptids festgestellt werden, welche einen Datenbankabgleich und damit eine Identifizierung des Proteins ermöglicht (de Hoffmann et al. 2007). Die Isolierung der zu fragmentierenden Zielmassen erfolgt bei den Ionenfallen über das Anlegen einer Spannung, die nur dem Zielmolekül eine stabile Flugbahn und somit den Verbleib in der Falle ermöglicht. Für die Fragmentierung der Peptide stehen heutzutage mehrere Technologien zur Verfügung. Hierzu gehören der *post source decay* (PSD), dessen Prinzip auf der spontanen Fragmentierung von metastabilen Peptiden beruht (Purcell et al. 2001), die *collision-induced dissociation* (CID), bei der ein inertes Stoßgas für die Fragmentierung verwendet wird (McReynolds et al. 1977; Biemann 1990; Wells et al. 2005) oder auch die *higher-energy collisional dissociation* (HCD) (Biemann 1990), bei der zusätzlich zum Stoßgas eine hohe Spannung angelegt wird. Die Fragmentierung stellt einen Strangbruch der Aminosäureketten dar, welcher vornehmlich an den Peptidbindungen erfolgt, wodurch die sogenannten b- und y-Ionen entstehen.

Bislang wurde die MALDI-basierende Massenspektrometrie vor allem für die Identifikation von Proteinen aus 2D-Gelen verwendet, sie lässt sich aber auch in Verbindung mit einer Vorfraktionierung, z.B. mittels HPLC, für die Analyse komplexer Proben nutzen. Häufig werden mittlerweile auch dreidimensionale Fraktionierungsstrategien verfolgt, bei denen beispielsweise eine isoelektrische Fokussierung von Proteinen in der ersten Dimension mit einer zweidimensionalen HPLC-Auftrennung kombiniert wird (Hubner et al. 2008). Ziel dieser Ansätze ist es, eine möglichst hohe Fraktionierung der Probenproteine zu erreichen, um möglichst viele Information aus dem vorliegenden Probenmaterial zu gewinnen. Trotz der enormen

Einleitung

technischen Verbesserungen sowie der Fortschritte im Bereich der Probenaufbereitung, die einen großen Einfluss auf die Anzahl von identifizierten und quantifizierten Proteinen sowie auf die Reproduzierbarkeit der Daten haben, stehen die Proteomanalysen im Vergleich zu den Genomanalysen immer noch am Anfang und bedürfen einer weiteren Entwicklung. So ist es bislang mit keinem methodischen Ansatz möglich, alle Proteine eines Proteoms zu erfassen (Hober et al. 2008). Auch fehlen nach wie vor Strategien, die es ermöglichen, große Probenanzahlen vergleichend mittels massenspektrometrischer Methoden zu analysieren, da alle bisher entwickelten Verfahren nur unter einem extrem hohen Zeit- und Laboraufwand durchführbar sind.

Zu Glaukomerkrankungen liegen bislang kaum Daten vor, die auf einer explorativen Proteomanalyse basieren. Der Fokus der einzigen Studie hierzu, die an humanem Probenmaterial durchgeführt wurden, beschränkt sich dabei auf die Analyse posttranslationaler Glyko-Proteinmodifikationen (Tezel et al. 2007a). In tierexperimentellen Studien wurden darüber hinaus oxidative Modifikationen sowie Phosphorylierungsmuster von Retinaproteinen untersucht (Tezel et al. 2007b; Yang et al. 2008b). Eine grundlegende Analyse von Protein-Quantitäten in der Retina von Glaukompatienten im Vergleich zu organisch Gesunden steht somit noch aus, würde aber zweifellos zu einem besseren Verständnis der glaukomatösen Prozesse führen.

2 Zielsetzung

Zahlreiche Studien konnten in den vergangenen Jahren Veränderungen der Reaktivitäten verschiedener Autoantikörper bei Glaukompatienten nachweisen, die eine Beteiligung autoimmuner Prozesse an der Pathogenese der Erkrankung nahelegen. Bislang wurde für die Bearbeitung dieser Fragestellung fast ausschließlich ein Western-Blot-basierendes Verfahren eingesetzt, welches für die Durchführung von klinischen Studien mit großen Probandenzahlen aufgrund des hohen Laboraufwandes sowie der fehlenden Reproduzierbarkeit der Daten nur bedingt geeignet ist. Auch wurden in bisherigen Studien ausschließlich Gewebehomogenate als Antigenmaterial verwendet, wodurch eine Identifizierung der von den veränderten Immunreaktivitäten betroffenen Antigenen erschwert wurde. Wie unter 1.6 erläutert, stellt die Technologie des Protein-Microarrays eine attraktive Alternative zu dem herkömmlichen Western-Blot-Verfahren dar, die es ermöglicht, große Probenzahlen in kurzer Zeit zu bearbeiten und aufgereinigte Antigene zu verwenden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Protein-Microarray Plattform etabliert und für die Anwendung in klinischen Studien nutzbar gemacht werden. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse, welche für den Einsatz des Verfahrens zu diagnostischen Zwecken unabdingbar ist. Um eine hohe Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten, sollen die einzelnen Versuchsparameter optimiert sowie zwei verschiedene Technologien zur Herstellung von Protein-Microarrays miteinander verglichen werden. Darüber hinaus sollen verschiedene Methoden der Datenprozessierung getestet werden, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch eine unsachgemäße Bearbeitung zu verhindern.

Bei den bisher durchgeführten Analysen von Autoantikörper-Reaktionen von Glaukompatienten zeigte sich, dass die Veränderungen sowohl im Serum vorliegen als auch im Kammerwasser. Diese okuläre Körperflüssigkeit steht im Gegensatz zum Serum in direktem Kontakt mit der Retina. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass dem Auge die Fähigkeit zur Eigenmodulation immunologischer Vorgänge zugeschrieben wird, leitet sich hieraus die Fragestellung ab, inwieweit die detektierten Veränderungen im Serum und Kammerwasser miteinander korrelieren. Da bislang in keiner Studie ein direkter Vergleich der Serum- und Kammerwasser-Autoantikörper-Reaktivitäten an ein und demselben Patienten durchgeführt wurde, besteht ein Ziel dieser Arbeit darin, die beiden Körperflüssigkeiten intraindividuell zu vergleichen. Hierdurch soll neben der möglichen Korrelation Kenntnis darüber gewonnen werden, ob sich auch Autoantikörper

Zielsetzung

nachweisen lassen, die nur im Auge vorliegen und somit eine potenziell höhere Relevanz für die Glaukompathogenese haben. Eine starke Übereinstimmung der Autoantikörper-Reaktionen beider Körperflüssigkeiten würde die Spezifität der bisher detektierten Veränderungen im Serum der Patienten untermauern. Für die Analyse soll erstmals das im Rahmen dieser Arbeit zu entwickelnde Protein-Microarray-Verfahren eingesetzt werden. Es sind dabei sowohl Autoantikörper-Reaktivitäten gegen Antigene zu untersuchen, die schon in vorangegangenen Western-Blot-Studien als relevant für glaukomatöse Erkrankungen identifiziert wurden, als auch solche Antigene, die im Zusammenhang mit anderen autoimmunen oder neurologischen Erkrankungen stehen und noch nicht mit der Pathogenese des Glaukoms in Verbindung gebracht wurden.

Da die anormalen Autoantikörper-Reaktionen potenziell mit Veränderungen im Retinaproteom von Glaukompatienten korrelieren, bzw. durch diese beeinflusst werden, besteht ein weiteres Ziel dieser Arbeit in dem Vergleich der Retinae von Glaukompatienten mit denen von gesunden Kontrollprobanden auf Ebene des Proteoms. Wie in 1.5 dargelegt, weisen neueste Publikationen auf Proteomveränderungen in der Retina von Glaukompatienten hin, wobei hier vor allem oxidative Protein-Modifikationen detektiert wurden. Auch konnte eine verstärkte Synthese und Ablagerung von Komplementproteinen nachgewiesen werden. Ein grundlegender Vergleich des Retinaproteoms von Glaukompatienten mit dem von gesunden Kontrollprobanden wurde bislang jedoch noch nicht durchgeführt. Es ist somit derzeit unklar, ob in diesem Gewebe Veränderungen in der Expressionsrate von Proteinen vorliegen, die einen möglichen Einfluss auf die stattfindenden neurodegenerativen Prozesse haben und möglicherweise mit den veränderten Autoantikörper-Reaktionen der Glaukompatienten korrelieren. Um diese Fragestellung bearbeiten zu können, sind im Rahmen dieser Dissertation Verfahren zu entwickeln, welche sowohl eine fokussierte als auch eine explorative Analyse von Proteomen ermöglichen. Die fokussierte Analyse spezifischer Proteine soll dabei mittels des unter 1.7 beschriebenen Antikörper-Microarray-Verfahrens erfolgen. Im Fokus dieser Analyse stehen vor allem die verschiedenen Komponenten des Komplementsystems als auch Zytokine, für die in Tiermodellstudien eine Beteiligung am Untergang retinaler Ganglienzellen nachgewiesen werden konnte. Ziel ist es, Erkenntnisse darüber zu erlangen, ob neben den Veränderungen der Antikörper-basierenden Autoimmunität auch weitere Komponenten des humoralen Immunsystems, wie Komplementproteine oder Zytokine, bei Glaukompatienten Abweichungen in ihrer Abundanz gegenüber gesunden Probanden aufweisen.

Zielsetzung

Die explorative Analyse des Retinaproteoms soll mittels eines Massenspektrometrie-basierenden Verfahrens erfolgen. Das zu etablierende Verfahren zielt darauf ab, eine umfassende Proteomanalyse des Probenmaterials zu ermöglichen, gleichzeitig aber den für die Probenaufarbeitung notwendigen hohen Zeit- und Laboraufwand zu umgehen, der bei bisher gängigen Methoden vorliegt. Durch die Umsetzung des Verfahrens auf einen Pipettierroboter soll zusätzlich eine standardisierte und reproduzierbare Aufarbeitung der Proben erreicht werden. Ein weiteres Ziel besteht darin, in Zusammenarbeit mit Diplomanden der Bioinformatik der Fachhochschule Bingen ein Programm zu entwickeln, welches die Verwaltung sowie die Verarbeitung der anfallenden massenspektrometrischen Daten ermöglicht. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Entwicklung von Modulen und Algorithmen, welche die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen gewährleisten sollen. Ziel der explorativen Proteomanalyse ist der Vergleich der Retinaproteome von Glaukompatienten und Gesunden auf quantitativer Ebene. Hierdurch werden neue Erkenntnisse über mögliche krankheitsassoziierte Proteomveränderungen angestrebt.

3 Material und Methoden

Das Projekt gliedert sich in drei Teilbereiche:

1. Die Etablierung der Protein-Microarray-Technologie mit anschließender Autoantikörper-Analyse von Patientenproben (Serum und Kammerwasser).
2. Die Adaptation der Parameter des Protein-Microarray-Verfahrens für die Methodik des Antikörper-Microarrays und deren anschließende Anwendung für die Analyse von Proteinabundanz in Serum- und Retinaprobe.
3. Die Entwicklung einer Hochdurchsatzmethode für die massenspektrometrische Analyse klinischer Proben. Das etablierte Verfahren soll für den proteomischen Vergleich humaner Retinaprobe genutzt werden.

3.1 Autoantikörper-Analyse mittels Protein-Microarrays

3.1.1 Patientenproben

Die Patientenproben wurden unter Berücksichtigung der Deklaration des Weltärztebundes zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen (Deklaration von Helsinki) gesammelt. Darüber hinaus lag für das Durchführen der Studie eine Genehmigung der Ethikkommission (Landesärztekammer Rheinland Pfalz) vor. Verwendete Blut- und Kammerwasserproben stammen von Probanden, die vor der Probenentnahme über die geplante Verwendung des Probenmaterials informiert wurden und hierzu ihr Einverständnis gaben. Von jedem Patienten wurde eine Blutprobe sowie eine Kammerwasserprobe entnommen. Um zelluläre Bestandteile wie Erythrozyten, Leukozyten oder Thrombozyten aus den Vollblutproben zu entfernen, wurden diese nach der Entnahme bei RT für 10min bei 5000g zentrifugiert. Der abgesunkene Blutkuchen, welcher die zellulären Bestandteile enthält, wurde verworfen und das gewonnene Serum (Überstand) bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingelagert. Die Kammerwasserproben, welche im Fall der Kontrollpatienten während einer Katarakt-Operation und im Fall der Glaukompatienten im Rahmen einer Trabekulektomie oder Trabekulotomie entnommen wurden, sind ebenfalls direkt nach der Entnahme bei -80°C eingelagert worden. Alle in dieser Studie eingeschlossenen Patienten wurden in der Universitäts-Augenklinik Mainz einer umfassenden ophthalmologischen Untersuchung unterzogen. Hierzu gehörte u.a. die Bestimmung des Augeninnendrucks (Goldmann Tonometrie/Applanation), eine visuelle Untersuchung des Augenhintergrunds (engl. *optical coherence tomography*, OCT) sowie

die Untersuchung mit einem weiteren bildgebenden Verfahren, der Heidelberger Retina-Tomographie (HRT). Die Klassifizierung der Patienten erfolgte unter Berücksichtigung der Richtlinien der Europäischen Glaukomgesellschaft (EGS) (Society 2006). Insgesamt wurden in dieser Studie Proben von 68 Patienten verwendet, die sich in 31 Kontrollpatienten (CTRL, Durchschnittsalter: 73 ± 10) und 37 Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom (POAG, Durchschnittsalter: 67 ± 10) unterteilen. Kataraktpatienten, welche in Übereinstimmung mit anderen Studien (Vesaluoma et al. 1998; Berlau et al. 2001; Joachim et al. 2007b) in dieser Studie als Kontrollgruppe dienten, zeigten keine klinischen Anzeichen eines primären Offenwinkelglaukoms oder einer anderen Augenerkrankung neben dem Katarakt. Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom wiesen einen Augeninnendruck (IOD) von mehr als 21mmHg ohne Medikation auf, darüberhinaus glaukotypische Gesichtsfeldausfälle (bestimmt durch Perimetrie, OCTOPUS 101 Perimeter; Haag-Streit, Wedel, Deutschland) sowie eine glaukomatöse Papillenexkavation. Patienten mit neurologischen Erkrankungen, wie dem Morbus Alzheimer, dem Morbus Parkinson oder autoimmunen Erkrankungen, wurden von dieser Studie ausgeschlossen. Als weitere Ausschlusskriterien galten ein akuter Glaukomanfall, Diabetes mellitus, eine Retinopathie und jegliche andere Augenerkrankungen.

3.1.2 Aufbereitung der Antigene und Herstellung von Protein-Microarrays

Antigene

Ein Ziel dieses Projekts bestand in der Etablierung der Protein-Microarray-Technologie (vgl. 1.6), welche für die Analyse von Autoantikörper-Reaktionen genutzt werden sollte. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe (Grus et al. 1997; Grus et al. 1998b; Grus et al. 2003; Joachim et al. 2003; Grus et al. 2004; Joachim et al. 2005; Grus et al. 2006; Joachim et al. 2007b; Joachim et al. 2007a; Joachim et al. 2007c; Joachim et al. 2008a) konnten durch die Anwendung dieses Verfahrens erstmals aufgereinigte Proteine als potenzielle Antigene zur Analyse von Autoantikörper-Reaktionen verwendet werden. Der Reinheitsgrad der kommerziell erworbenen Antigene lag je nach Hersteller (Sigma-Aldrich, BioMol) und Produkt zwischen 93% und 99%. Die Auswahl und Zusammenstellung der Antigene für die Herstellung der Protein-Microarrays basierte auf Autoantigenen, die in früheren Studien der Arbeitsgruppe teilweise mittels eines Western-Blot-Ansatzes bei Glaukompatienten ermittelt werden konnten (Grus et al. 2003; Joachim et al. 2003; Grus et al. 2004; Joachim et al. 2005; Grus et al. 2006; Joachim et al. 2007b; Joachim et al. 2007c; Joachim et al. 2008a).

Weitere relevante Autoantigenidentifikationen anderer Arbeitsgruppen fanden ebenfalls Berücksichtigung (Haneji et al. 1997; Tezel et al. 1998; Maruyama et al. 2000; Wax et al. 2001; Yang et al. 2001; Maruyama et al. 2002a). Eine vollständige Liste der verwendeten Antigene ist im Anhang aufgeführt (Tab. 1). Als Positivkontrolle diente eine Mischung aus anti-humanen IgG/A/M-Antikörpern (Konzentration: 1mg/ml), als Negativkontrolle wurde PBS-Tr (PBS; 1,5% Trehalose) verwendet. Alle Antigene wurden in PBS-Tr-Puffer zu einer Endkonzentration von 1mg/ml verdünnt, wodurch sich optimale Spotting-Eigenschaften ergeben und ein schnelles Verdunsten der Antigenlösung verhindert wird.

Spotting

Zu Beginn des Projekts erfolgte ein Vergleich zweier verschiedener Spotting-Technologien hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit und Eignung für das Spotten von proteinhaltigen Lösungen. Zum Einsatz kamen das herkömmliche Pin-basierende Spotting-Verfahren sowie eine Piezoelement-basierende Technologie, bei der die Objektträgeroberfläche während des Druckvorgangs nicht berührt wird. Als Parameter für den qualitativen Vergleich der hergestellten Microarrays wurden die Spot-Morphologie sowie die Variabilität von technischen Replikaten unterschiedlicher Antigene herangezogen. Für das Drucken von Studien-Microarrays fand das Piezoelement-basierende, berührungsfreie Verfahren Verwendung. Von jedem Antigen wurden drei technische Replikate auf Nitrozellulose-beschichtete Objektträger aufgebracht. Die verwendeten Slides waren jeweils in 16 Subarrays unterteilt, so dass 16 verschiedene Patientenproben gleichzeitig auf einem Objektträger analysiert werden konnten. Der Spotting-Prozess fand bei RT und einer Luftfeuchtigkeit von 35% statt. Pro Spot wurde 1nl der antigenhaltigen Lösungen aufgebracht, die in jeweils viermal 250pl an exakt die gleiche Position appliziert wurden. Die Überwachung der Genauigkeit des Spotting-Volumens sowie der präzisen Positionierung der Tropfen erfolgte während des gesamten Spotting-Vorgangs mittels eines Kamera-basierenden Verfahrens und durch die Programme sciDrop-VOLUME und autodrop-detection.

3.1.3 Inkubation des Patientenmaterials auf Protein-Microarrays

Zwecks Analyse von Autoantikörper-Reaktionen der unter 3.1.1 aufgeführten Patientenproben wurden diese auf den hergestellten Protein-Microarrays inkubiert. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte fanden bei 4°C auf einem Schüttler statt. Eine schematische Darstellung des Arbeitsablaufs ist in Abb. 5 dargestellt.

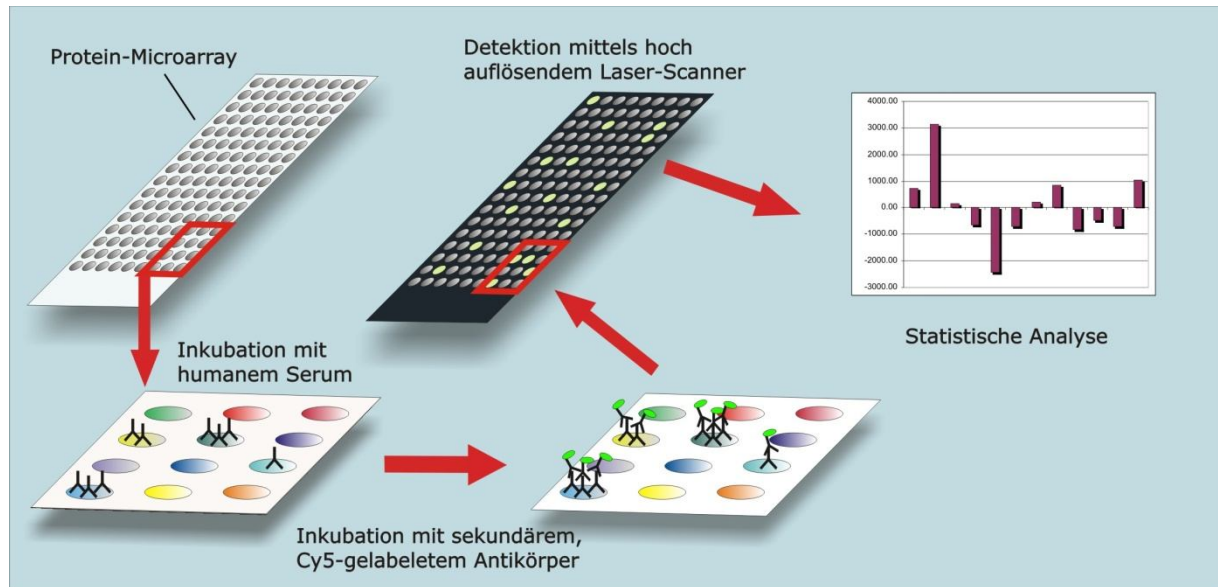


Abb. 5: Schematische Darstellung der Arbeitsabläufe eines Protein-Microarray-Versuchs. Die hergestellten Microarrays werden mit dem Probenmaterial inkubiert, wodurch die Antikörper an ihre Zielstrukturen binden. Im zweiten Schritt erfolgt eine Inkubation mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper, welcher die gebundenen Serumantikörper erkennt. Abschließend erfolgt die Detektion der Fluoreszenzsignale mittels eines Laserscanners sowie die statistische Auswertung der ermittelten Signale.

Die gedruckten Microarrays wurden mit einer Inkubationskammer versehen und anschließend für eine Stunde mit 4% bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Oberfläche zu maskieren. Im Anschluss erfolgte ein dreimaliges Waschen der Objektträger mit PBS-T (0,5% Tween in PBS), um ungebundene BSA-Moleküle zu entfernen. Alle Patientenserumproben wurden 1:250 in PBS verdünnt, die Kammerwasserproben in einem Verhältnis von 1:10 in PBS. Von jeder Verdünnung wurden 120 µl auf den vorbereiteten Microarrays inkubiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Proben randomisiert aufgetragen wurden. Die Inkubation des Patientenmaterials erfolgte über Nacht (12 h). Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS-T und in deren Anschluss die Inkubierung der Objektträger mit einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper (Cy5; 1:500 in PBS-T) für eine Stunde. Abschließend erfolgten zwei Waschschrte mit PBS-T, ein Waschschrte mit H₂O_{HPLC} sowie das Trocknen der Objektträger in einer Vakuumzentrifuge.

3.1.4 Visualisierung und Digitalisierung der Autoantikörper-Antigen-Reaktionen

Das Visualisieren der Autoantikörper-Antigen-Reaktionen wurde mittels eines hoch auflösenden, konfokalen Laserscanners durchgeführt. Bei der Auswertung der dabei erstellten 16-bit TIFF (engl. *tagged information file format*) -Bilddateien sowie der Ermittlung der einzelnen Spotintensitäten fand die TIGR Spotfinder Software Anwendung

(Saeed et al. 2003; Saeed et al. 2006). Die Berechnung der Spotintensitäten erfolgte dabei unter Berücksichtigung der Hintergrundfärbung nach folgender Formel:

$$= \frac{MW_{sp} - SI_{bgk}}{SI_{bgk} - SI_{bgk_{top5}}}$$

Formel 1: Berechnung der Spotintensität unter Berücksichtigung des Hintergrunds. MW_{sp} : durchschnittliche Intensität pro Pixel eines Spots; SI_{sp} : aufsummierte Intensität pro Spot; SI_{bgk} : aufsummierte Intensität Hintergrund; $SI_{bgk_{top5}}$: Summe von 5% der intensitätsstärksten Hintergrundpixel; $NuPix_{sp}$: Anzahl der Pixel eines Spots; $NuPix_{bgk}$: Anzahl der Pixel des Hintergrunds; $NuPix_{bgk_{top5}}$: Anzahl der Pixel von $SI_{bgk_{top5}}$.

3.1.5 Datenverarbeitung und statistische Auswertung der Microarraydaten

Um eine Verzerrung der Microarraydaten durch die Datenverarbeitung zu vermeiden, wurden drei verschiedene Algorithmen für die Normalisierung der Daten getestet und den Rohdaten vergleichend gegenübergestellt. Bei dem ersten Algorithmus handelt es sich um die Berechnung der AUC (engl. *area under curve*), bei dem der prozentuale Anteil der Intensität eines einzelnen Spots an der Summe der Intensitäten aller Spots eines Experiments berechnet wird:

$$= \frac{MW_{sp}}{SMW_{sp1...spn}} * 100$$

Formel 2: Berechnung der AUC. AUC_{sp} : prozentualer Anteil der Intensität eines Spots an der aufsummierten Intensität aller Spots; MW_{sp} : Intensität eines Spots; $SMW_{sp1...spn}$: aufsummierte Intensität aller Spots eines Experiments.

Bei dem zweiten Algorithmus handelt es sich um die so genannte Z-score-Transformation, bei der die Abweichung eines Spotsignals vom Mittelwert der Gesamtheit aller Spots unter Berücksichtigung der Standardabweichung berechnet wird (Cheadle et al. 2003):

$$= \frac{MW_{sp} - MW_{sp1...spn}}{SD_{sp1...spn}}$$

Formel 3: Berechnung des Z-scores. $Z\text{-score}_{sp}$: Z-score eines beliebigen Spots eines Experiments; MW_{sp} : Intensität des Spots; $MW_{sp1...spn}$: durchschnittliche Intensität aller Spots des Experiments; $SD_{sp1...spn}$: Standardabweichung berechnet über alle Spots eines Experiments.

Das dritte Verfahren basiert auf der Normalisierung über die ermittelten Intensitäten der IgG-Spots. Da davon auszugehen ist, dass bei den Patienten keine nennenswerten Unterschiede in der Gesamt-IgG-Menge vorliegen, stellt dieser Parameter eine Konstante dar, die zum Zweck der Normalisierung genutzt werden kann. Im ersten Schritt wurde bei diesem Verfahren der Mittelwert der IgG-Intensitäten über alle Probanden berechnet und im nächsten die Umrechnungsfaktoren, die notwendig waren, um die Werte der einzelnen Probanden diesem Wert anzugleichen. Mit dem Umrechnungsfaktor wurden abschließend alle Intensitäten der verschiedenen Experimente multipliziert.

Die Durchführung der AUC-, Z-scores- und IgG-Transformation sowie die Generierung der Heatmaps (vgl. 3.1.6) erfolgte in Statistica 8.0 über eine Schnittstelle (R-(D)COM Interface) zu der quelloffenen Software R mit den Zusatzmodulen MCRestimate, Heatplus, Hclust Waveslim, Rcom und Rodbc. Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Microarraydaten wurde der Variationskoeffizient (CV, engl. *coefficient of variance*) berechnet (Hamelinck et al. 2005). Die dafür verwendete Formel lautet wie folgt:

$$= \frac{\dots}{\dots}$$

Formel 4: Berechnung des Variationskoeffizienten. CV: Variationskoeffizient; SD_{SP3} : Standardabweichung über die drei technischen Replikate eines Antigens einer Probe; $MW_{SPx...SPn}$: durchschnittliche Spotintensität aller Spots einer Probe.

Die Detektion potenzieller Biomarker und signifikanter Unterschiede in den Autoantikörpermustern der beiden Studiengruppen (CTRL, POAG) sowie der verschiedenen Probenmaterialien (Serum, Kammerwasser) erfolgte unter Anwendung verschiedener statistischer Methoden. Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Verfahren findet sich in Publikationen der Arbeitsgruppe (Zimmermann et al. 1995; Grus et al. 1997; Grus et al. 1998a). Im ersten Schritt erfolgte eine univariate Varianzanalyse (ANOVA, engl. *analysis of variance*) zur Überprüfung einzelner Variablen, wie Antigen-Autoantikörper-Reaktionen für ein Antigen. Es sollte hierdurch festgestellt werden, ob diese eine größere Varianz zwischen den Gruppen aufweisen als innerhalb der Gruppen und ob ein signifikanter Gruppenunterschied für das jeweilige Antigen vorlag. Die Signifikanz der Gruppenunterschiede wurde mittels des Post-Hoc Tukey HSD (engl. *honestly significant difference*) -Tests ermittelt. Eine optimale Trennung (Klassifikation) der beiden Gruppen wird bei einer kleinen Intragruppenvarianz und einer gleichzeitig großen Intergruppenvarianz erreicht. In einem zweiten Schritt kamen verschiedene

Verfahren der multivariate Varianzanalyse (MANOVA, engl. *multivariate analysis of variance*) zur Anwendung, zu denen beispielsweise die Ermittlung der Mahalanobis-Distanzen oder der kanonischen Wurzeln gehört. Im Unterschied zur ANOVA werden bei der MANOVA die verschiedenen Variablen in Kombination miteinander getestet. Für alle hier geschilderten Verfahren wurde eine Signifikanzschwelle von $P \leq 0,05$ festgelegt.

Zusätzlich zu diesen beiden Ansätzen kamen künstliche neuronale Netze (KNN) für die Antikörper-Mustererkennung von Glaukompatienten zum Einsatz. Hierfür wurden die Messdaten der Antigene/Autoantikörper mit den stärksten Gruppenunterschieden ($n=10$) in zwei Hälften mit jeweils gleichen Anteilen von Kontroll- und Glaukompatienten geteilt. Mit einer Hälfte wurde das neuronale Netz hinsichtlich der Mustererkennung von Glaukompatienten trainiert (Trainingsdatensatz), mit der anderen Hälfte im Anschluss die Güte der Zuordnungen anhand des trainierten Musters getestet (Testdatensatz). Zur Bestimmung der Klassifizierungsgüte dienten somit ausschließlich Probanden, die nicht im Trainingsdatensatz eingeschlossen waren. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden mittels einer ROC-Kurve (engl. *receiver operating characteristic*) dargestellt, bei der die Sensitivität der Mustererkennung gegen dessen Spezifität (Falsch-positive Rate) aufgetragen wird. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Patientengruppen erfolgte die Auswertung der Messwerte der beiden Probenmaterialien getrennt.

Um einen intraindividuellen Vergleich der Autoantikörper-Reaktionen von Glaukompatienten und Kontrollprobanden durchzuführen und das Verhältnis der Antikörpermengen im Kammerwasser zu denen im korrespondierenden Serum für jedes Antigen zu bestimmen, wurde die Relation der Kammerwasser-Reaktionen im Vergleich zu denen im Serum berechnet. Die Berechnung erfolgte für jeden einzelnen Probanden nach folgender Formel:

$$\% = \frac{(\quad - \quad) * 100}{\quad | \quad |}$$

Formel 5: Berechnung der Relation von Kammerwasser- und Serumreaktionen. $M_{\%}$: prozentualer Anteil; MW_{kw} : gemittelte Spotintensität Kammerwasser; MW_{se} : gemittelte Spotintensität des betreffenden Serums.

Im Anschluss erfolgte die Berechnung des Mittelwerts für alle Probanden der Glaukomgruppe als auch der Kontrollgruppe, wobei Differenzen zwischen Serum- und Kammerwasser-Antikörper-Reaktionen von mehr als 100% als bedeutend bewertet wurden. Für alle statistischen Analysen wurde die Software Statistica 8.0 verwendet.

3.1.6 Reproduzierbarkeit von Protein-Microarrays

In diesem Projekt wurde überprüft, inwieweit die generierten Protein-Microarraydaten reproduzierbar sind und wie groß die natürlichen, versuchsbedingten Schwankungen sind. Hierfür erfolgte die Inkubation eines Standardserums (Gemisch aus 30 verschiedenen Seren) an drei verschiedenen Tagen, auf drei verschiedenen Objektträgern und jeweils drei Subarrays. Anschließend erfolgte die Digitalisierung der gemessenen Werte, anhand derer sowohl die natürlichen Schwankungen innerhalb eines Tages als auch diejenigen zwischen mehreren Tagen ermittelt werden konnten. Die Ergebnisse wurden mittels einer Heatmap visualisiert.

3.1.7 Analyse der biologischen Funktionen von Proteinen/Antigenen

Eine weitere Fragestellung des Microarray-Projekts bestand darin, welche biologischen Funktionen die verschiedenen, von Autoantikörpern erkannten Antigene ausüben und ob diese unter funktionalen Gesichtspunkten mit der Pathogenese des Glaukoms in Zusammenhang stehen können. Hierbei standen vor allem solche Antigene im Fokus, die einen signifikanten Unterschied in ihrer Antigen-Autoantikörper-Reaktivität zwischen Glaukompatienten und Kontrollprobanden zeigten. Um den Antigenen verschiedene biologische Funktionen zuordnen zu können, wurde die Software Cytoscape 2.6.2 (Shannon et al. 2003; Killcoyne et al. 2009) in Kombination mit dem Zusatzmodul Bingo 2.3 (Maere et al. 2005) verwendet. Dieses Programm ermöglicht es, durch die Nutzung allgemein gebräuchlicher Proteinamen (z.B. Swiss-Prot-Kennung) die Datenbanken des Gene Ontology Consortiums (GO) (Ashburner et al. 2000) zu durchsuchen, Proteinen ihre bislang beschriebenen Funktionen zuzuordnen und statistisch signifikant überrepräsentierte Proteinfunktionen hervorzuheben. Hierbei können beliebig viele Proteine gleichzeitig hinsichtlich ihrer Funktion untersucht werden. Als Einstellung für die Datenbanksuche wurde als Taxonomie „Homo sapiens“ gewählt. Für die Berechnung der statistisch signifikant überrepräsentierten Funktionen sowie die Erkennung von falsch-positiven Zuordnungen kam der von Benjamini und Hochberg entwickelte Algorithmus (Benjamini & Hochberg False Discovery Rate correction) zur Anwendung. Die Signifikanzschwelle wurde hierbei auf $P \leq 0,05$ gesetzt.

3.2 Protein-Expressions-Analysen mittels Antikörper-Microarrays

3.2.1 Aufbereitung der Patientenproben für die Serumproteinanalyse

Für die Analyse von Serumproteinen wurden die Blutproben der unter 3.1.1 aufgeführten Patienten verwendet. Von jeder Probandenprobe wurde ein 20µl Aliquot durch die Zugabe von 200µl Aceton und der anschließenden Lagerung bei -20°C (2h) ausgefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (4°C, 5000rpm, 15min) wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in 100µl PBS gelöst. Eine Mengenbestimmung des ausgefällten Probenproteins erfolgte mittels des Bicinchoninsäure-Verfahrens (BCA), welches auf einer kolorimetrisch detektierbaren Farbreaktion beruht (Smith et al. 1985). Hierzu kam das BCA-Proteinnachweis-Kit der Firma Thermo Scientific zur Anwendung, die Detektion der Farbreaktion erfolgte bei 570nm. Als Eichstandard diente eine Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin in einem Konzentrationsbereich zwischen 2 und 0,025µg/µl. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2 Aufbereitung von humaner Retina – Gesamtprotein-Isolierung

Als Ausgangsmaterial für die proteomische Retinaanalyse dienten Gewebeproben von Glaukompatienten und organisch Gesunden. Die Gewebeproben wurden von der Hornhautbank des Landes Rheinland-Pfalz in Mainz im Rahmen einer Organspende entnommen. Für die vorliegende Studie wurden nur solche Gewebeproben verwendet, bei denen der Proband zu Lebzeiten Patient in der Universitäts Augenklinik Mainz war und somit spezifisch einem Glaukomtyp zugeordnet werden konnte. Gewebeproben der gesunden Kontrollgruppe stammten von Patienten, die zu Lebzeiten keine Augenerkrankungen aufwiesen. Eine Kontrolle erfolgte durch die Mitarbeiter der Hornhautbank. Von jedem Spender, bzw. seinen Angehörigen, lag eine Einverständniserklärung für die Verwendung der Proben vor. Insgesamt wurden die Retinaproteine von 10 Spendern, unterteilt in 5 Glaukomprobanden (POAG) sowie 5 Kontrollprobanden, untersucht (Tab. 1). Das Durchschnittsalter der Glaukompatienten betrug 86 ± 9 Jahre, das der gesunden Probanden lag bei 82 ± 7 Jahren. Eine genauere Anpassung des Durchschnittsalters war aufgrund der geringen verfügbaren Probenanzahlen nicht möglich. In jeder Gruppe befanden sich drei weibliche sowie zwei männliche Probanden.

Da ein Vergleich des Retinaproteoms durchgeführt werden sollte, wurde bei der Präparation der Retinae auf die Entfernung aller der Retina anhaftenden okularen Bestandteile geachtet. Hierzu wurde jeweils eine Hälfte der Spenderaugen nach

Auftauen mit PBS gespült und dann die Retina mittels Pinzette vorsichtig vom retinalen Pigmentepithel abgelöst. In einem zweiten Schritt erfolgte unter Verwendung eines Binokulars die Beseitigung noch anhaftender Bestandteile des retinalen Pigmentepithels, des Glaskörpers sowie des Ziliarkörpers. Die „gesäuberten“ Retinae wurden im Anschluss auf Flüssigstickstoff gemörsert und das Homogenat bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingelagert.

| Spenderaugen | | | | |
|---------------------|-------------------|--------------|---------------|-------------|
| <u>Patient</u> | <u>Geschlecht</u> | <u>Alter</u> | <u>Gruppe</u> | <u>Auge</u> |
| 161/08 | M | 76 | Glaukom | R |
| 130/09 | M | 76 | Kontrolle | R |
| 178/08 | W | 94 | Glaukom | L |
| 041/09 | W | 87 | Kontrolle | L |
| 183/08 | M | 88 | Glaukom | R |
| 042/09 | M | 90 | Kontrolle | R |
| 114/09 | W | 95 | Glaukom | R |
| 060/09 | W | 82 | Kontrolle | L |
| 125/08 | W | 77 | Glaukom | R |
| 185/08 | W | 75 | Kontrolle | R |

Tab. 1.: Auflistung der verwendeten Retinaprobe. Aufgeführt sind die Patientennummer, das Geschlecht (M=männlich, W=weiblich), das Alter, die Gruppenzugehörigkeit sowie die Information, welches Auge verwendet wurde (L=links, R=rechts).

Die homogenisierten Gewebeprobe wurden mit einem Lysepuffer (0,1% SDS) versetzt, in diesem gelöst und durchmischt. Durch 20 minütige Zentrifugation bei 14.000rpm und 4°C konnten unlösliche Bestandteile, z.B. Zellkerne oder Plasmamembranfragmente, aus der Probe entfernt werden. Für die weiteren Analysen wurde nur der Überstand dieses Zentrifugationsschritts verwendet, die Bestimmung der Probenproteinmenge erfolgte mittels BCA-Test (vgl. 3.2.1). Eine Einlagerung der Proben fand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C statt.

3.2.3 Labeling der Probenproteine mit einem Fluorophor

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Antikörper-Microarray-Versuchen fand das Verfahren der direkten Detektion für die Visualisierung der gebundenen Proteine Anwendung (vgl. 1.7). Hierzu wurden sowohl von den Serumproben als auch von den Retinaprobe jeweils 5µg des isolierten Gesamtproteins mit 1µl einer DyLight 649-NHS-Ester Stammlösung versetzt. Die Zugabe der DyLight-Lösung erfolgte im 15-fachen Überschuss zu den Probenproteinen, um so eine kovalente Bindung der Fluores-

zenzmarker an alle Probenproteine zu erlauben. Nach erfolgter Inkubation des Ansatzes für 1h bei RT wurde die Proteinlösung mit einer 2M Glycinlösung versetzt, wodurch alle noch verbliebenen, reaktiven DyLight 649 NHS-Ester-Moleküle „abgefangen“ und somit inaktiviert wurden. Dieser Schritt ist notwendig, um eine unspezifische Hintergrundfärbung oder eine Markierung der gespotteten Antikörper und somit eine Detektion artifiziieller Fluoreszenzsignale zu vermeiden.

3.2.4 Herstellung der Antikörper-Microarrays

Die Herstellung der Antikörper-Microarrays erfolgte unter Zugrundelegung der im Rahmen der Etablierung des Protein-Microarray-Verfahrens erarbeiteten Kenntnisse und getesteten Parameter (vgl. 3.1.2/3.1.3). Jeder Antikörper wurde auf eine Konzentration von 1mg/ml mit PBS eingestellt und insgesamt 40 verschiedenen Antikörperlösungen auf die Nitrozellulose-beschichteten Objektträger aufgetragen (eine Auflistung der verwendeten Antikörper findet sich im Anhang in Tab. 2). Pro Spot wurde 1nl Antikörperlösung appliziert, pro Segment drei technische Replikate. Wie auch bei den Protein-Microarrays erfolgte während des gesamten Spotting-Vorgangs eine Kamera-gestützte Volumen- und Positionskontrolle der abgegebenen Tropfen durch die Programme sciDrop-VOLUME und autodrop-detection.

3.2.5 Inkubation des Probenmaterials

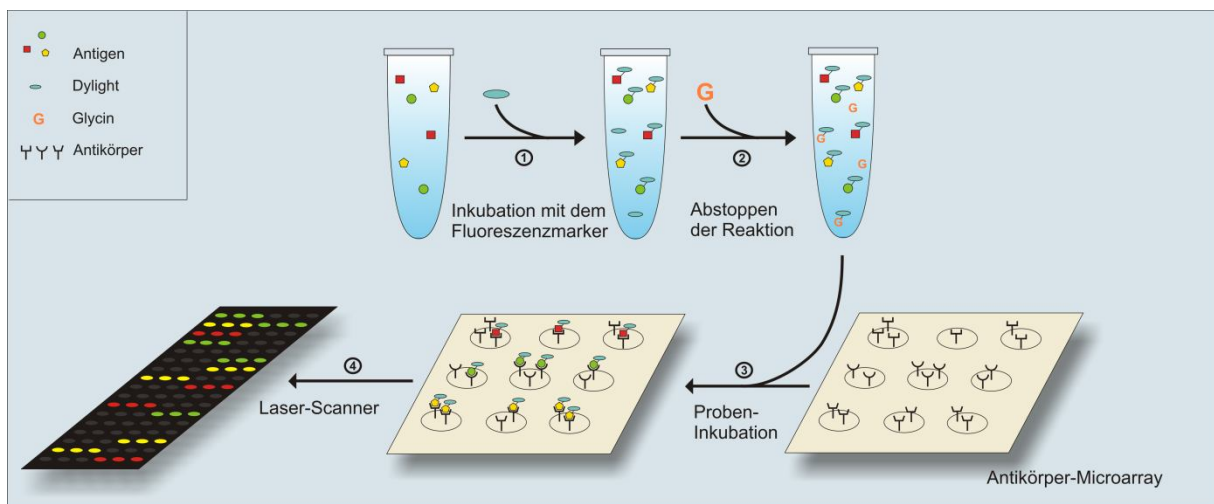


Abb. 6: Dargestellt ist der Arbeitsablauf eines Antikörper-Microarray-Versuchs. Die Probenproteine werden zu Beginn mit einem Fluoreszenzmarker versehen. Überschüssige Fluoreszenzmarker werden im Anschluss durch die Zugabe von Glycin inaktiviert und der Versuchsansatz auf dem Microarray inkubiert. Abschließend erfolgt die Detektion der gebundenen Proteine mittels eines konfokalen Laserscanners.

Die fertiggestellten Antikörper-Microarrays wurden vor der Probeninkubation mit 4% bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-T gewaschen. Von jeder Patientenprobe wurden die zuvor mit DyLight markierten Probenproteine mit PBS auf ein Endvolumen von 100µl verdünnt und anschließend auf dem Array inkubiert.

Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und H₂O_{HPLC} wurden die Microarrays in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend die gebundenen Proteine mittels eines konfokalen Laserscanners visualisiert (vgl. 3.1.4). Eine schematische Darstellung der verschiedenen Arbeitsschritte ist in Abb. 6 dargestellt.

3.2.6 Auswertung der Antikörper-Microarray-Daten

Da es sich bei dem Verfahren des Antikörper-Microarrays um eine dem Protein-Microarray-Verfahren sehr ähnliche Methode handelt und die generierten Daten in gleicher Form sowie die Messwerte in einem ähnlichen Intensitätsbereich vorliegen, wurden die für die Auswertung der Protein-Microarrays verwendeten Algorithmen übernommen. Die Normalisierung der Microarray-Daten wurde mittels der Z-score-Transformation durchgeführt (vgl. 3.1.5). Die statistische Analyse der Messdaten erfolgte ebenfalls nach dem für die Protein-Microarrays verwendeten Schema (vgl. 3.1.5).

3.3 Massenspektrometrische Analyse von Gewebeproben

3.3.1 Auftrennung von Retinaproteinen mittels Gelelektrophorese

Wie unter 1.9 geschildert, ist die direkte massenspektrometrische Analyse eines komplexen Probengemisches nur bedingt möglich, so dass eine vorherige Fraktionierung der Probenproteine notwendig ist. Um eine tiefgehende Analyse des Retinaproteoms zu ermöglichen, wurde deshalb im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein mehrstufiges Verfahren entwickelt, welches in diesem sowie den nachfolgenden Unterpunkten (3.3.2-3.3.4) beschrieben wird. In der ersten Stufe - der 1. Dimension - kam die 1970 von Lämmli entwickelte eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zum Einsatz (Laemmli 1970). Bei diesem Verfahren werden Proteine, deren Oberflächenladungen mittels negativ geladener SDS-Moleküle maskiert sind, in einem elektrischen Feld durch eine Matrix (Polyacrylamid) bewegt. Hierbei erfährt jedes Protein den gleichen „Anschub“ pro Masseneinheit, so dass es aufgrund der unterschiedlich

starken Interaktionen mit der Matrix zu einer molekulargewichtsabhängigen Auftrennung der Proteine kommt.

Bei der hier durchgeführten Studie wurden kommerziell erwerbliche Gele (Novex, Nu-PAGE, Bis-Tris-Gel) der Firma Invitrogen in Kombination mit einem MES-Puffer (2-(*N*-morpholino)ethansulfonsäure) verwendet, durch deren Einsatz eine hohe Reproduzierbarkeit der Probenfraktionierung erreicht werden konnte. Die Gele weisen eine Acrylamid-Konzentration von 12% auf und vermögen es, in Kombination mit dem MES-Puffer Proteine in einem Massenbereich von 3kDa bis 200kDa optimal aufzutrennen. Um einen Vergleich der verschiedenen Probandengruppen durchzuführen und belastbare Aussagen bezüglich der Proteinexpressionen treffen zu können, wurden von jeder Gruppe gleiche Mengen des Retinaproteingemisches für die elektrophoretische Fraktionierung eingesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des Bicinchoninsäure-Verfahrens (3.2.1). Die Gele erhielten eine Beladung mit 50µg Protein pro Laufspur. Zusätzlich wurde 5µl Proteinstandard (SeeBlue Plus2 Prestained Standard) als Massenreferenz aufgetragen. Zwecks Denaturierung und zur vollständigen Auflösung der Tertiär- und Sekundärstrukturen der Probenproteine erfolgte vor dem Auftragen auf das Gel eine Inkubation mit einem Denaturierungspuffer für 10min bei 95°C. Der Gellauf erfolgte bei 120V und 25mA für 90min. Die Gelkammer wurde während des gesamten Laufs gekühlt. Anschließend erfolgte die Färbung der aufgetrennten Proteine mit Hilfe von kolloidalem Coomassie. Färbe- und Waschschrte fanden nach Herstellerangaben auf einem Taumelschüttler bei RT statt. Abschließend wurden die resultierenden Bandenmuster mittels eines Flachbettscanners dokumentiert.

3.3.2 Trypsinverdau von Gelbanden

Im Anschluss an die gelelektrophoretischen Fraktionierung der Retinaproteine erfolgte deren Verdau mittels Trypsin - ein Arbeitsschritt, der in den meisten Fällen die Identifizierung der vorliegenden Proteine via Massenspektrometrie wesentlich erleichtert (vgl. 1.8), da häufig nur mit Hilfe der generierten Peptide ein in einer Identifizierung resultierender Datenbankabgleich der im Massenspektrometer ermittelten Massen durchgeführt werden kann. Bei der in dieser Studie für die Hydrolyse der Probenproteine verwendeten Endopeptidase handelt es sich um die Serinprotease Trypsin, welche Peptidbindungen spezifisch am Carboxyl-Ende der Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet (Thiede et al. 2000). Die Probenproteine werden somit in spezifische Peptide zerlegt, die unter anderem die Identifizierung der Proteine über den *peptide mass fingerprint* ermöglichen (vgl. 1.8). Das nachfolgend aufgeführte Protokoll steht in Anlehnung an die von

Shevchenko et al. skizzierten Arbeitsschritte (Shevchenko et al. 1996; Shevchenko et al. 2006), weist jedoch geringfügige Modifikationen auf, die sich aus im Rahmen des Projekts erarbeiteten Erfahrungswerten ableiten.

Als erster Arbeitsschritt erfolgte die Trennung der verschiedenen Laufspuren des Gels mit Hilfe eines Skalpell sowie die Zerteilung der jeweiligen Laufspuren in 18 einzelne Banden. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Größe der einzelnen Teilbereiche geachtet sowie auf die Zerlegung der Laufspuren auf derselben Höhe (Abb. 7). Im Folgenden wurden die Gelstücke für 5min mit 500µl 50mM $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ gewaschen, der Überstand verworfen, und die Gelstücke zwecks Dehydrierung mit 500µl Acetonitril (ACN) versetzt. Dieser Ansatz inkubierte für 5min auf den Gelstücken, gefolgt von der Abnahme des Überstands und der Trocknung der Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge (5min bei 45°C). Diese Arbeitsschritte wurden zweimal wiederholt. Der nächste Inkubationsschritt sah die Versetzung der Gelstücke mit 80µl einer 10mM DTT Lösung vor.

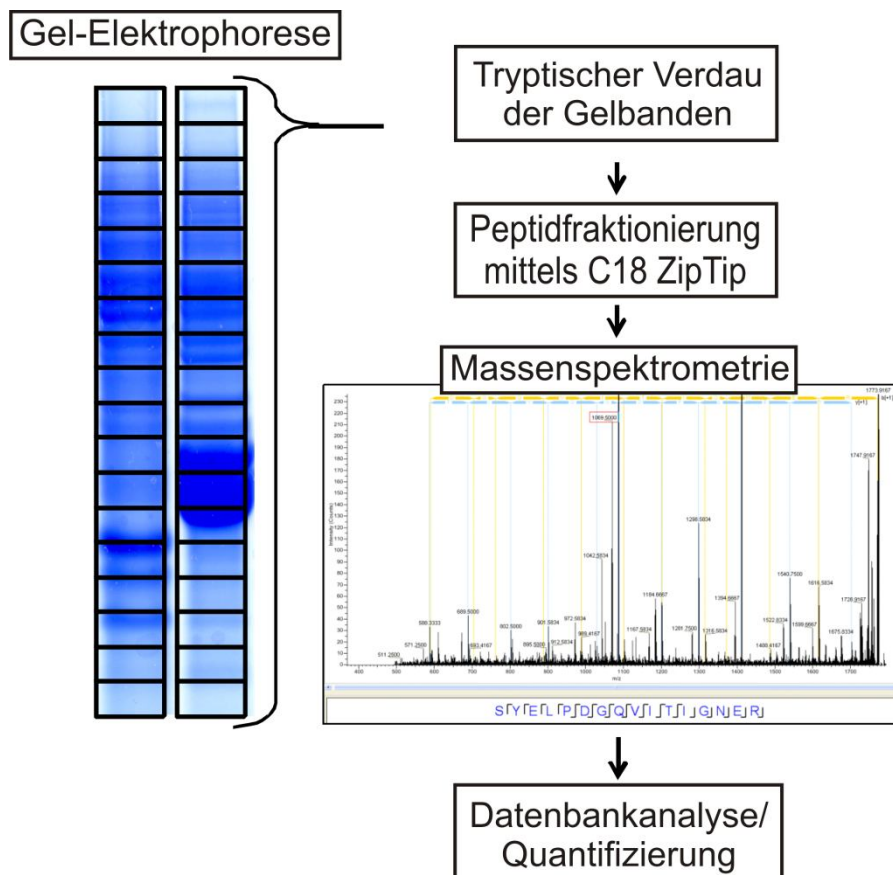


Abb. 7: Dargestellt ist das Schema des zweidimensionalen Ansatzes zur Fraktionierung der Probenproteine und Peptide und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse.

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 56°C. Dieser Vorgang dient der Reduktion von Disulfidbrückenbindungen, welche die räumliche Struktur der Probenproteine stabil-

sieren und somit bei dem nachfolgenden tryptischen Verdau die Zugänglichkeit der potenziellen Schnittstellen durch sterische Hinderungen beeinträchtigen würden (Hale et al. 2004). Anschließend erfolgte eine Behandlung der Gelstücke mit 80µl einer 55mM Iodacetamidlösung (eine Stunde bei RT im Dunkeln), wodurch die freien SH-Gruppen der Cysteine, die an den zuvor gespaltenen Disulfidbrücken beteiligt waren, irreversibel alkyliert werden (Carbamidomethylierung). Die Masse der Cysteine wird durch diese chemische Reaktion von 103,01Da auf 160,03Da erhöht. Um die verbliebenen DTT- und Iodacetamidmoleküle aus den Versuchsansätzen zu beseitigen, wurden die Gelstücke nach dem Reduktions-Alkylierungsschritt der oben geschilderten Waschprozedur unterzogen, und zwar unter der Verwendung von 50mM $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ und der nachfolgenden Dehydrierung mittels ACN. Für den enzymatischen Verdau kam in dieser Studie ein modifiziertes Trypsin zur Anwendung, welches sich durch eine selektive Methylierung der im Trypsin enthaltenen Lysine auszeichnet. Hierdurch wird der Eigenverdau der Protease auf die Aminosäure Arginin beschränkt, so dass weniger Autolysefragmente des Trypsins entstehen, die in den späteren massenspektrometrischen Messungen der Versuchsansätze stören könnten. Jeder Verdauansatz wurde mit 30µl einer 12,5ng/µl Trypsin enthaltenden 50mM $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ -Lösung versetzt. Dieser Ansatz inkubierte zuerst für 30min auf Eis und im Anschluss für 12 Stunden bei 37°C. Die Extraktion der generierten Peptide aus den Gelstücken erfolgte mittels eines dreistufigen Verfahrens, um so eine maximale Peptidausbeute zu gewährleisten. Im ersten Schritt wurden die Gelstücke für 30min mit 30µl einer 25mM $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ -Lösung versetzt. Dieser Schritt extrahiert vor allem saure Peptide aus der Gelmatrix. Im zweiten und dritten Schritt erfolgte eine Extraktion mittels eines Methansäure-ACN-Gemisches (30µl; 5% Methansäure, 50% ACN), was zur Elution von mehrheitlich basischen Peptiden führt. Die Überstände der einzelnen Extraktionsschritte wurden im Anschluss vereint und mittels einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von ca. 15µl eingengt, wodurch das volatile Puffersalz $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ zum Teil aus den Versuchsansätzen entfernt wurde. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Einlagerung der verdauten Proben bei -20°C.

3.3.3 Fraktionierung von Peptidgemischen mittels C18-Chromatographie

Zwecks weiterer Herabsetzung der Probenkomplexität wurden die einzelnen Versuchsansätze einem zweiten Fraktionierungsschritt unterzogen (2. Dimension). Die Auftrennung der Probenpeptide erfolgte dabei mittels herkömmlicher C18-Chromatographie - ein Verfahren, bei dem die unterschiedlichen Polaritäten der

Analytmoleküle zur Fraktionierung genutzt werden. Die stationäre Phase besteht hierbei aus Kohlenwasserstoffketten (C18), an welche die Peptide binden. Mittels eines Lösungsmittelgradienten werden die Peptide im Anschluss von der Säule eluiert, wobei polare Moleküle schneller vom Säulenmaterial abgelöst werden als unpolare. Da im Rahmen dieses Projektes ein Verfahren entwickelt werden sollte, mit welchem große Probenanzahlen in relativ kurzer Zeit bearbeitet werden können, wurden für die C18-Fraktionierungen ZipTips verwendet. Hierbei handelt es sich um herkömmliche Pipettenspitzen, die mit dem Säulenmaterial versehen sind, so dass Peptide durch einfaches Auf-und-Abpipettieren gebunden und auch wieder eluiert werden können. Das nachfolgend dargestellte Protokoll zur Aufreinigung und Fraktionierung der Peptide wurde nach ersten manuellen Tests auf einen Pipettierroboter übertragen. Hierfür wurde die *liquid handling station* Freedom Evo der Firma Tecan verwendet, deren Konfiguration die Bearbeitung zweier Proben simultan erlaubte. Folgende Arbeitsschritte wurden mit Hilfe des Pipettierroboters durchgeführt:

- 1) Zu Beginn der Fraktionierung wurden die pH-Werte der Probenlösungen durch die Zugabe von 3µl einer 0,1% TFA-Lösung auf pH 1,5 eingestellt. Dieser pH-Wert ermöglicht die Bindung der Probenpeptide an das Säulenmaterial der ZipTips.
- 2) Um optimale Bindungseigenschaften des Säulenmaterials zu gewährleisten, wurden die ZipTips vor ihrer Benutzung äquilibriert. Hierzu war ein fünfmaliges Waschen der Tips mit einer 100% ACN-Lösung erforderlich und im Anschluss ein fünfmaliges Waschen mit einer 0,1% TFA-Lösung.
- 3) Die Bindung der Probenpeptide an das Säulenmaterial der ZipTips erfolgte durch zehnmaliges Auf-und-Abpipettieren von 10µl der Probenlösung. Im Anschluss wurden die Tips dreimal mit einer 0,1% TFA-Lösung gewaschen, um ungebundenes Probenmaterial zu entfernen.
- 4) Die Elution und Fraktionierung der Peptide erfolgte mittels eines achtstufigen ACN-Gradienten (5% ACN, 10% ACN, 15% ACN, 20% ACN, 25% ACN, 30% ACN, 40% ACN und 60%ACN). Bei jedem Elutionsschritt wurden 3µl der jeweiligen Elutionslösung mit den ZipTips aufgenommen und die Peptide auf den Probenträger für die massenspektrometrische Analyse eluiert. Um die Trennschärfe der Peptidfraktionierung zu erhöhen, wurden die ZipTips zwischen den einzelnen Elutionsschritten mit einer 0,1% TFA-Lösung gewaschen. Da die ZipTip-Spitzen für die Fraktionierung mehrerer Proben verwendet wurden, erfolgte abschließend nach der Fraktionierung einer Probe

eine Regeneration der Säule durch Waschschritte mit einer 100% ACN-Lösung (fünf Wiederholungen) sowie durch das Waschen mit einer 0,1% TFA-Lösung (fünf Wiederholungen). Durch diesen Schritt konnte gewährleistet werden, dass alle Peptide eines Versuchsansatzes von der Säule eluiert und somit eine Probenverschleppung ausgeschlossen werden konnte.

- 5) Als letzter Schritt des Protokolls erfolgte die Versetzung der auf dem Probenträger getrockneten Peptidfraktionen mit 2µl einer Matrixlösung, wodurch die vorliegenden Peptide in einen Matrixkristall eingebettet wurden (vgl. 1.8). Die Durchführung dieses Pipettiervorgangs fand mit an dem Pipettierkopf des Roboters angebrachten Teflonnadeln statt, die sich durch eine hohe Präzision betreffend der Positionierung sowie des zu pipettierenden Volumens auszeichnen. Für die Messung der hier beschriebenen Proben wurde als Energie absorbierendes Molekül (EAM) α -Cyano-4-Hydroxizimtsäure verwendet, die sich besonders für die Messung kleinerer Moleküle eignet, da ihre Massenpeaks nur in einem Massenbereich von 200-1000Da auftreten und nicht wie bei anderen Matrices in einem Massenbereich von bis zu 3000Da (z.B. Sinapinsäure). Die Konzentration des Matrixmoleküls lag bei 2mg/ml, als Lösungsmittel wurde ein ACN-TFA-Gemisch verwendet (50% ACN, 0,1% TFA).

3.3.4 Massenspektrometrische Analyse der Peptidfraktionen

Die in dieser Studie analysierten Proben wurden mit einem Hybrid-Massenspektrometer der Firma Thermo Scientific analysiert. Bei dem Gerät handelt es sich um ein MALDI LTQ Orbitrap XL, welches mit einer Ionenfalle sowie einem Orbitrap-Massenanalysator ausgerüstet ist (vgl. 1.8). Neben der Massenbestimmung von Peptiden in einem Massenbereich von 0-4000Da können Zielpeptide unter Verwendung des CID-Verfahrens sowie einer HCD-Zelle (vgl. 1.8) auch fragmentiert und die daraus resultierenden Massen bestimmt werden. Die Kalibrierung der Ionenfalle als auch die der Orbitrap erfolgt über einen externen Standard. Dieser stellt ein Peptidgemisch dar, welches räumlich getrennt von dem Proben spot auf den Probenträger aufgebracht wird und sich aus Peptiden mit exakt definierten Massen zusammensetzt. Die Peaks des aufgezeichneten Kalibrierungsspektrums werden den m/z-Verhältnissen der jeweiligen Kalibrationsmoleküle zugeordnet, wodurch eine Kalibrationsfunktion berechnet werden kann. In der verwendeten Messmethode hinterlegt, behält diese bis zur Änderung von Geräteparametern oder äußeren Einflüssen ihre Gültigkeit. In dieser Studie wurde das

Proteo MassTM MALDI Calibration Kit for LTQ XL and LTQ hybrids verwendet, welches einen Massenbereich von 200-4000Da abdeckt.

Die massenspektrometrische Analyse der aufbereiteten Proben erfolgte mittels eines zweistufigen Messverfahrens. Zuerst wurden dabei die m/z -Verhältnisse der vorliegenden Peptide ermittelt (MS-Messung), anschließend folgte die Fragmentierung der Peptide sowie die Massenbestimmung der daraus resultierenden Fragmente (MS/MS-Messung). Die Detektion der Peptide wurde im Orbitrap-Massenanalysator bei höchster Auflösung (100.000 FWHM) durchgeführt, wobei der zu messende Massenbereich von 1000-4000Da zwecks höherer Sensitivität in zwei Massenbereiche unterteilt wurde: A. 1000-1700Da; B. 1700-4000Da. Für die MS-Messungen wurden von jedem Spot die aus 280 Laserschuss resultierenden Ionen akkumuliert und der Orbitrap zugeführt. Die applizierte Energie pro Schuss lag bei ca. 25 μ J. Aus den Peptidspektren mit dem Massenbereich von 1000-1700Da wurden anhand verschiedener Qualitätskriterien (siehe Anhang Tab. 3) 50 Peptidmassen ausgewählt und für die Generierung von Fragmentspektren herangezogen, aus dem Massenbereich von 1700-4000Da wurden 30 Peptide ausgewählt. Für jedes zu fragmentierende Peptid (MS/MS-Analyse) wurden 280 Laserschuss aufsummiert, wobei die Laserenergie pro Schuss bei 25 μ J lag. Bevorzugt wurden für die Fragmentierung Peptide mit einer hohen Signalintensität sowie einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis (engl. *signal/noise*, S/N). Die Fragmentierung erfolgte unter Verwendung des CID-Verfahrens, die Fragmentmassenbestimmung wurde in der Ionenfalle durchgeführt. Eine detaillierte Auflistung der für die Messung verwendeten Geräteeinstellungen findet sich im Anhang in Tabelle 3. Die Steuerung des Gerätes und der Messungen erfolgte über die Software Xcalibur. Das Zusammenspiel aller für die Generierung und Auswertung der massenspektrometrischen Daten notwendigen Steuerungs- und Datenverarbeitungsprogramme ist in Abb. 8 dargestellt.

3.3.5 Konvertierung der Rohdaten

Um die während der Messung erstellten Rohdatendateien in ein für die P²M (Proteomics Pipeline Mainz, s.u.) kompatibles Datenformat zu konvertieren, wurde das Softwarepaket ReAdW verwendet. Mit Hilfe dieses Programms werden die von Xcalibur generierten .RAW-Dateien in das häufig verwendete mzXML-Format (Pedrioli et al. 2004) konvertiert.

3.3.6 Verwaltung der Daten und Datenprozessierung

In Kooperation mit Diplomanden der Bioinformatik der Fachhochschule Bingen wurde ein Softwarepaket (P²M) entwickelt, mit dem es möglich ist, massenspektrometrische Daten

von Geräten verschiedener Hersteller zu verwalten, sie zu bearbeiten und auszuwerten. Im Vordergrund stehen dabei der Vergleich von Massenspektren verschiedener Patientengruppen, die Identifizierung von Proteinen sowie deren relative Quantifizierung.

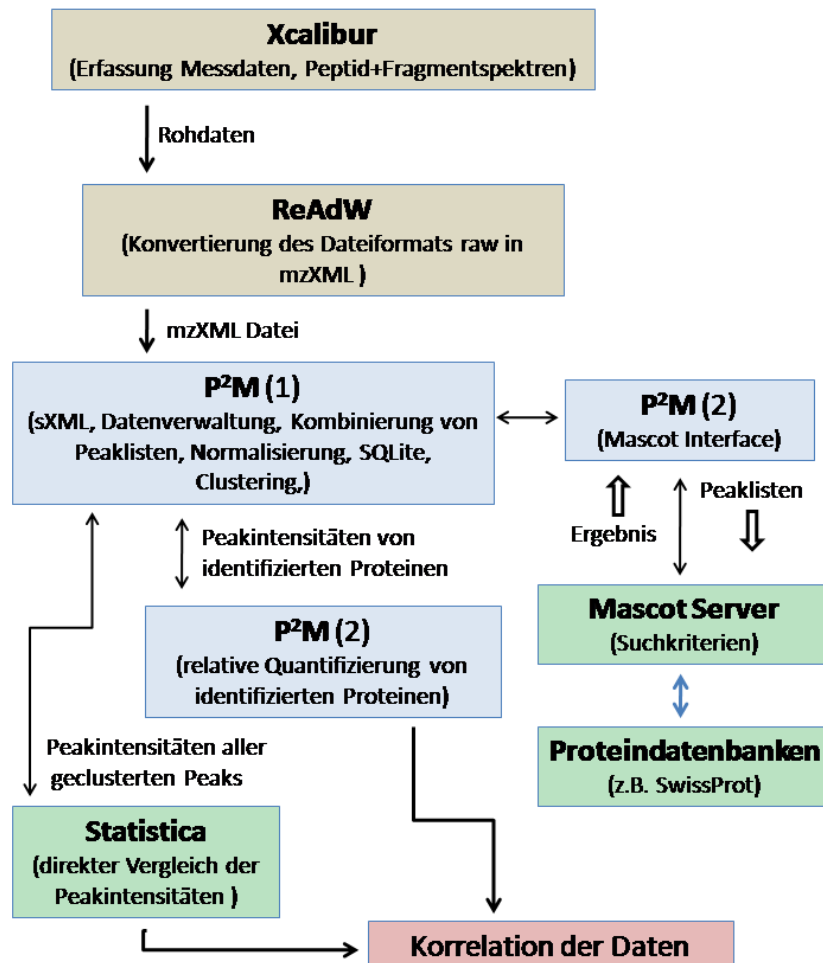


Abb. 8: Schematische Darstellung des Zusammenspiels der verschiedenen Programme für die Auswertung massenspektrometrischer Daten. Die Steuerung des Massenspektrometers erfolgt über Xcalibur, die Konvertierung der raw-Dateien in das mzXML-Format mittels des Programms ReAdW. Die Messdaten eines Spots werden im mzXML-Format an die P²M weitergereicht, welche die Verwaltung der Daten übernimmt. Hier sind verschiedene Varianten der Datenprozessierung und Bearbeitung möglich (Normalisierung, Clustering, etc.). Zusätzlich kann über ein eingebettetes Modul (Mascot Interface) eine Datenbankabfrage zwecks Proteinidentifikation gestartet werden (Mascot Server, Proteindatenbanken). Die Ergebnisse der Anfrage werden in die P²M importiert, welche mittels eines weiteren Moduls eine relative Quantifizierung der Proteine erlaubt. Über eine Schnittstelle zu Statistica wird eine statistische Auswertung von geclusterten Peakdaten ermöglicht, deren Ergebnisse ebenfalls in die P²M importiert werden können.

Über eine Importfunktion werden die XML- oder mzXML-Dateien der einzelnen Messungen in ein programmeigenes Dateiformat (sXML) überführt (Abb. 8). Hierdurch

liegen alle Messdaten in einem einheitlichen Datenformat vor, wodurch die Verwaltung der Daten erheblich vereinfacht wird.

Innerhalb der P²M stehen verschiedene Module zur Verfügung, die unterschiedliche Strategien der Datenprozessierung und Auswertung erlauben. So ist es beispielsweise möglich, einen direkten Vergleich der Spektren durchzuführen, z.B. im Fall gemessener Proben von verschiedenen Probandengruppen. Hierzu werden die Spektren normalisiert, geclustert und die detektierten Intensitätswerte mit ihren dazugehörigen Massen sowie den Patienteninformationen in eine Matrix überführt, deren Daten im Anschluss mit Hilfe eines Statistikprogramms ausgewertet werden können. Die Normalisierung erfolgt, um messungsbedingte Einflüsse auf die Gesamtintensität des Spektrums auszugleichen. Normalisiert werden kann sowohl auf die Gesamtintensität des Spektrums - den totalen Ionenfluss - sowie auf einen hinzugefügten internen Standard. In dieser Arbeit wurden für die Normalisierung der vorliegenden Messdaten der totale Ionenfluss verwendet (Sauve et al. 2004). Gespeichert werden die Peakinformationen zusammen mit den Patienteninformationen im Format einer CSV-Datei (engl. *comma separated values*). Diese kann über eine in die P²M implementierte Schnittstelle direkt an das Programm Statistica zur Auswertung übergeben werden.

3.3.7 Identifizierung von Proteinen

Für die Identifizierung von Proteinen wurde neben dem Proteome Discoverer (Thermo Scientific) das in die P²M eingebettete Mascot Interface verwendet, über welches die in der P²M vorliegenden Peakinformationen direkt an den Mascot Server weitergeleitet werden können (Abb. 8). Übergeben werden hierbei sowohl die Peakmassen der Peptidspektren, als auch die der Fragmentspektren. Der Mascot Server stellt eine Schnittstelle zwischen dem datenverwaltenden Programm sowie den Primär-Sequenz-Datenbanken dar, d.h. er übermittelt die Peakinformationen der verschiedenen Messungen an die Datenbank. Die Suchanfragen werden dabei über ein HTML (engl. *hypertext markup language*) -Formular definiert. Die verschiedenen, für eine erfolgreiche Datenbanksuche notwendigen, Parameter können bei diesem Schritt ebenfalls festgelegt und übergeben werden. Hierzu gehören unter anderem die Auswahl der Datenbank (z.B. Swiss-Prot oder NCBIInr), die Taxonomie des untersuchten Organismus, die Auswahl möglicher Peptidmodifikationen (z.B. Oxidationen oder Phosphorylierungen) sowie die erlaubte Massentoleranz. Eine Auflistung der in dieser Studie verwendeten Suchparameter findet sich im Anhang in Tabelle 4. Im Rahmen der Datenbankabfrage werden die theoretisch ermittelten Peptidmassen mit den experimentell ermittelten

verglichen, unter Berücksichtigung der zuvor festgelegten Toleranzen. Hierfür können einerseits nur die Daten der Peptidspektren herangezogen werden (PMF-Suche), andererseits aber auch die Daten der Fragmentspektren (MS/MS-Suche). Übereinstimmungen zwischen experimentell bestimmten Peptidmassen und Datenbankeinträgen werden von Mascot mittels eines Wahrscheinlichkeits-basierenden Algorithmus untersucht, bewertet und hinsichtlich ihrer Signifikanz überprüft (Pappin et al. 1993; Perkins et al. 1999). Die Darstellung der Ergebnisse der Datenbanksuche erfolgt in Form einer HTML-Seite. Für jede Zuordnung sind im Ergebnisbericht die in der Datenbank hinterlegten Informationen aufgelistet, wie z.B. die Anzahl der zugeordneten Peptide, deren Sequenzen, die Sequenzabdeckung und vor allem der Wahrscheinlichkeitswert und dessen Schwellenwert, ab dem von einer signifikanten Identifizierung auszugehen ist. Die Ergebnisse der Datenbanksuche werden über das Mascot Interface in die P²M importiert und hier für jeden einzelnen Spot in Form einer SQLite-Datenbank gespeichert. Sie können aber zusätzlich auch als Exceltabelle exportiert werden. Übertragen werden dabei nur signifikante Zuordnungen.

3.3.8 Auswertung und Quantifizierung von Probenproteinen

Für die Quantifizierung von Proteinen wurden nur solche Peakinformationen herangezogen, die einem identifizierten Protein zugeordnet werden konnten. Darüber hinaus wurde die Analyse auf solche Proteine beschränkt, die in beiden Probandengruppen erfolgreich identifiziert werden konnten. Die restriktiven Ausschlusskriterien dienten der Vermeidung von falsch-positiven Zuordnungen nicht identifizierter Peptide und deren potenziell fehlerhaftem Einfluss auf die Ergebnisse der Quantifizierung. Ein weiteres Kriterium stellte die Grenze eines Intensitätsunterschieds von mindestens 30% zwischen der Glaukomgruppe und der Kontrollgruppe dar, die für ein Protein detektiert werden mussten, um es der Gruppe von regulierten Proteinen zuzuordnen. Die Auswertung der Daten erfolgte ausschließlich anhand normalisierter Daten (vgl. 3.3.6).

Der für die Quantifizierung der Proteine notwendige Algorithmus stellte ein ebenfalls in der P²M eingebettetes Modul dar.

3.3.9 Chemikalien und Verbrauchsmittel

| Name | Hersteller |
|---|---|
| Allgemein | |
| Aceton | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| BCA Protein Assay Kit | Fisher, Frankfurt, Deutschland |
| BSA | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Falcontubes | Fisher, Frankfurt, Deutschland |
| Flüssiger Stickstoff | Messer Griesheim, Griesheim, Deutschland |
| Handschuhe (Nitril) | Kimberly-Clark, Atlanta, USA |
| H ₂ O _{HPLC} | Mallinckrodt Baker BV, Holland |
| PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) | Invitrogen [®] , Carlsbad, USA |
| Pipettenspitzen | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| SDS | ICN Biomedicals, Meckenheim, Deutschland |
| Softstripes (PCR, 200 µl) | Biozym [®] Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland |
| TRIS | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| 96 well PCR plates | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Protein-Microarrays | |
| Cy5 Goat Anti-Human IgG (H+L) | Jackson Immuno Research, UK |
| Goat Anti-Human IgA + IgG + IgM (H+L) | Thermo Scientific, USA |
| Mikrotiterplatten 384 well | Genetix, UK |
| Nitrocellulose Film Slides (ONCYTE [®]) | Grace Bio-Labs, Bend USA |
| 16-pad FAST frame hybridization chamber; | Whatmann, Maidstone, UK |
| Trehalose | ICN Biomedicals, Meckenheim, Deutschland |
| Tween 20 | ICN Biomedicals, Meckenheim, Deutschland |
| Antikörper-Microarrays | |
| DyLight 649 NHS Ester | Pierce, Rockford, USA |
| Nitrocellulose Film Slides (ONCYTE [®]) | Grace Bio-Labs, Bend USA |
| 16-pad FAST frame hybridization chamber; | Whatmann, Maidstone, UK |

| Name | Hersteller |
|---|--|
| Massenspektrometrie | |
| Acetonitril | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Alpha-cyano-4-hydroxymizsäure | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland |
| Ammoniumbicarbonat | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland |
| Dithiothreitol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Iodacetamid | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| 384 MTP steel target | Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland |
| Laufpuffer (MES SDS, 20x) | Invitrogen [®] , Carlsbad, USA |
| Novex Colloidal Blue Staining Kit | Invitrogen [®] , Carlsbad, USA |
| NuPAGE [®] Novex [®] Bis-Tris Mini Gels | Invitrogen [®] , Carlsbad, USA |
| NuPAGE [®] Probenpuffer (LDS 4x) | Invitrogen [®] , Carlsbad, USA |
| Peptide calibration standard MS | Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland |
| Proteingelmarker (Seebue [®] , plus2, 1x) | Invitrogen [®] , Carlsbad, USA |
| Proteo Mass [™] MALDI Calibration Kit for LTQ XL and LTQ hybrids | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Sequencing Grade Modified Trypsin | Promega Corporation, Madison, USA |
| TFA | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| ZipTips C ₁₈ | Millipore |

3.3.10 Lösungen

| Protein-Microarrays/Antikörper-Microarrays | |
|---|--------|
| 4% BSA (100ml) | |
| BSA | 4gr |
| PBS | 100ml |
| 1 M Glycin (100ml) | |
| Glycin | 7,5gr |
| H ₂ O _{HPLC} | 100ml |
| 1,5% PBS-TR (100ml) | |
| Trehalose | 1,5gr |
| PBS | 100ml |
| 0,5% PBS-T (100 ml) | |
| PBS | 99,5ml |
| Tween-20 | 500µl |

| Massenspektrometrie | |
|--|---------------------------------|
| 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60% Acetonitrillösungen | |
| Acetonitril | 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60ml |
| H ₂ O _{HPLC} | 95, 90, 85, 80, 75, 70, 60 40ml |
| α-Cyano-4-Hydroxymizimtsäure-Matrix (10ml) | |
| α-Cyano-4-Hydroxymizimtsäure | 20mg |
| H ₂ O _{HPLC} | 4,8ml |
| Acetonitril | 5ml |
| TFA | 200μl |
| 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung (100ml) | |
| NH ₄ HCO ₃ | 480mg |
| H ₂ O _{HPLC} | 100ml |
| 25 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung (100ml) | |
| NH ₄ HCO ₃ | 240mg |
| H ₂ O _{HPLC} | 100ml |
| 10mM DTT (10ml) | |
| DTT | 15,4mg |
| 50 mM Ammoniumbicarbonat | 10ml |
| Extraktionslösung II (100ml) | |
| Methansäure | 5ml |
| Acetonitril | 50ml |
| H ₂ O _{HPLC} | 45ml |
| Färbelösung für PAGE (Colloidal Blue Staining Kit, 100ml) | |
| Methanol | 20ml |
| H ₂ O _{HPLC} | 55ml |
| Stainer A | 5ml |
| Stainer B | 20ml |
| Fixierlösung für Gelelektrophorese (100ml) | |
| Methanol | 50ml |
| Essigsäure | 10ml |
| H ₂ O _{HPLC} | 40ml |

| Massenspektrometrie | |
|---|--------|
| 55 mM Iodacetamid (10ml) | |
| Iodacetamid | 10 mg |
| 50 mM Ammoniumbicarbonat | 10ml |
| Laufpuffer (MES) für Gelelektrophorese | |
| H ₂ O _{HPLC} | 950ml |
| MES 20X Buffer (Invitrogen) | 50ml |
| SDS-Lysepuffer (0.1%) (100ml) | |
| SDS | 100mg |
| PBS | 100ml |
| 0,1% TFA-Lösung | |
| TFA | 100 µl |
| H ₂ O _{HPLC} | 100 ml |
| Trypsin-Stammlösung (0,1µg/µl, 200µl) | |
| Trypsin | 200 ng |
| Trypsinpuffer | 200 µl |
| Trypsin-Gebrauchslösung (12,5µg/µl, 200µl) | |
| Trypsinstammlösung | 25 µl |
| 50 mM Ammoniumbicarbonat | 200 µl |

3.3.11 Software

| Name | Hersteller |
|---|---|
| <u>Allgemein</u> | |
| Cytoscape 2.6.2, Zusatzmodul: Bingo 2.3 | http://www.cytoscape.org/ |
| Gene Ontology Annotation Datenbank | http://www.geneontology.org |
| Microsoft Office 2007 | Microsoft, USA |
| R-project; Zusatzmodule: MCRestimate, Heatplus, Hclust Waveslim, Rcom und Rodbc | http://www.r-project.org/ |
| Statistica Version 8.1 | Statsoft, Tulsa, USA |
| <u>Protein/Antikörper-Microarrays</u> | |
| autodrop-detection Software | Scienion, Berlin, Deutschland |
| sciDrop-VOLUME | Scienion, Berlin, Deutschland |
| Spotfinder Software Version 3.1.1 | TM4, Dana-Faber Cancer Institute, Boston, USA |

| Name | Hersteller |
|--|--|
| <u>Massenspektrometrie</u> | |
| LTQ Tune | Thermo Scientific, Bremen, Deutschland |
| Mascot | Matrix Science, London, England |
| NCBIInr | National Center for Biotechnology, Bethesda, USA |
| Proteome Discoverer | Thermo Scientific, Bremen, Deutschland |
| Proteomics Pipeline Mainz (P ² M) | Universitäts Augenklinik, Mainz, Deutschland |
| ReAdW | Thermo Scientific, Bremen, Deutschland |
| Swiss-Prot | Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Schweiz |
| Xcalibur | Thermo Scientific, Bremen, Deutschland |

3.3.12 Geräte

| Name | Hersteller |
|--|--|
| <u>Allgemein</u> | |
| Biofuge primo R | Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland |
| CanonScan 8400 F | Canon, Krefeld, Deutschland |
| Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor: A-4-62 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Eppendorf Concentrator 5301 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| KühlThermoMixer | HLCBioTech, Bovenden, Deutschland |
| Multiscan Ascent | Thermo Scientific, USA |
| Titramax 100 (Schüttler) | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| Porzellanmörser | Schott GmbH, Mainz, Deutschland |
| Standard Power Pack P 25 | Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Vortex REAX top | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| <u>Protein/Antikörper-Microarrays</u> | |
| Affymetrix 428 TM Array Scanner | Affymetrix 428 TM Array Scanner, High Wycombe, UK |
| OmniGrid100 | Digilab Genomic Solutions, Ann Arbor, USA |
| Stahl-Pin für Kontakt-Arraysplotter: GMP3 | ArrayIt, Sunnyvale, USA |
| sciFLEXARRAYER S3, Düse für Non-Contact Arraysplotter: PDC60 | Scienion AG, Berlin, Germany |
| <u>Massenspektrometrie</u> | |
| Freedom Evo, Pipettierroboter | Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz |
| MALDI LTQ Orbitrap XL | Thermo Scientific, Bremen, Deutschland |
| 384 MTP steel target, | Thermo Scientific, Bremen, Deutschland |

4 Ergebnisse

Die hier geschilderten Ergebnisse unterteilen sich in zwei Bereiche. Der erste setzt sich mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden und ihrer Optimierung auseinander und umfasst das Verfahren des Protein-Microarrays (4.1.1), die Antikörper-Microarray-Technologie (4.1.2) und das Massenspektrometrie-basierende Verfahren für die Proteomanalyse (4.1.3).

Im zweiten Teil werden die durch die Anwendung der etablierten Methoden generierten Ergebnisse dargestellt. Hierbei finden sowohl die Analyse der Autoantikörper-Reaktionen von Glaukompatienten (4.2.1) Berücksichtigung, als auch die fokussierte Analyse (4.2.2) von Serum-und-Retinaproteinen sowie deren massenspektrometrische Analyse (4.2.3).

4.1 Methodenentwicklung und Optimierung

4.1.1 Etablierung des Protein-Microarray-Verfahrens

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des Protein-Microarrays für die Analyse von Autoantikörper-Reaktionen etabliert. Angesichts des durchzuführenden Vergleichs von Autoantikörper-Reaktionen im Rahmen einer klinischen Studie ergeben sich hierbei besondere Anforderungen an die Reproduzierbarkeit der generierten Daten, durch welche ein aussagekräftiger und belastbarer Vergleich der verschiedenen Patientengruppen erst ermöglicht wird. Die Ergebnisse der verschiedenen Tests, welche zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Daten durchgeführt wurden, sind in den nachfolgenden Punkten aufgeführt.

Vergleich der verschiedenen Spotting-Technologien

Zu Beginn des Projekts wurden zwei verschiedene Spotting-Technologien hinsichtlich ihrer Eignung für das Drucken von proteinhaltigen Lösungen miteinander verglichen. Durch die Gegenüberstellung dieser Technologien sollte das Verfahren ermittelt werden, welches am besten für das Aufbringen von Proteinen auf Nitrozellulose-beschichtete Objektträger geeignet ist. Als wichtigster Parameter dieser Evaluation ist die technische Reproduzierbarkeit der hergestellten Protein-Microarrays zu nennen, die im Rahmen der geplanten Analyse von klinischen Proben eine bedeutende Rolle spielt. Aber auch die Bedienbarkeit sowie die Anfälligkeit der Geräte gegenüber Störungen floss in die Entscheidungsfindung mit ein. Eine besondere Herausforderung und Anforderung an die beiden getesteten Technologien stellten die verschiedenen physikalischen Eigenschaften der zu druckenden Proteine dar, welche sich stark auf das Spotting-

Ergebnisse

Verhalten der Lösungen auswirken. Zunächst wurde das herkömmlich verwendete Pin-basierende Verfahren getestet, bei dem mit Hilfe von Stahlnadeln die Lösungen auf die Objektträgeroberfläche appliziert werden. Hierbei treten die zuvor mit der proteinhaltigen Lösung benetzten Stahlnadeln kurzzeitig in Kontakt mit der Nitrozellulosebeschichtung der Objektträger, wodurch die Lösung auf die Oberfläche übertragen wird. Es zeigte sich, dass es hierbei, bedingt durch den Kontakt mit der Stahlnadel, zu einer Verletzung der Nitrozellulosebeschichtung kommen kann, woraus eine inhomogene Verteilung der Proteinlösung auf der Oberfläche hervorgeht (Abb. 9A).

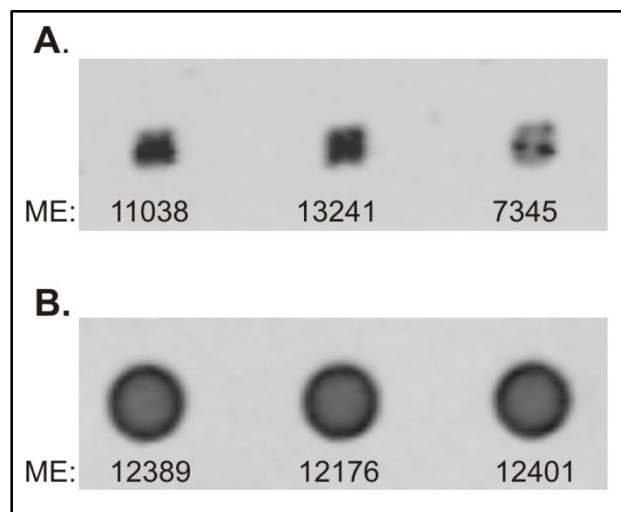


Abb. 9: Technische Replikate von gedruckter HSP60-Proteinlösung. **A)** Gedruckt mittels Pin-basierender Technologie; **B)** Gedruckt mittels Non-contact-Verfahren. Für jeden Spot ist die durchschnittliche Pixelintensität (ME) angegeben.

Auch die Spot-Morphologien technischer Replikate sowie deren Signalintensitäten schwankten dabei stark, wie in Abb. 9A exemplarisch dargestellt ist. Eine exakte Volumenkontrolle ist bei diesem Verfahren nicht möglich, es gelingt lediglich eine grobe Einschränkung des Volumenbereichs, die durch die Wahl der Nadeldicke bewirkt wird. Bei dem zweiten getesteten Verfahren handelt es sich um das so genannte Non-contact-Verfahren, dem eine Piezoelement-basierende Technologie zugrundeliegt. Die Proteinlösungen werden hierbei in Form von kleinen Tropfen (240-280pl) aus einer Glasdüse auf die Oberfläche geschossen. Ein Kontakt der Düse mit der Objektträgeroberfläche ist somit nicht erforderlich. Auch ermöglicht diese Technologie über ein bildgebendes Verfahren die exakte Bestimmung des Tropfen-Volumens. Eine präzise Justierung des Volumens ist ebenfalls möglich, da sich dieses in direkter Abhängigkeit der Einstellungen des Piezoelements (Voltzahl und Pulsweite) befindet. Die Spotmuster, die mit diesem Verfahren generiert werden konnten, zeichneten sich durch eine wesentlich größere Homogenität und eine geringere Schwankung zwischen den

Ergebnisse

Intensitäten technischer Replikate aus, als die des Pin-basierenden Verfahrens (Abb. 9B).

Reaktionsmuster und Hintergrundrauschen

In Abb. 10 sind exemplarisch die Antikörper-Reaktionsmuster zweier Serumproben sowie die von zwei Kammerwasserproben dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die

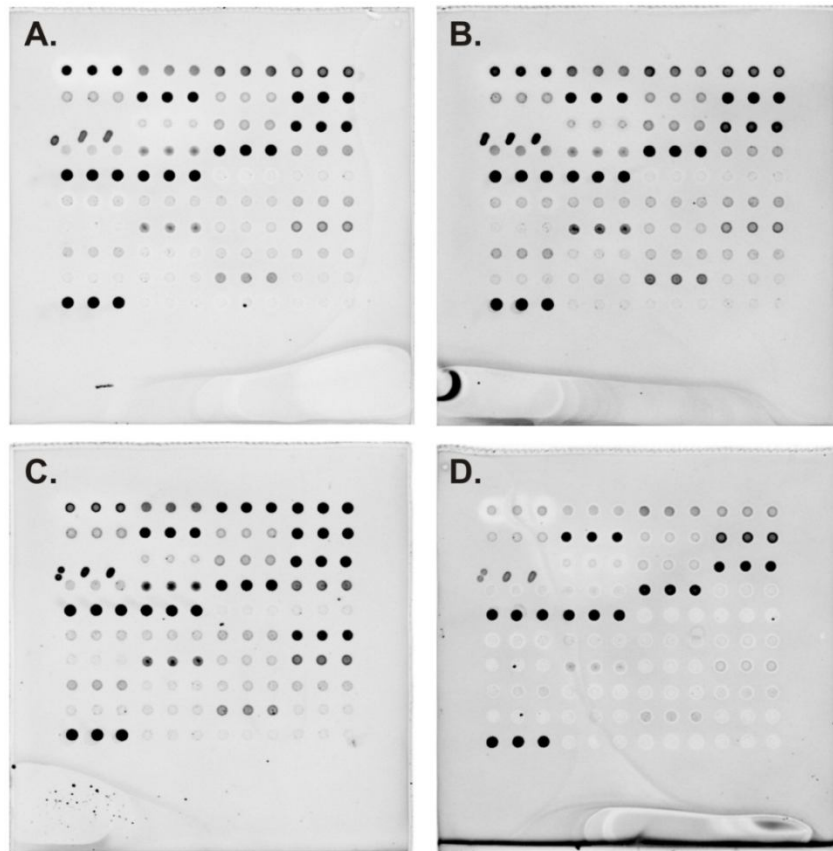


Abb. 10: Exemplarisch dargestellt sind die Autoantikörper-Reaktionsmuster von zwei Serumproben (A, B) sowie die von zwei Kammerwasserproben (C, D). Drei Spots in Reihe repräsentieren die technischen Replikate eines Antigens. Je dunkler die Färbung eines Spots, desto stärker die Reaktionen der Autoantikörper gegen das jeweilige Antigen.

verschiedenen Subarrays unterschiedlich starke Hintergrundfärbungen aufweisen, wodurch die Notwendigkeit der Berücksichtigung dieses Hintergrundsignals bei der Berechnung der Signalstärke eines einzelnen Spots bestätigt wird (vgl. 3.1.5, Formel 1). Nur wenige Antigene, wie z.B. das Myelin-Oligodendrocyte-Glycoprotein (MOG) oder die DNA Topoisomerase 1, zeigten keine bis kaum messbare Reaktivitäten - dies war sowohl bei den unter 3.1.1 beschriebenen Serumproben als auch bei den Kammerwasserproben der Fall.

Reproduzierbarkeit von Protein-Microarrays

Eine häufig verwendete Methode für die Bewertung der Reproduzierbarkeit von Microarraydaten ist der Variationskoeffizient (CV, vgl. 3.1.5) (Hamelinck et al. 2005), welcher die relative Standardabweichung für die technischen Replikate eines Antigens darstellt. Ein CV von beispielsweise 0,5 entspricht dabei einer relativen Abweichung von 50%.

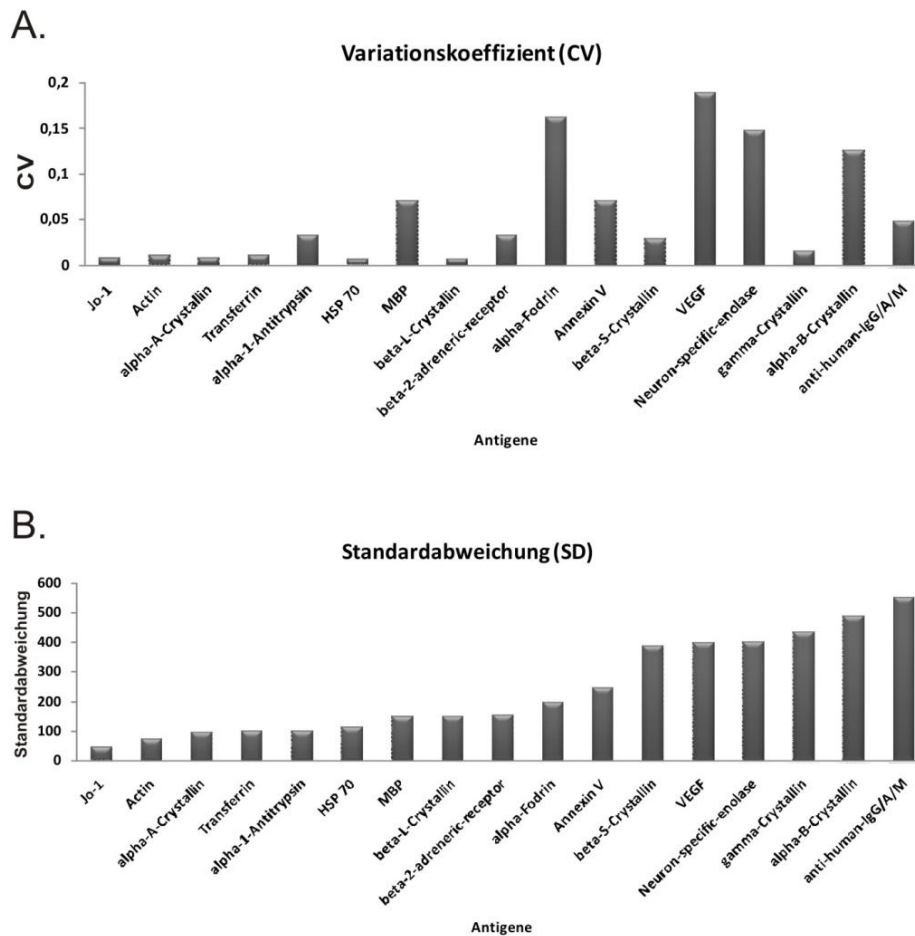


Abb. 11: Dargestellt sind die Variationskoeffizienten (A) sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (B) verschiedener auf den Studienarrays vertretener Antigene. Auf der X-Achse finden sich jeweils aufgelistet die verschiedenen Antigene, auf der Y-Achse die dazugehörigen CV-Werte bzw. die Standardabweichungen.

Unter Verwendung des Pin-basierenden Verfahrens konnte ein medianer CV von 0,32 mit einer Standardabweichung von 0,3 erreicht werden. In die Berechnung flossen die Messergebnisse für die technischen Replikate von drei Antigenen ein. Die Standardabweichungen über die technischen Replikate der einzelnen Antigene lagen hierbei zwischen 19% und 77% der gemessenen Spotintensität. Im Gegensatz dazu konnte mit dem Piezoelement-basierenden Verfahren eine viermal kleinere Variabilität

Ergebnisse

für die technischen Replikate eines Antigens erreicht werden (medianer CV: $0,079 \pm 0,072$). Die Beobachtungen für das Piezoelement-basierende Verfahren decken sich mit den Daten, die während des Spotting-Vorgangs von der sciDrop-VOLUME und autodrop-detection Software erfasst wurden (vgl. 3.1.2). Die Software detektierte eine Volumenvariation der abgeschossenen Tropfen von lediglich 2%, was äquivalent zu 5pl eines 250pl Tropfens ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für das Drucken von Studienmicroarrays das Non-contact-Verfahren gewählt, und auch hier wurde die Reproduzierbarkeit der technischen Replikate anhand des Variationskoeffizienten untersucht. Der mediane CV lag bei diesen Microarrays mit 0.032 und einer Standardabweichung von 0.061 unter dem CV der oben beschriebenen Testarrays. Die Variationskoeffizienten einiger Antigene sind in Abb. 11A dargestellt, die dazugehörigen Standardabweichungen ebenfalls (Abb. 11B).

Tag-zu-Tag-Abweichungen

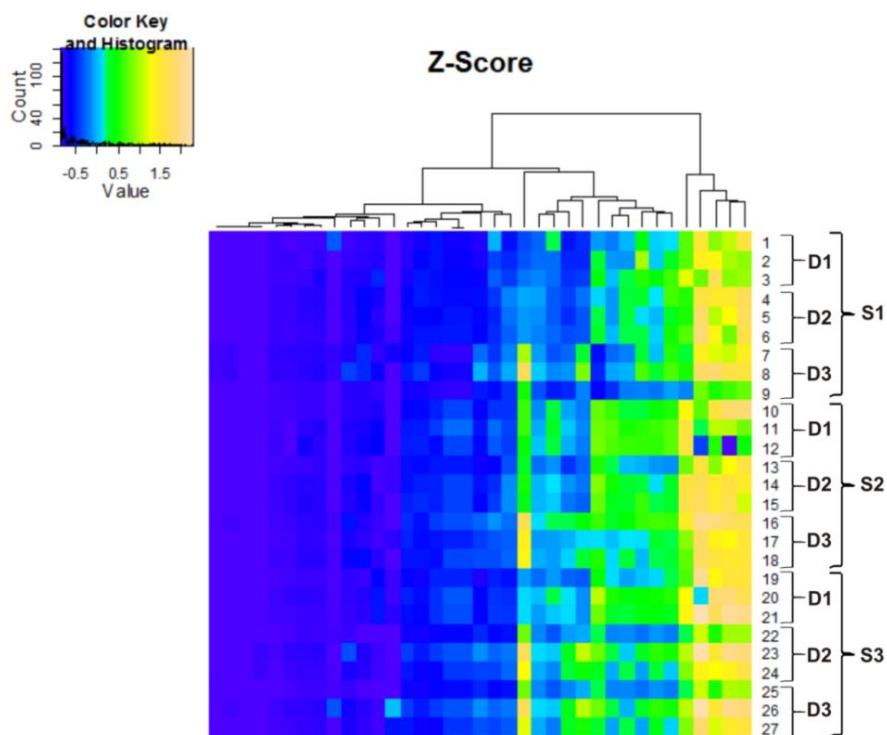


Abb. 12: Dargestellt sind die Ergebnisse des Reproduzierbarkeitsversuchs in Form einer Heatmap. Die Z-scores der einzelnen Messungen sind hierbei farblich codiert, wobei blaue Felder einem geringen, gelbe einem hohen Z-score entsprechen. Auf der X-Achse sind die einzelnen, hierarchisch geclusterten Antigene aufgetragen, auf der Y-Achse die einzelnen Versuche. Die einzelnen Versuche sind durch 1-27 gekennzeichnet und diejenigen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, durch D1-D3. Versuche, die auf verschiedenen Slides durchgeführt wurden, sind durch S1-S3 markiert. Man erkennt, dass sich die ermittelten Intensitäten der einzelnen Versuche nur geringfügig voneinander unterscheiden, und nur wenige Ausreißer (z.B. Versuch 9 oder Versuch 25) vorliegen.

Ergebnisse

Im Gegensatz zu der unter 4.1.1 geschilderten Reproduzierbarkeitsanalyse wurde in diesem Teilprojekt die Variabilität der Messergebnisse von Protein-Microarrays untersucht, welche durch die Proben-Inkubationen an verschiedenen Tagen und auf verschiedenen Objektträgern hervorgerufen wurden (vgl. 3.1.6). Die Ergebnisse sind in Abb. 12 in Form einer Heatmap veranschaulicht.

An drei verschiedenen Tagen (D1-D3) wurden auf drei verschiedenen Objektträgern (S1-S3) jeweils drei Proben vergleichend analysiert. Wie die grafische Darstellung der Messergebnisse zeigt, ist die Reproduzierbarkeit der Daten sowohl bei Inkubationen an verschiedenen Tagen als auch bei Inkubationen auf verschiedenen Objektträgern durchaus gegeben. So weichen nur wenige Messungen, z.B. die Versuche 9,13, 22 und 25 deutlich vom Reaktionsmuster der übrigen Ansätze ab. Bei den restlichen Teilversuchen lassen sich nur geringfügige Unterschiede in der Intensität der Reaktionen feststellen, die in den meisten Fällen nur einzelne Antigene betreffen, wie anhand von Versuch 12 zu erkennen ist. Insgesamt betrachtet liegt die Reproduzierbarkeit derjenigen Ergebnisse, die durch Inkubationen auf ein und demselben Objektträger an verschiedenen Tagen generiert wurden, geringfügig höher als die derjenigen Inkubationen, die an einem Tag auf verschiedenen Objektträgern durchgeführt wurden.

Gegenüberstellung verschiedener Verfahren zur Datennormalisierung

Aufgrund der potenziellen Verzerrung von Microarraydaten durch die notwendige Aufbereitung der Rohdaten wurden verschiedene Verfahren der Verarbeitung und Normalisierung miteinander verglichen. Zu den getesteten Verfahren gehörte die Bestimmung des prozentualen Anteils einer einzelnen gemessenen Spotintensität an der Gesamtheit aller gemessenen Intensitäten eines Microarrayexperiments (AUC-Transformation), die Berechnung des Z-scores sowie die Normalisierung anhand der gemessenen IgG-Intensitäten (vgl. 3.1.5). Wie sich in Abb. 13A-B zeigt, spiegeln die über die AUC berechneten Werte die Verhältnisse der Rohdaten wieder. Die Rohdatenwerte, die in diesem Beispiel zwischen 5.000 und 35.000 liegen, werden durch diese Variante der Datennormalisierung in einen Wertebereich von 0,4 bis 2,4 transformiert. Als Vorteil des AUC-Verfahrens ist somit anzusehen, dass sich die resultierenden Werte ausschließlich im positiven Bereich befinden, was weitere notwendige Rechenschritte, wie z.B. für den intraindividuellen Vergleich, vereinfacht. Der Z-score, welcher die Abweichung einer Spotintensität vom Mittelwert aller Spotintensitäten eines Experiments unter Berücksichtigung der Standardabweichung darstellt, transformiert in diesem Beispiel die Rohdatenwerte in einen Zahlenbereich von

Ergebnisse

-0,6 bis 1,4. Die Verhältnisse zwischen den einzelnen Variablen (Antigenen) bleiben auch hier erhalten (Abb. 13C).

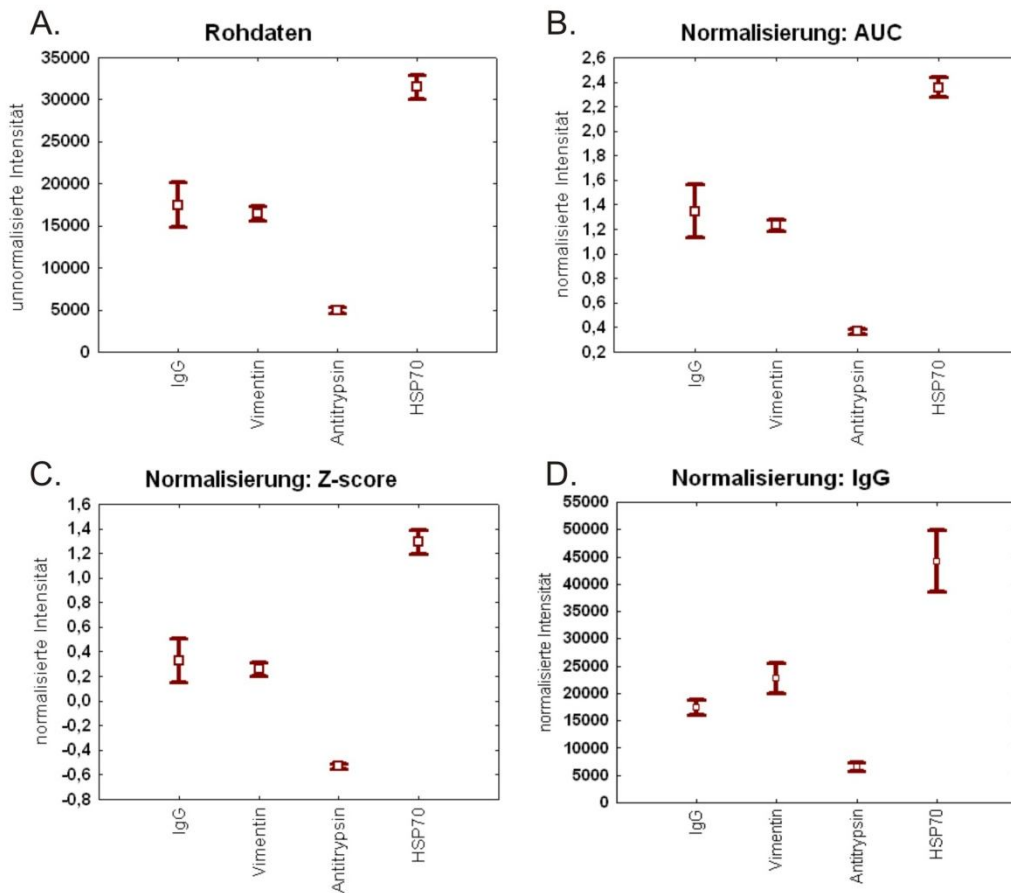


Abb. 13: Dargestellt sind die Resultate verschiedener Verfahren der Datennormalisierung im Vergleich zu den Rohdaten. Für den Vergleich der Normalisierungsverfahren wurden die vier Antigene anti-IgG, Vimentin, alpha-1-Antitrypsin und HSP70 ausgewählt. **A)** Unnormalisierte Rohdaten; **B)** Normalisierung über die area under curve (AUC); **C)** Normalisierung mittels Z-score Transformation; **D)** Normalisierung über die gemessene IgG-Intensität. Auf den X-Achsen sind jeweils die verschiedenen Antigene dargestellt, auf den Y-Achsen die gemessenen Intensitäten (**A**) und deren normalisierten Werte (**B, C, D**). Für jedes Antigen ist der $MW \pm 0,95$ Konfidenzintervall abgebildet.

Die Normalisierung der Messdaten anhand der detektierten IgG-Intensitäten nimmt nur in geringem Maße Einfluss auf den Zahlenbereich der einzelnen Werte. Die Verhältnisse zwischen den verschiedenen Antigenen verändern sich jedoch, wie anhand der errechneten Werte für Vimentin zu erkennen ist (Abb. 13D). Für die Normalisierung der Studiendaten wurde aufgrund dieser Beobachtungen das Verfahren der Z-score Transformation verwendet. Dieses vermeidet eine Verzerrung der Daten, wie sie durch das IgG-basierende Verfahren hervorgerufen werden, und ermöglicht eine Vergleichbarkeit der Arraydaten über viele unabhängige Studien hinweg, wobei hier die einzelnen Werte nicht wie bei der AUC-Normalisierung beim Hinzufügen weiterer Experimente neu berechnet werden müssen.

4.1.2 Etablierung des Antikörper-Microarray-Verfahrens

Da sich bei der Etablierung des Protein-Microarray-Verfahrens im Rahmen diese Arbeit zeigte, dass das Piezoelement-basierende Non-contact-Verfahren wesentlich besser für das Drucken proteinhaltiger Lösungen geeignet ist als das Stahlnadel-basierende Contact-Verfahren (vgl. 4.1.1), wurde diese Technologie auch für die Herstellung von Antikörper-Microarrays verwendet. Die verschiedenen, für das Drucken von Protein-Microarrays optimierten Parameter, z.B. die Einstellungen des Piezoelements, konnten für das Drucken der Antikörper-Microarrays übernommen werden. Die gewählte Antikörper-Verdünnung von 1mg/ml erwies sich als geeignet, da sie einerseits eine hohe Antikörperkonzentration der Lösung gewährleistete und sich andererseits die Viskosität der Lösung noch in einem Bereich befand, der sich von dem Piezoelement bewältigen ließ.

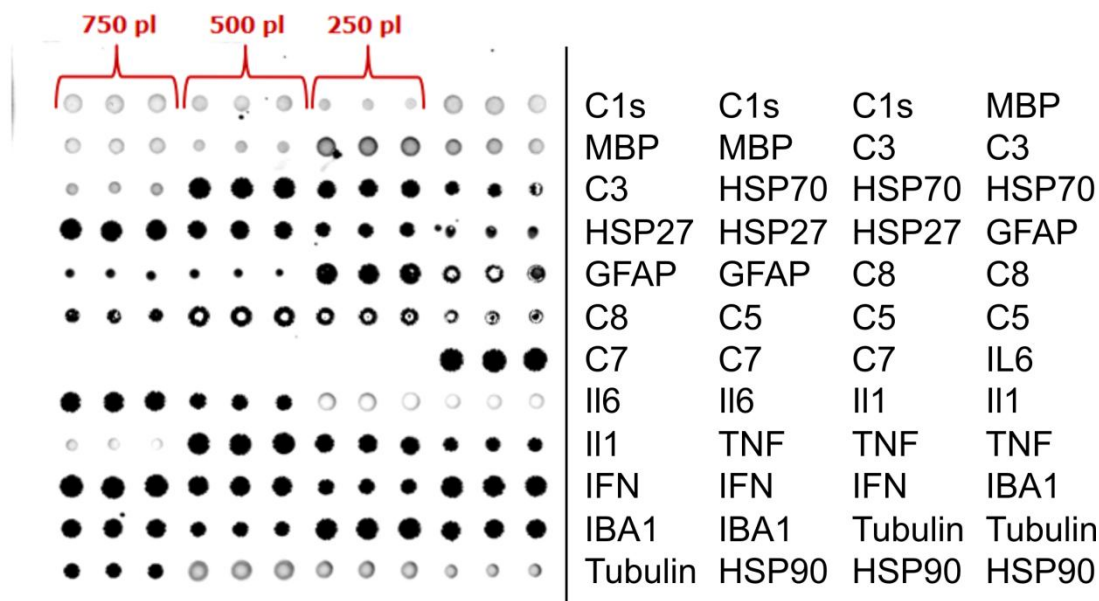


Abb. 14: Exemplarisch dargestellt ist das Reaktionsmuster eines Antikörper-Microarrays. Von jedem Antikörper wurden drei verschiedene Volumina (750 pl, 500 pl und 250 pl) auf den Objektträger aufgebracht. In der rechten Hälfte der Abbildung sind diejenigen Proteine aufgelistet, gegen welche die auf den Microarray gedruckten Antikörper gerichtet sind. Es ist zu erkennen, dass zwischen den verschiedenen Volumina eines Antikörperspots nur geringe Intensitätsunterschiede bestehen, dass sich aber manche der detektierten Signale nahe des Sättigungsbereichs befindet.

Durch die hohe Konzentration der Antikörper konnte somit ein Spotting-Volumen von mehr als 1nl vermieden werden, welches sich unweigerlich auf den Durchmesser des Spots und damit auf die Anzahl der auf einem Subarray möglichen Spots ausgewirkt hätte. Die Aussage bezüglich der Viskosität ist jedoch nur für solche Antikörper gültig, die in wässriger Lösung vorlagen. Verschiedene kommerziell erworbene Antikörper, z.B. der verwendete anti-MBP Antikörper, enthielten zwecks Stabilisierung der

Ergebnisse

Immunglobuline bis zu 40% Glycerol und wiesen somit eine wesentlich höhere Viskosität auf als Antikörper in wässriger Lösung. Um ein Drucken aller Antikörper in der gleichen Konzentration zu ermöglichen, wurden die verschiedenen Einstellungen des Piezoelements, wie Pulsweite und Voltzahl, für jeden einzelnen dieser Antikörper optimiert.

Der Effekt unterschiedlicher Mengen an gespottetem Antikörper wurde anhand von 16 verschiedene Antikörpern untersucht, die jeweils in drei verschiedenen Volumina (750pl, 500pl, 250pl) auf einem Array vorlagen und mit 10µg Serumprotein inkubiert wurden. Wie sich in Abb. 14 erkennen lässt, zeigen sich nur bei wenigen Antikörpern geringfügige Unterschiede in der detektierten Signalstärke. Auffällig ist dagegen, dass sich die Intensitätswerte mancher Spots nahe der Sättigung und somit im Bereich des Detektionsmaximums befinden. Ein dynamischer Messbereich ist unter diesen Voraussetzungen nicht gegeben. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurde die Menge an inkubiertem Protein auf fünf µg gesenkt und das Volumen an gespottetem Antikörper auf einen nl gesteigert.

4.1.3 Massenspektrometrie-basierende Proteomanalyse

Die geplante Durchführung einer explorative Analyse des Retinaproteoms, bei der im Gegensatz zum Antikörper-Microarray-Verfahren keine spezifischen Proteine im Fokus stehen, erforderte die Notwendigkeit, eine Methode zu entwickeln, welche einerseits die Detektion möglichst vieler verschiedener Proteine erlaubt und andererseits deren Quantifizierung zulässt. Als Mittel der Wahl war hier ein Massenspektrometrie-basierendes Verfahren anzusehen, welches mit zwei Protein/Peptidseparationstechniken zur Probenaufbereitung kombiniert werden sollte.

Probenaufbereitung

Um eine umfassende massenspektrometrische Analyse der aus den Spenderaugen gewonnenen Retinaproteine zu ermöglichen, bedurfte es, wie unter 1.8 geschildert, zuerst einer Herabsetzung der Probenkomplexität.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Probenfraktionierung durch eine Kombination von zwei klassischen Verfahren der Proteinanalytik. Dabei wurden die Proteine in der ersten Dimension mittels der SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt einem Trypsinverdau unterzogen. Durch den Einsatz kommerzieller Gele konnte hierbei, neben einer hohen Trennschärfe, auch eine hohe Reproduzierbarkeit der Probenfraktionierung erreicht werden (vgl. 3.3.2, Abb. 7). Die aus dem Proteinverdau resultierenden Peptide

Ergebnisse

wurden in einer zweiten Dimension unter Verwendung von C18-ZipTips fraktioniert - ein Schritt, welcher der weiteren Herabsetzung der Probenkomplexität diene. Als positiver Nebeneffekt dieser Fraktionierung ist die damit einhergehende Säuberung der Peptide anzusehen, da durch das chromatographische Verfahren in der Peptidlösung vorliegende Verunreinigungen, wie z.B. Salze, entfernt werden. Die Bindekapazität der verwendeten Spitzen liegt bei 5µg Protein/Peptid, so dass bei einer auf dem Gel eingesetzten Proteinmenge von 50µg und einer anschließenden Unterteilung der Laufspur in 18 Teilbereiche davon auszugehen ist, dass das gesamte Probenmaterial von den Tips gebunden und durch Elution auf den Probenträger für die Massenspektrometrie übertragen wurde. Die Fraktionierung des gebundenen Probenmaterials erfolgte durch einen konstant ansteigenden ACN-Gradienten, der bei einer Konzentration von 60% endete. Höhere ACN-Konzentrationen wurden zur Fraktionierung nicht verwendet, da sich bei Vorversuchen zeigte, dass bei 60% ACN bereits alle Peptide von dem Säulenmaterial eluiert und somit weitere Schritte überflüssig sind. Je nach ACN-Konzentration eluieren unterschiedliche Peptide von der Säule, und nur wenige Peptide „schmier“ über mehrere Fraktionen hinweg, so dass von einer adäquaten Auftrennung der Probenpeptide auszugehen ist (Anhang Abb. 1).

Zu Beginn des Projekts wurde die Peptidfraktionierung mittels ZipTip per Hand getestet. Hierbei zeigte sich, dass diese manuelle Ausführung für die Bearbeitung eines hohen Probenaufkommens ungeeignet ist, da sich Ungenauigkeiten in den Pipettiervorgängen nicht vermeiden lassen. So stellt das in die Pipettenspitze eingebettete Säulenmaterial bei der Aufnahme und Abgabe von Lösungen einen hohen Widerstand dar, der bei mehrfacher Benutzung einer Spitze zu stark schwankenden Elutionsvolumina führt und somit die Reproduzierbarkeit der Daten herabsetzt. Auch zeigte sich, dass sich bei einer manuellen Nutzung der Pipettenspitzen häufig Luftblasen in dem eingebetteten Säulenmaterial festsetzen und somit die Spitze verstopfen. Eine Beseitigung dieser Luftblasen ist nur durch mehrmaliges Spülen der Säule möglich - eine Prozedur, die einerseits sehr zeitaufwendig ist und andererseits die Reproduzierbarkeit der Daten mindert, da durch die zusätzlichen Spülvorgänge möglicherweise auch Probenpeptide eluiert werden.

Um diesen Faktoren entgegenzuwirken, wurde die Peptidfraktionierung mittels C18-ZipTip auf einen Pipettierroboter umgesetzt, welcher alle notwendigen Schritte - von der Bindung der Probenpeptide an das Säulenmaterial bis hin zur Elution auf den Probenträger für die Massenspektrometrie - ausführt. Die eluierten Volumina wiesen hier

Ergebnisse

eine wesentlich höhere Uniformität auf als bei der manuellen Ausführung der Peptidfraktionierung. Auch die Problematik der sich in der Säule bildenden Luftblasen konnte durch den Robotereinsatz beseitigt werden. Die Reproduzierbarkeit des Versuchsablaufs wurde somit durch diesen Schritt entscheidend verbessert. Ein weiterer Vorteil der robotisierten Versuchsdurchführung liegt in dem beachtlichen Zeitgewinn. So können mit der bestehenden Roboterkonfiguration zwei ZipTip-Fraktionierungen parallel durchgeführt werden. Die benötigte Zeit für die achtstufige Fraktionierung von 36 Gelbanden - dies entspricht zwei Patientenproben - liegt inklusive der Matrixapplikation bei ca. sechs Stunden im Gegensatz zu mehr als 10 Stunden, die bei einer manuellen Ausführung oder ca. 24 Stunden, die bei einer HPLC-Fraktionierung notwendig wären.

Die angewandte zweistufige Fraktionierungsstrategie führte insgesamt zu der Gesamtzahl von 144 Messpunkten pro eingesetzter Patientenprobe (18 Gelbanden pro Laufspur, acht Fraktionen pro Gelbande), so dass eine wesentlich tiefgehendere Proteomanalyse ermöglicht wurde als bei einer direkten Messung des Probenmaterials.

Massenspektrometrische Analyse und Datenbankabgleich

Die generierten Peptidfraktionen wurden mit einem MALDI LTQ Orbitrap XL Hybridmassenspektrometer gemessen. Dabei erfolgte die Erfassung der Molekülmassen der in den Proben vorhandenen Peptide in der Orbitrap mit höchstmöglicher Auflösung (MS-Analyse). Um mögliche Unregelmäßigkeiten in der Verteilung der Matrix-Peptidkristalle auf dem Probenträger auszugleichen, wurden die MS-Spektren für die Generierung der Peakmassen/Intensitäten von fünf verschiedenen Positionen auf dem Probenträger gemittelt.

Da sich, wie in Abb. 15 zu erkennen ist, ein Großteil der detektierten Peakmassen in einem Bereich von 1000-2000Da befand, wurde der zu erfassende Massenbereich von 1000-4000Da in zwei einzelne Messbereiche unterteilt (1000-1700Da, 1700-4000Da). Verbessert wurde durch die Zweiteilung vor allem die Detektion von gering abundanten Peptiden, deren Intensitäten nur wenige Prozent des jeweils höchsten Peaks im Spektrum (100%) ausmachen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass mehr als 50 Peptidmassen einer Fragmentierung bzw. einer MS/MS Analyse zugeführt werden können (das Resultat einer Peptidfragmentierung ist exemplarisch in Abb. 16 dargestellt). So limitiert die Steuerungssoftware des Massenspektrometers die maximale Anzahl an zu fragmentierenden Peptidmassen auf 50 pro Messzyklus. Durch die Unterteilung des Messbereichs wird diese künstliche Grenze umgangen, und bis zu 100

Ergebnisse

verschiedene Peptidmassen pro Peptidfraktion/Spot können fraktioniert und ihre Aminosäuresequenzen ermittelt werden.

In dieser Studie wurden von jedem Spot 50 Peptidmassen in dem Massenbereich von 1000-1700Da und 30 Peaks in dem Massenbereich von 1700-4000Da ausgewählt. Sowohl die Fragmentierungen als auch die Detektion der resultierenden Fragmentenmassen wurden in der Ionenfalle durchgeführt. Die Wahl für die im Vergleich zur Orbitrap wesentlich geringer auflösenden Ionenfalle ist begründet in ihrer hohen Messgeschwindigkeit sowie ihrer höheren Sensitivität.

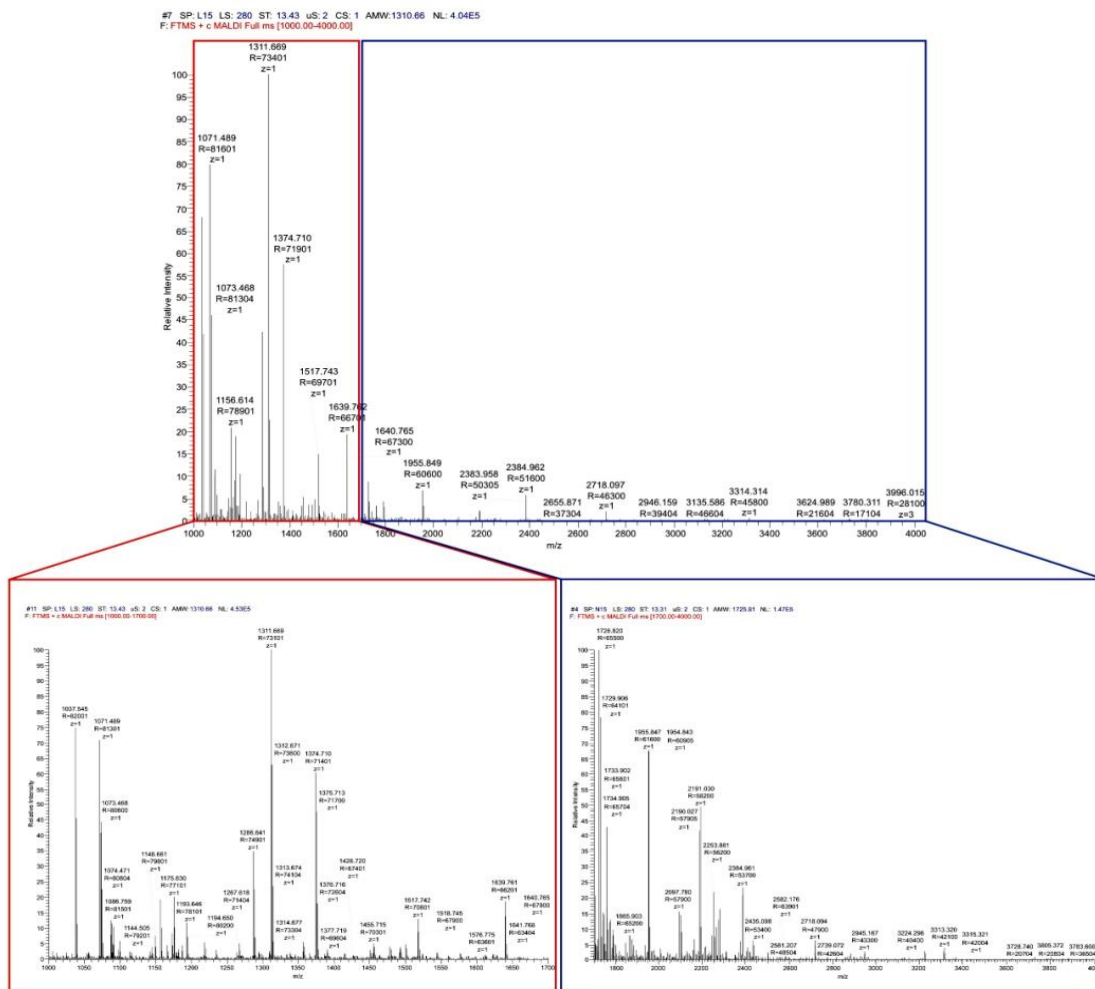


Abb. 15 Unterteilung des Messbereichs. Der zu erfassende Massenbereich von 1000-4000Da wurde aufgrund der hohen Peakdichte im Bereich von 1000-2000Da in zwei Messbereiche unterteilt. So wurden einerseits Massen in einem Bereich von 1000-1700Da (rot) und andererseits in einem Bereich von 1700-4000Da (blau) erfasst.

Durch einen Abgleich der aus den Fragmentspektren gewonnenen Peakinformationen mit einer Datenbank konnte neben den Aminosäuresequenzen der Peptide auch die Abweichung der experimentell bestimmten Massen zu denen der Datenbank ermittelt werden. Die durchschnittliche Massenabweichung der experimentellen Peptidmassen zu

Ergebnisse

den in der Swiss-Prot Datenbank hinterlegten lag bei lediglich 4,31ppm (MD: 3,8ppm; SD: 2,86ppm). Dies entspricht einer mittleren Abweichung von 0,0043Da bei einem 1000Da Molekül und belegt die extrem hohe Massengenauigkeit der Orbitrap-Massenspektrometrie.

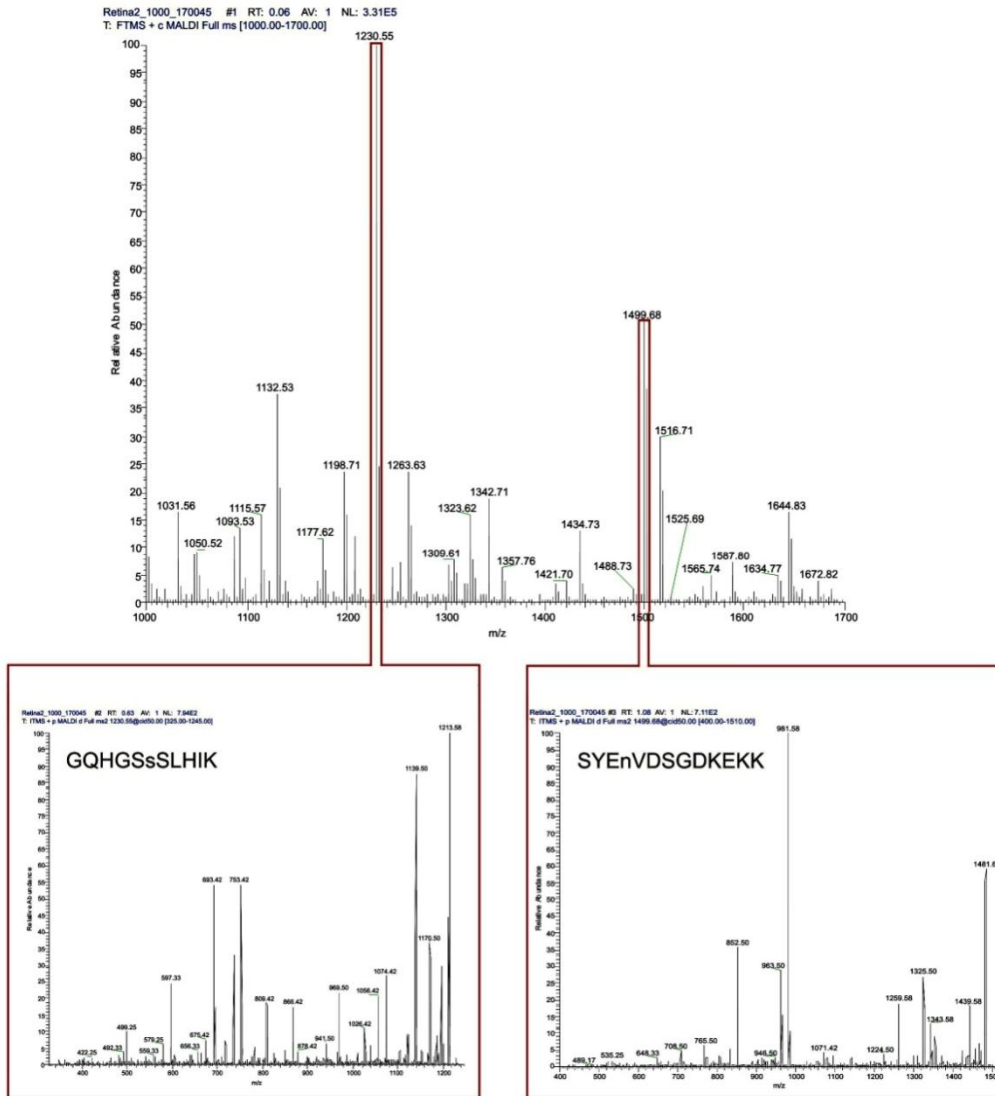


Abb. 16: Beispielhafte Darstellung des Resultats zweier Peptidfragmentierungen. Im oberen Teil der Abb. ist das Übersichtspektrum mit einem Massenbereich von 1000-1700Da dargestellt. Anhand verschiedener Kriterien wurden zwei Peptidmassen (1230,55Da, 1499,69Da) ausgewählt und einer MS/MS-Analyse unterzogen. Die erzeugten Fragmentspektren sind im unteren Bereich der Abb. dargestellt, die ermittelte Aminosäuresequenz findet sich hier ebenfalls.

Wie anhand von Abb. 17A gezeigt, führt eine geringere Massenabweichung zu einem höheren Peptid-Score. Begründet ist dies in einer besseren Zuordnung der Massen, die in einer höheren Anzahl an mit der Datenbank übereinstimmenden Fragmentationen resultiert (Abb. 17B). Eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der zugeordneten Fragmentationen und der Höhe des Peptide-Scores konnte ebenfalls nachgewiesen

Ergebnisse

werden ($r=0,47$; Abb. 18A). Die Höhe des erreichten Peptid-Scores stellt das Gütemaß der Entschlüsselung der Aminosäuresequenz und deren Zuordnung zu einem Protein dar: je höher der Score, desto eindeutiger die Zuordnung zu einem spezifischen Protein.

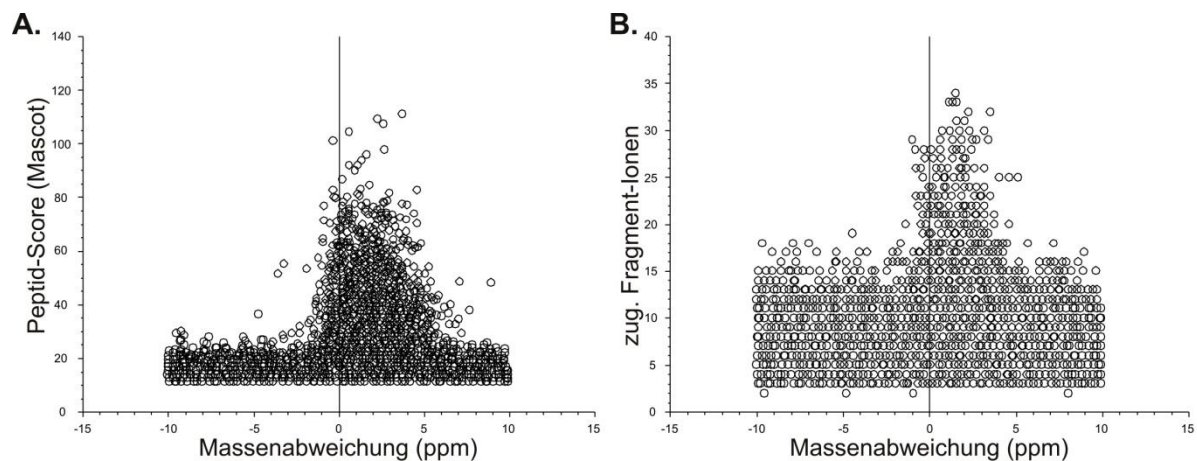


Abb. 17: Auswirkungen der Massenabweichungen der experimentell bestimmten Massen zu denen der Datenbank auf den von Mascot ausgegebenen Peptid-Score (A), sowie die Anzahl der pro Peptid zugeordneten Fragment-Ionen (B).

Dass mehrfach ein und dieselbe Sequenz verschiedenen Proteinen zugeordnet wurde, zeigt sich in Abb. 18B. Hier ist zu erkennen, dass einige Peptide bis zu zehn und wenige sogar bis zu 18 unterschiedlichen Proteinen zugeordnet wurden. Es wurde jedoch auch deutlich, dass mit steigendem Peptide-Score die Anzahl der möglichen Zuordnungen sinkt und die Identifikation somit spezifischer wird (Abb. 18B). Insgesamt betrachtet, trifft eine Mehrfachzuordnung auf weniger als 15% der zugeordneten Peptide zu (Anhang Tab. 5).

Um der zu Beginn des Kapitels angesprochenen Inhomogenität der Peptidkristallisation Rechnung zu tragen, wurde jeder Messzyklus inklusive der MS- und MS/MS-Messung einmal wiederholt, so dass pro Spot/Peptidfraktion 160 Fragmentmessungen durchgeführt wurden. So resultierte in den meisten Fällen die Fragmentierung eines hoch abundanten Peptids in einem qualitativ hochwertigen Spektrum, dessen Peakinformationen zu einer Entschlüsselung der Aminosäuresequenz und einer Proteinzuzuordnung führten. In mehreren Fällen konnten jedoch von hoch abundanten Peptiden nur wenige Fragmentbruchstücke detektiert und somit nur wenige Fragmentationen zugeordnet werden (Abb. 18C). Hieraus leitet sich, wie zuvor geschildert, ein geringerer Peptide-Score ab (Abb. 18A).

Auf der anderen Seite konnte in vielen Fällen auch von extrem gering abundanten Peptiden ein qualitativ hochwertiges Fragmentspektrum generiert werden. Der

Ergebnisse

durchschnittlich erreichte Peptid-Score unter Berücksichtigung der nicht zugeordneten Peptide lag bei $15,78 \pm 8,36$ ($N=34738$), der durchschnittliche Score der zugeordneten Peptide bei $22,71 \pm 12,64$ ($N=10041$).

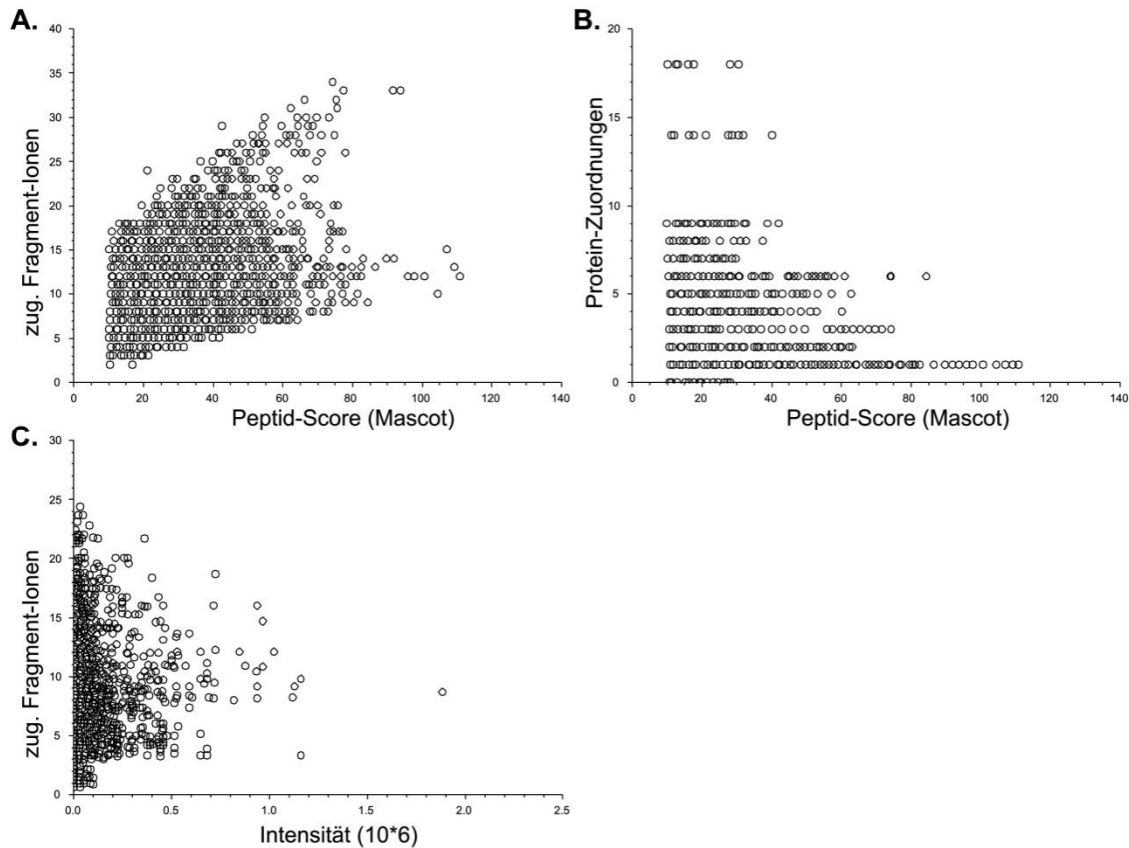


Abb. 18: Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der einem Peptid zugeordneten Fragmentionen und dem von Mascot generierten Peptid-Score (A). Auswirkung des erzielten Peptid-Scores auf die Anzahl der Protein-Zuordnungen des Peptids (B). Zusammenhang zwischen der Abundanz/Intensität eines Peptids und der Anzahl der ihm zugeordneten Fragment-Ionen (C).

250 Proteine konnten signifikant identifiziert werden (vgl. Anhang, Tab. 6), der durchschnittliche Protein-Score, der in etwa die Summe der zugeordneten Peptid-Scores darstellt, lag bei $234,03 \pm 718,55$. Die erreichte Sequenzabdeckung pro Protein lag im Mittel bei 17,45%, mit einer Standardabweichung von 15,28%. Die Diskrepanz zwischen der hohen Anzahl der zugeordneten Peptide und der Anzahl an signifikant identifizierten Proteinen ist durch die hohe Redundanz der fragmentierten Peptidmassen zu erklären. So wurden zahlreiche Peptidmassen mehrfach fragmentiert, da ihre Massen in verschiedenen Peptidfraktionen einer Gelbande und darüber hinaus auch in verschiedenen Patientenproben detektiert wurden. Für die Berechnung des Protein-Scores wurde jeweils nur das Fragmentspektrum mit dem höchsten Score einer spezifischen Masse verwendet.

4.2 Ergebnisse der Analyse von Patientenproben

4.2.1 Analyse der Autoantikörperprofile von Glaukompatienten

Als maßgebliches Ziel dieser Arbeit galt die Analyse von Autoantikörper-Mustern von Glaukompatienten und im Speziellen der Vergleich dieser Immunreaktionen in den Serum- und Kammerwasserproben einzelner Individuen. Die Realisierung des Vorhabens wurde durch den Einsatz des erfolgreich etablierten Protein-Microarray-Verfahrens ermöglicht.

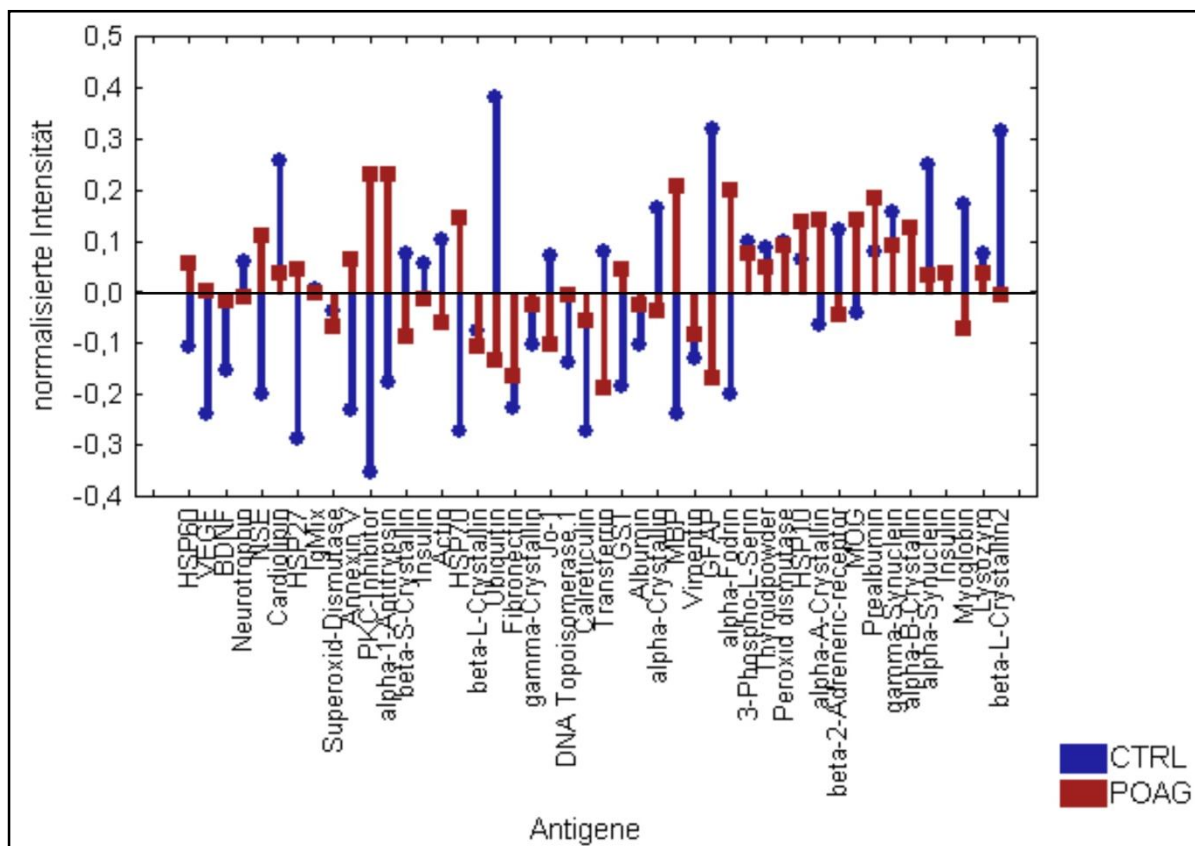


Abb. 19: Übersichtsprofil der gemittelten Serum-Intensitätswerte. Auf der Y-Achse sind die normalisierten Intensitäten aufgetragen, auf der X-Achse die im Versuch eingesetzten Antigene. Die blaue Linie repräsentiert die Kontrollgruppe (CTRL), die rote Linie die Glaukomgruppe (POAG).

Um neben dem intraindividuellen Vergleich der beiden Körperflüssigkeiten auch eine Aussage über die Veränderung der Immunantwort von Glaukompatienten im Vergleich zu Gesunden treffen zu können, wurden neben 37 Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom auch 31 gesunde Kontrollpatienten in die Studie eingeschlossen. Bei allen Patienten erfolgte sowohl die Analyse der Serum- als auch der Kammerwasserproben. Dabei wurden ausschließlich Autoantikörper-Reaktivitäten gegen aufgereinigte Antigene untersucht (n=37). Wie in den vorangegangenen Studien konnten

Ergebnisse

bei allen Probanden komplexe Autoantikörpermuster detektiert werden, dies sowohl im Serum als auch im Kammerwasser (Abb. 10).

In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob sich die Mengen an IgG/A/M in den Serum- und Kammerwasserproben der beiden Probandengruppen oder der beiden Körperflüssigkeiten voneinander unterscheiden. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Antikörpertitern der Glaukomgruppe (POAG) und der Kontrollgruppe (CTRL) (Serum: $P \geq 0,9$; Kammerwasser: $P \geq 0,6$; Anhang Abb. 2.) festgestellt werden, wie auch bei dem Vergleich der beiden Körperflüssigkeiten ($P \geq 0,7$).

Der Vergleich der Antikörper-Muster zwischen den beiden Probandengruppen zeigte dagegen zahlreiche und deutliche Unterschiede. In diesem Zusammenhang wurde zunächst das Serum untersucht. Hier konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe im Serum der POAG-Patienten zahlreiche erhöhte, aber auch geminderte Antikörperreaktionen festgestellt werden. Eine grafische Gegenüberstellung der Mittelwerte der beiden Gruppen findet sich in Abb. 19.

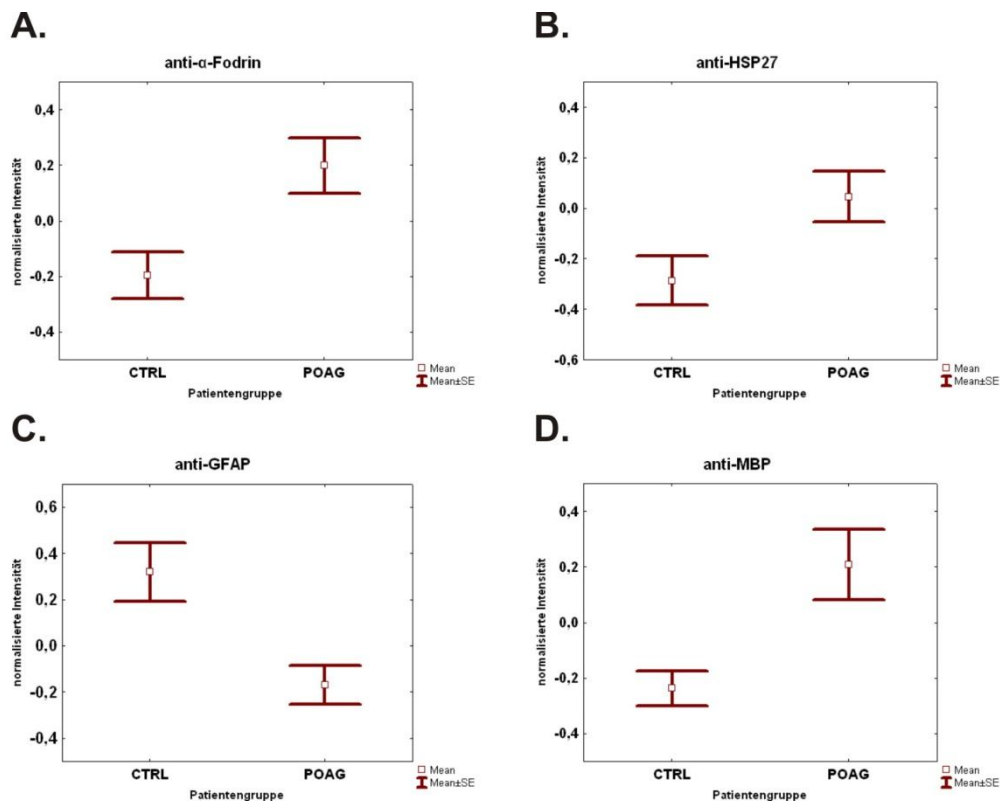


Abb. 20: Whisker-Plots für vier Serum-Autoantikörper mit signifikanten Änderungen ihrer Reaktivität ($P \leq 0,05$). Auf der Y-Achse findet sich die normalisierte Reaktionsintensität, auf der X-Achse die beiden Gruppen. A-D: Whisker Plot für (A) anti- α -Fodrin; (B) anti-HSP27; (C) anti-GFAP; (D) anti-MBP.

Ergebnisse

Zu den statistisch signifikant erhöhten Autoantikörpern gehörten beispielweise anti- α -Fodrin ($P \leq 0,0027$), anti-Annexin V ($P \leq 0,026$), anti-HSP27 ($P \leq 0,019$), anti-HSP70 ($P \leq 0,0033$) und anti-MBP ($P \leq 0,0028$). Für andere Antigene konnten in den Seren von Glaukoma-Patienten dagegen signifikant erniedrigte Autoantikörper-Reaktivitäten festgestellt werden. Hierzu gehören das saure Gliafaserprotein (GFAP, $P \leq 0,001$), β -L-Crystallin ($P \leq 0,03$) oder auch Ubiquitin ($P \leq 0,0038$). Die statistischen Daten der signifikant ($P \leq 0,05$) veränderten Antikörperreaktionen finden sich exemplarisch in Abb. 20 sowie in umfassender Form in Abb. 3 des Anhangs.

Mittels der multivariaten Diskriminanzanalyse konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Serum zwischen den POAG-Patienten und der Kontrollgruppe ermittelt werden ($P \leq 0,002$).

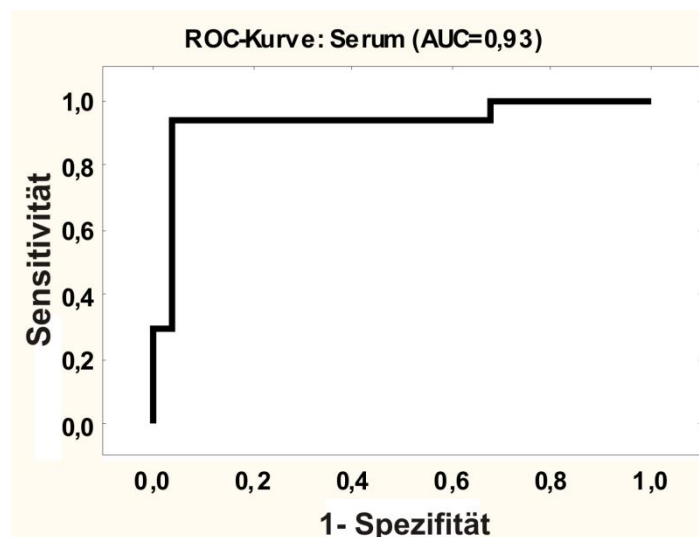


Abb. 21: ROC-Kurve, berechnet anhand der Serumwerte ($AUC=0,93$) Auf der Y-Achse findet sich die Sensitivität, auf der X-Achse die Spezifität, wobei der Wert hier als 1-Spezifität angegeben ist.

Die Daten der zehn Antigene, welche die signifikantesten Unterschiede in den Autoantikörper-Reaktionen der beiden Probandengruppen aufwiesen, wurden desweiteren dafür verwendet, ein künstliches neuronales Netz hinsichtlich der Mustererkennung und Klassifizierung von Glaukoma-Patienten zu trainieren (vgl. 3.1.5). Das Training der neuronalen Netze erfolgte mit einem Trainingsdatensatz, welcher Daten von 50% der Probanden enthielt. Die Effizienz des trainierten Modells bei der Klassifizierung von Patienten wurde mit einem Testdatensatz überprüft, der die andere Hälfte der Probanden beinhaltete. Die Ergebnisse für die Serumproben sind in Abb. 21 mittels einer ROC-Kurve dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass Glaukoma-Patienten anhand des trainierten Autoantikörper-Modells mit einer Sensitivität von mehr als 90%

Ergebnisse

bei einer gleichzeitigen Spezifität von mehr als 93% detektiert werden konnten (AUC=0,93).

Die Antikörper-Reaktionen im Kammerwasser der Glaukumpatienten zeigten größtenteils gleiche oder zumindest ähnliche Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollprobanden. Insgesamt waren die Unterschiede aber ein wenig schwächer ausgeprägt als die des Serums: So konnte im Kammerwasser nur bei acht Antigenen (Serum: 12) ein signifikanter Unterschied ($P \leq 0,05$) der Antikörper-Reaktionen von Glaukumpatienten im Vergleich zu den von Gesunden festgestellt werden (Anhang Abb. 4 und Abb. 5).

Intraindividueller Vergleich

Eine Aussage darüber, ob die Autoantikörper-Reaktivitäten des Serums diejenigen des Kammerwassers widerspiegeln, wurde durch einen direkten Vergleich der Messwerte beider Körperflüssigkeiten eines Probanden und die Ermittlung der Differenz der Kammerwasseraktivitäten zu denen der Serumwerte ermöglicht (vgl. 3.1.5, Formel 5). Hierbei zeigte sich, dass sich die Antikörper-basierenden Immunreaktivitäten der beiden Körperflüssigkeiten nur geringfügig voneinander unterscheiden und dass die meisten Differenzen unterhalb der 100% Marke liegen, welche als Signifikanzschwelle festgelegt wurde. Diese Beobachtung gilt sowohl für die Gruppe der Kontrollprobanden als auch für die der Glaukumpatienten. Hinsichtlich der Kontrollgruppe konnten für einige Antigene signifikant stärkere Reaktivitäten im Serum beobachtet werden. Hierzu gehören die Strukturproteine MBP und GFAP, aber beispielsweise auch das Hitzeschockprotein 60. Für andere Antigene, z.B. α -1-Antitrypsin, wurden dagegen im Kammerwasser der Kontrollprobanden höhere Werte ermittelt. Grundsätzlich stimmten aber die Immunreaktivitäten gegen mehr als 80% der getesteten Antigene in Serum und Kammerwasser überein bzw. wiesen nur leichte Differenzen auf (Abb. 22A). Ein ähnliches Bild ergab sich bei dem Vergleich von Serum und Kammerwasser bezüglich der Antikörper-Reaktivitäten bei den Glaukumpatienten (Abb. 22B). Auch hier konnten für einige wenige Antigene höhere Autoantikörper-Reaktivitäten im Serum festgestellt werden. Als Antigene, bei denen diese Differenz mehr als 100% betrug, sind Albumin sowie α -1-Antitrypsin zu nennen.

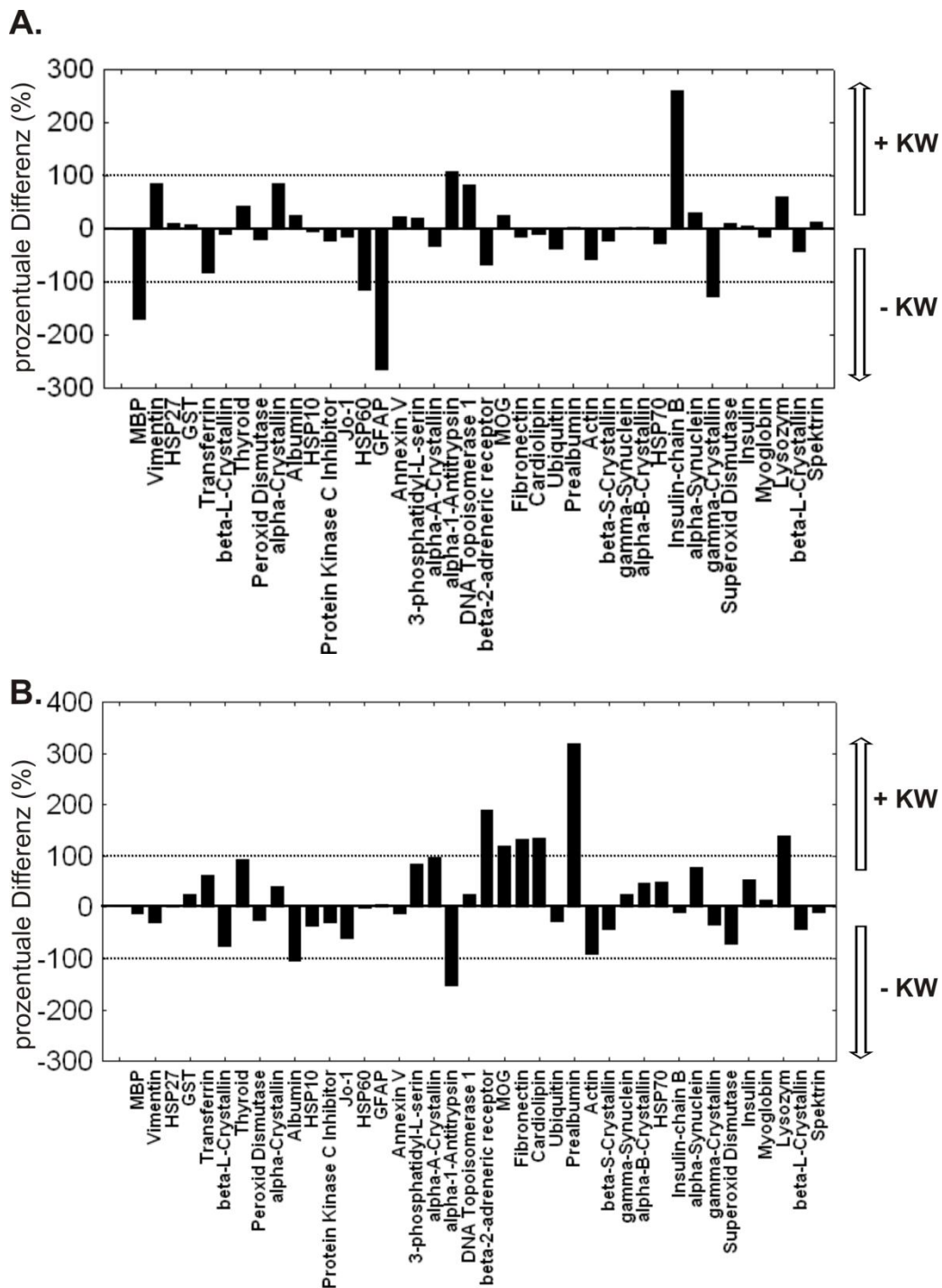


Abb. 22: Intraindividueller Vergleich der Autoantikörper-Reaktivitäten in Serum und Kammerwasser. Es wurde für jeden einzelnen Probanden der prozentuale Anteil der Kammerwasserreaktionen an denen des Serums ermittelt und grafisch dargestellt. Auf den X-Achsen sind die verschiedenen Antigene aufgelistet, auf den Y-Achsen die ermittelten Differenzen. Werte im positiven Bereich stellen höhere Reaktionen im Kammerwasser dar als im korrespondierenden Serum, Werte im negativen Bereich schwächere Reaktionen im Kammerwasser. **A)** Intraindividueller Vergleich der Kontrollprobanden; **B)** Intraindividueller Vergleich der POAG Patienten. Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte.

Die Ergebnisse für α -1-Antitrypsin stehen interessanterweise im Gegensatz zu denen der Kontrollgruppe, für die eine höhere Reaktivität der anti- α -1-Antitrypsin-Antikörper im

Ergebnisse

Kammerwasser ermittelt wurde. Wie auch in der Kontrollgruppe konnten in den Kammerwasserproben der Glaukumpatienten für manche Antigene signifikant höhere Messwerte ermittelt werden als im korrespondierenden Serum. Hierzu gehören unter anderem die Proteine Fibronectin und Transthyretin. Auch in den Proben der Glaukumpatienten stimmen aber allgemein betrachtet die Autoantikörper-Reaktionen in Serum und Kammerwasser bei mehr als 80% der getesteten Antigene überein oder weisen nur geringfügige Unterschiede auf.

GO-Analysen

Die Ermittlung der biologischen Funktionen getesteter Antigene wurde durch eine Abfrage der Datenbanken des GeneOntology Consortiums durchgeführt (vgl. 3.1.7). Ermittelt wurden die Funktionen solcher Antigene, bei denen die Autoantikörper des Serums oder des Kammerwassers einen signifikanten Unterschied zwischen den Probanden der Kontrollgruppe und der Glaukomgruppe zeigten.

| biologische Funktion | Serum-Marker | | | | | | | | | | | KW-Marker | | | | | | | | | | |
|---|-----------------|------------------|-----------------------|-----------|-------------|------|-------|-------|-----|----------------|-----------|-----------|-------|--------|-----------------|------------------------|-------------|-------|-----|-----|--------|---|
| | α -1-An* | α -Fodhi- | β -L-Crystallin | Annexin V | Fibronectin | GFAP | HSP27 | HSP70 | MBP | PK-C Inhibitor | Ubiquitin | Gesamt | Actin | Annex- | α -A-Cr- | α -B-Crystallin | Cardiolipin | HSP10 | GST | MBP | Gesamt | |
| anti-apoptotisch | | | | X | | | X | | | | | 2 | X | X | X | | X | X | | | | 5 |
| Zytoskelett/Zytoskelett-assoziiert | X | | X | | X | | X | | X | | | 5 | X | X | | X | | | | | X | 4 |
| sonstige strukturelle Funktionen | X | X | | X | | | | | X | | | 4 | X | | X | X | | | | | X | 4 |
| Reaktion auf Stress/Stimulus | X | | | X | X | | X | X | X | | X | 6 | X | X | | | X | | | X | | 4 |
| intrazellulärer Vesikelverkehr/Regulation | X | | | | X | | | X | | | | 3 | | | X | X | | | | | | 2 |
| Entzündungs/Wundprozesse | X | | | X | X | | | | | | | 3 | X | | | | | | | | | 0 |
| Organsitaion zellulärer Strukturen | X | | X | | | | X | X | | X | | 5 | X | | | | | | | | | 1 |
| allgemeine Entwicklungsprozesse | | | | X | | | | | X | | | 2 | X | X | X | X | | X | X | X | | 7 |
| Entwicklung des zentralen Nervensystems | | | | | | | | | X | | | 1 | | | | | | X | X | | | 2 |
| Bestandteil der Linse | | X | | | | | | | | | | 1 | | X | X | | | | | | | 2 |
| Zellbewegung/Lokalisation der Zelle | | | | | X | | X | | | | | 2 | | | | | | | | | | 0 |

Abb. 23: Übersicht über die verschiedenen ermittelten biologischen Proteinfunktionen. In den Spalten sind diejenigen Antigene aufgeführt, deren Autoantikörperantwort einen signifikanten Gruppenunterschied zwischen CTRL und POAG aufwies. Die Marker für Serum und Kammerwasser sind getrennt aufgeführt. Ein X markiert eine Zuordnung zu der jeweiligen Proteinfunktion, wobei rot für eine erhöhte Antikörper-Reaktivität und blau für eine geminderte Reaktivität der POAG-Probanden steht.

Die zahlreichen den Antigenen zugeordneten Funktionen wurden der Übersicht halber in einem zweiten Schritt manuell zu funktionell artverwandten Gruppen zusammengefasst. Auffälligerweise konnten viele der statistisch überrepräsentierten Annotationen funktionalen Bereichen wie dem Zytoskelett, dem intrazellulären Vesikelverkehr,

apoptotischen Prozessen oder der allgemeinen Stressbewältigung zugeordnet werden (Abb. 23).

Den meisten Proteinen wurden mehreren Funktionen zugeordnet, wie z.B. dem Hitzeschockprotein 27, welches sowohl bei anti-apoptotischen Vorgängen eine Rolle spielt als auch bei der Regulation des Zytoskeletts oder der Reaktion auf externe Stimuli. Von den Autoantikörpern im Serum scheinen vor allem diejenigen Proteine betroffen zu sein, die mit der Stressabwehr (n=6) in Verbindung stehen oder die an zytoskelettalen Prozessen (n=5) beteiligt sind. Im Kammerwasser sind insbesondere solche Proteine von den veränderten Antikörper-basierenden autoimmunen Prozessen betroffen, die an allgemeinen Entwicklungsprozessen (n=7) sowie anti-apoptotischen (n=5) Vorgängen beteiligt sind, aber auch zahlreiche Proteine des Zytoskeletts oder der Stressbewältigung.

4.2.2 Fokussierte Proteinanalyse mittels Antikörper-Microarrays

Mit Hilfe des Antikörper-Microarray-Verfahrens konnte die gezielte Expressionsanalyse verschiedener Proteine durchgeführt werden. Im Fokus standen dabei Proteine des Komplementsystems, verschiedenen Zytokinen sowie Proteine, die unter funktionalen Gesichtspunkten als Stressantwort zu betrachten sind. Die Unterscheidung von potenziellen gewebespezifischen Veränderungen und systemisch vorliegenden Änderungen wurde einerseits durch die Analyse von Retinaproben und andererseits von Serumproben von Glaukoma-Patienten ermöglicht, die gesunden Kontrollprobanden vergleichend gegenüber gestellt wurden.

Fokussierte Analyse von Serumproteinen

Zur Ermittlung der relativen Abundanzen verschiedener Proteine des Serums und zur Durchführung eines Vergleichs dieser Proteinmengen zwischen Glaukoma-Patienten und Kontrollprobande, wurden die Blutproben von 68 Studienpatienten analysiert, die sich in 31 Kontrollpatienten und 37 Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom unterteilen. Für die meisten der getesteten Proteine konnten bei allen Patienten eindeutige Signale festgestellt werden. Einige wenige Proteine, z.B. das Surfactant protein D oder das Protein S100, zeigten bei keinem der Patienten ein detektierbares Signal. Die stärksten Signale konnten für verschiedene Bestandteile des Komplementsystems, z.B. den Komplementfaktor C5 oder C6, aber auch für andere Proteine, wie IBA1 oder β -Tubulin, festgestellt werden (Abb. 24).

Ergebnisse

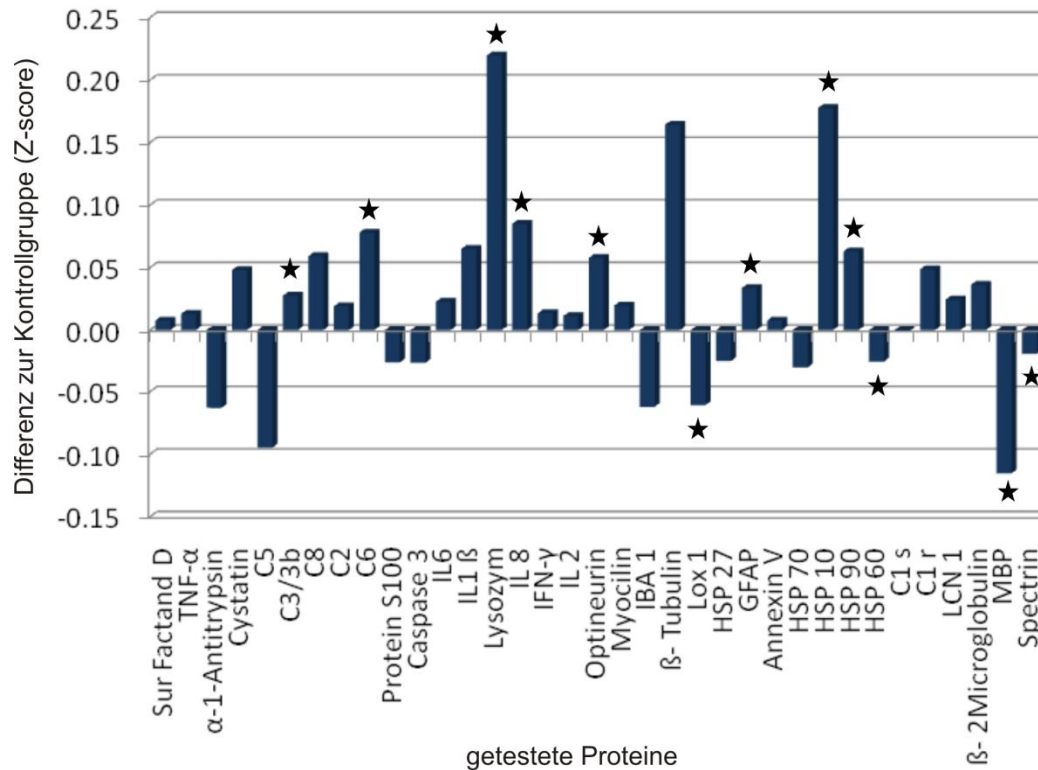


Abb. 24: Dargestellt sind die Abweichungen der detektierten Proteinmengen in den Serumproben von Glaukmapatienten im Vergleich zu den von Kontrollprobanden. Auf der X-Achse sind die verschiedenen getesteten Proteine aufgeführt, auf der Y-Achse die Abweichungen zur Kontrollgruppe. Balken im positiven Bereich symbolisieren erhöhte Werte, Balken im negativen Bereich geminderte Werte in den Proben von Glaukmapatienten. Die abgebildeten Daten beziehen sich jeweils auf den Gruppen-Mittelwert. Für Proteine, die mit einem Stern versehen sind, konnte ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied ($P \leq 0,05$) festgestellt werden.

Die statistische Analyse der Messdaten zeigte zahlreiche signifikante Unterschiede zwischen den Proteinprofilen der Glaukmapatienten und denen der Kontrollgruppe, wobei im Serum der Glaukmapatienten sowohl erhöhte Proteinmengen detektiert werden konnten als auch geminderte (Abb. 25, Liste aller Proteine mit signifikant veränderten Mengen mit $P \leq 0,05$ siehe Anhang Abb. 6). Bei Glaukmapatienten erhöhte Mengen konnten z.B. für die Komplementproteine C3/3b ($P \leq 0,04$) und C6 ($P \leq 0,009$) festgestellt werden, ebenso für zytoskelettale Proteine wie das saure Gliafaserprotein (GFAP, $P \leq 0,03$) oder β -Tubulin ($P \leq 0,02$). Einige Endzündungsmarker, wie Interleukin 1- β ($P \leq 0,01$) oder Interleukin 8 ($P \leq 0,02$), zeigten ebenfalls signifikant erhöhte Proteinmengen bei Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom. Ebenso wurden für die Hitzeschockproteine 10 ($P \leq 0,03$) und 90 ($P \leq 0,04$) erhöhte Mengen detektiert.

Signifikant erniedrigte Proteinmengen in den Seren der Glaukomgruppe ergaben sich für das Strukturprotein α -Fodrin ($P \leq 0,02$) sowie für das Myelin-basische Protein ($P \leq 0,03$).

Ergebnisse

Die Proteine HSP 60 ($P \leq 0,04$) und LOX1 ($P \leq 0,0006$) lagen bei Glaukompatienten ebenfalls in signifikant niedrigeren Mengen vor als in den Seren der Kontrollprobanden.

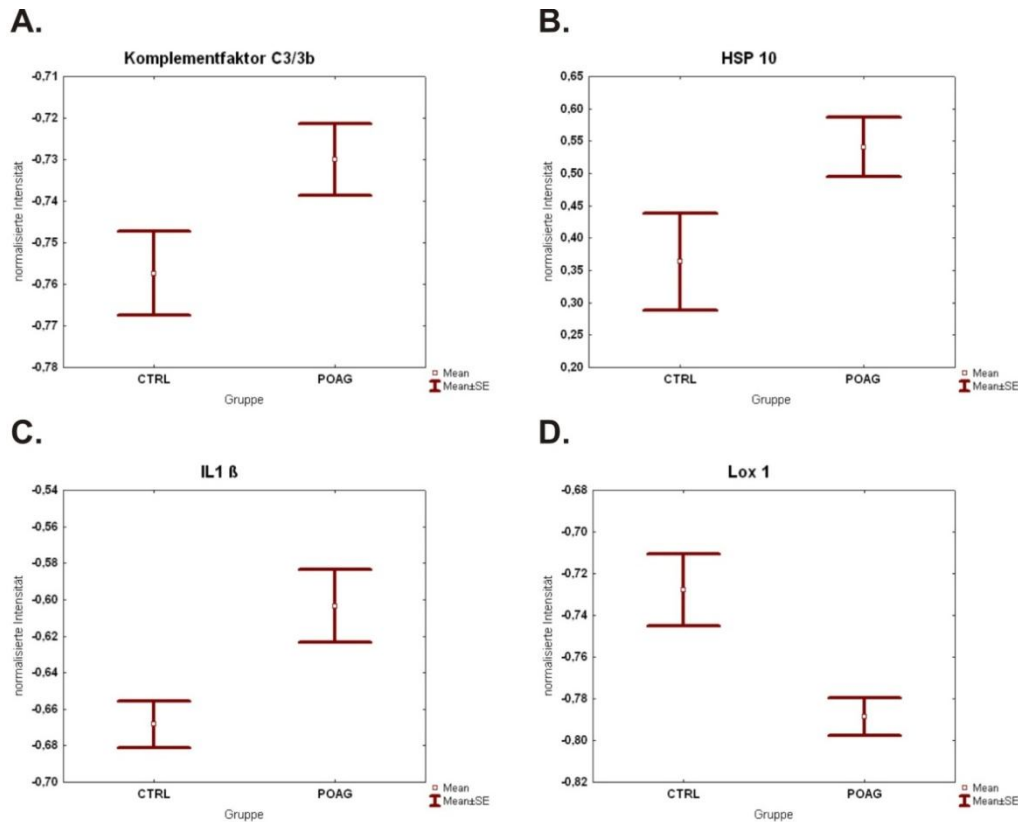


Abb. 25: Whisker-Plots für vier der mittels Antikörper-Microarray analysierter Serumproteine. Auf der Y-Achse ist jeweils die normalisierte Intensität dargestellt, auf der X-Achse die beiden Gruppen. **A-D:** Whisker Plot für **(A)** C3/3b; **(B)** HSP10; **(C)** IL-1 β ; und **(D)** Lox1. Für die dargestellten Proteine konnte ein signifikanter Gruppenunterschied ($P \leq 0,05$) ermittelt werden. Eine vollständige Auflistung aller Proteine mit signifikant veränderten Mengen findet sich in Abb. 6 des Anhangs.

Fokussierte Analyse von Retinaproteinen

Parallel zu der fokussierten Analyse von Serumproteinen wurde die Methode des Antikörper-Microarrays für die Analyse von Retinaprobe genutzt. Hauptziel war es, einen Vergleich der gemessenen Proteinquantitäten zwischen den Retinae aus Spenderaugen von Glaukompatienten und denen von Kontrollprobanden durchzuführen. Zu diesem Zweck wurden fünf Retinae jeder Studiengruppe mittels des Antikörper-Microarray-Verfahrens untersucht.

Ähnlich wie bei den mit diesem Verfahren getesteten Serumproben konnten auch hier bei allen Probanden für die meisten Proteine Signale detektiert werden, jedoch nicht für die Proteine Surfactant protein D und das Protein S100. Die stärksten Signale wurden, ebenfalls in Übereinstimmung mit den Serumproben, für verschiedene Proteine des Komplementsystems sowie für das Strukturprotein β -Tubulin detektiert (Abb. 26).

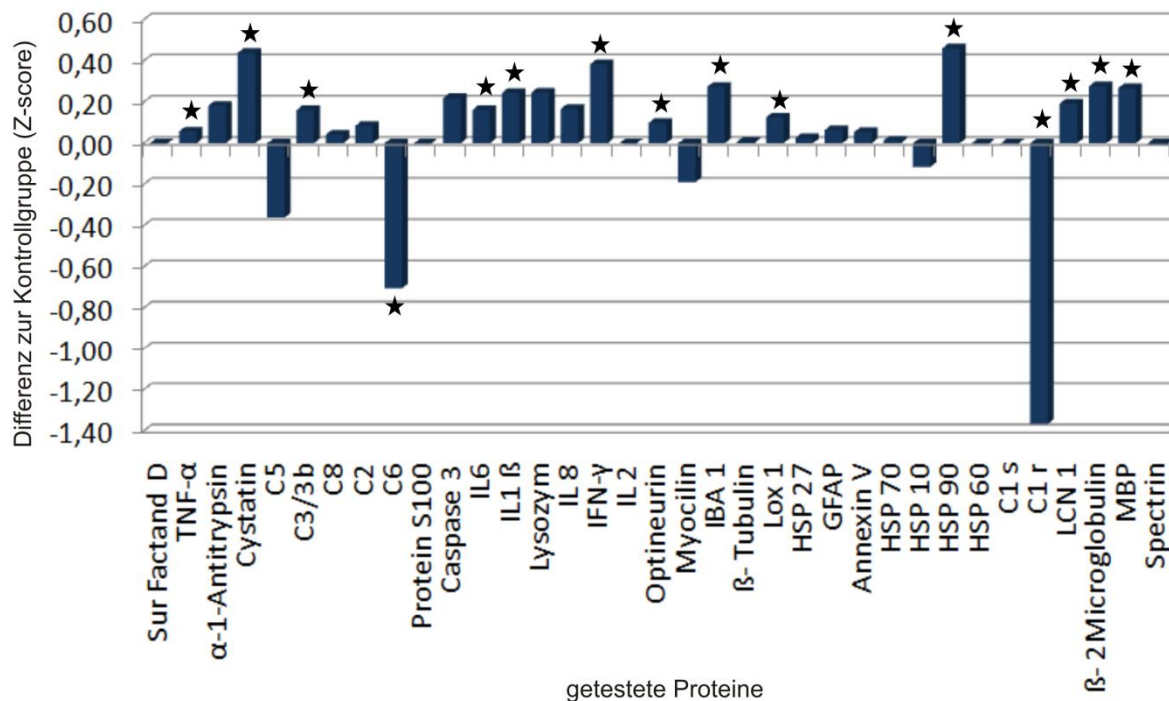


Abb. 26: Aufgeführt sind die Abweichungen der detektierten Retina-Proteinmengen in den Proben von Glaukmapatienten im Vergleich zu den von Kontrollprobanden. Auf der X-Achse sind die verschiedenen untersuchten Proteine aufgeführt, auf der Y-Achse die Abweichungen zur Kontrollgruppe. Balken im positiven Bereich symbolisieren erhöhte Werte, Balken im negativen Bereich geminderte Werte in den Proben von Glaukmapatienten. Die abgebildeten Daten beziehen sich jeweils auf den Gruppen-Mittelwert. Für Proteine, die mit einem Stern versehen sind, konnte ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied ($P \leq 0,05$) festgestellt werden.

Unter statistischen Gesichtspunkten zeigten die Proteinzusammensetzungen der Retinae von Glaukmapatienten eindeutige Abweichungen zu den Proteinprofilen der gesunden Kontrollprobanden. So waren bei 13 der 37 getesteten Proteine signifikant erhöhte Quantitäten in den Retinae der Glaukmaprobanden zu beobachten, bei zwei Proteinen geminderte - die Daten sind exemplarisch in Abb. 27 und vollständig in Abb. 7 des Anhangs dargestellt. Zu Proteinen mit einer erhöhten Quantität gehören, wie auch im Serum, der Komplementfaktor C3/3b ($P \leq 0,04$), der Endzündungsmarker Interleukin 1- β ($P \leq 0,008$) und das Hitzeschockprotein 90 ($P \leq 0,006$). Darüber hinaus wurden für weitere Endzündungsmarker, wie Interleukin 6 ($P \leq 0,006$), Interferon γ ($P \leq 0,003$) oder dem Tumor-necrosis-factor- α ($P \leq 0,0004$), erhöhte Proteinmengen in den Retinae von Glaukmapatienten detektiert. Strukturproteine wie IBA1 ($P \leq 0,0006$) oder das Myelin-basische Protein (MBP, $P \leq 0,01$) zeigten in den Proben der Glaukmaprobanden ebenfalls signifikant erhöhte Proteinmengen. Signifikant erniedrigte Proteinmengen konnten interessanterweise für die Komplementfaktoren C1r ($P \leq 0,0001$) und C6 ($P \leq 0,005$) ermittelt werden - ein Ergebnis, welches zumindest im Fall des Komplementfaktors C6 im Gegensatz zu den ermittelten Serumwerten steht.

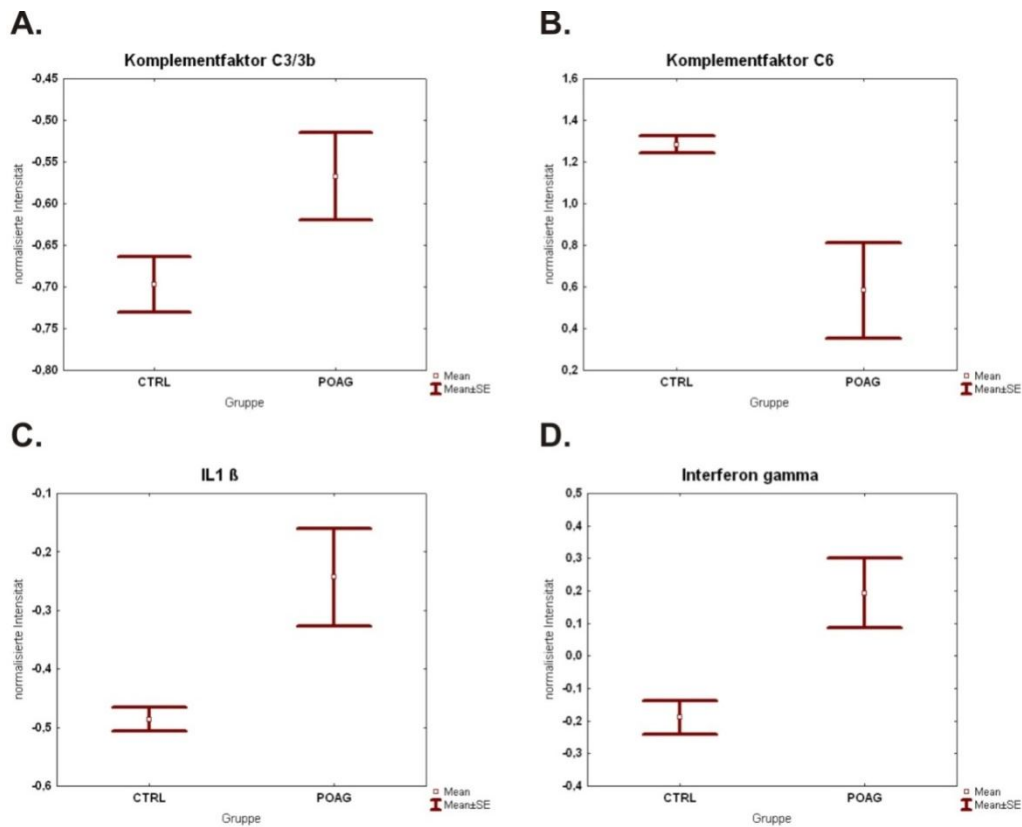


Abb. 27: Whisker-Plots für vier der mittels Antikörper-Microarray analysierter Retinaproteine. Auf der Y-Achse ist jeweils die normalisierte Intensität dargestellt, auf der X-Achse die beiden Gruppen. **A-D:** Whisker Plot für (A) C3/3b; (B) C6; (C) Il-1 β und (D) Interferon- γ . Für die dargestellten Proteine konnte ein signifikanter Gruppenunterschied ($P \leq 0,05$) ermittelt werden. Eine vollständige Auflistung aller Proteine mit signifikant veränderten Mengen findet sich in Abb. 7 des Anhangs.

4.2.3 Massenspektrometrische Analyse von Retinaproben

Ziel der unfokussierten Retinaproteomanalyse mittels Massenspektrometrie war eine Quantifizierung und Funktionsanalyse der identifizierten Proteine, um so eine Aussage über möglicherweise krankheitsbedingt veränderte Proteinexpressionen zu erhalten.

Die 250 verschiedenen, identifizierten Proteine (Auflistung siehe Anhang, Tab. 6) lassen sich den verschiedensten Aufgabenbereichen zuordnen. So konnten zahlreiche Proteine des Zytoskeletts (z.B. α/β -Actin, Gelsolin, α/β -Tubulin, Dynein), des Stoffwechsels (z.B. Triosephosphate-Isomerase) oder der Apoptose-Regulation (z.B. HSP 27, Superoxid-Dismutase) identifiziert werden, aber auch Retina-spezifische Proteine, wie das retinale S-Antigen und das Retinaldehyd-bindende Protein 1 (engl. *cellular retinaldehyde-binding protein*, CRALBP). Wie komplex die Wechselwirkungen und Interaktionen zwischen den Proteinen sind, zeigt sich anhand von Abb. 28.

Ergebnisse

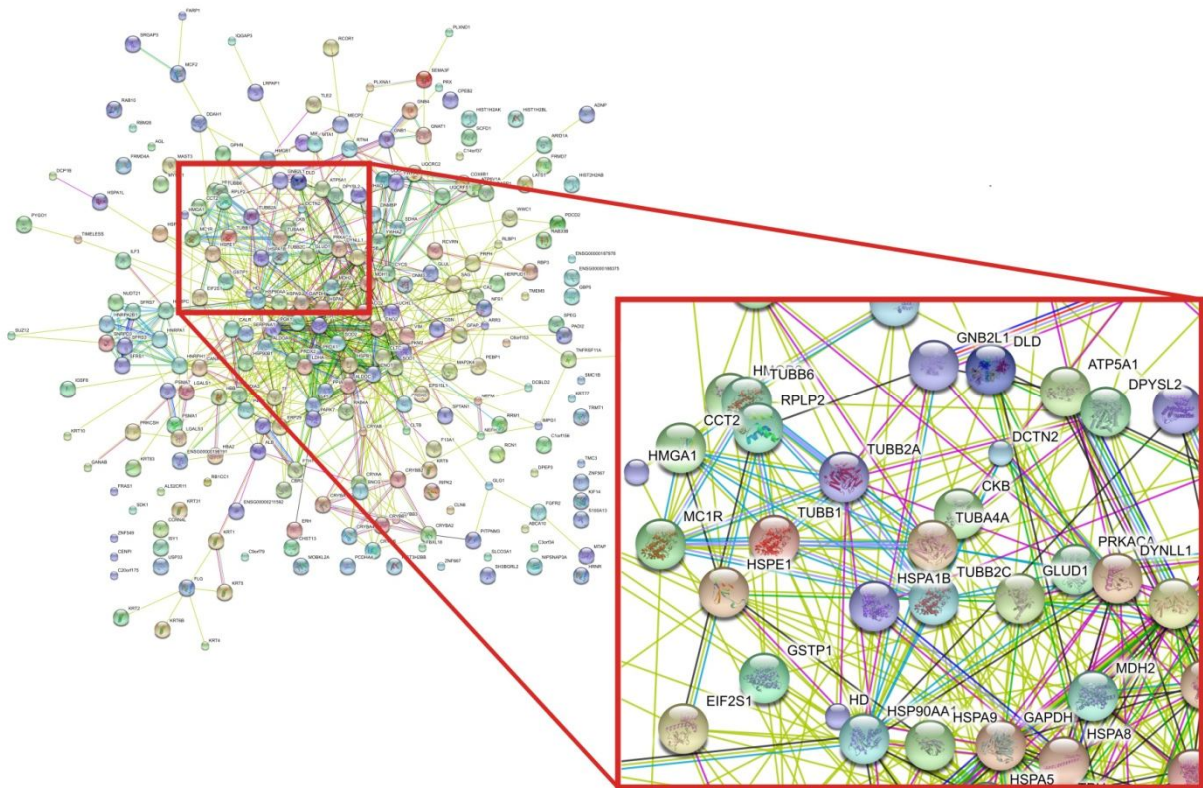


Abb. 28: Dargestellt sind die komplexen Wechselwirkungen und Interaktionen von Proteinen, die im Rahmen der Retinaproteomanalyse identifiziert werden konnten. Jede Kugel symbolisiert ein Protein, jede Verbindungslinie einen Zusammenhang. Die unterschiedlichen Farben der Verbindungslinien stehen dabei für die verschiedenen Datentypen, die der Aussage einer Verbindung zugrundegelegt wurden: z.B. rot=experimentelle Daten; blau: Datenbank; schwarz: Koexpression; gelb: Literaturrecherche. Die Grafik wurde mit dem Web-Tool String 8.2 durchgeführt (<http://string-db.org/>)(Jensen et al. 2009).

Um eine überschaubare, aber dennoch detaillierte Analyse der biologischen Funktionen identifizierter Proteine zu erreichen, wurden diese mit den Datenbankeinträgen des GeneOntology Consortiums abgeglichen (vgl. 3.1.7). Hierdurch wird eine Zuordnung der Proteine zu ihren Aufgabenbereichen ermöglicht sowie eine Aussage darüber, wie stark die funktionalen Gruppen im vorliegenden Datensatz bzw. der Probe vertreten sind und in welcher Verbindung sie zu anderen Gruppen stehen. Eine visuelle Veranschaulichung des komplexen Interaktionsmusters ist in Abb. 29 gezeigt.

Die Verbindungsknoten stehen hier für spezifische Funktionsbereiche, deren Präsenz in der Gesamtprobe anhand der Färbungsintensität verdeutlicht wird. Ein hoher Anteil der identifizierten Proteine ist grundlegenden Prozessen, wie dem Stoffwechsel (18%), der Proteinsynthese (14%) oder dem Zytoskelett (8%), zuzuordnen. Relativ hoch lag auch der Anteil an Apoptose-regulierenden Proteinen (11%) sowie Proteinen, die an oxidativen Prozessen bzw. deren Vermeidung beteiligt sind (12%). Proteine der intra- und interzellulären Signaltransduktion waren dagegen nur mit 4% vertreten. Eine genaue

Ergebnisse

Aufstellung der verschiedenen funktionalen Gruppen und ihrem jeweiligen Anteil an der Gesamtheit aller identifizierten Proteine findet sich im Anhang, Abb. 8A.

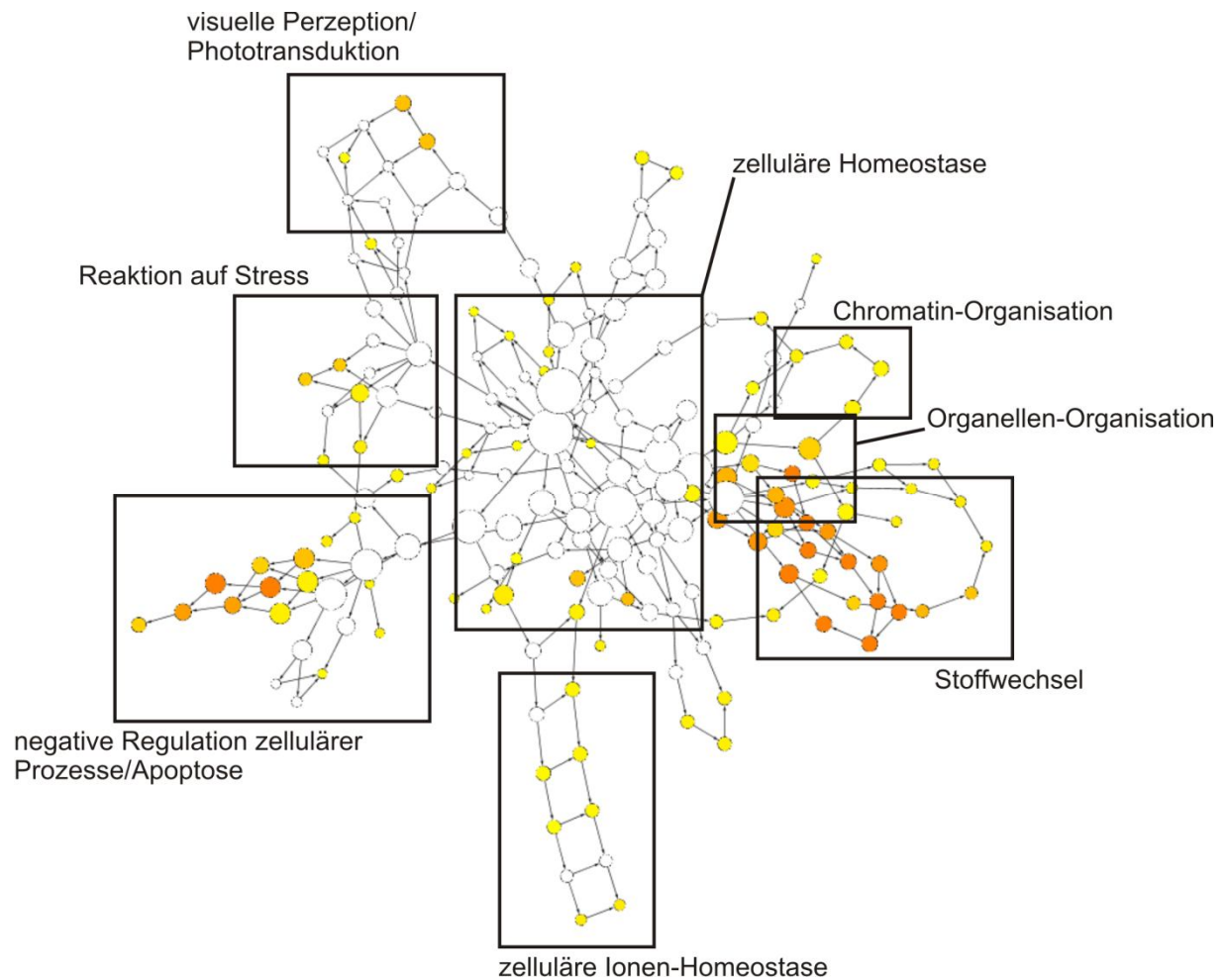


Abb. 29: Dargestellt sind die verschiedenen funktionalen Gruppen, denen die identifizierten Retinaproteine zugeordnet werden konnten. Jeder Kreis stellt eine biologische Funktion dar, die Intensität der Färbung steht für das Aufkommen von Proteinen, die dieser Funktion zugeordnet werden konnten. Verbindungslinien zeigen einen engen Zusammenhang zwischen den angrenzenden funktionalen Gruppen. Der Übersichtlichkeit wegen wurden die einzelnen Funktionen zu größeren funktionalen Bereichen zusammengefasst.

Die Quantifizierung der identifizierten Proteine erfolgte anhand eines Intensitätsvergleichs der ihnen im Rahmen der Datenbankanalyse (Mascot, vgl. 3.3.7) zugeordneten Peptide. Hierfür wurden nur solche Proteine herangezogen, die in beiden Probandengruppen identifiziert werden konnten (N=158). Im Vergleich zu den Retinaprobe der Kontrollgruppe zeigte die Patientengruppe für 37 Proteine eine Abweichung der Abundanz von mehr als 30%. Davon wiesen 17 Proteine eine erhöhte und 20 eine geringere Menge auf als die Proben der Kontrollgruppe (Abb. 30). Eine besonders auffällige Abweichung konnte bei dem Protein β -Crystallin B2 detektiert werden, welches bei Glaukompatienten mehr als 15-fach erhöht vorlag.

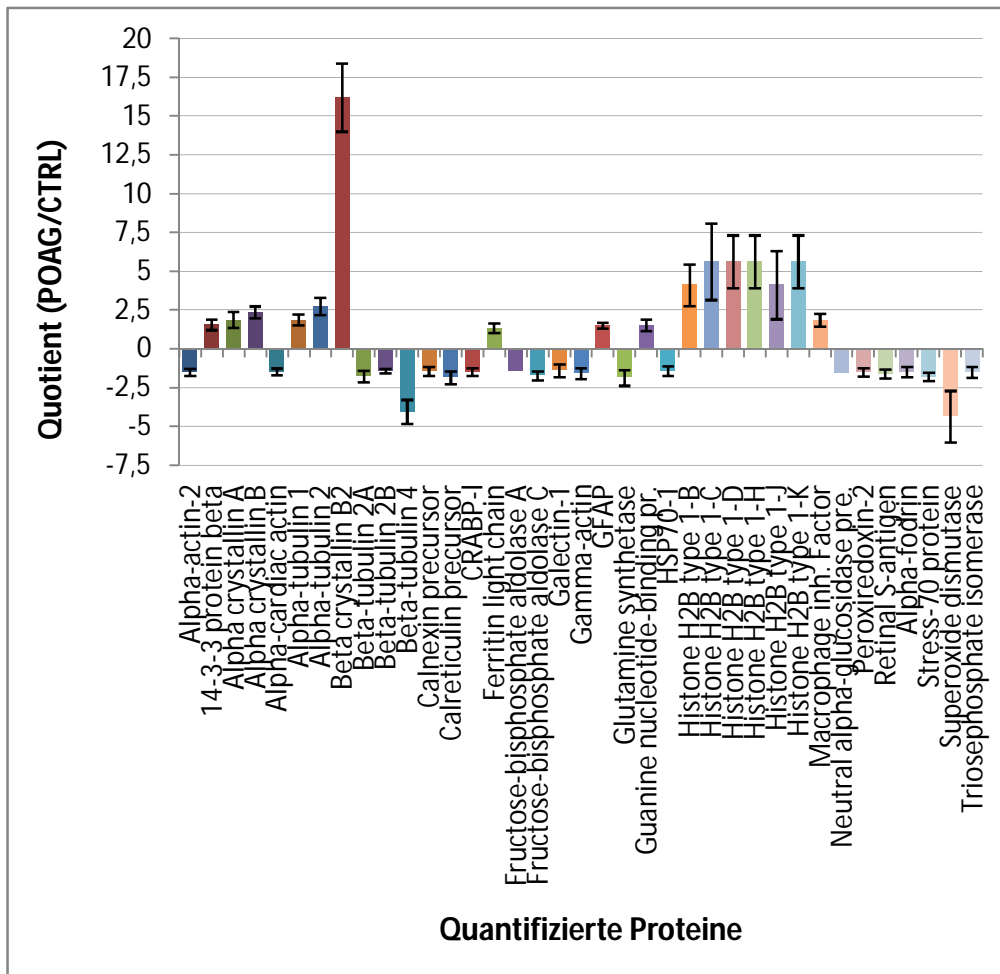


Abb. 30: Dargestellt sind die Abweichungen der mittels Massenspektrometrie detektierten Proteinmengen in den Retinaprobe von Glaukompatienten im Vergleich zu denen von Kontrollprobanden. Auf der X-Achse sind die verschiedenen identifizierten/quantifizierten Proteine aufgeführt, auf der Y-Achse die jeweilige Abweichungen zur Kontrollgruppe (Quotient). Balken im positiven Bereich symbolisieren erhöhte Werte, Balken im negativen Bereich geminderte Werte in den Proben von Glaukompatienten.

Andere stark erhöhte Proteine waren verschiedene Histone (>5-fach) und das α -Tubulin 2 (2,5-fach). Niedrigere Mengen konnten beispielsweise bei α -Actin 2 (1,5-fach), dem retinale S-Antigen (1,6-fach) oder der Superoxid-Dismutase (4,3-fach) beobachtet werden. Für die Proteine mit erhöhten Mengen, und auch für diejenigen mit geminderten Mengen, wurde eine gesonderte Abfrage der GO-Datenbank durchgeführt, um eine Aussage darüber zu erhalten, welche funktionalen Gruppen von diesen Veränderungen betroffen sind. Die erhöhten Proteine scheinen unter funktionalen Gesichtspunkten vor allem in die Chromosomen-Organisation (28%) sowie in Apoptose-hemmende Prozesse involviert zu sein. Andere Proteine mit erhöhten Mengen spielen eine Rolle in der Signaltransduktion (11%), der Makrophagenaktivierung (6%) sowie der Prostaglandinsynthese (5%) (Abb. 31A, Anhang Abb. 8B). Proteine, die bei Glaukompatienten in geringeren Mengen vorlagen, wurden vor allem

Ergebnisse

Stoffwechselprozessen (33%), der Apoptose-Regulation (33%) und dem Protein- bzw. Kerntransport (17%) zugeordnet (Abb. 31B, Anhang Abb. 8C). Zwei weitere Proteine, die ebenfalls in geringeren Mengen vorlagen (Superoxid Dismutase, Peroxiredoxin-2), stehen im Zusammenhang mit der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies.

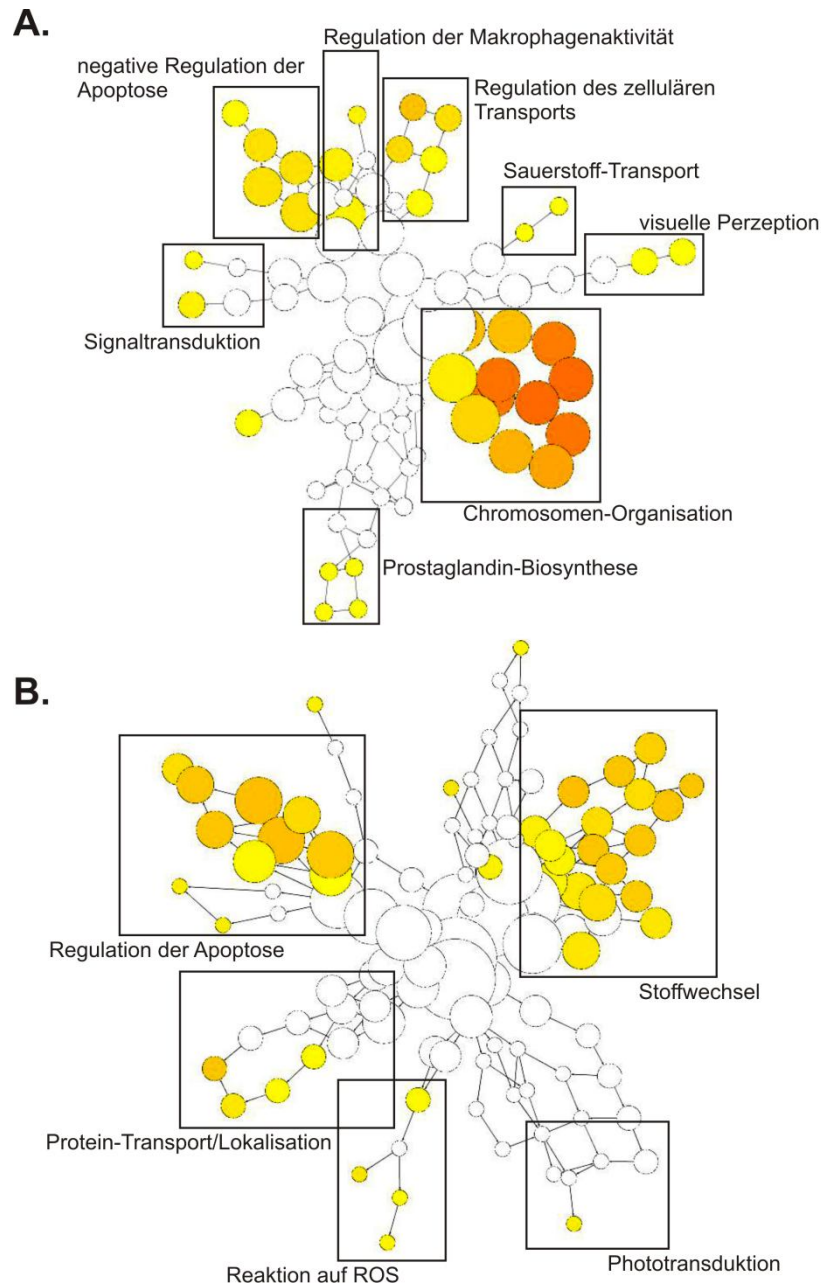


Abb. 31: Dargestellt sind die funktionalen Gruppen, denen Proteine zugeordnet wurden, die in den Retinae von Glaukompatienten in erhöhten (**A**) und geminderten (**B**) Konzentrationen vorlagen. Jeder Kreis stellt eine biologische Funktion dar, die Intensität der Färbung steht für das Aufkommen dieser Funktion zugeordneter Proteine in der Probe. Verbindungslinien zeigen einen engen Zusammenhang zwischen den angrenzenden funktionalen Gruppen. Der Übersichtlichkeit wegen wurden die einzelnen Funktionen zu größeren funktionalen Bereichen zusammengefasst.

5 Diskussion

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Protein Microarrays

Eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung des Protein-Microarray-Verfahrens und dessen Einsatz für die Analyse von Autoantikörper-Reaktionen bei Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom und Kontrollprobanden. Das Verfahren des Protein-Microarrays stellt einen neuen und vielversprechenden Ansatz für das Antikörper-Screening bei Autoimmunerkrankungen und Tumoren dar und ermöglicht, im Gegensatz zum bislang verwendeten Western-Blot-Ansatz, bei verhältnismäßig geringem Arbeitsaufwand das Screening zahlreicher Patientenproben innerhalb kurzer Zeit. Durch die Miniaturisierung des Testverfahrens ist es möglich, einen Microarray mit mehreren Hundert Antigenen zu bestücken und dadurch unter Einsatz geringster Probenmengen einen tiefen Einblick in die Autoantikörper-basierenden Immunprozesse der Probanden zu erhalten.

Trotz der Tatsache, dass die Technologie des Microarrays seit den 1990er Jahren für zahlreiche Genomanalysen genutzt und dabei immer weiter verfeinert und verbessert wurde (Larkin et al. 2005), stellt die Reproduzierbarkeit der Daten nach wie vor ein Problem dar (Kricka et al. 2008). Zu Beginn des neuen Jahrtausends erfolgte die Adaptation der Array-Technologie für die Analyse von Proteomen (Charboneau et al. 2002; Nielsen et al. 2003; Chan et al. 2004; Belluco et al. 2005), Protein-Protein-Interaktionen (Haab 2001; Letarte et al. 2005; Jones et al. 2006) und auch Antigen-Antikörper-Reaktionen (Joos et al. 2000; Bacarese-Hamilton et al. 2002; Hiller et al. 2002; Robinson et al. 2002a; Bouwman et al. 2003). Der Reproduzierbarkeit kam im Zuge dieser Entwicklung eine völlig neue Bedeutung zu, da bei diesen Analysen nicht mehr nur - wie bei herkömmlichen GeneArray-Analysen - das Wissen um die An-oder-Abwesenheit des Analyts im Vordergrund stand, sondern dessen Quantifizierung (Haab 2001). Verschärft wird diese Problematik durch die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der verschiedenen nativen Proteine, welche die Spotting-Eigenschaften erheblich beeinflussen, wie z.B. die Viskosität der proteinhaltigen Lösungen. So weisen die verschiedenen Proteine eines Protein-Microarrays nicht ein solch uniformes Spotting-Verhalten auf wie DNA-Sonden eines GeneArray. Dieser Unterschied ist darin begründet, dass die verwendeten DNA-Sonden lediglich aus vier verschiedenen Grundbausteinen (Nukleotiden) aufgebaut sind und somit unter physikalischen

Gesichtspunkten ein wesentlich homogeneres Verhalten zeigen als Proteine, die aus 20 verschiedenen Grundbausteinen (Aminosäuren) bestehen können (Kattah et al. 2008).

In Anbetracht der hier geplanten Anwendung von Protein-Microarrays für die Analyse von klinischen Proben und der möglichen Nutzung der generierten Daten für den Einsatz zur Glaukom-Diagnostik kam der Reproduzierbarkeit der Daten bei der Etablierung der Microarray-Plattform eine wesentliche Bedeutung zu. Der unter 4.1.1 geschilderte Vergleich der zwei verfügbaren Spotting-Technologien unterstreicht die Bedeutung eines optimierten Druckprozesses. So zeigte sich, dass die Non-Contact Technologie der herkömmlichen Pin-basierenden Variante weit überlegen ist und dass die Variabilität der mittels Non-Contact-Verfahren generierten Daten um ein vielfaches kleiner waren als die des Contact-Verfahrens (vgl. 4.1.1, Abb. 9). Auch konnte bei der Piezoelement-basierenden Technologie das Absetzen von exakt gleichen Volumina auf verschiedene Spots während des gesamte Spotting-Prozesses mittels einer Kamera überwacht werden – eine Möglichkeit der frühen Qualitätskontrolle, die bei dem Pin-basierenden Verfahren nicht gegeben ist. Das bessere Abschneiden der Non-Contact-Technologie als Resultat dieses Technologie-Vergleichs deckt sich in weiten Teilen mit den in der Literatur geschilderten Beobachtungen (Schena 2000), und auch die erreichten Variabilitätskoeffizienten stimmen mit den von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen überein (Espina et al. 2003; Tisone 2005).

Ebenfalls Anteil an der Reproduzierbarkeit der Protein-Microarraydaten hat die Wahl der Objektträgeroberflächenbeschichtung, die einen enormen Einfluss auf verschiedene Parameter hat, wie das Signal/Rausch-Verhältnis, die Hintergrundintensität oder das Detektionslimit der Analyten. In einer Vielzahl von Studien wurden die verschiedenen Eigenschaften von Oberflächenbeschichtungen, wie Nitrozellulose, Silanen, Polysinen oder Aldehyden sowie die Eignung von zwei- und dreidimensionalen Oberflächenstrukturen, vergleichend getestet (Stillman et al. 2000; Angenendt et al. 2002; Angenendt et al. 2003; Kusnezow et al. 2003; Angenendt et al. 2004; Angenendt 2005; Guillaume et al. 2005). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Studien wurden für das hier vorliegende Projekt Nitrozellulose-beschichtete Objektträger verwendet, da diese sich durch eine hohe Bindekapazität sowie ein adäquates Signal/Rausch-Verhältnis auszeichnen und gleichzeitig die native Struktur der Proteine erhalten bleibt (Stillman et al. 2000; Angenendt et al. 2003; Angenendt 2005). Die Eignung dieser Oberflächenbeschichtung spiegelt sich in den geringen Variationskoeffizienten wider, die für die hier verwendeten Studienarrays erreicht werden

konnten (vgl. 4.1.1). Die Tag-zu-Tag-Abweichung der generierten Microarray-Daten steht ebenfalls in Übereinstimmung mit der Literatur (Guilleaume et al. 2005).

Einen weiteren Faktor bei der Analyse von Microarraydaten, der für die Vergleichbarkeit von Studienproben eine entscheidende Rolle einnimmt, stellt die Prozessierung der gemessenen Spotintensitäten dar. Hierzu gehören sowohl die Subtraktion der Hintergrundintensitäten von den Spotintensitäten als auch eine anschließende Normalisierung der Daten. Ein Durchführen der Hintergrundsubtraktion gewährleistet, dass Spotintensitäten nicht durch eine unspezifische, artifizielle Hintergrundfluoreszenz beeinflusst und künstlich verstärkt werden. Für die Vergleichbarkeit der Daten von verschiedenen Patienten ist dieser Schritt der Datenprozessierung somit unerlässlich. Die Notwendigkeit einer Normalisierung besteht darin, eventuelle Unterschiede in Versuchsabläufen, die sich auf die zu detektierenden Spotintensitäten auswirken, mittels mathematischer Verfahren auszugleichen. So wird eine Vergleichbarkeit von Experimenten ermöglicht, die beispielsweise an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Für die Normalisierung der generierten Arraydaten boten sich verschiedene Verfahren an, die zum Teil bereits für die Anwendung auf GeneArray-Daten etabliert worden sind (Kepler et al. 2002; Quackenbush 2002; Pieler et al. 2004), zum Teil aber auch solche, die speziell für die Anwendung auf Protein-und-Antikörper-Microarrays zugeschnitten sind (Hamelinck et al. 2005). In vielen Studien, die sich mit einer Microarray-basierenden Analyse von Antikörper-Reaktivitäten befassen, werden die Messdaten anhand der ermittelten IgG-Gesamtkonzentrationen normalisiert (Hamelinck et al. 2005; Horn et al. 2006; Li et al. 2007). Dieses Verfahren wurde für die Prozessierung der in diesem Projekt generierten Daten ebenfalls in Erwägung gezogen. Nach ersten Versuchen stellte sich jedoch heraus, dass diese Variante zu einer extremen Verzerrung der Daten führt (vgl. 4.1.1, Abb. 13D). Desweiteren lagen bei einigen Proben die gemessenen IgG-Werte nahe des Sättigungsbereichs, so dass eine einwandfreie Bestimmung der IgG-Gesamtmenge nicht gewährleistet werden konnte. In Folge dessen wurden aus GeneArray-Experimenten bekannte Verfahren getestet, die auf einen internen Standard verzichten und deren Normalisierungsalgorithmen auf der globalen Intensität eines Array-Experiments basieren. Diese lassen sich nicht zuletzt auch aufgrund einer ähnlichen Problematik, wie z.B. dynamischer Messbereiche oder Inter- und Intra-Array-Variationen, von Gene-auf-Protein-Arraydaten übertragen (Eckel-Passow et al. 2005; Sundaresh et al. 2006). Die hier getesteten Verfahren (vgl. 3.1.5) der AUC-und-Z-score-Transformation erwiesen sich beide als geeignet, da sie keine Verzerrung der Daten hervorrufen, sondern die tatsächlich vorliegenden Verhältnisse

widerspiegeln (vgl. 4.1.1). Im Umkehrschluss stellt dies eine weitere Bestätigung für die Güte der generierten Arraydaten dar, da eine geringe Beeinflussung der Daten durch deren Transformation einen geringen Bedarf an Normalisierung ausdrückt. Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit von unabhängigen Experimenten wurde für die durchgeführte Patientenstudie dem Z-score-Verfahren (Cheadle et al. 2003) der Vorzug gegeben. In Studien anderer Arbeitsgruppen wurde dieses Verfahren der globalen Normalisierung ebenfalls für die Prozessierung von Protein-Microarraydaten verwendet (Hueber et al. 2005; Groathouse et al. 2006).

Insgesamt betrachtet zeigte sich, dass jeder der notwendigen Schritte eines Microarray-Versuchs als potenzielle Fehlerquelle anzusehen ist und bei inadäquater Handhabung einen aussagekräftigen Vergleich von Patientenproben beeinträchtigen kann. Wie von Kattah et al. in dem Artikel „Protein Microarrays Address the Elephant in the Room“ (Kattah et al. 2008) sehr treffend beschrieben, wird diesen Problemen in vielen der bislang veröffentlichten Studien oft nicht genug Rechnung getragen, da Parameter wie die Reproduzierbarkeit der Daten oder auch die Auswirkungen verschiedener Normalisierungsstrategien nicht ausreichend untersucht werden. Dies erscheint auch unter dem Umstand verwunderlich, dass die Technologie des Microarrays schon in den frühen 1980er Jahren angewandt wurde (Hawkes et al. 1982) und viele der heute diskutierten Fragen damals ebenfalls im Fokus der Wissenschaft standen (Towbin et al. 1984; Gordon et al. 1985). Erkenntnisse und Lösungsansätze aus dieser Zeit scheinen jedoch heutzutage keine Berücksichtigung mehr zu finden, da damals eine andere Terminologie (Dot-Blot) verwendet wurde, worin ein möglicher „Wissensverlust“ begründet sein mag, wie es von Gordon et al. vertreten wird (Gordon 2008).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Arbeit die Technologie des Protein-Microarrays erfolgreich etabliert wurde. Mögliche Fehlerquellen wurden eingehend untersucht und beseitigt, so dass bei den unter 4.2.1 dargestellten Studienergebnissen von einer realitätsgetreuen Wiedergabe der Antikörper-basierenden Immunprozesse bei Glaukoma-Patienten ausgegangen werden kann. Darüber hinaus ermöglicht die Technologie durch geringfügige Anpassungen, wie z.B. die Wahl eines anderen Zweitantikörpers, die Detektion von anderen Immunglobulinklassen wie IgE oder IgM (Hiller et al. 2002; Harwanegg et al. 2003; Deinhofer et al. 2004; Harwanegg et al. 2006; Li et al. 2007) oder auch verschiedener Immunglobulin-Isotypen (IgG1, IgG2 etc.).

5.1.2 Antikörper-Microarrays

Die gezielte Analyse von Proteinen gewinnt in heutigen Proteomstudien immer mehr an Bedeutung, da sie die Quantifizierung von beispielsweise funktional verwandten Proteinen und somit eine direkte Aussage über deren Verhalten unter bestimmten Einflüssen ermöglicht. Das Antikörper-Microarray-Verfahren stellt hierfür ein ideales Werkzeug dar. Neben der Bestimmung von posttranslationalen Modifikationen (Kodadek 2002) oder der Entschlüsselung von Signaltransduktionsketten (Nielsen et al. 2003) eignet sich das Verfahren vor allem für die Ermittlung von Proteinquantitäten - eine Anwendung, die in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund stand.

Der Etablierung des Antikörper-Microarray-Verfahrens wurden die erarbeiteten Parameter des Protein-Microarray-Verfahrens zugrundegelegt. Die Adaptation der Spotting-Parameter stellte sich als unproblematisch heraus, da die physikalischen Eigenschaften der Antikörperlösungen denjenigen Proteinlösungen ähneln, die auch für die Herstellung von Protein-Microarrays verwendet wurden. Das Verfahren des Piezoelement-basierenden Non-contact-Spottings erwies sich somit als vielseitig anwendbar und relativ unempfindlich gegenüber verschiedenen zu druckenden Lösungen. Die Normalisierung der Daten erfolgte, wie auch bei den Protein-Microarrays, über die globale Intensität eines Arrays unter Berücksichtigung der Standardabweichung (Z-score Transformation, vgl. 3.1.5). Adaptiert wurde dieser Algorithmus aufgrund des im Vergleich zu Protein-Microarrays ähnlichen Intensitätsbereichs der detektierten Signale, aber auch aufgrund von Parametern, wie dem dynamischen Messbereich oder der Inter- und Intra-Array-Variationen (Eckel-Passow et al. 2005).

Die Visualisierung der gebundenen/isolierten Proteine wurde über einen kovalent an die Probenproteine gebundenen Fluoreszenzmarker realisiert (vgl. 3.2.3). Der Vorteil dieses Verfahrens besteht in der geringeren Anzahl an Inkubations- und Waschschritten, die in einer geringeren Variabilität und damit in einer höheren Reproduzierbarkeit der Daten resultiert. Nachteilhaft wirkt sich dagegen aus, dass es durch den angebrachten Fluoreszenzmarker potenziell zu einer Strukturveränderung des Proteins bzw. zu einer Verdeckung von Epitopen kommen kann, die den auf dem Microarray aufgetragenen Antikörpern als Bindungsstelle dienen (Angenendt 2005). Es ist somit möglich, dass eine Detektion der Probenproteine durch den gerade zu diesem Zweck angebrachten Fluoreszenzmarker verhindert wird (Nielsen et al. 2004). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Microarray-Versuchen scheint dieser Effekt auf die meisten Probenproteine nicht zuzutreffen, da eindeutige und teilweise auch sehr starke Signale

detektiert werden konnten. Bei manchen Proteinen, wie dem Surfactant protein D oder dem Protein S100, konnten jedoch in keiner Patientenprobe Signale erfasst werden, so dass hier möglicherweise eine Veränderung der Epitope vorliegt. Weitere Ursachen könnten eine für den Nachweis zu geringe Konzentration oder ein strukturbedingt verdeckter Carboxylterminus der Proteine sein, welcher eine kovalente Bindung des Fluoreszenzmarkers und somit auch eine Detektion des Proteins mittels des Laser-Scanners verhindern würden. Eine Vermeidung dieser möglichen Effekte wäre durch das Verfahren der indirekten Visualisierung der gebundenen Proteine zu erreichen. Wie unter 1.8 erläutert, werden hierbei Antikörper eingesetzt, welche die eingefangenen Proteine erkennen und eine Visualisierung beispielsweise über Enzymreaktionen ermöglichen, die durch an den Antikörper gekoppelte Enzyme vermittelt werden (Angenendt 2005). Als Beispiel ist hier das TSA-System (engl. *tyramide signal amplification*) zu nennen, bei dem eine an den Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase die Bildung von fluoreszenzmarkierten Thyramid-Radikalen katalysiert, welche wiederum mit den gebundenen Proteinen interagieren und kovalent an diese binden (Varnum et al. 2004). Da jeweils mehrere Radikale pro Protein erzeugt bzw. gebunden werden, geht diese Methode mit einer Signalverstärkung einher, die bei dem Verfahren der direkten Detektion nicht möglich ist. Ein negativer Faktor der indirekten Visualisierung von gebundenen Proteinen ist die Notwendigkeit von zwei Antikörpern mit unterschiedlichen Zielepitopen für jedes der zu analysierenden Proteine, wodurch ein erheblicher Kostenmehraufwand entsteht.

Auch die Ausrichtung der Antikörper auf der Nitrozellulosebeschichtung der Objektträger kann Einfluss auf die Stärke der detektierten Signale ausüben. So ist davon auszugehen, dass die applizierten Antikörper kein homogenes Bindeverhalten zeigen und teilweise mit ihrem Fc-Teil an die Oberfläche binden, teilweise mit ihren Antigen-bindenden Fab-Fragmenten. Im Fall einer Oberflächeninteraktion der Fab-Fragmente ist eine Funktionalität des Antikörpers mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mehr gegeben, so dass ein gewisser Prozentsatz der auf die Objektträgeroberfläche aufgetragenen Antikörper als inaktiv anzusehen ist. Eine Lösung dieses Problems wäre eine Affinitäts-basierende Kopplung der Antikörper an die Oberfläche, die eine orientierte Bindung der Antikörper ermöglichen würde. So könnten die Fc-Fragmente der Antikörper beispielsweise durch ein Poly-Histidin-Peptid modifiziert werden, welches spezifisch an eine Nickel-NTA-Oberfläche bindet (Zhu et al. 2001). Ein weiteres klassisches Verfahren der Affinitätschromatographie, welches ebenfalls zu diesem Zweck genutzt wird, stellt eine Kombination aus Biotin-markierten Antikörpern und Objektträgern dar, die mit einer

Streptavidin/Avidin-Beschichtung versehen sind (Delehanty et al. 2002; Wacker et al. 2004). Studien anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass durch eine orientierte Aufbringung der Antikörper teilweise eine vielfach höhere Signalintensität erreicht werden konnte als bei einer ungerichteten Anordnung (Peluso et al. 2003).

Bezüglich der Antikörper-Microarrays lässt sich somit zusammenfassend festhalten, dass es sich bei dieser Technologie um ein Hochdurchsatz-fähiges, sensitives und Probenmaterial-schonendes Verfahren handelt. Die benötigte Probenmenge, welche auch eine Detektion von gering abundanten Proteinen zulässt, lag in dieser Studie bei ca. fünf µg und damit weit unter den Mengen, die bei anderen Verfahren und dem gleichen Analysevorhaben benötigt werden. Durch verschiedene Modifikationen, wie die oben angesprochene orientierte Aufbringung von Antikörpern oder durch eine andere Form der Visualisierung, besteht jedoch die Möglichkeit, die Sensitivität der Methode weiter zu erhöhen.

5.1.3 Massenspektrometrie

Um zusätzlich zu der fokussierten Analyse von Retinaproteinen auch eine explorative, nicht durch eine subjektive Auswahl der zu analysierenden Proteine beeinflusste Analyse durchführen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein Verfahren auf der Basis der Massenspektrometrie entwickelt, welches neben der Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen vor allem auch die Bearbeitung größerer Studiengruppen ermöglicht. So sind die meisten bisher beschriebenen Ansätze aufgrund des hohen zeitlichen Aufwands für das Durchführen klinischer Studien unter der Maßgabe einer möglichst umfassenden Proteomanalyse ungeeignet. Die entscheidende Anforderung an die zu entwickelnde Methode war somit, den Labor- und Zeitaufwand für die Bearbeitung der Proben möglichst gering und dabei gleichzeitig die Sensitivität auf hohem Niveau zu halten.

Die Möglichkeiten der massenspektrometrischen Proteomanalyse sind divers und erstrecken sich von der Analyse intakter Proteine und Peptide (SELDI-TOF, MALDI-TOF (Paweletz et al. 2001; Hortin 2006)) bis hin zu den sogenannten Shotgun-Ansätzen, bei denen die Probenproteine zu Beginn der Analyse in spezifische Peptide zerlegt werden (z.B. LC-ESI, LC-MALDI (Rappsilber et al. 2002; Maccarrone et al. 2010)). Hinsichtlich der Detektion von Markerproteinen, die aufgrund ihrer Menge oder ihrer Modifikationen eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Proben/Gruppen erlauben, weist jedes dieser Verfahren Vor- und Nachteile auf. Das an die MALDI-Technologie angelehnte

Diskussion

SELDI-Verfahren ermöglicht beispielsweise eine sehr schnelle und leicht zu automatisierende Analyse intakter Proteine und Peptide (Hutchens et al. 1993; Weinberger et al. 2000). Seine entscheidende Schwäche besteht jedoch darin, dass nur die Molekulargewichte der intakten Proteine detektiert werden und dass aufgrund der geringen Auflösung des Geräts sowie fehlender Fragmentierungsmöglichkeiten keine Identifizierung der Proteine möglich ist (De Bock et al. 2010). Um eine Aussage über die Identität der Zielmassen/Proteine zu erlangen, müssen somit extrem laborintensive Verfahren nachgeschaltet werden, die zudem die Nutzung eines zweiten, in diesem Fall hochauflösenden, Massenspektrometers erfordern (Grus et al. 2005).

Andere Verfahren, z.B. die häufig bei der Verfolgung einer Shotgun-Strategie eingesetzte Kopplung einer zweidimensionalen HPLC-Fraktionierung mit einem ESI-Massenspektrometer (vgl. 1.8), erlauben dagegen die gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen. Im Hinblick auf die Bearbeitung einer Studie mit hohem Probenaufkommen erweist sich dieser Ansatz in der Umsetzung jedoch oft als schwer realisierbar, da die Messung einer einzelnen Patientenprobe mehrere Tage dauern kann und somit extrem Ressourcen-intensiv ist. Auch die parallele Bearbeitung von Proben ist mittels dieses Ansatzes ohne die Nutzung kostenintensiver Labeling-Techniken (SILAC, ICAT, ICPLTM, ITRAQ) oder mehrerer Massenspektrometer nicht möglich (DeSouza et al. 2005; Schmidt et al. 2005; Shiiro et al. 2006).

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren stellt eine Kombination mehrerer klassischer Techniken der Proteinanalytik dar und vereint deren Vorteile. So handelt es sich bei der in der 1. Dimension für die Probenfraktionierung eingesetzte SDS-PAGE um ein extrem robustes und unter Verwendung von kommerziellen Gelen gut reproduzierbares Trennverfahren, welches eine adäquate Vorfraktionierung der Probenproteine ermöglicht und somit die Probenkomplexität deutlich herabsetzt (Penna et al. 2007). Die Fraktionierung der durch den Trypsinverdau generierten Peptide erfolgte mittels C18-Chromatographie - ein ebenfalls klassisches Trennverfahren, welches standardmäßig in den oben angesprochenen HPLC-Ansätzen Anwendung findet. Hauptsächlich eingesetzt werden die hier verwendeten C18-ZipTips zur Probenaufreinigung, beispielsweise vor einer HPLC-Fraktionierung (Hubner et al. 2008). Vereinzelt werden sie auch im Rahmen von klinischen Studien zur Serumauflbereitung genutzt, um eine direkte Messung im Massenspektrometer durchzuführen (Nelsestuen et al. 2005; Tiss et al. 2007), oder für die Fraktionierung von komplexen Peptidgemischen (Baczek 2004). Durch die Fraktionierung der Proben kann im allgemeinen eine bessere Sequenzabdeckung

identifizierter Proteine erreicht werden, aber auch eine generell höhere Signalintensität (Elhanany et al. 2001; Wa et al. 2006).

Ein besonderer Vorteil der ZipTip-Fraktionierung liegt in der Automatisierbarkeit der notwendigen Pipettierschritte und dem damit einhergehenden Zeitgewinn sowie der im Vergleich zur manuellen Ausführung höheren Reproduzierbarkeit. So dauert die Fraktionierung von 36 Gelbanden unter Verwendung des Pipettierroboters, wie geschildert, um ein Vielfaches kürzer als mit HPLC-basierenden Systemen. Allerdings beruht der deutliche zeitliche Vorteil darauf, dass die in dieser Studie bearbeiteten Proben in nur acht verschiedene Fraktionen je Gelbande unterteilt wurden. Herkömmliche HPLC-Ansätze trennen die Proben dagegen teilweise in mehrere Tausend Fraktionen pro Probe auf (Zanivan et al. 2008). Die geringere Anzahl an Fraktionen einer Probe schlägt sich auch in der Anzahl der durchgeführten MS/MS-Analysen nieder, die in dieser Studie bei 160 pro Fraktion lag. Bei gängigen HPLC-ESI-Ansätzen werden dagegen teilweise mehrere Tausend Fragmentspektren pro Probe erzeugt, wodurch sich die hohe Anzahl identifizierter Proteine in diesen Studien erklären lässt (Hubner et al. 2008). Mittels MALDI-Technologie würden sich solche Kennzahlen nur durch eine stärkere Fraktionierung der Probe erreichen lassen, da ansonsten allein die Menge der auf dem Probenträger vorliegenden Peptid/Matrixkristalle für ein derartig hohes Messaufkommen nicht ausreichend wäre. Der zeitliche Vorteil des hier etablierten ZipTip-MALDI-Verfahrens wird somit durch einen gewissen Verlust an Sensitivität gegenüber den HPLC-ESI-basierenden Verfahren erkauft.

Insgesamt betrachtet kann gesagt werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt worden ist, die eine Massenspektrometrie-basierende Proteomanalyse von Studien mit hohem Probenaufkommen ermöglicht und die sich durch eine geringe Fehleranfälligkeit sowie eine hohe zeitliche Effizienz auszeichnet. Die Anzahl von 250 identifizierten und 158 quantifizierten Proteinen steht in einem angemessenen Verhältnis zu dem eingesetzten Labor- und Zeitaufwand, wobei eventuell eine noch höhere Anzahl an identifizierten Proteinen auf Kosten der Ressourcenaufwendung erreicht werden könnte. Die Durchführung von Studien mit hohen Fallzahlen würde dadurch jedoch erschwert. Mittlerweile wurde das Verfahren auch erfolgreich in anderen Projekten eingesetzt, die sich beispielsweise mit der Detektion von Biomarkern in der Tränenflüssigkeit befassen (Ude et al. 2010), womit die vielseitige Anwendungsmöglichkeit der Methode verdeutlicht wird.

5.2 Analyse von Patientenproben

5.2.1 Autoantikörper-Profilung bei Glaukompatienten

In zahlreichen vorangegangenen Studien konnten Veränderungen der natürlichen Antikörper-basierenden Autoimmunität bei Glaukompatienten nachgewiesen werden. Bislang kamen jedoch ausschließlich komplexe Proteingemische zur Analyse dieser Autoantikörper-Reaktionen zum Einsatz - eine Überprüfung der in diesen Studien identifizierten Autoantigene anhand von spezifischen Proteinen stand bislang aus. Auch konnte bislang nicht geklärt werden, inwieweit die im Serum detektierten Veränderungen die des Kammerwasser widerspiegeln und wie sich die Antikörper-Reaktivitäten dieser Körperflüssigkeiten innerhalb eines Patienten zueinander verhalten.

Gruppenvergleich

Unter Verwendung der Protein-Microarray-Technologie konnten auch in dieser Arbeit zahlreiche veränderte, Autoantikörper-basierende Immunreaktivitäten bei Glaukompatienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. Erstmals wurden dabei aufgereinigte Antigene zum Nachweis von Autoantikörper-Reaktivitäten eingesetzt, so dass sich dieser Ansatz im Vergleich zu vorangegangenen Studien, bei denen Gewebehomogenate verwendet wurden, durch eine wesentlich höhere Spezifität auszeichnet. Die in vorangegangenen Studien mittels Western-Blot detektierten Gruppenunterschiede konnten durch den hier verwendeten Protein-Microarray-Ansatz bestätigt werden. So wurden beispielsweise für HSP27, HSP70, MBP oder α -Fodrin erhöhte Reaktivitäten im Serum der Glaukompatienten gemessen - Ergebnisse, die mit den bislang veröffentlichten Studiendaten übereinstimmen (Tezel et al. 1998; Grus et al. 2006; Joachim et al. 2007b; Joachim et al. 2008a). Für Actin konnte eine erhöhte Autoantikörper-Reaktionen im Kammerwasser der Glaukomprobanden festgestellt werden, dies ist ein Befund, der sich ebenfalls mit den Resultaten bisher durchgeführter Western-Blot-Studien deckt (Joachim et al. 2007c). Auch zeigten einige der Antigene, die bislang nicht im Zusammenhang mit einer glaukomatösen Erkrankung untersucht wurden, deutliche Veränderungen bei den Autoantikörper-Reaktivitäten der Glaukompatienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden. Hierzu gehörten beispielsweise α -1-Antitrypsin, Annexin V, der Protein Kinase C Inhibitor oder Ubiquitin, aber interessanterweise auch Antigene, die im Vergleich zu Kontrollprobanden signifikant geminderte Reaktionen aufwiesen, wie GFAP oder Ubiquitin. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die postulierte autoimmune Komponente der Glaukopathogenese

(vgl. 1.5) einerseits multifaktorieller Natur ist, da eine Vielzahl an Antigenen von diesen Veränderungen betroffen ist, und dass andererseits keine „klassische“ Autoimmunerkrankung vorliegt, bei der vom alleinigen Auftreten autoaggressiver Antikörper ausgegangen wird. Vielmehr besteht auch ein Verlust von natürlicher Autoimmunität, ein Aspekt, der weiter unten in diesem Kapitel näher beleuchtet wird.

Intraindividueller Vergleich

Der Vergleich der autoimmunen Prozesse des Kammerwassers mit denen des Serums ergab eine hohe Kongruenz der Autoantikörper-Reaktionen in beiden Körperflüssigkeiten. So zeigten die Resultate des durchgeführten intraindividuellen Vergleichs, bei dem für jeden einzelnen Patienten das Verhältnis der Antikörper-Reaktionen im Kammerwasser zu denen im Serum errechnet wurde, eine mehr als 80%ige Übereinstimmung der Reaktivitäten in beiden Körperflüssigkeiten, und dies sowohl bei den Kontrollprobanden als auch bei den Glaukompatienten. Das Ergebnis verdeutlicht, dass sich die Antikörper-basierenden immunologischen Prozesse einer okularen Flüssigkeit, wie dem Kammerwasser, welche in direktem Kontakt mit der Retina - dem Ort der Glaukopathogenese - steht, nur geringfügig von den systemischen Prozessen im Serum unterscheiden. Der erstmals durchgeführte intraindividuelle Vergleich von Autoantikörper-Reaktionen in Serum und Kammerwasser bestätigt somit, dass die bisher in zahlreichen Studien detektierten Unterschiede im Serum von Glaukompatienten als spezifisch angesehen werden können und dass sie die immunologischen Ereignisse widerspiegeln, die sich lokal im Auge ereignen. Eine Nutzung dieser spezifischen Autoantikörpermuster zu diagnostischen Zwecken scheint somit nicht abwegig.

In welchem Zusammenhang die systemischen Veränderungen mit den lokal im Auge vorliegenden Prozessen stehen, ist bislang ungeklärt. Angesichts der Immunkompetenz des Auges und seiner Abschottung vom systemischen Immunsystem durch die Blut-Hirn-Schranke ist davon auszugehen, dass auf die immunmodulatorischen Vorgänge im Auge ähnliche regulatorischen Mechanismen einwirken wie im restlichen Organismus. Allerdings wird im Zusammenhang mit glaukomatösen Erkrankungen auch eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke diskutiert (Arend et al. 2004; Flammer et al. 2007; Grieshaber et al. 2007), so dass ein „Einwandern“ von systemisch vorliegenden Antikörpern denkbar wäre. Die detektierten erhöhten Autoantikörper-Reaktionen im Kammerwasser suggerieren jedoch auch eine lokale Antikörperproduktion im Auge, die

Diskussion

beispielsweise auf eine Antikörperproduktion des retinalen Pigmentepithels zurückzuführen sein könnte (Tezel et al. 2009).

Biologische Funktion der betroffenen Antigene

Eine weitere Beobachtung bei der Analyse von Autoantikörper-Reaktionen ist die Tatsache, dass viele der Autoantikörper, die einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen zeigen, gegen Proteine des Zytoskeletts gerichtet sind und in besonderem Maße das Actin-Zytoskelett und seine Interaktionspartner betreffen. Die Auswertungen der Datenbanken des GeneOntology Consortiums (vgl. 4.2.1) bestätigen diesen Eindruck.

Neben zahlreichen Actin-bindenden Proteinen (ABP's) konnte für Actin selbst eine erhöhte Autoantikörper-Reaktivität im Kammerwasser von Glaukoma-Patienten nachgewiesen werden (Anhang Abb. 4/5). Zu den ABPs, die von veränderten Immunreaktivitäten der Glaukoma-Patienten betroffen sind, gehört das Protein Annexin V. Für dieses im Zytosol vorliegende, Ca^{2+} bindende Protein konnte gezeigt werden, dass es bei höheren Ca^{2+} Konzentrationen seine Lokalisation ändert, sich an der zytosolischen Seite der Plasmamembran anlagert, dort mit filamentösem Actin (F-Actin) quervernetzt und so ein Bestandteil submembraner Zytoskelettstrukturen wird (Tzima et al. 1999).

α -Fodrin, ebenso ein Ca^{2+} bindendes, zytoskelettales Protein, welches der intrazellulären Seite der Plasmamembran aufliegt, konnte gleichermaßen eine Actin-bindende und quervernetzende Funktion zugewiesen werden (Perrin et al. 1985). Das Myelin-basische Protein (MBP), welchem eine wesentliche Bedeutung bei der Ausbildung von Myelinscheiden im zentralen und peripheren Nervensystem (ZNS, PNS) zukommt (Readhead et al. 1990), ist ebenfalls dazu in der Lage, mit dem Actin-Zytoskelett zu interagieren. So bindet MBP über elektrostatische Wechselwirkungen an Actin, reguliert dessen Polymerisation, bündelt es und nimmt somit Einfluss auf die Filamentstrukturen des Actin-Zytoskeletts (Dobrowolski et al. 1986; Roth et al. 1993). In der vorliegenden Studie konnten, wie auch in vorangegangenen (Joachim et al. 2008a), erhöhte Autoantikörper-Reaktionen gegen dieses Protein bei Glaukoma-Patienten beobachtet werden.

Dieser Befund steht interessanterweise in Übereinstimmung mit einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, der Multiplen Sklerose. Auch hier konnten erhöhte Reaktionen und eine Beteiligung von anti-MBP Autoantikörpern an der Pathogenese der

Erkrankung gezeigt werden (Panitch et al. 1980; Linthicum et al. 1981; Melse et al. 1983; Matsiota et al. 1988). Bei der multiplen Sklerose wird den Autoantikörpern aufgrund eines autoaggressiven Verhaltens eine Einflussnahme auf die Demyelinisierungsprozesse im ZNS zugeschrieben - ein Vorgang, der auch bei den Glaukomerkrankungen denkbar wäre. Als möglicher Wirkungsort, dessen Schädigung einen glaukومتypischen Schaden nach sich ziehen könnte, wäre der Sehnerv zu nennen, für den schon verstärkte Reaktionen von anti-MBP Autoantikörpern aus dem Serum von Glaukometpatienten gezeigt werden konnten (Joachim et al. 2008a).

Ein weiteres Protein, welches in direktem Zusammenhang mit dem Actin-Zytoskelett und dessen Regulation steht und für welches in der vorliegenden Studie erhöhte Autoantikörperreaktionen bei POAG-Patienten gefunden werden konnten, ist das Hitzeschockprotein HSP27. In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass dieses Protein an die Enden von Actin-Filamenten bindet und dass sein Phosphorylierungsstatus eine bedeutende Variable bei der Regulation der Actin-Mikrofilamentdynamik darstellt (Benndorf et al. 1994). Desweiteren scheint HSP27 grundlegend in die Modulation der Actin-Mikrofilamentdynamik in Folge von oxidativem Stress involviert zu sein und somit eine adaptive Antwort auf reaktive Sauerstoffspezies zu vermitteln (Huot et al. 1996) - eine Thematik, die im Zusammenhang mit glaukometösen Erkrankungen vielfach diskutiert wurde (Sacca et al. 2008; Yu et al. 2008; Fatma et al. 2009). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung von humanen Retinazellen mit anti-HSP27 Antikörpern zu einer Internalisierung der Antikörper und einem Abbau des Actin-Netzwerkes führt, mit dem apoptotische Prozesse von Retinazellen einhergehen (Tezel et al. 2000b).

In der vorliegenden Studie konnten für alle der hier aufgeführten, mit dem Zytoskelett assoziierten Proteine erhöhte Autoantikörper-Reaktionen im Serum, teilweise auch im Kammerwasser, der POAG-Probanden detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde für das saure Gliafaserprotein (GFAP) keine verstärkte Immunreaktion der POAG-Probanden nachgewiesen, sondern eine signifikant geminderte (vgl. 4.2.1, Abb. 20). GFAP liegt ausschließlich zytosolisch vor und bildet hier Intermediärfilamente aus. In der Retina wird GFAP unter normalen Bedingungen vorwiegend von Astrozyten und in geringfügigen Mengen von Müller-Zellen gebildet. Bei einer Vielzahl von Retinaverletzungen oder Degenerationen, wie der Photorezeptordegeneration (DiLoreto et al. 1995), einer retinalen Ischämie (Osborne et al. 1991) oder Verletzungen des Sehnervens, (Chen et al. 2002) konnte vor allem in Müller-Zellen eine verstärkte GFAP-

Expression festgestellt werden. Für Astroglia stellte sich heraus, dass eine Veränderung der zellulären Gegebenheiten sowie der zellulären Bewegung von einer erhöhten GFAP-Expression und einem gleichzeitigen Verlust an F-Actin und ABPs begleitet wird (Abd-el-Basset et al. 1991). Auch für die Glaukomerkrankungen konnte sowohl im Tiermodell (Wang et al. 2000; Wang et al. 2002) als auch bei der Untersuchung von humanem Gewebe (Tezel et al. 2003) eine Gliaaktivierung nachgewiesen werden, die von einer verstärkten GFAP-Expression begleitet ist. Da in der vorliegenden Studie eine geringere Actin-Konzentration in den Retinae von Glaukompatienten detektiert wurde (vgl. 4.2.3 und 5.2.3), scheint auch hier eine Beeinflussung des Actin-Zytoskeletts durch eine gesteigerte Gliaaktivität nicht abwegig.

Allgemein betrachtet lässt sich somit sagen, dass von den veränderten Antikörper-Reaktionen zahlreiche zytoskelettale Komponenten betroffen sind, deren Integrität für das Überleben von Zellpopulationen unter Stressbedingungen essentiell ist. Gerade im Rahmen einer Erkrankung wie dem primären Offenwinkelglaukom, bei dem ein erhöhter intraokularer Druck vorliegt, woraus sich die Notwendigkeit einer Umstrukturierung des Zytoskeletts zur Aufrechterhaltung subzellulärer Strukturen ableitet, kommt den dynamischen Prozessen des Zytoskeletts ein besonderer Stellenwert zu. Inwieweit diese Prozesse durch das Vorliegen von erhöhten und geminderten Autoantikörper-Reaktionen geschützt oder beeinträchtigt werden, ist bislang unbekannt. Bekannt ist dagegen, dass Antikörper über Rezeptor-vermittelte Endozytose von Zellen internalisiert werden können (Ma et al. 1993; Casalini et al. 1997; Tezel et al. 2000b; Shih et al. 2006) und dass sie intrazelluläre Strukturen und Kompartimente beeinflussen (Tezel et al. 2000b; Bohm 2003). Im Fall der erhöhten Immunreaktivitäten könnte somit ein schädigendes, autoaggressives Verhalten vorliegen, das auf einer direkten Einflussnahme der Antikörper auf retinale Zellen basiert, oder aber indirekt durch die Initialisierung von Komplementprozessen vermittelt wird (vgl. 5.2.2). Die Wirkweise derjenigen Autoantikörper, für die eine geminderte Reaktivität beobachtet wurde, ist dagegen schwieriger einzuordnen. Möglicherweise kommt diesen Immunglobulinen eine protektive Funktion zu, wie sie von Shoenfeld et al. vertreten wird (Shoenfeld et al. 2005). So konnte die schützende Rolle von Autoantikörpern bei mehreren Autoimmunerkrankungen beobachtet werden, wie dem Lupus erythematoses (Bootsma et al. 1996). In dieser Studie war eine Korrelation zwischen dem Vorliegen von anti-dsDNA Autoantikörpern und einer schwächeren Ausbildung des Krankheitsbildes zu beobachten. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Autoantikörper Autoantigene maskieren, deren Kreuzreaktion mit infektiösem Material verhindern und so eine weitere,

potenziell schädliche Immunantwort durch autoreaktive CD5+ Zellen unterbinden können (Mockridge et al. 2004). Auch können Autoantikörper die Oberflächenrezeptoren von autoreaktiven CD5+ Zellen maskieren und hierdurch autoimmune Prozesse abwenden (Kohler et al. 2003). Eine mögliche Ursache der protektiven Funktion von Autoantikörpern scheint in deren asymmetrischer Glykosylierung zu liegen, die 10-20% aller Autoantikörper betrifft. Sie erlaubt es ihnen zwar, ihr Antigen zu erkennen, aber nicht, weitere - potenziell schädliche - Autoimmunprozesse einzuleiten (Mathov et al. 1995; Canellada et al. 2002). Antikörper mit fehlerhaften Glykosylierungen scheinen dagegen in die Pathogenese verschiedenster Immunkrankheiten involviert zu sein (Alavi et al. 2000; Axford et al. 2003). So legen Untersuchungen an chronischen und rheumatischen Autoimmunerkrankungen nahe, dass jede Krankheit mit einem spezifischen Muster an IgG-Glykosylierungen assoziiert ist (Martin et al. 2001; Axford et al. 2003).

Ob den Autoantikörpern, für die in der hier vorliegenden Studie geminderte Reaktivitäten detektiert wurden, tatsächlich eine protektive Funktion zukommt, lässt sich anhand der generierten Daten nicht belegen, aber auch nicht ausschließen. Einen ersten Schritt zur Überprüfung dieser Hypothese würde die Analyse des Glykosylierungsstatus darstellen, da dieser, wie oben geschildert, maßgeblichen Einfluss auf die Wirkweise des jeweiligen Antikörpers hat. So könnte beispielsweise die potenziell protektive Funktion eines Autoantikörpers durch ein fehlerhaftes Glykosylierungsmuster verloren gehen.

Die These der protektiven Autoimmunität wird ebenfalls von Schwartz et al. vertreten (Schwartz et al. 2001; Schwartz et al. 2002b; Schwartz et al. 2003; Schwartz et al. 2004; Schwartz et al. 2005; Schwartz et al. 2008; Schwartz et al. 2009), sie postuliert, dass autoimmune Prozesse im ZNS teilweise protektiv wirken können und eine Degeneration von neuronalen Geweben verhindern bzw. verlangsamen. Gezeigt werden konnte, dass eine systemische Injektion mit anti-MBP T-Zellen zu einer erhöhten Überlebensrate von neuronalen Zellen in Folge einer traumatischen ZNS-Verletzung bei Ratten führt (Moalem et al. 1999a; Moalem et al. 2000a; Moalem et al. 2000b). Diese Ergebnisse stehen im direkten Gegensatz zu der klassischen Ansicht von Immunaktivitäten im ZNS, in der sowohl T-Zellen als auch Antikörpern eine eher schädigende Wirkung zugewiesen wurde (Popovich et al. 1996; Popovich et al. 1997). Die Theorie zu den Beobachtungen von Schwartz et al. basiert auf der Erkenntnis, dass traumatische Verletzungen im ZNS eine sekundäre Degeneration neuronaler Zellen nach sich ziehen, die von herkömmlichen protektiven Mechanismen nicht mehr adäquat abgefangen werden

können. Die sekundäre Degeneration wird durch zytotoxische Vorgänge hervorgerufen, wie zum Beispiel der verstärkten Ausschüttung von Glutamat, und verursacht die Degeneration neuronaler Zellen, die nicht direkt von dem traumatischen Ereignis betroffen sind (Hovda et al. 1991; Faden 1993; Yoles et al. 1998). Die Behandlung mit MBP-reaktiven CD4+ T-Zellen scheint diesen sekundären Prozessen entgegenzuwirken, da eine Akkumulation dieser Zellen in den betroffenen Geweben beobachtet werden konnte, einhergehend mit einer signifikant höheren Überlebensrate der neuronalen Zellen. Vermittelt wird die protektive Antwort der autoreaktiven T-Zellen dabei vermutlich durch Makrophagen, mit denen sie in Interaktion treten (Schwartz et al. 2001). Die Resultate einer Behandlung mit MBP-reaktiven CD4+ T-Zellen konnten nicht nur für das Tiermodell der EAE (Experimentelle autoimmune Encephalitis) gezeigt werden, sondern auch für ein experimentelles Glaukomtiermodell (Moalem et al. 1999a; Moalem et al. 1999b; Hauben et al. 2000; Moalem et al. 2000b; Hauben et al. 2001). Eine verminderte sekundäre Degeneration ließ sich auch durch die Immunisierung mit nicht pathogen wirksamen Peptiden des ZNS erzielen, welche die Möglichkeit der Nutzung der protektiven Autoimmunität zur Bekämpfung neurodegenerativer Erkrankungen nahelegt. Es könnten also durch die Stimulation körpereigener protektiver Mechanismen degenerative Prozesse in neuronalen Geweben unterbunden werden. Erste Studien, bei denen das von der FDA zur Behandlung von Multipler Sklerose freigegebene synthetische Polymer COP1 verwendet wurde, belegen die neuroprotektive Wirkung einer Stimulierung des Immunsystems (Kipnis et al. 2000; Schori et al. 2001).

Das Vorliegen von autoimmunen T-Zellen allein scheint aber nicht ausreichend für eine protektive Wirkweise zu sein, da es bei gleichzeitiger Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen (CD4+-CD8+) zu einer schädigenden Wirkung kommt (Seddon et al. 1999; Seddon 2000). Die protektive T-Zellantwort scheint somit nur dann von Makrophagen vermittelt zu werden, wenn sie neben den autoreaktiven-T-Zellen gleichzeitig mit regulatorischen T-Zellen in Kontakt stehen. Die Rolle von Antikörpern und im Speziellen die von Autoantikörpern wurde im Rahmen dieser Studien nicht untersucht. Erkenntnisse über eine mögliche Beteiligung an diesen protektiven Prozessen würde Aufschluss darüber geben, inwieweit die T-Zell-basierenden Mechanismen durch Antikörper beeinflusst oder dirigiert werden und welche Bedeutung möglicherweise den veränderten Autoantikörper-Reaktionen, insbesondere den geminderten, bei Glaukompatienten zukommt.

Festhalten lässt sich, dass die Ergebnisse vorangegangener Studien zu Autoantikörper-Reaktionen von Glaukompatienten bestätigt werden konnten. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Immunreaktivitäten des Serums die Antikörper-basierenden immunologischen Vorgänge im Kammerwasser widerspiegeln. Diese Kongruenz untermauert die Spezifität der Serumantikörpermuster und damit deren Nutzbarkeit für eine Klassifizierung der Patienten, die in diesem Fall eine mehr als 90%ige Sensitivität und Spezifität aufweist. Die genaue Bedeutung der veränderten Autoantikörper-Reaktionen ist bislang weiterhin unklar, jedoch liegt die Vermutung nahe, dass hierdurch Strukturen negativ beeinflusst werden, die für das Überleben von retinalen Zellen unter Stressbedingungen - wie einem erhöhten IOD - essentiell sind. Die Frage, ob den Autoantikörpern, für die Veränderungen detektiert wurden, in gesunden Probanden eine eher schützende oder schädliche Funktion zukommt, ist ebenfalls noch unbeantwortet. Allerdings gibt es eindeutige Hinweise dafür, dass autoimmune Prozesse nicht nur schädigend wirken können, sondern durchaus auch protektive Funktionen wahrnehmen.

Aktuellste Studien unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass bei Glaukompatienten neben den veränderten Immunreaktionen von Immunglobulinen der Klasse G auch bei Immunglobulinen der Klasse M ein anormales Reaktionsverhalten vorliegt (Beck et al. 2010). Die autoimmunen Prozesse im Rahmen der Glaukopathogenese scheinen somit umfassender und vielfältiger zu sein als bisher angenommen. Welche Rolle autoreaktive T-Zellen oder die IgG-Isotypen 1-4 spielen, und inwieweit die Autoantikörper mit dem unter 5.2.2 besprochenen Komplementsystem in Verbindung stehen, wurde bislang noch nicht untersucht und bleibt in zukünftigen Studien zu klären.

5.2.2 Analyse spezifischer Serum-und-Retinaproteine

Komplementsystem

Eine weitere, in dieser Arbeit besonders beachtete Komponente des humoralen Immunsystems, die im Hinblick auf die Glaukopathogenese zu beachten ist, stellt das Komplementsystem dar. Diese verstärkte Aufmerksamkeit wurde den vorwiegend in der Leber synthetisierten Proteinen aufgrund ihres natürlichen Zusammenspiels mit Antigen-gebundenen Immunglobulinen zuteil, welche häufig als Initiator der Komplementkaskade fungieren. Sie ermöglichen erst die Anlagerung der initialen Komplementproteine C1s, C1r und C1q an eine Zelle und leiten somit die Ausbildung eines Membranangriffskomplex ein (Arlaud et al. 2002). Unter Berücksichtigung der unter 5.2.1 diskutierten Veränderungen der Autoantikörper-Reaktivitäten bei Glaukompatienten liegt

Diskussion

dadurch die Vermutung nahe, dass ein solches Zusammenspiel dieser beiden Komponenten des humoralen Immunsystems auch an dem Untergang von Ganglienzellen in der Retina beteiligt sein könnte.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung des Komplementsystems an dem Untergang retinaler Ganglienzellen wurden durch die Arbeiten von Kuehn et al. erbracht. Die Arbeitsgruppe konnte unter Verwendung immunhistochemischer Methoden bei Probanden mit einem erhöhten intraokularen Druck Ablagerungen der Komplementproteine C1q und C3 in der Retina nachweisen (Kuehn et al. 2006). Zusätzlich ließ sich in dieser Studie anhand eines Tiermodells, bei dem durch Lasern der episkleralen Vene ein erhöhter intraokularer Druck erzeugt wurde, eine verstärkte Expression der Komplementproteine C1q und C3 beobachten, die zu einer Ablagerung dieser Proteine in der retinalen Ganglienzellschicht führte (Kuehn et al. 2006). In einer weiteren Studie konnte die Arbeitsgruppe eindeutig belegen, dass die erhöhten Komplementexpressionsraten mit dem Untergang retinaler Ganglienzellen korrelieren (Kuehn et al. 2008). Die Tatsache, dass vor allem retinale Ganglienzellen vom Komplement-induzierten Untergang betroffen sind, deckt sich mit der Erkenntnis, dass neuronale Zellen im Gegensatz zu Gliazellen nicht dazu in der Lage sind, die Prozesse der Komplementkaskade angemessen zu inhibieren, woraus sich eine besondere Anfälligkeit gegenüber diesen Prozessen ableitet (Singhrao et al. 1999).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass bei Tieren mit einem experimentell erhöhten Augeninnendruck eine Inhibierung der Komplementkaskade durch einen Knock-Out des Proteins C3 zu einer signifikant höheren Überlebensrate retinaler Ganglienzellen führt (Kuehn et al. 2008). Das Komplementprotein C3 scheint somit maßgeblich am Untergang retinaler Ganglienzellen infolge eines erhöhten intraokularen Drucks beteiligt zu sein. Dass dies nicht nur auf Patienten mit einer okularen Hypertension zutrifft, konnte von Stasi et al. gezeigt werden, die auch bei Glaukompatienten eine erhöhte Konzentration an Komplementproteinen in der Retina nachwiesen (Stasi et al. 2006).

Die geschilderten Daten belegen, dass es sowohl infolge eines erhöhten intraokularen Drucks als auch im Rahmen der Glaukopathogenese innerhalb der Retina zu einer verstärkten mRNA-Expression von Komplementproteinen kommt. Ob aber tatsächlich auch größere Mengen an Komplementprotein in der humanen Retina vorliegen, wurde bislang nur mit immunhistochemischen Ansätzen untersucht. Desweiteren stellte sich die Frage, ob die Ablagerung von Komplementproteinen in der Retina und der damit einhergehenden Untergang retinaler Ganglienzellen ausschließlich auf lokal exprimierte

Proteine zurückzuführen ist, oder ob hierbei auch ein weiterer Faktor zum Tragen kommt, der auf einer eventuell systemisch vorliegenden Erhöhung der Komplementproteinmengen beruht. So wäre es denkbar, dass es aufgrund einer erhöhten Permeabilität der Blut-Retinaschranke, beispielsweise ausgelöst durch eine Ischämie (Kaur et al. 2008), zu einer Ablagerung von Komplementproteinen aus dem Blut bzw. der Leber kommt.

Um diese Fragestellung näher zu beleuchten, wurden in dieser Arbeit erstmals die Quantitäten der wichtigsten Komplementkomponenten mittels des Antikörper-Microarray-Verfahrens in den Serum- und Retinaprobe von Glaukumpatienten im Vergleich zu denen von gesunden Probanden analysiert. Hierbei konnten in den Serumproben der Glaukumpatienten sowohl das für die Komplementkaskade zentrale Protein C3 als auch das später in der Kaskade folgende Protein C6 in signifikant erhöhten Mengen nachgewiesen werden (vgl. 4.2.2, Abb. 26). Deutlich erhöhte Mengen des Proteins C3 zeigten auch die Retinaprobe der Glaukumpatienten, wiesen aber im Gegensatz zu den Serumproben geminderte Mengen der Komplementproteine C1r und C6 auf (vgl. 4.2.2, Abb. 27). Die in der Retina detektierten C3-Mengen stehen im Einklang mit den von Kuehn et al. geschilderten Beobachtungen. Das Resultat der Serumproteinanalyse untermauert jedoch die These, dass neben der lokalen Produktion von Komplementproteinen in der Retina, die beispielsweise durch reaktive Mikrogliazellen erfolgen kann (Singhrao et al. 1999), auch systemisch eine erhöhte Menge des Proteins C3 vorliegt, die eventuell zu den detektierten Komplementablagerungen in der Retina von Glaukumpatienten beiträgt. Als möglicher Effekt dieser C3-Ablagerungen ist einerseits die verstärkte Ausbildung von Membranangriffskomplexen zu nennen, welche die Lyse der betroffenen Zellen einleitet. Andererseits fungiert die im Rahmen der Komplementaktivierung aus dem C3-Vorläufer hervorgehende Untereinheit C3a als Anaphylatoxin, welches zu einer Modulation der Gliaaktivität und damit einhergehend zu lokalen inflammatorischen Prozessen führt (Kohl 2001). Dass die dadurch stimulierten Gliazellen Mediatoren ausschütten (z.B. Zytokine wie IFN- γ oder TNF- α), die dazu in der Lage sind, den Untergang retinaler Ganglienzellen auszulösen bzw. unterstützen, konnte in verschiedenen Studien unter Verwendung tierexperimenteller Ansätze gezeigt werden (Neufeld 1999; Tezel et al. 2000a; Neufeld et al. 2002). Es ist somit anzunehmen, dass die Aktivierung der Komplementkaskade neben der Ausbildung des Membranangriffskomplexes über einen zusätzlichen, sekundären Effekt an dem Untergang retinaler Ganglienzellen beteiligt ist.

Zytokine

Zu den Zytokinen, für die ein Zusammenhang zwischen den inflammatorischen Prozessen in der Retina und dem Untergang retinaler Ganglienzellen hergestellt werden konnte, gehören beispielsweise Interleukin1- β (Abcouwer et al. 2008), TNF- α (Tezel et al. 2000a; Yuan et al. 2000) und IFN- γ (Tura et al. 2009). Diese Zytokine wurden bislang jedoch ausschließlich anhand verschiedener Tiermodelle untersucht, bei denen die inflammatorischen Ereignisse in der Retina durch das Hervorrufen einer Ischämie oder beispielsweise durch einen künstlich erhöhten intraokularen Druck ausgelöst worden sind. Eine Untersuchung der Zytokinmengen in der humanen Retina bzw. der Retina eines Glaukompatienten wurden bisher dagegen jedoch nicht durchgeführt. Um diese Lücke zu schließen und zu überprüfen, inwieweit die tierexperimentellen Erkenntnisse auf den humanen Organismus übertragbar sind, wurden in der vorliegenden Arbeit parallel zu der Erfassung der Komplementproteine auch die Abundanzen mehrerer Zytokine in den Serum- und Retinaprobe der Probanden mittels des Antikörper-Microarray-Verfahrens analysiert. Die Resultate dieser Studie bestätigen die bisher für die Tierversuche geschilderten Versuchsergebnisse und belegen eindeutig das verstärkte Auftreten inflammatorischer Prozesse in der Retina von Glaukompatienten. So konnten im Serum die Zytokine IL1- β und IL8 und in den Retinaprobe die Zytokine IL1- β , IL6, IFN- γ und TNF- α in erhöhten Mengen bei Glaukompatienten nachgewiesen werden (vgl. 4.2.2, Abb. 26/27).

Inwieweit das Zusammenspiel dieser veränderten Zytokinmengen als eine protektive Antwort auf eine Stresssituation anzusehen ist, durch welche retinale Ganglienzellen geschützt werden, oder ob es eher zum Untergang dieses Zelltyps der Retina beiträgt, ist bislang unklar und wird kontrovers diskutiert. Im Fall von TNF- α konnte, wie auch bei IFN- γ (Amantea et al. 2009), eine schädigende Wirkung anhand mehrerer Studien gezeigt werden, in denen ein experimentell erhöhter TNF- α -Spiegel zu einem stark erhöhten Verlust retinaler Ganglienzellen führt (Tezel et al. 2000a; Kitaoka et al. 2006). Die gleichzeitige Gabe eines anti-TNF- α Antikörpers minderte dagegen den Untergang der Nervenzellen um 68% (Tezel et al. 2000a). Demgegenüber steht eine Studie, in der gezeigt werden konnte, dass TNF- α nach erfolgter Axotomie durchaus auch eine neuroprotektive Funktion ausüben und den sekundären Tod retinaler Ganglienzellen verhindern kann, wodurch die ambivalente Funktionsweise dieses Zytokins verdeutlicht wird (Diem et al. 2001). Die erhöhten Mengen dieses Zytokins, die in der vorliegenden Studie in den Retinae von Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom detektiert

wurden, lassen sich somit hinsichtlich ihres Effekts auf die Ganglienzellen nicht eindeutig einordnen.

Dem Interleukin 6 (IL6), von dem in den analysierten Retinae der Glaukumpatienten ebenfalls eine erhöhte Konzentration gefunden wurde, wird eine vornehmlich neuroprotektive Funktion zugewiesen. IL6 gehört zu der großen Familie von Zytokinen, die mittels Interaktion mit dem Membranrezeptor gp130 dazu in der Lage sind, die STAT1- und STAT3-Signalkaskade (engl. *signal transducers and activators of transcription*) zu aktivieren und somit als Reaktion auf einen Stresszustand die Genaktivität von Zellen zu beeinflussen (Hirano et al. 1994). Auch in dieser Arbeit ließen sich mittels der massenspektrometrischen Analyse Hinweise für eine verstärkte Genaktivität in den Retinae von Glaukumpatienten nachweisen, da für zahlreiche Histone veränderte Proteinmengen detektiert wurden (vgl. 4.2.3, Abb. 30) Desweiteren konnte beobachtet werden, dass IL6 den Tod retinaler Ganglienzellen infolge druckinduzierter apoptotischer Prozesse vermindert (Sappington et al. 2006; Huang et al. 2009). Sezerniert wird dieses Zytokin von Astroglia, und es wirkt vorliegenden proapoptischen Signalen entgegen, die ebenfalls von Gliazellen ausgesandt werden. Die Ausschüttung von IL6 wird unter anderem durch die vorherrschende Konzentrationen des Interleukins 1- β kontrolliert, für welches in der vorliegenden Arbeit sowohl im Serum als auch in der Retina erhöhte Mengen bei Glaukumpatienten detektiert werden konnten, wodurch sich die erhöhten IL6-Mengen in der Retina von Glaukumpatienten erklären ließen.

Im Zusammenhang mit dem primären Offenwinkelglaukom, bei dem der graduelle Verlust retinaler Ganglienzellen von einem erhöhten Augeninnendruck begleitet wird, kommt dem neuroinflammatorischen Zytokin IL1- β eine besondere Rolle zu. So konnte gezeigt werden, dass IL1- β die Expression der Matrixmetalloproteinase 3 im Trabekelmaschenwerk steigert, woraus lokal eine verstärkte Ablagerung an extrazellulärem Material resultiert. Diese führt wiederum zu einem schlechteren Abfluss des Kammerwassers und damit zu dem für das primäre Offenwinkelglaukom typischen Anstieg des intraokularen Drucks, der letztendlich in einer erhöhten Stressbelastung der verschiedenen Zellen der Retina mündet (Kelley et al. 2007). Bei einer gleichzeitig erhöhten TNF- α Konzentration wird dieser Effekt zusätzlich verstärkt (Kelley et al. 2007). Neben dem Effekt auf die Expressionsrate der Metalloproteasen konnte für IL1- β in einer tierexperimentellen Studie gezeigt werden, dass infolge einer Ischämie die IL1- β Konzentration innerhalb der Retina stark ansteigt und zu einem signifikanten Verlust

retinaler Zellen in der Ganglienzellschicht führt. Begleitet wurden diese Veränderungen von einer verminderten Dicke der inneren plexiformen Schicht (Yoneda et al. 2001). Die Tatsache, dass die Ausschüttung des neuroprotektiv wirkenden IL6 durch IL1- β gefördert wird, IL1- β aber ansonsten eher eine destruktive Komponente zukommt, verdeutlicht erneut die ambivalenten Auswirkungen veränderter Zytokinexpressionen im Zusammenhang mit den neurodegenerativen Prozessen in der Retina und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die in dieser Studie detektierten Zytokinkonzentrationen belegen das Vorliegen inflammatorischer Prozesse in der Retina von Glaukompatienten und deuten darüber hinaus auch auf eine Beteiligung zellulärer Komponenten des Immunsystems an dem Pathomechanismus des Glaukoms hin. So ist davon auszugehen, dass die erhöhten Zytokinkonzentrationen teilweise auf aktivierte Mikrogliazellen zurückzuführen sind, die neben der Sezernierung von Komplementproteinen oder reaktiven Sauerstoffspezies auch zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen befähigt sind (Singh et al. 1999; Kim et al. 2005; Block et al. 2007). Einen weiteren Hinweis auf die Aktivierung von Gliazellen erbrachte das Resultat der quantitativen Analyse des Proteins IBA1 (engl. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*). Dieses Protein stellt einen spezifischen Marker für Mikrogliazellen dar und wird nicht in den anderen Gliazellen neuronaler Gewebe, wie z.B. den Astroglia, exprimiert (Ito et al. 1998). Mikrogliazellen sind als Teil des monozytischen Phagozytosesystems im zentralen Nervensystem und der Retina anzusehen, deren primäre Zuständigkeit in der Beseitigung von Zelltrümmern liegt (Oehmichen 1982). Eine Aktivierung dieser Zellen ist als allgemeine Antwort auf eine okuläre Infektion, eine Ischämie oder neuronale Verletzung zu werten (Schuetz et al. 2004) und erfolgt häufig durch die pro-inflammatorische Mediatoren IFN- γ , TNF- α sowie verschiedene Proteine des Komplementsystems (Schuetz et al. 2004). Aus der Aktivierung der Zellen resultiert eine Änderung der Zellmorphologie, bei der sich die Zelle vom ramifizierten Stadium mit kleinem Zellkörper und zahllosen Ausläufern in das aktivierte Stadium mit amöboider Ausprägung wandelt (Langmann 2007). Neben der Ausschüttung verschiedenster Mediatoren führt die Aktivierung dieses Zelltyps zu einer verstärkten Expression des Proteins IBA1 (Ito et al. 1998; v Eitzen et al. 1998; Mori et al. 2000; Ito et al. 2001). Die Menge an IBA1 kann somit als Indikator für den Zustand von Mikrogliazellen bzw. deren Aktivierung angesehen werden. Im Rahmen der hier durchgeführten Gewebeanalyse wurde eine erhöhte Menge dieses Proteins in den Retinaprobe der Glaukompatienten nachgewiesen (vgl. 4.2.2, Abb. 26; Abb. 7 des Anhangs), so dass bei diesen Probanden von einer Aktivierung der Mikroglia

auszugehen ist. Zusätzlich untermauert wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass, wie zuvor dargelegt, eine Aktivierung dieser Zellen unter anderem durch die Zytokine IFN- γ und TNF- α erfolgt - beides Mediatoren, für die in den Retinae der Glaukumpatienten erhöhte Konzentrationen nachgewiesen werden konnten (vgl. 4.2.2, Abb. 26/27). Inwieweit aktivierte Mikrogliazellen an dem graduellen Verlust retinaler Ganglienzellen bei Glaukumpatienten beteiligt sind, ist bislang ungeklärt. Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass aktivierte Mikrogliazellen ihrer Hauptfunktion nachgehen und Zelltrümmer abgestorbener Zellen beseitigen, wie z.B. durch die Ausbildung eines Membranangriffskomplex zerstörte Zellen. Andererseits ist es denkbar, dass die Mikrogliazellen durch die Ausschüttung von Mediatoren ein zytotoxisches Umfeld schaffen, welches zu dem Untergang der retinalen Ganglienzellen beiträgt (Langmann 2007).

Insgesamt konnten durch die fokussierte Proteinanalyse Ergebnisse erzielt werden, welche die pathomechanistischen Aspekte der Glaukopathogenese weiter erhellen und hierbei ein Zusammenspiel von verschiedenen Komponenten des Immunsystems andeuten. Durch den Einsatz des etablierten Antikörper-Microarray-Verfahrens war es möglich, zahlreiche Proteine gleichzeitig zu quantifizieren und daraus Rückschlüsse hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Pathomechanismus abzuleiten. So konnten in dieser Studie zahlreiche Proteine humaner Proben analysiert werden, die bislang ausschließlich in tierexperimentellen Studien untersucht wurden, deren Relevanz für den humanen Glaukopathomechanismus aber noch nicht als gesichert angesehen werden konnte bzw. überhaupt nachgewiesen wurde. In den Retina- und Serumproben von Glaukumpatienten wurden erhöhte Konzentrationen verschiedener Komplementproteine detektiert, die nach Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen mit dem Untergang retinaler Ganglienzellen in Verbindung stehen. In dieser Hinsicht ist auch eine Interaktion mit Autoantikörpern denkbar, für die stark veränderte Reaktivitäten bei Glaukumpatienten nachgewiesen werden konnten und die möglicherweise für die Initiierung der Komplementkaskade an retinalen Ganglienzellen verantwortlich sind. Desweiteren wurden in den Retinaprobe von Glaukumpatienten erhöhte Konzentrationen von verschiedenen Zytokinen nachgewiesen, die einen eindeutigen Hinweis auf inflammatorische Prozesse liefern. Ob den analysierten Zytokinen im Hinblick auf die Glaukopathogenese eine eher protektive oder aber neurodestruktive Rolle zukommt, ist bislang noch nicht beantwortet.

Es zeigt sich somit, dass für das Verständnis des Glaukopathomechanismus nicht unbedingt die Betrachtung einzelner Komponenten, wie dem Antikörper-basierenden Teil des Immunsystems oder dem Komplementsystem, zielführend ist, sondern dass vielmehr die Erfassung diverser Parameter und vor allem das Verständnis ihrer Interaktionen und Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung ist.

5.2.3 Retinaproteomanalyse mittels Massenspektrometrie

Die explorative Analyse des Retinaproteoms und dessen Vergleich zwischen organisch Gesunden und Glaukompatienten kommt in gewisser Weise der Betretung von Neuland gleich, da bislang in keiner vorherigen Studie humanes Material im Zusammenhang mit dieser Fragestellung untersucht wurde. Auch allgemein finden sich im Bezug auf Glaukom-assoziierte Erkrankungen nur wenige Proteomstudien, die darüber hinaus ausschließlich anhand tierexperimenteller Studien generiert wurden, und deren Relevanz für den humanen Organismus noch ungeklärt ist (Tezel et al. 2005; Miyara et al. 2008; Carter-Dawson et al. 2010).

In der vorliegenden Studie erfolgte somit erstmals eine umfassende massenspektrometrische Analyse des Retinaproteoms von Glaukompatienten - mit dem Ziel, mögliche krankheitsassoziierte Veränderungen dieses Gewebes zu untersuchen. Die dabei identifizierten Proteine sind größtenteils grundlegenden Zellprozessen zuzuordnen, die dem Katabolismus, dem Zytoskelett, der Signaltransduktion oder beispielsweise der Ionen-Homeostase dienen (Anhang Abb. 8A). Darüber hinaus ließen sich aber auch zahlreiche Neuronen- bzw. Retina-spezifischen Proteine identifizieren, wie das Neural cell adhesion molecule 1, das Cellular retinoic acid-binding protein 1 (CRABP1), Recoverin oder der Interphotoreceptor matrix proteoglycan 1 precursor.

Für 37 Proteine konnten bei Glaukompatienten Unterschiede in der vorliegenden Proteinmenge detektiert werden. Die Analyse ihrer biologischen Funktionen ergab zahlreiche funktionale Zusammenhänge, bei denen, im Gegensatz zu den erhöhten, vor allem die bei Glaukompatienten in geringeren Quantitäten vorliegenden Proteine in direkter Wechselwirkung miteinander stehen (Anhang Abb. 9A-B). Besonders Proteine, die an der Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind (Peroxoredoxin-2, Superoxid Dismutase) sowie Proteine des Stoffwechsels spielen hier eine zentrale Rolle. Verdeutlicht wird dadurch, dass die krankheitsassoziierten Prozesse sich nicht nur auf die Quantitäten einzelner Proteine auswirken, sondern dass ganze Gruppen von funktionsverwandten Proteinen betroffen sind.

Diskussion

In der Gruppe der erhöht vorliegenden Apoptose-regulierenden Proteine kommt vor allem den Hitzeschockproteinen alpha-Crystallin-A (Heat-shock protein beta-4) und alpha-Crystallin-B (Heat-shock protein beta-5) eine interessante Rolle zu. Ihre anti-apoptotische Wirkung wurde vielfach im Zusammenhang mit der Katarakt-Pathogenese beschrieben (Liu et al. 2004; Strickler et al. 2007; Andley 2009), ist darüber hinaus aber auch in apoptotische Vorgänge der Retina, wie beim Retinoblastom (Kase et al. 2009), involviert. In Photorezeptorzellen tragen diese Crystalline in den frühen Stadien der EAU (Experimentelle autoimmune Uveitis) zur Bewältigung des experimentell ausgelösten, oxidativen Stresses bei (Rao et al. 2008; Saraswathy et al. 2009). Da, wie zuvor mehrfach angesprochen und weiter unten diskutiert, auch bei der Glaukompathogenese eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies vorliegt (Tezel 2006), könnten die erhöhten Crystallin-Mengen als protektive Antwort auf dieses neurodestruktive Potential verstanden werden.

Ein weiteres, bei Glaukompatienten in erhöhten Mengen detektiertes Protein stellt 14-3-3 β/α (Protein kinase C inhibitor protein 1) dar, dessen zahlreiche, strukturbedingte Protein-Protein-Interaktionen ihm eine Art Kontrollfunktion für verschiedenste Signalwege zukommen lassen und dessen anti-apoptotische Wirkung in vielen Studien belegt wurde (Muslin et al. 1996; Yaffe et al. 1997; Xing et al. 2000; Yang et al. 2006). Hinsichtlich apoptotischer Vorgänge in retinalen Ganglienzellen konnte für dieses Protein ebenfalls eine eindeutige Involvierung aufgezeigt werden (Surgucheva et al. 2008; Yang et al. 2008b). So bindet 14-3-3 an Bad - ein Mitglied der proapoptotischen BCL-2 Familie - wodurch dessen Einwanderung in die Mitochondrien und die damit verbundene Auslösung apoptotischer Signale unterbunden wird (Yang et al. 2008b). Die bisherigen Erkenntnisse zu 14-3-3 beruhten neben Zellkulturversuchen (Surgucheva et al. 2008) ausschließlich auf tierexperimentellen Studien, bei denen an Ratten ein chronisch erhöhter Augeninnendruck nachgebildet wurde. Wie auch in der vorliegenden Arbeit konnte bei diesen Versuchen eine erhöhte Menge des 14-3-3 Proteins detektiert werden (Yang et al. 2008b), wodurch die These einer zentralen Involvierung von 14-3-3 in die neurodegenerativen Prozesse der Retina untermauert wird. Unter funktionalen Gesichtspunkten betrachtet, könnte eine erhöhte 14-3-3-Konzentration zu einer vermehrten Bindung von Bad führen, wodurch dessen apoptotische Wirkung abgewendet würde. Daher ist die erhöhte 14-3-3-Menge, wie auch bei den α -Crystallinen, als eine protektive Reaktion auf einen Stresszustand anzusehen.

Diskussion

Unter immunologischen Gesichtspunkten erweist sich die erhöhte Menge an detektiertem MIF (macrophage migration inhibitory factor) als interessant. Dieses Zytokin ist als eine der zentralen Regulationseinheiten inflammatorischer Ereignisse anzusehen, wirkt aktivierend auf Zellen des Immunsystems und darüber hinaus als Gegenpart anti-inflammatorischer Glukokortikoide (Lue et al. 2002; Hoi et al. 2007). Bei Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, nimmt dieses Protein eine Schlüsselrolle in den chronisch-inflammatorischen Prozessen ein, weswegen es mehr und mehr als potenzielles Ziel eines therapeutischen Ansatzes in den Fokus rückt (Becker et al. 2009; Santos et al. 2009). Bezüglich einer Involvierung von MIF in die pathomechanistischen Prozesse des Glaukoms liegen bislang keine Erkenntnisse vor. Da jedoch auch das Glaukom in Folge seines progressiven Verlaufs von chronisch-inflammatorischen Prozessen begleitet wird, scheint auch hier eine Beteiligung dieses Proteins nicht unwahrscheinlich. Aufgrund seiner Funktion ist dieses Protein eher als Gegenspieler zu den oben diskutierten α -Crystallinen oder dem 14-3-3-Protein zu betrachten. Die erhöhte Proteinmenge von MIF könnte zu einer verstärkten Sequestrierung von anti-inflammatorischen Botenstoffen führen oder auch zu einer verstärkten Mikrogliaaktivität beitragen, für die hinsichtlich der Glaukompathogenese vielfältige Hinweise vorliegen (vgl. 5.2.1 und 5.2.2).

Neben den bisher diskutierten Proteinen, für die erhöhte Mengen in der Retina von Glaukompatienten nachgewiesen werden konnten, wurden für zahlreiche Proteine auch geringere Quantitäten festgestellt - Proteine, die größtenteils mit dem Stoffwechsel, apoptotischen Prozessen und der Bekämpfung reaktiver Sauerstoffspezies in Verbindung stehen.

Gerade den anti-oxidativ wirkenden Proteinen Superoxid-Dismutase und Peroxiredoxin kommt im Rahmen der Glaukompathogenese eine besondere Bedeutung zu. Beide dienen der Adsorption freier Sauerstoffradikale, die in den Mitochondrien gebildet werden und die bei überschreiten eines Schwellenwertes ein zytotoxisches Potential entwickeln - den oxidativen Stress (Finkel 2001). Die Auswirkung dieses destruktiven Potentials wird mit vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Morbus Alzheimer, in Verbindung gebracht, bei denen die Radikale für das Absterben neuronaler Zellen verantwortlich zeichnen (Castegna et al. 2002; Andersen 2004). Oxidative Vorgänge in der Retina konnten infolge von ischämischen Zuständen aber auch im Zusammenhang mit glaukomatösen Prozessen beobachtet werden (Bonne et al. 1998; Tezel 2006). Durch ischämische Prozesse kann es beispielsweise zu

Versorgungsengpässen der Retina und ihrer Axone und einer daraus resultierenden Bildung von ROS kommen (Flammer et al. 2002). Die direkten Auswirkungen dieser Prozesse auf die Zellen der Retina sind dabei mannigfaltig, münden aber bei inadäquater Inaktivierung der Radikale auf den verschiedensten Wegen in der Auslösung pro-apoptotischer Prozesse und Signalkaskaden, gefolgt vom Zelltod (Tezel 2006; Kumar et al. 2007; Li et al. 2008). Die Auswirkung einer veränderten Superoxid-Dismutase-Quantität auf retinale Zellen ist in Anbetracht dieser Vorgänge leicht zu deuten. So resultiert die hier bei Glaukompatienten detektierte und mit zwei weiteren tierexperimentellen Studien in Übereinstimmung stehende Minderung dieses Proteins mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer geringeren Inaktivierung freier Radikale und damit in einer dysfunktionalen Apoptose-Inhibition (Moreno et al. 2004; Miyara et al. 2008). Die beobachteten Veränderungen der Proteinkonzentration von Peroxiredoxin-2 in den Retinae von Glaukompatienten sind in demselben Licht zu betrachten. So übt auch dieses Protein eine vornehmlich anti-oxidative und damit eine anti-apoptotische Funktion aus (Radyuk et al. 2009). Mit Prozessen der Glaukopathogenese wurde dieses Protein bislang nicht in Verbindung gebracht, es zeigte sich aber in einer tierexperimentellen Studie, dass eine Behandlung mit TNF- α zu einer Minderung der Peroxiredoxin-Konzentration in retinalen Gangleinzellen führt (Fatma et al. 2008). Da in den Retinaprobe der hier untersuchten Glaukompatienten eine erhöhte TNF- α -Konzentration nachgewiesen werden konnte (Anhang Abb. 7), scheint dies ein möglicher Erklärungsansatz für das Ausfallen einer der wichtigsten anti-oxidativen Funktionseinheiten im Rahmen der Glaukopathogenese zu sein.

Ebenfalls der Regulation apoptotischer Prozesse zuzuordnen ist das bei Glaukompatienten gemindert vorliegende Chaperon Calreticulin (CRP55, vgl. 4.2.3 Abb. 30), welches neben der intrazellulären Ca^{2+} Homeostase auch an Prozessen wie der Faltung von neu synthetisierten Proteinen beteiligt ist (Michalak et al. 2009). Hinsichtlich krankheitsassoziierter Prozesse konnte für Calreticulin eine Beteiligung an der Pathogenese verschiedener Tumorarten nachgewiesen werden, bei denen erhöhte Calreticulin-Konzentrationen in einer geringeren Streuung und einem geringeren Wachstum von Metastasen resultieren (Alur et al. 2009; Cao et al. 2009; Panaretakis et al. 2009). Im Kontext von Alterungsprozessen ist Calreticulin ebenfalls eine bedeutende Rolle zuzuschreiben, da dessen Dysfunktion in einer fehlerhaften Faltung von Proteinen und deren Akkumulation im Lumen des Endoplasmatischen Retikulum resultiert. Die Folge hiervon ist unter anderem eine gesteigerte Produktion freier Sauerstoffradikale, deren neurodestruktives Potential zuvor bereits diskutiert wurde (Mattson et al. 2006;

Yang et al. 2008a). Beim Glaukom, welches - bedingt durch seinen chronischen Verlauf und das verstärkte Auftreten im Alter - ebenfalls als eine altersbedingte Erkrankung anzusehen ist, könnten ähnliche Prozesse eine Rolle spielen. So werden auch hier Proteinmissfaltungen als Auslöser der Erkrankung diskutiert (Gould et al. 2006; Vollrath et al. 2006), die durch einen verminderten Calreticulin-Level begünstigt würden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte explorative Analyse des Retinaproteoms von Glaukompatienten im Vergleich zu organisch Gesunden erbrachte die Bestätigung von Daten vorangegangener, tierexperimenteller Studien und belegt damit deren Relevanz für das humane Glaukom. Darüber hinaus konnten auch zahlreiche neue Erkenntnisse erlangt werden, die beispielsweise eine verstärkte Expression neuroprotektiver Proteine, wie den α -Crystallinen, nachweisen - ein Vorgang, der als Antwort auf den schleichenden Verlust retinaler Ganglienzellen anzusehen ist. Andererseits betreffen die detektierten Veränderungen Proteine, denen aufgrund ihrer Funktion eher eine kausative Rolle in der Glaukopathogenese zukommt und die in zentrale pro-apoptische Prozesse involviert sind. Außerdem sind die detektierten Proteomveränderungen als ein weiterer Beleg für die bedeutende Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen der Glaukopathogenese zu interpretieren, da viele der vermehrt oder vermindert vorliegende Proteine mit deren Regulation in Verbindung stehen.

5.3 Fazit und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass die verschiedensten Akteure und Mechanismen im Rahmen der Pathogenese des primären Offenwinkelglaukoms eine Rolle spielen, die möglicherweise kausativer Natur ist. Der tatsächliche Einfluss der einzelnen Komponenten auf die neurodegenerativen Ereignisse in der Retina ist dabei jedoch nach wie vor nicht vollständig geklärt. Eine eindeutige Aussage über den Auslöser der Erkrankung kann somit zum jetzigen Zeitpunkt nicht getroffen werden.

Die veränderten Autoantikörperreaktionen belegen eine Involvierung des Immunsystems oder stellen zumindest eine messbare, epiphenomenale Reaktion auf die erkrankungsbedingten und apoptotischen Ereignisse dar. Da die betroffenen Antigene zentrale Funktionen in den neuronalen Geweben einnehmen, ist eine kausative Verbindung zur Glaukopathogenese nicht auszuschließen. Eine mögliche Auswirkung der anormalen Antikörper-Reaktivitäten könnte die Inhibierung von Prozessen sein, die

unter Stressbedingungen - wie einem erhöhten Augeninnendruck - essentiell für die Integrität des Gewebes sind.

In Zusammenhang mit der diskutierten Beteiligung des Komplementsystems am retinalen Ganglienzelltod kommt den Autoantikörpern potenziell noch eine weitere Rolle zu. Vorstellbar ist hier eine Initiierung der Komplementkaskade durch die Anlagerung von Komplementproteinen an Zell-gebundene Autoantikörper, die in der Einleitung des Zelltods mündet. Das mögliche Zusammenspiel zwischen Autoantikörpern und Komplementsystem sowie den weiteren in dieser Arbeit untersuchten Faktoren ist in Abb. 32 verdeutlicht.

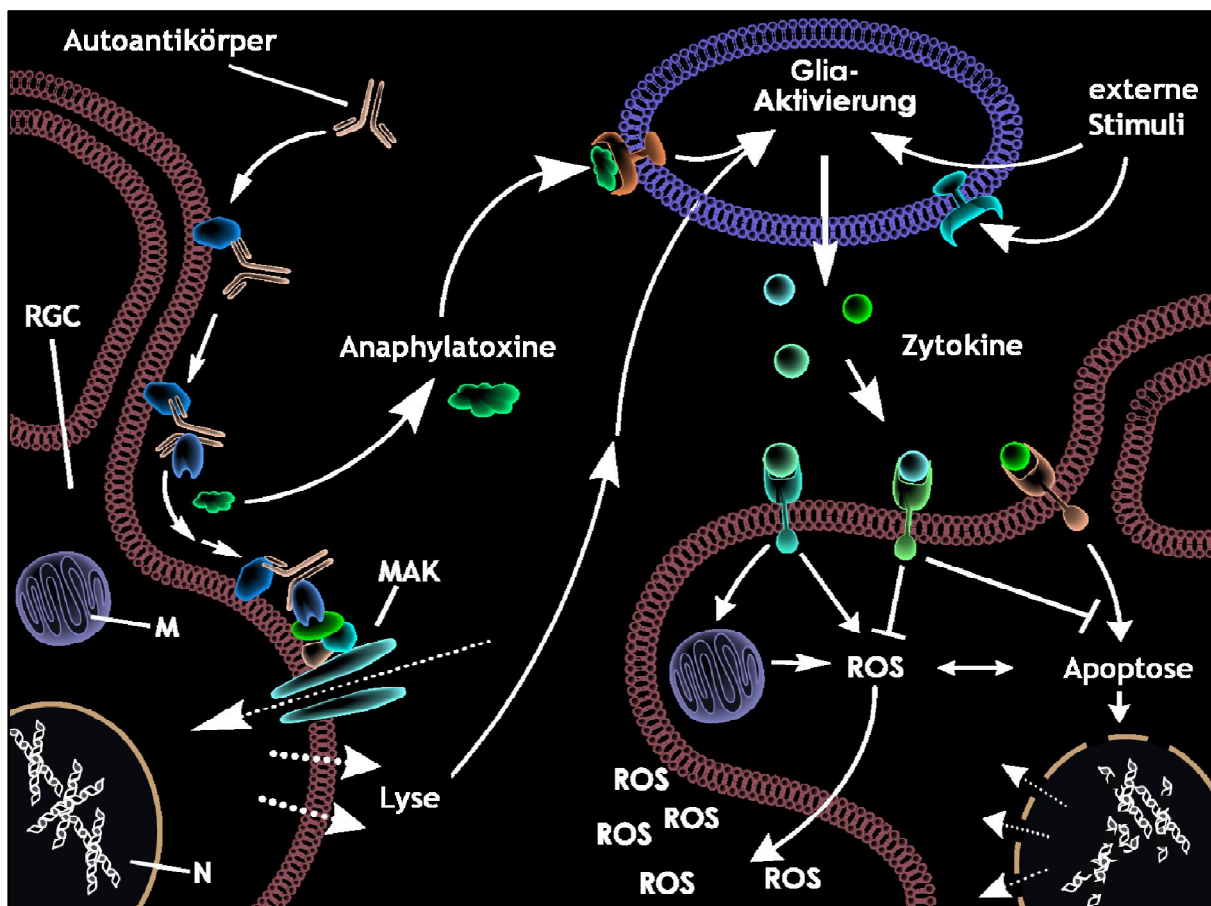


Abb. 32: Darstellung des möglichen Zusammenspiels der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren. M: Mitochondrien; MAK: Membranangriffskomplex; N: Nucleus; RGC: retinale Ganglienzelle; ROS: reaktive Sauerstoffspezies.

Die erhöhten Komplementprotein-Konzentrationen in der Retina belegen die Involvierung einer weiteren Komponente des Immunsystems, die zumindest in einigen Fällen direkt für das Absterben der Ganglienzellen verantwortlich zeichnen dürfte. Anaphylatoxine, die im Verlauf der Komplementkaskade entstehen, sowie die Zelltrümmer der durch die Komplementaktionen lysierten Zellen leiten mit hoher Wahrscheinlichkeit eine

Diskussion

Aktivierung von Gliazellen ein, die wiederum durch die Ausschüttung von Zytokinen in der Schaffung eines pro-inflammatorischen Milieus mündet. Sowohl für die verstärkte Aktivität der Gliazellen als auch für erhöhte Zytokin-Konzentrationen konnten in dieser Arbeit eindeutige Hinweise in den Retinae von Glaukompatienten gefunden werden.

Die direkte Auswirkung des Zytokin-Cocktails ist schwer zu deuten, jedoch ist davon auszugehen, dass in umliegenden Zellen unter anderem pro-apoptotische Prozesse hervorgerufen werden, die bei unangemessener Inhibierung zum Zelltod - und somit zu einer sekundären Neurodegeneration - führen. Anzeichen für eine fehlerhafte Abwehr apoptotischer Prozesse finden sich beispielsweise in der geminderten Konzentration von Proteinen, die für die Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich sind - einer der zentralen Komponenten apoptotischer Prozesse. Hieran zeigt sich, dass nicht nur äußere Einflüsse den Untergang retinaler Ganglienzellen begünstigen, sondern dass auch intrazelluläre Vorgänge zum Tragen kommen.

Welcher der verschiedenen geschilderten Faktoren kausativ an den neurodegenerativen Prozessen beteiligt ist, bleibt ungeklärt. Die Vielzahl der unterschiedlichen Faktoren untermauert jedoch die Notwendigkeit, die Ursache der Glaukomerkrankung nicht in einem einzelnen fehlgesteuerten Mechanismus zu suchen, sondern das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Das Glaukom stellt eine heterogene Gruppe von okularen Erkrankungen dar, deren Pathogenese sich durch einen langsamen, progradienten Untergang von retinalen Ganglienzellen und ihren Axonen auszeichnet.

In den letzten Jahren wurde im Kontext der Glaukompathogenese verstärkt die Beteiligung autoreaktiver Antikörper diskutiert. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in dem Vergleich solcher Autoantikörper-Reaktionen in den Serum- und Kammerwasserproben einzelner Glaukompatienten. Hierdurch sollte geklärt werden, inwieweit die Immunreaktivitäten dieser beiden Körperflüssigkeiten miteinander übereinstimmen und ob sich Hinweise auf eine lokale Antikörperproduktion im immunprivilegierten Auge finden lassen. Mittels eines etablierten Protein-Microarray-Verfahrens wurden die Immunreaktionen gegen 40 verschiedene Antigene, wie z.B. Hitzeschock-Proteine oder neuronale Strukturproteine, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die detektierten Autoantikörper-Reaktionen gegen mehr als 80% der untersuchten Antigene in beiden Körperflüssigkeiten miteinander übereinstimmen. Verdeutlicht wird hierdurch, dass die Antikörper-basierenden immunologischen Vorgänge im Auge bzw. Kammerwasser, trotz dessen Abschottung vom Blutkreislauf durch die Blut-Retina-Schranke, denen des Serums stark ähneln. Nur vereinzelt lassen sich Hinweise auf eine lokale Antikörperproduktion im Auge finden, wodurch die Spezifität der detektierten Serumantikörper-Reaktionen für die Glaukomerkrankung belegt wird.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Detektion möglicher veränderter Proteinexpressionen in den Retinae von Glaukompatienten, die potentiell zu den neurodegenerativen Prozessen der Glaukompathogenese beitragen. Um die Analyse spezifischer Proteinexpressionen zu ermöglichen, wurde das Verfahren des Antikörper-Microarrays etabliert und auf die Fragestellung angewendet. Untersucht wurden hierbei vor allem die Abundanzen von Komplementproteinen, Zytokinen und Hitzeschock-Proteinen, aber auch die von verschiedenen neuronalen Strukturproteinen. Als Probenmaterial dienten Retinaprobe von Glaukompatienten, die vergleichend denen von gesunden Probanden gegenübergestellt wurden. Zusätzlich wurden auch die Proteinmengen in Serumproben von Glaukompatienten und Gesunden untersucht. Die Analyse erbrachte die Erkenntnis, dass neben der verstärkten Expression von Komplementproteinen in der Retina (z.B. C3, C6) auch im Serum der Glaukompatienten eine erhöhte Konzentration dieser Proteine vorliegt, die im Rahmen der

Zusammenfassung

Glaukomerkrankung möglicherweise ebenfalls eine Rolle spielen. Ähnliches konnte für verschiedene Zytokine, wie z.B. TNF- α , IFN- γ oder IL1- β beobachtet werden, die in den untersuchten Retinae von Glaukomprobanden, teilweise auch in den Serumproben der Patienten, in verstärktem Maße detektiert werden konnten. Die erhöhte Produktion von Zytokinen in der Retina ist wahrscheinlich auf die Aktivierung von Gliazellen zurückzuführen, wofür in dieser Arbeit zahlreiche Hinweise gefunden werden konnten. Deren Aktivierung wird vermutlich durch apoptotische Prozesse in der Retina ausgelöst, eventuell aber auch durch eine erfolgte Komplementaktivierung. Darüber hinaus konnten mittels eines massenspektrometrischen Verfahrens weitere Expressionsunterschiede verschiedener retinaler Proteine bei Glaukopatienten festgestellt werden, welche die neurodegenerativen Prozesse begünstigen. So liegen bei Glaukopatienten z.B. verschiedene Proteine der ROS-Bewältigung in geminderten Mengen vor, wie die Superoxid Dismutase und Peroxiredoxin-2, was wiederum zu einer unzureichenden Beseitigung der Radikale führt.

Inwieweit die untersuchten Faktoren kausativ an den neurodegenerativen Prozessen beteiligt sind, bleibt ungeklärt, jedoch untermauert deren Vielzahl die Notwendigkeit, die Ursache der Glaukomerkrankung als komplexe Interaktion und Wechselwirkung verschiedener Komponenten zu betrachten und nicht als einen einzelnen fehlgesteuerten Mechanismus.

7 Literaturverzeichnis

- Abcouwer, S. F., S. Shanmugam, P. F. Gomez, S. Shushanov, A. J. Barber, K. F. Lanoue, P. G. Quinn, M. Kester and T. W. Gardner** (2008). "Effect of IL-1beta on survival and energy metabolism of R28 and RGC-5 retinal neurons." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(12): 5581-5592.
- Abd-el-Basset, E. M., I. Ahmed and S. Fedoroff** (1991). "Actin and actin-binding proteins in differentiating astroglia in tissue culture." *J Neurosci Res*, 30(1): 1-17.
- Adamus, G.** (2003). "Autoantibody-induced apoptosis as a possible mechanism of autoimmune retinopathy." *Autoimmun Rev*, 2(2): 63-68.
- Alavi, A., N. Arden, T. D. Spector and J. S. Axford** (2000). "Immunoglobulin G glycosylation and clinical outcome in rheumatoid arthritis during pregnancy." *J Rheumatol*, 27(6): 1379-1385.
- Alavi, A. and J. S. Axford** (2008a). "Glyco-biomarkers: potential determinants of cellular physiology and pathology." *Dis Markers*, 25(4-5): 193-205.
- Alavi, A. and J. S. Axford** (2008b). "Sweet and sour: the impact of sugars on disease." *Rheumatology (Oxford)*, 47(6): 760-770.
- Alur, M., M. M. Nguyen, S. E. Eggener, F. Jiang, S. S. Dadras, J. Stern, S. Kimm, K. Roehl, J. Kozlowski, M. Pins, M. Michalak, R. Dhir and Z. Wang** (2009). "Suppressive roles of calreticulin in prostate cancer growth and metastasis." *Am J Pathol*, 175(2): 882-890.
- Alward, W. L.** (2003). "Biomedicine. A new angle on ocular development." *Science*, 299(5612): 1527-1528.
- Amantea, D., G. Nappi, G. Bernardi, G. Bagetta and M. T. Corasaniti** (2009). "Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators." *FEBS J*, 276(1): 13-26.
- Andersen, J. K.** (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" *Nat Med*, 10 Suppl: S18-25.
- Anderson, N. L. and N. G. Anderson** (2002). "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects." *Mol Cell Proteomics*, 1(11): 845-867.
- Andley, U. P.** (2009). "Effects of alpha-crystallin on lens cell function and cataract pathology." *Curr Mol Med*, 9(7): 887-892.
- Angenendt, P.** (2005). "Progress in protein and antibody microarray technology." *Drug Discov Today*, 10(7): 503-511.
- Angenendt, P. and J. Glokler** (2004). "Evaluation of antibodies and microarray coatings as a prerequisite for the generation of optimized antibody microarrays." *Methods Mol Biol*, 264: 123-134.
- Angenendt, P., J. Glokler, D. Murphy, H. Lehrach and D. J. Cahill** (2002). "Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials." *Anal Biochem*, 309(2): 253-260.
- Angenendt, P., J. Glokler, J. Sobek, H. Lehrach and D. J. Cahill** (2003). "Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications." *J Chromatogr A*, 1009(1-2): 97-104.
- Arend, O., N. Plange, W. E. Sponsel and A. Remky** (2004). "Pathogenetic aspects of the glaucomatous optic neuropathy: fluorescein angiographic findings in patients with primary open angle glaucoma." *Brain Res Bull*, 62(6): 517-524.

- Arlaud, G. J., C. Gaboriaud, N. M. Thielens, M. Budayova-Spano, V. Rossi and J. C. Fontecilla-Camps** (2002). "Structural biology of the C1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity." *Mol Immunol*, 39(7-8): 383-394.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin and G. Sherlock** (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." *Nat Genet*, 25(1): 25-29.
- Aslan, M., A. Cort and I. Yucel** (2008). "Oxidative and nitrative stress markers in glaucoma." *Free Radic Biol Med*, 45(4): 367-376.
- Axford, J. S., G. Cunnane, O. Fitzgerald, J. M. Bland, B. Bresnihan and E. R. Frears** (2003). "Rheumatic disease differentiation using immunoglobulin G sugar printing by high density electrophoresis." *J Rheumatol*, 30(12): 2540-2546.
- Bacarese-Hamilton, T., L. Mezzasoma, C. Ingham, A. Ardizzoni, R. Rossi, F. Bistoni and A. Crisanti** (2002). "Detection of allergen-specific IgE on microarrays by use of signal amplification techniques." *Clin Chem*, 48(8): 1367-1370.
- Baczek, T.** (2004). "Fractionation of peptides in proteomics with the use of pl-based approach and ZipTip pipette tips." *J Pharm Biomed Anal*, 34(5): 851-860.
- Beck, S., N. Boehm, M. Schlich, K. Pfirrmann, N. Pfeiffer and F. H. Grus** (2010). "Comparison of Anti-Ocular IgG and IgM Autoantibody Patterns in Glaucoma Patients." ARVO, Fort Lauderdale, USA., P 4817/A49
- Becker, H., H. Pavenstaedt and P. Willeke** (2009). "Emerging Treatment Strategies and Potential Therapeutic Targets in Primary Sjogren's Syndrome." *Inflamm Allergy Drug Targets*.
- Belluco, C., E. Mammano, E. Petricoin, L. Prevedello, V. Calvert, L. Liotta, D. Nitti and M. Lise** (2005). "Kinase substrate protein microarray analysis of human colon cancer and hepatic metastasis." *Clin Chim Acta*, 357(2): 180-183.
- Benndorf, R., K. Hayess, S. Ryazantsev, M. Wieske, J. Behlke and G. Lutsch** (1994). "Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity." *J Biol Chem*, 269(32): 20780-20784.
- Berden, J. H., R. M. Termaat, K. Brinkman, R. J. Smeenk, A. J. Swaak, P. Faaber, K. Assmann, L. P. van de Heuvel and J. H. Veerkamp** (1989). "Binding of anti-DNA antibodies to glomerular heparan sulfate: a new clue for the pathogenesis of SLE nephritis?" *Nephrologie*, 10(3): 127-132.
- Berlau, J., P. Lorenz, R. Beck, J. Makovitzky, U. Schlotzer-Schrehardt, H. J. Thiesen and R. Guthoff** (2001). "Analysis of aqueous humour proteins of eyes with and without pseudoexfoliation syndrome." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 239(10): 743-746.
- Bhakdi, S. and J. Trantum-Jensen** (1991). "Complement lysis: a hole is a hole." *Immunol Today*, 12(9): 318-320; discussion 321.
- Biemann, K.** (1990). "Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation." *Methods Enzymol*, 193: 455-479.
- Block, M. L., L. Zecca and J. S. Hong** (2007). "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms." *Nat Rev Neurosci*, 8(1): 57-69.
- Boeckmann, B., A. Bairoch, R. Apweiler, M. C. Blatter, A. Estreicher, E. Gasteiger, M. J. Martin, K. Michoud, C. O'Donovan, I. Phan, S. Pilbout and M. Schneider** (2003). "The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003." *Nucleic Acids Res*, 31(1): 365-370.
- Bohm, I.** (2003). "Disruption of the cytoskeleton after apoptosis induction with autoantibodies." *Autoimmunity*, 36(3): 183-189.

- Bonne, C., A. Muller and M. Villain** (1998). "Free radicals in retinal ischemia." *Gen Pharmacol*, 30(3): 275-280.
- Bootsma, H., P. E. Spronk, E. J. Hummel, G. de Boer, E. J. ter Borg, P. C. Limburg and C. G. Kallenberg** (1996). "Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies." *Scand J Rheumatol*, 25(6): 352-359.
- Bouwman, K., J. Qiu, H. Zhou, M. Schotanus, L. A. Mangold, R. Vogt, E. Erlandson, J. Trenkle, A. W. Partin, D. Misek, G. S. Omenn, B. B. Haab and S. Hanash** (2003). "Microarrays of tumor cell derived proteins uncover a distinct pattern of prostate cancer serum immunoreactivity." *Proteomics*, 3(11): 2200-2207.
- Burnette, W. N.** (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem*, 112(2): 195-203.
- Cahill, D. J.** (2001). "Protein and antibody arrays and their medical applications." *J Immunol Methods*, 250(1-2): 81-91.
- Campbell, N. A. and J. B. Reece** (1997). "Biologie 1." Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Canellada, A., T. Gentile, J. Dokmetjian and R. A. Margni** (2002). "Occurrence, properties, and function of asymmetric IgG molecules isolated from non-immune sera." *Immunol Invest*, 31(2): 107-120.
- Cao, C., Y. Han, Y. Ren and Y. Wang** (2009). "Mitoxantrone-mediated apoptotic B16-F1 cells induce specific anti-tumor immune response." *Cell Mol Immunol*, 6(6): 469-475.
- Carter-Dawson, L., Y. Zhang, R. S. Harwerth, R. Rojas, P. Dash, X. C. Zhao, E. WoldeMussie, G. Ruiz, A. Chuang, W. P. Dubinsky and J. B. Redell** (2010). "Elevated albumin in retinas of monkeys with experimental glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(2): 952-959.
- Casalini, P., E. Luison, S. Menard, M. I. Colnaghi, G. Paganelli and S. Canevari** (1997). "Tumor pretargeting: role of avidin/streptavidin on monoclonal antibody internalization." *J Nucl Med*, 38(9): 1378-1381.
- Castegna, A., M. Aksenov, V. Thongboonkerd, J. B. Klein, W. M. Pierce, R. Booze, W. R. Markesbery and D. A. Butterfield** (2002). "Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71." *J Neurochem*, 82(6): 1524-1532.
- Ceribelli, A., L. Andreoli, I. Cavazzana, F. Franceschini, A. Radice, L. Rimoldi, R. A. Sinico, M. Carlsson, J. Wieslander and A. Tincani** (2009). "Complement cascade in systemic lupus erythematosus: analyses of the three activation pathways." *Ann N Y Acad Sci*, 1173: 427-434.
- Chan, S. M., J. Ermann, L. Su, C. G. Fathman and P. J. Utz** (2004). "Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways." *Nat Med*, 10(12): 1390-1396.
- Charboneau, L., H. Tory, T. Chen, M. Winters, E. F. Petricoin, 3rd, L. A. Liotta and C. P. Paweletz** (2002). "Utility of reverse phase protein arrays: applications to signalling pathways and human body arrays." *Brief Funct Genomic Proteomic*, 1(3): 305-315.
- Chadler, C., M. P. Vawter, W. J. Freed and K. G. Becker** (2003). "Analysis of microarray data using Z score transformation." *J Mol Diagn*, 5(2): 73-81.
- Chen, H. and A. J. Weber** (2002). "Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Muller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor." *Glia*, 38(2): 115-125.
- Chui, D., G. Sellakumar, R. Green, M. Sutton-Smith, T. McQuistan, K. Marek, H. Morris, A. Dell and J. Marth** (2001). "Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(3): 1142-1147.

- Chung, H. S., A. Harris, D. W. Evans, L. Kagemann, H. J. Garzosi and B. Martin** (1999). "Vascular aspects in the pathophysiology of glaucomatous optic neuropathy." *Surv Ophthalmol*, 43 Suppl 1: S43-50.
- Cojocar, I. M., M. Cojocar and C. Musuroi** (2000). "Study of anti-striational and anti-thyroid antibodies in patients with myasthenia gravis." *Rom J Intern Med*, 38-39: 111-120.
- Davies, D. R. and G. H. Cohen** (1996). "Interactions of protein antigens with antibodies." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1): 7-12.
- Davies, D. R., S. Sheriff and E. A. Padlan** (1988). "Antibody-antigen complexes." *J Biol Chem*, 263(22): 10541-10544.
- De Bock, M., D. de Seny, M. A. Meuwis, J. P. Chapelle, E. Louis, M. Malaise, M. P. Merville and M. Fillet** (2010). "Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS." *J Biomed Biotechnol*, 2010: 906082.
- de Hoffmann, E. and V. Stroobant** (2007). "Mass spectrometry: principles and applications." John Wiley & Sons
- DeFranco, A. L.** (1993). "Structure and function of the B cell antigen receptor." *Annu Rev Cell Biol*, 9: 377-410.
- Deinhofer, K., H. Sevcik, N. Balic, C. Harwanegg, R. Hiller, H. Rumpold, M. W. Mueller and S. Spitzauer** (2004). "Microarrayed allergens for IgE profiling." *Methods*, 32(3): 249-254.
- Delehanty, J. B. and F. S. Ligler** (2002). "A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria." *Anal Chem*, 74(21): 5681-5687.
- DeSouza, L., G. Diehl, M. J. Rodrigues, J. Guo, A. D. Romaschin, T. J. Colgan and K. W. Siu** (2005). "Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cI-CAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry." *J Proteome Res*, 4(2): 377-386.
- Diem, R., R. Meyer, J. H. Weishaupt and M. Bahr** (2001). "Reduction of potassium currents and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT phosphorylation by tumor necrosis factor-(alpha) rescues axotomized retinal ganglion cells from retrograde cell death in vivo." *J Neurosci*, 21(6): 2058-2066.
- DiLoreto, D. A., Jr., M. R. Martzen, C. del Cerro, P. D. Coleman and M. del Cerro** (1995). "Muller cell changes precede photoreceptor cell degeneration in the age-related retinal degeneration of the Fischer 344 rat." *Brain Res*, 698(1-2): 1-14.
- Dobrowolski, Z., H. Osinska, M. Mossakowska and B. Barylko** (1986). "Ca²⁺-calmodulin-dependent polymerization of actin by myelin basic protein." *Eur J Cell Biol*, 42(1): 17-26.
- Doyle, H. A. and M. J. Mamula** (2001). "Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity." *Trends Immunol*, 22(8): 443-449.
- Eckel-Passow, J. E., A. Hoering, T. M. Therneau and I. Ghobrial** (2005). "Experimental design and analysis of antibody microarrays: applying methods from cDNA arrays." *Cancer Res*, 65(8): 2985-2989.
- Elhanany, E., A. Ordentlich, O. Dgany, D. Kaplan, Y. Segall, R. Barak, B. Velan and A. Shafferman** (2001). "Resolving pathways of interaction of covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts." *Chem Res Toxicol*, 14(7): 912-918.
- Elkon, K. B. and L. Culhane** (1984). "Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus." *J Immunol*, 132(5): 2350-2356.
- Espina, V., A. I. Mehta, M. E. Winters, V. Calvert, J. Wulfkuhle, E. F. Petricoin, 3rd and L. A. Liotta** (2003). "Protein microarrays: molecular profiling technologies for clinical specimens." *Proteomics*, 3(11): 2091-2100.

- Faden, A. I.** (1993). "Experimental neurobiology of central nervous system trauma." *Crit Rev Neurobiol*, 7(3-4): 175-186.
- Fatma, N., E. Kubo, M. Sen, N. Agarwal, W. B. Thoreson, C. B. Camras and D. P. Singh** (2008). "Peroxiredoxin 6 delivery attenuates TNF-alpha-and glutamate-induced retinal ganglion cell death by limiting ROS levels and maintaining Ca²⁺ homeostasis." *Brain Res*, 1233: 63-78.
- Fatma, N., E. Kubo, C. B. Toris, W. D. Stamer, C. B. Camras and D. P. Singh** (2009). "PRDX6 attenuates oxidative stress- and TGFbeta-induced abnormalities of human trabecular meshwork cells." *Free Radic Res*, 43(9): 783-795.
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse** (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science*, 246(4926): 64-71.
- Finkel, T.** (2001). "Reactive oxygen species and signal transduction." *IUBMB Life*, 52(1-2): 3-6.
- Flammer, J. and M. Mozaffarieh** (2007). "What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy?" *Surv Ophthalmol*, 52 Suppl 2: S162-173.
- Flammer, J., S. Orgul, V. P. Costa, N. Orzalesi, G. K. Kriegelstein, L. M. Serra, J. P. Renard and E. Stefansson** (2002). "The impact of ocular blood flow in glaucoma." *Prog Retin Eye Res*, 21(4): 359-393.
- Forrester, S., J. Qiu, L. Mangold, A. Partin, D. Misek, B. Phinney, D. Whitten, P. Andrews, E. Diamandis, G. S. Omenn, S. Hanash and B. B. Haab** (2007). "An experimental strategy for quantitative analysis of the humoral immune response to prostate cancer antigens using natural protein microarrays." *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 1(5): 494-505.
- Galassi, F., G. Renieri, A. Sodi, F. Ucci, L. Vannozzi and E. Masini** (2004). "Nitric oxide proxies and ocular perfusion pressure in primary open angle glaucoma." *Br J Ophthalmol*, 88(6): 757-760.
- Geen, J., R. C. Howells, M. Ludgate, D. A. Hullin and S. I. Hogg** (2004). "The prevalence of anti-acetylcholinesterase antibodies in autoimmune disease." *Autoimmunity*, 37(8): 579-585.
- Glish, G. L. and R. W. Vachet** (2003). "The basics of mass spectrometry in the twenty-first century." *Nat Rev Drug Discov*, 2(2): 140-150.
- Gordon, J.** (2008). "Protein microarrays: before the elephant got in the room." *Clin Chem*, 54(12): 2087-2088.
- Gordon, J. and M. Rosenthal** (1985). "A multidot immunobinding assay for autoimmune testing: evaluation for the diagnosis and management of connective tissue diseases." *J Rheumatol*, 12(2): 257-264.
- Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Csordas, J. J. Diaz and J. J. Madjar** (1997). "Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins." *Electrophoresis*, 18(3-4): 328-337.
- Gorg, A., W. Postel, S. Gunther, J. Weser, J. R. Strahler, S. M. Hanash, L. Somerlot and R. Kuick** (1988). "Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes concentrations." *Electrophoresis*, 9(1): 37-46.
- Gould, D. B., M. Reedy, L. A. Wilson, R. S. Smith, R. L. Johnson and S. W. John** (2006). "Mutant myocilin nonsecretion in vivo is not sufficient to cause glaucoma." *Mol Cell Biol*, 26(22): 8427-8436.
- Grehn, F.** (2008). "Augenheilkunde." Springer-Verlag GmbH 30. Auflage.
- Grieshaber, M. C. and J. Flammer** (2007). "Does the blood-brain barrier play a role in Glaucoma?" *Surv Ophthalmol*, 52 Suppl 2: S115-121.
- Groathouse, N. A., A. Amin, M. A. Marques, J. S. Spencer, R. Gelber, D. L. Knudson, J. T. Belisle, P. J. Brennan and R. A. Slayden** (2006). "Use of protein microarrays to define the humoral immune response in leprosy patients and identification of disease-state-specific antigenic profiles." *Infect Immun*, 74(11): 6458-6466.

- Grub, M. and J. Mielke** (2004). "[Aqueous humor dynamics]." *Ophthalmologe*, 101(4): 357-365.
- Grus, F. and D. Sun** (2008a). "Immunological mechanisms in glaucoma." *Semin Immunopathol*, 30(2): 121-126.
- Grus, F. H., A. J. Augustin, N. G. Evangelou and K. Toth-Sagi** (1998a). "Analysis of tear-protein patterns as a diagnostic tool for the detection of dry eyes." *Eur J Ophthalmol*, 8(2): 90-97.
- Grus, F. H., A. J. Augustin and K. Toth-Sagi** (1998b). "Diagnostic classification of autoantibody repertoires in endocrine ophthalmopathy using an artificial neural network." *Ocul Immunol Inflamm*, 6(1): 43-50.
- Grus, F. H., S. C. Joachim, K. Bruns, K. J. Lackner, N. Pfeiffer and M. B. Wax** (2006). "Serum Autoantibodies to {alpha}-Fodrin Are Present in Glaucoma Patients from Germany and the United States." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(3): 968-976.
- Grus, F. H., S. C. Joachim, E. M. Hoffmann and N. Pfeiffer** (2004). "Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma." *Mol Vis*, 10: 132-137.
- Grus, F. H., S. C. Joachim and N. Pfeiffer** (2003). "Analysis of complex autoantibody repertoires by surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry." *Proteomics*, 3(6): 957-961.
- Grus, F. H., S. C. Joachim, D. Wuenschig, J. Rieck and N. Pfeiffer** (2008b). "Autoimmunity and glaucoma." *J Glaucoma*, 17(1): 79-84.
- Grus, F. H., V. N. Podust, K. Bruns, K. Lackner, S. Fu, E. A. Dalmaso, A. Wirthlin and N. Pfeiffer** (2005). "SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(3): 863-876.
- Grus, F. H. and C. W. Zimmermann** (1997). "Identification and classification of autoantibody repertoires (Western blots) with a pattern recognition algorithm by an artificial neural network." *Electrophoresis*, 18(7): 1120-1125.
- Guilleaume, B., A. Bunes, C. Schmidt, F. Klimek, G. Moldenhauer, W. Huber, D. Arlt, U. Korf, S. Wiemann and A. Poustka** (2005). "Systematic comparison of surface coatings for protein microarrays." *Proteomics*, 5(18): 4705-4712.
- Guo, L. and M. F. Cordeiro** (2008). "Assessment of neuroprotection in the retina with DARC." *Prog Brain Res*, 173: 437-450.
- Haab, B. B.** (2001). "Advances in protein microarray technology for protein expression and interaction profiling." *Curr Opin Drug Discov Devel*, 4(1): 116-123.
- Haab, B. B., M. J. Dunham and P. O. Brown** (2001). "Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions." *Genome Biol*, 2(2): RESEARCH0004.
- Haab, B. B. and H. Zhou** (2004). "Multiplexed protein analysis using spotted antibody microarrays." *Methods Mol Biol*, 264: 33-45.
- Hale, J. E., J. P. Butler, V. Gelfanova, J. S. You and M. D. Knierman** (2004). "A simplified procedure for the reduction and alkylation of cysteine residues in proteins prior to proteolytic digestion and mass spectral analysis." *Anal Biochem*, 333(1): 174-181.
- Hamelinck, D., H. Zhou, L. Li, C. Verweij, D. Dillon, Z. Feng, J. Costa and B. B. Haab** (2005). "Optimized normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling." *Mol Cell Proteomics*, 4(6): 773-784.
- Haneji, N., T. Nakamura, K. Takio, K. Yanagi, H. Higashiyama, I. Saito, S. Noji, H. Sugino and Y. Hayashi** (1997). "Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome." *Science*, 276(5312): 604-607.
- Harrison, P. M., A. Kumar, N. Lang, M. Snyder and M. Gerstein** (2002). "A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it." *Nucleic Acids Res*, 30(5): 1083-1090.

- Harwanegg, C. and R. Hiller** (2006). "Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development." *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 38(7): 232-236.
- Harwanegg, C., S. Laffer, R. Hiller, M. W. Mueller, D. Kraft, S. Spitzauer and R. Valenta** (2003). "Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy." *Clin Exp Allergy*, 33(1): 7-13.
- Hauben, E., E. Agranov, A. Gothilf, U. Nevo, A. Cohen, I. Smirnov, L. Steinman and M. Schwartz** (2001). "Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease." *J Clin Invest*, 108(4): 591-599.
- Hauben, E., O. Butovsky, U. Nevo, E. Yoles, G. Moalem, E. Agranov, F. Mor, R. Leibowitz-Amit, E. Pevsner, S. Akselrod, M. Neeman, I. R. Cohen and M. Schwartz** (2000). "Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion." *J Neurosci*, 20(17): 6421-6430.
- Hawkes, R., E. Niday and J. Gordon** (1982). "A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies." *Anal Biochem*, 119(1): 142-147.
- Hayes, J. D. and R. C. Strange** (1995). "Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress." *Free Radic Res*, 22(3): 193-207.
- Hazin, R., A. M. Hendrick and M. Y. Kahook** (2009). "Primary open-angle glaucoma: diagnostic approaches and management." *J Natl Med Assoc*, 101(1): 46-50.
- Hiller, R., S. Laffer, C. Harwanegg, M. Huber, W. M. Schmidt, A. Twardosz, B. Barletta, W. M. Becker, K. Blaser, H. Breiteneder, M. Chapman, R. Cramer, M. Duchene, F. Ferreira, H. Fiebig, K. Hoffmann-Sommergruber, T. P. King, T. Kleber-Janke, V. P. Kurup, S. B. Lehrer, J. Lidholm, U. Muller, C. Pini, G. Reese, O. Scheiner, A. Scheynius, H. D. Shen, S. Spitzauer, R. Suck, I. Swoboda, W. Thomas, R. Tinghino, M. Van Hage-Hamsten, T. Virtanen, D. Kraft, M. W. Muller and R. Valenta** (2002). "Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment." *FASEB J*, 16(3): 414-416.
- Hirano, T., T. Matsuda and K. Nakajima** (1994). "Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily." *Stem Cells*, 12(3): 262-277.
- Hober, S. and M. Uhlen** (2008). "Human protein atlas and the use of microarray technologies." *Curr Opin Biotechnol*, 19(1): 30-35.
- Hoi, A. Y., M. N. Iskander and E. F. Morand** (2007). "Macrophage migration inhibitory factor: a therapeutic target across inflammatory diseases." *Inflamm Allergy Drug Targets*, 6(3): 183-190.
- Horn, S., A. Lueking, D. Murphy, A. Staudt, C. Gutjahr, K. Schulte, A. Konig, M. Landsberger, H. Lehrach, S. B. Felix and D. J. Cahill** (2006). "Profiling humoral autoimmune repertoire of dilated cardiomyopathy (DCM) patients and development of a disease-associated protein chip." *Proteomics*, 6(2): 605-613.
- Hortin, G. L.** (2006). "The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome." *Clin Chem*, 52(7): 1223-1237.
- Hortin, G. L. and D. Sviridov** (2009). "The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome." *J Proteomics*.
- Hovda, D. A., A. Yoshino, T. Kawamata, Y. Katayama and D. P. Becker** (1991). "Diffuse prolonged depression of cerebral oxidative metabolism following concussive brain injury in the rat: a cytochrome oxidase histochemistry study." *Brain Res*, 567(1): 1-10.
- Hu, Q., R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman and R. Graham Cooks** (2005). "The Orbitrap: a new mass spectrometer." *J Mass Spectrom*, 40(4): 430-443.
- Huang, P., S. S. Zhang and C. Zhang** (2009). "The two sides of cytokine signaling and glaucomatous optic neuropathy." *J Ocul Biol Dis Infor*, 2(2): 78-83.

- Hubner, N. C., S. Ren and M. Mann** (2008). "Peptide separation with immobilized pl strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis." *Proteomics*, 8(23-24): 4862-4872.
- Hudson, M. E., I. Pozdnyakova, K. Haines, G. Mor and M. Snyder** (2007). "Identification of differentially expressed proteins in ovarian cancer using high-density protein microarrays." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(44): 17494-17499.
- Hueber, W., B. A. Kidd, B. H. Tomooka, B. J. Lee, B. Bruce, J. F. Fries, G. Sonderstrup, P. Monach, J. W. Drijfhout, W. J. van Venrooij, P. J. Utz, M. C. Genovese and W. H. Robinson** (2005). "Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum*, 52(9): 2645-2655.
- Hultschig, C., J. Kreutzberger, H. Seitz, Z. Konthur, K. Bussow and H. Lehrach** (2006). "Recent advances of protein microarrays." *Curr Opin Chem Biol*, 10(1): 4-10.
- Huot, J., F. Houle, D. R. Spitz and J. Landry** (1996). "HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress." *Cancer Res*, 56(2): 273-279.
- Hutchens, T. W. and T.-T. Yip** (1993). "New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules." *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 7(7): 576-580.
- Ito, D., Y. Imai, K. Ohsawa, K. Nakajima, Y. Fukuuchi and S. Kohsaka** (1998). "Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1." *Brain Res Mol Brain Res*, 57(1): 1-9.
- Ito, D., K. Tanaka, S. Suzuki, T. Dembo and Y. Fukuuchi** (2001). "Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain." *Stroke*, 32(5): 1208-1215.
- James, P., M. Quadroni, E. Carafoli and G. Gonnet** (1993). "Protein identification by mass profile fingerprinting." *Biochem Biophys Res Commun*, 195(1): 58-64.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport and M. Slomchik** (2002). "Immunologie." Spektrum akademischer Verlag, 5. Auflage.
- Jensen, L. J., M. Kuhn, M. Stark, S. Chaffron, C. Creevey, J. Muller, T. Doerks, P. Julien, A. Roth, M. Simonovic, P. Bork and C. von Mering** (2009). "STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms." *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue): D412-416.
- Joachim, S. C., K. Bruns, K. J. Lackner, N. Pfeiffer and F. H. Grus** (2007a). "Analysis of IgG antibody patterns against retinal antigens and antibodies to alpha-crystallin, GFAP, and alpha-enolase in sera of patients with "wet" age-related macular degeneration." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245(5): 619-626.
- Joachim, S. C., K. Bruns, K. J. Lackner, N. Pfeiffer and F. H. Grus** (2007b). "Antibodies to alpha B-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal tension glaucoma and IgG antibody patterns against retinal antigen in aqueous humor." *Curr Eye Res*, 32(6): 501-509.
- Joachim, S. C., F. H. Grus, D. Kraft, K. White-Farrar, G. Barnes, M. Barbeck, S. Ghanaati, S. Cao, B. Li and M. B. Wax** (2009). "Complex antibody profile changes in an experimental autoimmune glaucoma animal model." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(10): 4734-4742.
- Joachim, S. C., F. H. Grus and N. Pfeiffer** (2003). "Analysis of autoantibody repertoires in sera of patients with glaucoma." *Eur J Ophthalmol*, 13(9-10): 752-758.
- Joachim, S. C., N. Pfeiffer and F. H. Grus** (2005). "Autoantibodies in patients with glaucoma: a comparison of IgG serum antibodies against retinal, optic nerve, and optic nerve head antigens." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 243(8): 817-823.

- Joachim, S. C., J. Reichelt, S. Berneiser, N. Pfeiffer and F. H. Grus (2008a).** "Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246(4): 573-580.
- Joachim, S. C., J. Reichelt, S. Berneiser, N. Pfeiffer and F. H. Grus (2008b).** "Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246(4): 573-580.
- Joachim, S. C., D. Wuenschig, N. Pfeiffer and F. H. Grus (2007c).** "IgG antibody patterns in aqueous humor of patients with primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma." *Mol Vis*, 13: 1573-1579.
- Jones, R. B., A. Gordus, J. A. Krall and G. MacBeath (2006).** "A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays." *Nature*, 439(7073): 168-174.
- Joos, T. O., M. Schrenk, P. Hopfl, K. Kroger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schorner, M. Durr, K. Herick, S. Rupp, K. Sohn and H. Hammerle (2000).** "A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics." *Electrophoresis*, 21(13): 2641-2650.
- Kaburaki, J., M. Kuwana, M. Yamamoto, S. Kawai and Y. Ikeda (1997).** "Clinical significance of anti-annexin V antibodies in patients with systemic lupus erythematosus." *Am J Hematol*, 54(3): 209-213.
- Kaburaki, J., M. Kuwana, M. Yamamoto, S. Kawai, E. Matsuura and Y. Ikeda (1995).** "Clinical significance of phospholipid-dependent anti-beta 2-glycoprotein I (beta 2-GPI) antibodies in systemic lupus erythematosus." *Lupus*, 4(6): 472-476.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988).** "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." *Anal Chem*, 60(20): 2299-2301.
- Kase, S., J. G. Parikh and N. A. Rao (2009).** "Expression of alpha-crystallin in retinoblastoma." *Arch Ophthalmol*, 127(2): 187-192.
- Kattah, M. G., P. J. Utz and I. Balboni (2008).** "Protein microarrays address the elephant in the room." *Clin Chem*, 54(6): 937-939.
- Kaur, C., W. S. Foulds and E. A. Ling (2008).** "Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage." *Clin Ophthalmol*, 2(4): 879-889.
- Kelley, M. J., A. Y. Rose, K. Song, Y. Chen, J. M. Bradley, D. Rookhuizen and T. S. Acott (2007).** "Synergism of TNF and IL-1 in the induction of matrix metalloproteinase-3 in trabecular meshwork." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(6): 2634-2643.
- Kepler, T. B., L. Crosby and K. T. Morgan (2002).** "Normalization and analysis of DNA microarray data by self-consistency and local regression." *Genome Biol*, 3(7): RESEARCH0037.
- Killcoyne, S., G. W. Carter, J. Smith and J. Boyle (2009).** "Cytoscape: a community-based framework for network modeling." *Methods Mol Biol*, 563: 219-239.
- Kim, S. U. and J. de Vellis (2005).** "Microglia in health and disease." *J Neurosci Res*, 81(3): 302-313.
- Kipnis, J., E. Yoles, Z. Porat, A. Cohen, F. Mor, M. Sela, I. R. Cohen and M. Schwartz (2000).** "T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13): 7446-7451.
- Kitaoka, Y., J. M. Kwong, F. N. Ross-Cisneros, J. Wang, R. K. Tsai, A. A. Sadun and T. T. Lam (2006).** "TNF-alpha-induced optic nerve degeneration and nuclear factor-kappaB p65." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(4): 1448-1457.
- 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.
- Kodadek, T. (2002).** "Development of protein-detecting microarrays and related devices." *Trends Biochem Sci*, 27(6): 295-300.

- Kohl, J.** (2001). "Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases." *Mol Immunol*, 38(2-3): 175-187.
- Kohler, H., J. Bayry, A. Nicoletti and S. V. Kaveri** (2003). "Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response?" *Scand J Immunol*, 58(3): 285-289.
- Kopf, E., D. Shnitzer and D. Zharhary** (2005). "Panorama Ab Microarray Cell Signaling kit: a unique tool for protein expression analysis." *Proteomics*, 5(9): 2412-2416.
- Kraj, A. and J. Silberring** (2008). "Proteomics: Introduction to Methods and Applications." New Jersey: Wiley & Sons.
- Kricka, L. J. and S. R. Master** (2008). "Validation and quality control of protein microarray-based analytical methods." *Mol Biotechnol*, 38(1): 19-31.
- Kuehn, M. H., C. Y. Kim, B. Jiang, A. V. Dumitrescu and Y. H. Kwon** (2008). "Disruption of the complement cascade delays retinal ganglion cell death following retinal ischemia-reperfusion." *Exp Eye Res*, 87(2): 89-95.
- Kuehn, M. H., C. Y. Kim, J. Ostojic, M. Bellin, W. L. Alward, E. M. Stone, D. S. Sakaguchi, S. D. Grozdanic and Y. H. Kwon** (2006). "Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension." *Exp Eye Res*, 83(3): 620-628.
- Kumar, D. M. and N. Agarwal** (2007). "Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence." *J Glaucoma*, 16(3): 334-343.
- Kurien, B. T., K. Hensley, M. Bachmann and R. H. Scofield** (2006). "Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases." *Free Radic Biol Med*, 41(4): 549-556.
- Kusnezow, W. and J. D. Hoheisel** (2003). "Solid supports for microarray immunoassays." *J Mol Recognit*, 16(4): 165-176.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, 227(5259): 680-685.
- Langmann, T.** (2007). "Microglia activation in retinal degeneration." *J Leukoc Biol*, 81(6): 1345-1351.
- Larkin, J. E., B. C. Frank, H. Gavras, R. Sultana and J. Quackenbush** (2005). "Independence and reproducibility across microarray platforms." *Nat Methods*, 2(5): 337-344.
- Lehmann, P. V., T. Forsthuber, A. Miller and E. E. Sercarz** (1992). "Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen." *Nature*, 358(6382): 155-157.
- Letarte, M., D. Voulgaraki, D. Hatherley, M. Foster-Cuevas, N. J. Saunders and A. N. Barclay** (2005). "Analysis of leukocyte membrane protein interactions using protein microarrays." *BMC Biochem*, 6: 2.
- Lewis, G. P., P. A. Erickson, C. J. Guerin, D. H. Anderson and S. K. Fisher** (1989). "Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment." *Exp Eye Res*, 49(1): 93-111.
- Li, G. Y. and N. N. Osborne** (2008). "Oxidative-induced apoptosis to an immortalized ganglion cell line is caspase independent but involves the activation of poly(ADP-ribose)polymerase and apoptosis-inducing factor." *Brain Res*, 1188: 35-43.
- Li, Q. Z., J. Zhou, A. E. Wandstrat, F. Carr-Johnson, V. Branch, D. R. Karp, C. Mohan, E. K. Wakeland and N. J. Olsen** (2007). "Protein array autoantibody profiles for insights into systemic lupus erythematosus and incomplete lupus syndromes." *Clin Exp Immunol*, 147(1): 60-70.
- Link, A. J., J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik and J. R. Yates, 3rd** (1999). "Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry." *Nat Biotechnol*, 17(7): 676-682.

- Linthicum, D. S., I. R. Mackay, A. Wilson, L. B. Horvath and P. R. Carnegie** (1981). "Detection of antibodies to central nervous system antigens by solid phase radioimmunoassay." *J Neurosci Res*, 6(5): 567-578.
- Liotta, L. A., V. Espina, A. I. Mehta, V. Calvert, K. Rosenblatt, D. Geho, P. J. Munson, L. Young, J. Wulfkuhle and E. F. Petricoin, 3rd** (2003). "Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications." *Cancer Cell*, 3(4): 317-325.
- Lipton, S. A., Z. Gu and T. Nakamura** (2007). "Inflammatory mediators leading to protein misfolding and uncompetitive/fast off-rate drug therapy for neurodegenerative disorders." *Int Rev Neurobiol*, 82: 1-27.
- Liu, J. P., R. Schlosser, W. Y. Ma, Z. Dong, H. Feng, L. Lui, X. Q. Huang, Y. Liu and D. W. Li** (2004). "Human alphaA- and alphaB-crystallins prevent UVA-induced apoptosis through regulation of PKCalpha, RAF/MEK/ERK and AKT signaling pathways." *Exp Eye Res*, 79(6): 393-403.
- LoBuglio, A. F., R. S. Cotran and J. H. Jandl** (1967). "Red cells coated with immunoglobulin G: binding and sphering by mononuclear cells in man." *Science*, 158(808): 1582-1585.
- Lottspeich, F. and H. Zorbach** (1998). "Bioanalytik." Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Lue, H., R. Kleemann, T. Calandra, T. Roger and J. Bernhagen** (2002). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease." *Microbes Infect*, 4(4): 449-460.
- Luster, A. D.** (2002). "The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity." *Curr Opin Immunol*, 14(1): 129-135.
- Ma, J., N. King, S. L. Chen, R. Penny and S. N. Breit** (1993). "Antibody penetration of viable human cells. II. Anti-RNP antibodies binding to RNP antigen expressed on cell surface, which may mediate the antibody internalization." *Clin Exp Immunol*, 93(3): 396-404.
- Maccarrone, G., C. W. Turck and D. Martins-de-Souza** (2010). "Shotgun Mass Spectrometry Workflow Combining IEF and LC-MALDI-TOF/TOF." *Protein J*.
- MacCoss, M. J. and J. R. Yates, 3rd** (2001). "Proteomics: analytical tools and techniques." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4(5): 369-375.
- Maere, S., K. Heymans and M. Kuiper** (2005). "BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks." *Bioinformatics*, 21(16): 3448-3449.
- Makarov, A.** (2000). "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis." *Anal Chem*, 72(6): 1156-1162.
- Makarov, A., E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat and S. Horning** (2006). "Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer." *Anal Chem*, 78(7): 2113-2120.
- Martin, K., R. Talukder, F. C. Hay and J. S. Axford** (2001). "Characterization of changes in IgG associated oligosaccharide profiles in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis using fluorophore linked carbohydrate electrophoresis." *J Rheumatol*, 28(7): 1531-1536.
- Maruyama, I., Y. Ikeda, M. Nakazawa and H. Ohguro** (2002a). "Clinical roles of serum autoantibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients." *Tohoku J Exp Med*, 197(3): 125-132.
- Maruyama, I., T. Maeda, S. Okisaka, A. Mizukawa, M. Nakazawa and H. Ohguro** (2002b). "Autoantibody against neuron-specific enolase found in glaucoma patients causes retinal dysfunction in vivo." *Jpn J Ophthalmol*, 46(1): 1-12.
- Maruyama, I., H. Ohguro and Y. Ikeda** (2000). "Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(7): 1657-1665.

- Mathov, I., L. I. Plotkin, L. Squiquera, C. A. Fossati, R. A. Margni and J. Leoni** (1995). "N-glycanase treatment of F(ab)² derived from asymmetric murine IgG3 mAb determines the acquisition of precipitating activity." *Mol Immunol*, 32(14-15): 1123-1130.
- Matsiota, P., A. Blancher, B. Doyon, B. Guilbert, M. Clanet, E. D. Kouvelas and S. Avrameas** (1988). "Comparative study of natural autoantibodies in the serum and cerebrospinal fluid of normal individuals and patients with multiple sclerosis and other neurological diseases." *Ann Inst Pasteur Immunol*, 139(1): 99-108.
- Mattson, M. P. and T. Magnus** (2006). "Ageing and neuronal vulnerability." *Nat Rev Neurosci*, 7(4): 278-294.
- McReynolds, J. H. and M. Anbar** (1977). "Isotopic assay of nanomole amounts of nitrogen-15 labeled amino acids by collision-induced dissociation mass spectrometry." *Anal Chem*, 49(12): 1832-1836.
- Melse, J., M. Noppe, R. Crols, J. Gheuens and A. Lowenthal** (1983). "Autoantibodies to brain specific proteins in human serum from normal and several pathological conditions." *Acta Neurol Belg*, 83(1): 17-22.
- Michalak, M., J. Groenendyk, E. Szabo, L. I. Gold and M. Opas** (2009). "Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum." *Biochem J*, 417(3): 651-666.
- Miyara, N., M. Shinzato, Y. Yamashiro, A. Iwamatsu, K. Kariya and S. Sawaguchi** (2008). "Proteomic analysis of rat retina in a steroid-induced ocular hypertension model: potential vulnerability to oxidative stress." *Jpn J Ophthalmol*, 52(2): 84-90.
- Moalem, G., A. Gdalyahu, Y. Shani, U. Otten, P. Lazarovici, I. R. Cohen and M. Schwartz** (2000a). "Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity." *J Autoimmun*, 15(3): 331-345.
- Moalem, G., R. Leibowitz-Amit, E. Yoles, F. Mor, I. R. Cohen and M. Schwartz** (1999a). "Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy." *Nat Med*, 5(1): 49-55.
- Moalem, G., A. Monsonego, Y. Shani, I. R. Cohen and M. Schwartz** (1999b). "Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege." *FASEB J*, 13(10): 1207-1217.
- Moalem, G., E. Yoles, R. Leibowitz-Amit, S. Muller-Gilor, F. Mor, I. R. Cohen and M. Schwartz** (2000b). "Autoimmune T cells retard the loss of function in injured rat optic nerves." *J Neuroimmunol*, 106(1-2): 189-197.
- Mochizuki, M., S. Sugita, N. Ishikawa and T. Watanabe** (2000). "Immunoregulation by aqueous humor." *Cornea*, 19(3 Suppl): S24-25.
- Mockridge, C. I., A. Rahman, S. Buchan, T. Hamblin, D. A. Isenberg, F. K. Stevenson and K. N. Potter** (2004). "Common patterns of B cell perturbation and expanded V4-34 immunoglobulin gene usage in autoimmunity and infection." *Autoimmunity*, 37(1): 9-15.
- Moreno, M. C., J. Campanelli, P. Sande, D. A. Sanes, M. I. Keller Sarmiento and R. E. Rosenstein** (2004). "Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure." *Free Radic Biol Med*, 37(6): 803-812.
- Mori, I., Y. Imai, S. Kohsaka and Y. Kimura** (2000). "Upregulated expression of Iba1 molecules in the central nervous system of mice in response to neurovirulent influenza A virus infection." *Microbiol Immunol*, 44(8): 729-735.
- Muslin, A. J., J. W. Tanner, P. M. Allen and A. S. Shaw** (1996). "Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine." *Cell*, 84(6): 889-897.
- Nam, M. J., J. Madoz-Gurpide, H. Wang, P. Lescure, C. E. Schmalbach, R. Zhao, D. E. Misek, R. Kuick, D. E. Brenner and S. M. Hanash** (2003). "Molecular profiling of the immune response

- in colon cancer using protein microarrays: occurrence of autoantibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3." *Proteomics*, 3(11): 2108-2115.
- Nelstuen, G. L., Y. Zhang, M. B. Martinez, N. S. Key, B. Jilma, M. Verneris, A. Sinaiko and R. S. Kasthuri** (2005). "Plasma protein profiling: unique and stable features of individuals." *Proteomics*, 5(15): 4012-4024.
- Neufeld, A. H.** (1999). "Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma." *Surv Ophthalmol*, 43 Suppl 1: S129-135.
- Neufeld, A. H., S. Kawai, S. Das, S. Vora, E. Gachie, J. R. Connor and P. T. Manning** (2002). "Loss of retinal ganglion cells following retinal ischemia: the role of inducible nitric oxide synthase." *Exp Eye Res*, 75(5): 521-528.
- Niederhorn, J. Y.** (1999). "Anterior chamber-associated immune deviation." *Chem Immunol*, 73: 59-71.
- Nielsen, U. B., M. H. Cardone, A. J. Sinskey, G. MacBeath and P. K. Sorger** (2003). "Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16): 9330-9335.
- Nielsen, U. B. and B. H. Geierstanger** (2004). "Multiplexed sandwich assays in microarray format." *J Immunol Methods*, 290(1-2): 107-120.
- O'Farrell, P. H.** (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *J Biol Chem*, 250(10): 4007-4021.
- Oehmichen, M.** (1982). "Are resting and/or reactive microglia macrophages?" *Immunobiology*, 161(3-4): 246-254.
- Osborne, N. N., F. Block and K. H. Sontag** (1991). "Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal Muller cells." *Vis Neurosci*, 7(6): 637-639.
- Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A. C. Bjorklund, D. C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D. B. Williams and G. Kroemer** (2009). "Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death." *EMBO J*, 28(5): 578-590.
- Panitch, H. S., C. J. Hooper and K. P. Johnson** (1980). "CSF antibody to myelin basic protein. Measurement in patients with multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis." *Arch Neurol*, 37(4): 206-209.
- Pappin, D. J., P. Hojrup and A. J. Bleasby** (1993). "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting." *Curr Biol*, 3(6): 327-332.
- Patterson, S. D. and R. H. Aebersold** (2003). "Proteomics: the first decade and beyond." *Nat Genet*, 33 Suppl: 311-323.
- Paul, W. and H. Steinwedel** (1953). "Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld." *Zeitschrift Naturforschung Teil A*, Vol 8: p.448.
- Paweletz, C. P., B. Trock, M. Pennanen, T. Tsangaris, C. Magnant, L. A. Liotta and E. F. Petricoin, 3rd** (2001). "Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer." *Dis Markers*, 17(4): 301-307.
- Pedrioli, P. G., J. K. Eng, R. Hubley, M. Vogelzang, E. W. Deutsch, B. Raught, B. Pratt, E. Nilsson, R. H. Angeletti, R. Apweiler, K. Cheung, C. E. Costello, H. Hermjakob, S. Huang, R. K. Julian, E. Kapp, M. E. McComb, S. G. Oliver, G. Omenn, N. W. Paton, R. Simpson, R. Smith, C. F. Taylor, W. Zhu and R. Aebersold** (2004). "A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research." *Nat Biotechnol*, 22(11): 1459-1466.

- Peluso, P., D. S. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, K. Witte, L. S. Jung, P. Wagner and S. Nock** (2003). "Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays." *Anal Biochem*, 312(2): 113-124.
- Penna, A. and M. Cahalan** (2007). "Western Blotting using the Invitrogen NuPage Novex Bis Tris minigels." *J Vis Exp*, (7): 264.
- 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.
- Perrin, D. and D. Aunis** (1985). "Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells." *Nature*, 315(6020): 589-592.
- Pfeiffer, N.** (2005). "Glaukom und okuläre Hypertension." Thieme, Stuttgart, 2. Aufl.
- Pieler, R., F. Sanchez-Cabo, H. Hackl, G. G. Thallinger and Z. Trajanoski** (2004). "ArrayNorm: comprehensive normalization and analysis of microarray data." *Bioinformatics*, 20(12): 1971-1973.
- Popovich, P. G., B. T. Stokes and C. C. Whitacre** (1996). "Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system." *J Neurosci Res*, 45(4): 349-363.
- Popovich, P. G., P. Wei and B. T. Stokes** (1997). "Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats." *J Comp Neurol*, 377(3): 443-464.
- Purcell, A. W. and J. J. Gorman** (2001). "The use of post-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry to delineate T cell determinants." *J Immunol Methods*, 249(1-2): 17-31.
- Quackenbush, J.** (2002). "Microarray data normalization and transformation." *Nat Genet*, 32 Suppl: 496-501.
- Quigley, H. A.** (1996). "Number of people with glaucoma worldwide." *Br J Ophthalmol*, 80(5): 389-393.
- Quigley, H. A. and A. T. Broman** (2006). "The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020." *Br J Ophthalmol*, 90(3): 262-267.
- Rabilloud, T.** (1996). "Solubilization of proteins for electrophoretic analyses." *Electrophoresis*, 17(5): 813-829.
- Radyuk, S. N., K. Michalak, V. I. Klichko, J. Benes, I. Rebrin, R. S. Sohal and W. C. Orr** (2009). "Peroxiredoxin 5 confers protection against oxidative stress and apoptosis and also promotes longevity in *Drosophila*." *Biochem J*, 419(2): 437-445.
- Rao, N. A., S. Saraswathy, G. S. Wu, G. S. Katselis, E. F. Wawrousek and S. Bhat** (2008). "Elevated retina-specific expression of the small heat shock protein, alphaA-crystallin, is associated with photoreceptor protection in experimental uveitis." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(3): 1161-1171.
- Rappsilber, J., U. Ryder, A. I. Lamond and M. Mann** (2002). "Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome." *Genome Res*, 12(8): 1231-1245.
- Rawal, N. and M. K. Pangburn** (2001). "Structure/function of C5 convertases of complement." *Int Immunopharmacol*, 1(3): 415-422.
- Readhead, C., N. Takasashi, H. D. Shine, R. Saavedra, R. Sidman and L. Hood** (1990). "Role of myelin basic protein in the formation of central nervous system myelin." *Ann N Y Acad Sci*, 605: 280-285.

- Resnikoff, S., D. Pascolini, D. Etya'ale, I. Kocur, R. Pararajasegaram, G. P. Pokharel and S. P. Mariotti** (2004). "Global data on visual impairment in the year 2002." *Bull World Health Organ*, 82(11): 844-851.
- Reth, M.** (1994). "B cell antigen receptors." *Curr Opin Immunol*, 6(1): 3-8.
- Reynolds, A., C. Laurie, R. L. Mosley and H. E. Gendelman** (2007). "Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders." *Int Rev Neurobiol*, 82: 297-325.
- Ritch, R. and U. Schlotzer-Schrehardt** (2001). "Exfoliation syndrome." *Surv Ophthalmol*, 45(4): 265-315.
- Ritch, R., U. Schlotzer-Schrehardt and A. G. Konstas** (2003). "Why is glaucoma associated with exfoliation syndrome?" *Prog Retin Eye Res*, 22(3): 253-275.
- Robinson, W. H., C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese, H. E. de Vegvar, K. Skriner, D. L. Hirschberg, R. I. Morris, S. Muller, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, J. S. Smolen, P. O. Brown, L. Steinman and P. J. Utz** (2002a). "Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses." *Nat Med*, 8(3): 295-301.
- Robinson, W. H., L. Steinman and P. J. Utz** (2002b). "Protein and peptide array analysis of autoimmune disease." *Biotechniques*, Suppl: 66-69.
- Roth, G. A., M. D. Gonzalez, C. G. Monferran, M. L. De Santis and F. A. Cumar** (1993). "Myelin basic protein domains involved in the interaction with actin." *Neurochem Int*, 23(5): 459-465.
- Sacca, S. C. and A. Izzotti** (2008). "Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye." *Prog Brain Res*, 173: 385-407.
- Sacca, S. C., A. Izzotti, P. Rossi and C. Traverso** (2007). "Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress." *Exp Eye Res*, 84(3): 389-399.
- Saeed, A. I., N. K. Bhagabati, J. C. Braisted, W. Liang, V. Sharov, E. A. Howe, J. Li, M. Thiagarajan, J. A. White and J. Quackenbush** (2006). "TM4 microarray software suite." *Methods Enzymol*, 411: 134-193.
- Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush and J. Quackenbush** (2003). "TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis." *Biotechniques*, 34(2): 374-378.
- Santos, L. L. and E. F. Morand** (2009). "Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis." *Clin Chim Acta*, 399(1-2): 1-7.
- Sappington, R. M., M. Chan and D. J. Calkins** (2006). "Interleukin-6 protects retinal ganglion cells from pressure-induced death." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(7): 2932-2942.
- Saraswathy, S. and N. A. Rao** (2009). "Mitochondrial proteomics in experimental autoimmune uveitis oxidative stress." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(12): 5559-5566.
- Sauve, A. C. and T. C. Speed** (2004). "Normalization, baseline correction and alignment of high-throughput mass spectrometry data." *Proceedings Gensips*.
- Schachner, M. and W. Zillig** (1971). "Fingerprint maps of tryptic peptides from subunits of Escherichia coli and T 4 -modified DNA-dependent RNA polymerases." *Eur J Biochem*, 22(4): 513-519.
- Schena, M., Davies, R.W.,** (2000). "Technology standards for microarray search." In "Microarray Biochip Technology" (M. Schena, Ed.), Eaton Publishing, Natick, MA: 1-18.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown** (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science*, 270(5235): 467-470.

- Schmidt, A., J. Kellermann and F. Lottspeich** (2005). "A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels." *Proteomics*, 5(1): 4-15.
- Schori, H., J. Kipnis, E. Yoles, E. WoldeMussie, G. Ruiz, L. A. Wheeler and M. Schwartz** (2001). "Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6): 3398-3403.
- Schütt, C. and B. Bröker** (2009). "Grundwissen Immunologie." Spektrum akademischer Verlag, 2. Auflage.
- Schuetz, E. and S. Thanos** (2004). "Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases." *Curr Drug Targets*, 5(7): 619-627.
- Schwartz-Albiez, R., R. C. Monteiro, M. Rodriguez, C. J. Binder and Y. Shoenfeld** (2009). "Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation." *Clin Exp Immunol*, 158 Suppl 1: 43-50.
- Schwartz, J. C., M. W. Senko and J. E. Syka** (2002a). "A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer." *J Am Soc Mass Spectrom*, 13(6): 659-669.
- Schwartz, M. and J. Kipnis** (2001). "Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries." *Trends Mol Med*, 7(6): 252-258.
- Schwartz, M. and J. Kipnis** (2002b). "Multiple sclerosis as a by-product of the failure to sustain protective autoimmunity: a paradigm shift." *Neuroscientist*, 8(5): 405-413.
- Schwartz, M. and J. Kipnis** (2004). "Self and non-self discrimination is needed for the existence rather than deletion of autoimmunity: the role of regulatory T cells in protective autoimmunity." *Cell Mol Life Sci*, 61(18): 2285-2289.
- Schwartz, M. and J. Kipnis** (2005). "Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases." *J Neurol Sci*, 233(1-2): 163-166.
- Schwartz, M., A. London and R. Shechter** (2009). "Boosting T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity." *Neuroscience*, 158(3): 1133-1142.
- Schwartz, M., I. Shaked, J. Fisher, T. Mizrahi and H. Schori** (2003). "Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity." *Trends Neurosci*, 26(6): 297-302.
- Schwartz, M. and Y. Ziv** (2008). "Immunity to self and self-maintenance: a unified theory of brain pathologies." *Trends Immunol*, 29(5): 211-219.
- Schweitzer, B. and S. F. Kingsmore** (2002). "Measuring proteins on microarrays." *Curr Opin Biotechnol*, 13(1): 14-19.
- Scibek, J. J., M. E. Plumb and J. M. Sodetz** (2002). "Binding of human complement C8 to C9: role of the N-terminal modules in the C8 alpha subunit." *Biochemistry*, 41(49): 14546-14551.
- Seddon, B.** (2000). "The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: generation, specificity and mode of action." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 48(5): 339-345.
- Seddon, B. and D. Mason** (1999). "Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes." *J Exp Med*, 189(2): 279-288.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker** (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." *Genome Res*, 13(11): 2498-2504.
- Shen, F., B. Chen, J. Danias, K. C. Lee, H. Lee, Y. Su, S. M. Podos and T. W. Mittag** (2004). "Glutamate-induced glutamine synthetase expression in retinal Muller cells after short-term ocular hypertension in the rat." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(9): 3107-3112.

- Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen and M. Mann** (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." *Nat Protoc*, 1(6): 2856-2860.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm and M. Mann** (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem*, 68(5): 850-858.
- Shih, L. B., H. H. Z. Lu, H. Xuan and D. M. Goldenberg** (2006). "Internalization and intracellular processing of an anti B-cell lymphoma monoclonal antibody, 112." *International Journal of Cancer*, 56(4): 438-445.
- Shiio, Y. and R. Aebersold** (2006). "Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry." *Nat Protoc*, 1(1): 139-145.
- Shoenfeld, Y. and E. Toubi** (2005). "Protective autoantibodies: role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential." *Arthritis Rheum*, 52(9): 2599-2606.
- Singhrao, S. K., J. W. Neal, B. P. Morgan and P. Gasque** (1999). "Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease." *Exp Neurol*, 159(2): 362-376.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk** (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem*, 150(1): 76-85.
- Society, T. E. G.** (2006). "Terminology and guidelines for glaucoma." www.eugs.org, 11nd edition.
- Sommer, A., J. M. Tielsch, J. Katz, H. A. Quigley, J. D. Gottsch, J. Javitt and K. Singh** (1991). "Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey." *Arch Ophthalmol*, 109(8): 1090-1095.
- Stasi, K., D. Nagel, X. Yang, R. F. Wang, L. Ren, S. M. Podos, T. Mittag and J. Danias** (2006). "Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(3): 1024-1029.
- Steel, L. F., M. G. Trotter, P. B. Nakajima, T. S. Mattu, G. Gonye and T. Block** (2003). "Efficient and specific removal of albumin from human serum samples." *Mol Cell Proteomics*, 2(4): 262-270.
- Stillman, B. A. and J. L. Tonkinson** (2000). "FAST slides: a novel surface for microarrays." *Biotechniques*, 29(3): 630-635.
- Stone, E. M., J. H. Fingert, W. L. M. Alward, T. D. Nguyen, J. R. Polansky, S. L. F. Sunden, D. Nishimura, A. F. Clark, A. Nystuen, B. E. Nichols, D. A. Mackey, R. Ritch, J. W. Kalenak, E. R. Craven and V. C. Sheffield** (1997). "Identification of a Gene That Causes Primary Open Angle Glaucoma." *Science*, 275: 668-670.
- Strickler, A. G., M. S. Byerly and W. R. Jeffery** (2007). "Lens gene expression analysis reveals downregulation of the anti-apoptotic chaperone alphaA-crystallin during cavefish eye degeneration." *Dev Genes Evol*, 217(11-12): 771-782.
- Sundaresh, S., D. L. Doolan, S. Hirst, Y. Mu, B. Unal, D. H. Davies, P. L. Felgner and P. Baldi** (2006). "Identification of humoral immune responses in protein microarrays using DNA microarray data analysis techniques." *Bioinformatics*, 22(14): 1760-1766.
- Surgucheva, I., V. I. Shestopalov and A. Surguchov** (2008). "Effect of gamma-synuclein silencing on apoptotic pathways in retinal ganglion cells." *J Biol Chem*, 283(52): 36377-36385.
- Suzuki, S., K. Utsugisawa, H. Yoshikawa, M. Motomura, S. Matsubara, K. Yokoyama, Y. Nagane, T. Maruta, T. Satoh, H. Sato, M. Kuwana and N. Suzuki** (2009). "Autoimmune Targets of Heart and Skeletal Muscles in Myasthenia Gravis." *Arch Neurol*.
- Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida** (1988). "Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2(8): 151-153.

- Tezel, G.** (2006). "Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences." *Prog Retin Eye Res*, 25(5): 490-513.
- Tezel, G., B. C. Chauhan, R. P. LeBlanc and M. B. Wax** (2003). "Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(7): 3025-3033.
- Tezel, G., D. P. Edward and M. B. Wax** (1999). "Serum autoantibodies to optic nerve head glycosaminoglycans in patients with glaucoma." *Arch Ophthalmol*, 117(7): 917-924.
- Tezel, G., C. Luo and X. Yang** (2007a). "Accelerated aging in glaucoma: immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the human retina and optic nerve head." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(3): 1201-1211.
- Tezel, G., G. M. Seigel and M. B. Wax** (1998). "Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(12): 2277-2287.
- Tezel, G. and M. B. Wax** (2000a). "Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells." *J Neurosci*, 20(23): 8693-8700.
- Tezel, G. and M. B. Wax** (2000b). "The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells." *J Neurosci*, 20(10): 3552-3562.
- Tezel, G. and M. B. Wax** (2004). "The immune system and glaucoma." *Curr Opin Ophthalmol*, 15(2): 80-84.
- Tezel, G., X. Yang and J. Cai** (2005). "Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(9): 3177-3187.
- Tezel, G., X. Yang, C. Luo, Y. Peng, S. L. Sun and D. Sun** (2007b). "Mechanisms of immune system activation in glaucoma: oxidative stress-stimulated antigen presentation by the retina and optic nerve head glia." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(2): 705-714.
- Tezel, G., X. Yang, C. Luo, D. W. Powell, J. B. Klein, H. J. Kaplan and M. H. Kuehn** (2009). "Proteomics Supports Different Pathways of Complement Activity in Human Glaucoma." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 50(5): 4044-.
- Thiede, B., S. Lamer, J. Mattow, F. Siejak, C. Dimmler, T. Rudel and P. R. Jungblut** (2000). "Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion." *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14(6): 496-502.
- Tisone, T. C., Tonkinson, J.L.** (2005). "Non-contact Dispensing for Protein Microarrays." In "Protein Microarrays" (M. Schena, Ed.), Jones & Bartlett Pub, MA 169-185.
- Tiss, A., C. Smith, S. Camuzeaux, M. Kabir, S. Gayther, U. Menon, M. Waterfield, J. Timms, I. Jacobs and R. Cramer** (2007). "Serum peptide profiling using MALDI mass spectrometry: avoiding the pitfalls of coated magnetic beads using well-established ZipTip technology." *Proteomics*, 7 Suppl 1: 77-89.
- Tomlinson, S.** (1993). "Complement defense mechanisms." *Curr Opin Immunol*, 5(1): 83-89.
- Towbin, H. and J. Gordon** (1984). "Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook." *J Immunol Methods*, 72(2): 313-340.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9): 4350-4354.
- Tsuruya, T., K. Hata, T. Kamimura, A. Hayakawa, Y. Aoyagi, H. Asakura, K. Ishihara, M. Toshima, K. Soga, K. Sibasaki and et al.** (1991). "[Clinical significance of antibodies against

- calmodulin in patients with various liver diseases]." *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 88(2): 131-137.
- Tura, A., F. Schuettauf, P. P. Monnier, K. U. Bartz-Schmidt and S. Henke-Fahle** (2009). "Efficacy of Rho-kinase inhibition in promoting cell survival and reducing reactive gliosis in the rodent retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(1): 452-461.
- Tzima, E., C. Poujol, P. Nurden, A. T. Nurden, M. A. Orchard and J. H. Walker** (1999). "Annexin V relocates to the periphery of activated platelets following thrombin activation: an ultrastructural immunohistochemical approach." *Cell Biol Int*, 23(9): 629-635.
- Ude, K. T., N. Boehm, M. Wiegand, N. Pfeiffer and F. H. Grus** (2010). "Dig Deeper Into the Tear Proteome: Advanced Protein Profiling in Dry Eye Patients." ARVO, Fort Lauderdale, USA,.
- v Eitzen, U., R. Egensperger, S. Kosel, E. M. Grasbon-Frodl, Y. Imai, K. Bise, S. Kohsaka, P. Mehraein and M. B. Graeber** (1998). "Microglia and the development of spongiform change in Creutzfeldt-Jakob disease." *J Neuropathol Exp Neurol*, 57(3): 246-256.
- Varnum, S. M., R. L. Woodbury and R. C. Zangar** (2004). "A protein microarray ELISA for screening biological fluids." *Methods Mol Biol*, 264: 161-172.
- Venables, P. J., P. R. Smith and R. N. Maini** (1983). "Purification and characterization of the Sjogren's syndrome A and B antigens." *Clin Exp Immunol*, 54(3): 731-738.
- Vesaluoma, M., P. Mertaniemi, S. Mannonen, I. Lehto, R. Uusitalo, S. Sarna, A. Tarkkanen and T. Tervo** (1998). "Cellular and plasma fibronectin in the aqueous humour of primary open-angle glaucoma, exfoliative glaucoma and cataract patients." *Eye*, 12 (Pt 5): 886-890.
- Volanakis, J. E.** (1990). "Participation of C3 and its ligands in complement activation." *Curr Top Microbiol Immunol*, 153: 1-21.
- Vollrath, D. and Y. Liu** (2006). "Temperature sensitive secretion of mutant myocilins." *Exp Eye Res*, 82(6): 1030-1036.
- Wa, C., R. Cerny and D. S. Hage** (2006). "Obtaining high sequence coverage in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry for studies of protein modification: analysis of human serum albumin as a model." *Anal Biochem*, 349(2): 229-241.
- Wacker, R., H. Schroder and C. M. Niemeyer** (2004). "Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment: a comparative study." *Anal Biochem*, 330(2): 281-287.
- Wang, X., G. A. Cioffi, G. Cull, J. Dong and B. Fortune** (2002). "Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma." *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43: 1008-1094.
- Wang, X., S. S. Tay and Y. K. Ng** (2000). "An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma." *Exp Brain Res*, 132(4): 476-484.
- Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams and I. Humphery-Smith** (1995). "Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*." *Electrophoresis*, 16(7): 1090-1094.
- Wax, M. B., D. A. Barrett and A. Pestronk** (1994). "Increased incidence of paraproteinemia and autoantibodies in patients with normal-pressure glaucoma." *Am J Ophthalmol*, 117(5): 561-568.
- Wax, M. B., G. Tezel, K. Kawase and Y. Kitazawa** (2001). "Serum autoantibodies to heat shock proteins in glaucoma patients from Japan and the United States." *Ophthalmology*, 108(2): 296-302.
- Wax, M. B., G. Tezel, I. Saito, R. S. Gupta, J. B. Harley, Z. Li and C. Romano** (1998). "Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma." *Am J Ophthalmol*, 125(2): 145-157.

- Weinberger, S. R., T. S. Morris and M. Pawlak** (2000). "Recent trends in protein biochip technology." *Pharmacogenomics*, 1(4): 395-416.
- Wells, J. M. and S. A. McLuckey** (2005). "Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins." *Methods Enzymol*, 402: 148-185.
- Wilkins, M. R., C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams and D. F. Hochstrasser** (1996a). "From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis." *Biotechnology (N Y)*, 14(1): 61-65.
- Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser and K. L. Williams** (1996b). "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.
- Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, K. L. Williams and D. F. Hochstrasser** (1996c). "Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects." *Electrophoresis*, 17(5): 830-838.
- Wolters, D. A., M. P. Washburn and J. R. Yates, 3rd** (2001). "An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics." *Anal Chem*, 73(23): 5683-5690.
- Xing, H., S. Zhang, C. Weinheimer, A. Kovacs and A. J. Muslin** (2000). "14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades." *EMBO J*, 19(3): 349-358.
- Yaffe, M. B., K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon and L. C. Cantley** (1997). "The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity." *Cell*, 91(7): 961-971.
- Yan, D. B., F. M. Coloma, A. Metheerairut, G. E. Trope, J. G. Heathcote and C. R. Ethier** (1994). "Deformation of the lamina cribrosa by elevated intraocular pressure." *Br J Ophthalmol*, 78(8): 643-648.
- Yang, J., G. Tezel, R. V. Patil, C. Romano and M. B. Wax** (2001). "Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(6): 1273-1276.
- Yang, S., T. Liu, S. Li, X. Zhang, Q. Ding, H. Que, X. Yan, K. Wei and S. Liu** (2008a). "Comparative proteomic analysis of brains of naturally aging mice." *Neuroscience*, 154(3): 1107-1120.
- Yang, X., W. H. Lee, F. Sobott, E. Papagrigoriou, C. V. Robinson, J. G. Grossmann, M. Sundstrom, D. A. Doyle and J. M. Elkins** (2006). "Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(46): 17237-17242.
- Yang, X., C. Luo, J. Cai, W. M. Pierce and G. Tezel** (2008b). "Phosphorylation-dependent interaction with 14-3-3 in the regulation of bad trafficking in retinal ganglion cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(6): 2483-2494.
- 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.
- Yoles, E. and M. Schwartz** (1998). "Potential neuroprotective therapy for glaucomatous optic neuropathy." *Surv Ophthalmol*, 42(4): 367-372.
- Yoneda, S., H. Tanihara, N. Kido, Y. Honda, W. Goto, H. Hara and N. Miyawaki** (2001). "Interleukin-1beta mediates ischemic injury in the rat retina." *Exp Eye Res*, 73(5): 661-667.
- Yu, A. L., R. Fuchshofer, M. Birke, A. Kampik, H. Bloemendal and U. Welge-Lussen** (2008). "Oxidative stress and TGF-beta2 increase heat shock protein 27 expression in human optic nerve head astrocytes." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(12): 5403-5411.
- Yuan, L. and A. H. Neufeld** (2000). "Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head." *Glia*, 32(1): 42-50.

Literaturverzeichnis

- Zanivan, S., F. Gnad, S. A. Wickstrom, T. Geiger, B. Macek, J. Cox, R. Fassler and M. Mann** (2008). "Solid tumor proteome and phosphoproteome analysis by high resolution mass spectrometry." *J Proteome Res*, 7(12): 5314-5326.
- Zhu, H., M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein and M. Snyder** (2001). "Global analysis of protein activities using proteome chips." *Science*, 293(5537): 2101-2105.
- Zimmermann, C. W., F. H. Grus and R. Dux** (1995). "Multivariate statistical comparison of autoantibody-repertoires (western blots) by discriminant analysis." *Electrophoresis*, 16(6): 941-947.

8 Anhang

Tab. 1: Auflistung der für die Herstellung der Protein-Microarrays verwendeten Antigene (vergl. 3.1.2).

| Verwendete Antigene | | |
|--|------------|------------|
| Name | Organismus | Hersteller |
| α -1-Antitrypsin | human | Sigma |
| α -A-Crystallin | human | Sigma |
| α -B-Crystallin | human | Sigma |
| β -2-adrenergic Receptor | human | Sigma |
| α -Synuclein | human | Sigma |
| β -L-Crystallin | human | Sigma |
| β -S-Crystallin | human | Sigma |
| γ -Crystallin | human | Sigma |
| γ -Synuclein | human | Sigma |
| Actin | bovin | Sigma |
| Albumin | human | Sigma |
| Annexin V | human | Sigma |
| Brain derived neurotrophic factor (BDNF) | human | RnDSystems |
| Calreticulin | bovin | Sigma |
| Cardiolipin | human | Sigma |
| Fibrin | human | Sigma |
| Fibronektin | human | Sigma |
| Glial fibrillary acidic protein (GFAP) | human | Sigma |
| Glutathione S-Transferase | human | Sigma |
| HSP10 | human | Biomiol |
| HSP27 | human | Stressgene |
| HSP60 | human | Stressgene |
| HSP70 | human | Stressgene |
| Insulin | human | Sigma |
| Jo-1 | human | Sigma |
| Lysozyme | human | Sigma |
| Myelin Basic Protein (MBP) | bovin | Fluka |
| Myelin Oligodendrocyte Glykoprotein (MOG) | bovin | Fluka |
| Myoglobin | human | Sigma |
| Neurotrophin3 | human | RnDSystems |
| Neuron Specific Enolase (NSE) | human | Sigma |
| Protein Kinase C Inhibitor (10 μ g/ μ l) | human | Sigma |
| Spectrin/alpha Fodrin | human | Sigma |
| Superoxid-Dismutase | human | Sigma |
| Transferrin | human | Sigma |
| Transthyretin | human | Sigma |
| DNA Topoisomerase I | human | Sigma |
| Ubiquitin | human | Sigma |
| Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) | human | Sigma |
| Vimentin | human | Progene |

Tab. 2: Auflistung der für die Herstellung der Antikörper-Microarrays verwendeten Antikörper (vergl. 3.2.4). Gelistet sind der Name des Zielantigens, des Zielorganismus sowie der des jeweiligen Herstellers.

| Verwendete Antikörper | | |
|---|-------------------|----------------------|
| Name | Spezifität | Hersteller |
| α -1-Antitrypsin | anti-human | RnDSystems |
| α -Fodrin | anti-human | Lifespan biosciences |
| Annexin V | anti-human | RnDSystems |
| β -2-Microglobulin | anti-human | RnDSystems |
| β -Tubulin | anti-mammalia | Covance |
| BRN3a (Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A) | anti-human | Chemicon USA |
| C1r | anti-human | GeneTex |
| C1s | anti-human | Lifespan biosciences |
| C3/3b | anti-human | HyCult biotech b.v. |
| C5 | anti-human | GeneTex |
| C6 | anti-human | GeneTex |
| C7a | anti-human | GeneTex |
| C8a | anti-human | AbD Serotec |
| C9a | anti-human | GeneTex |
| Caspase 3 | anti-human | RnDSystems |
| Cystatin | anti-human | RnDSystems |
| GFAP (Glial fibrillary acidic protein) | anti-human | RnDSystems |
| HSP10 | anti-human | RnDSystems |
| HSP27 | anti-human | RnDSystems |
| HSP60 | anti-human | RnDSystems |
| HSP70 | anti-human | RnDSystems |
| HSP90 | anti-human | RnDSystems |
| IBA 1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1) | anti-human | Wako Japan |
| Il 1 β | anti-human | RnDSystems |
| Il 2 | anti-human | RnDSystems |
| Il 6 | anti-human | RnDSystems |
| Il 8 | anti-human | RnDSystems |
| Interferon γ | anti-human | RnDSystems |
| Lox 1 | anti-human | Lifespan biosciences |
| Lysozym | anti-human | RnDSystems |
| MBP (Myelin Basic Protein) | anti-human | Lifespan biosciences |
| Myocilin | anti-human | Lifespan biosciences |
| Optineurin | anti-human | Lifespan biosciences |
| Protein S 100 | anti-human | RnDSystems |
| Surfactant protein D | anti-human | RnDSystems |
| TNF α (Tumor necrosis factor α) | anti-human | RnDSystems |

Tab. 3: Auflistung der Geräteeinstellungen und Programmparameter für die massenspektrometrische Peptidanalyse mittels MALDI LTQ Orbitrap XL (vergl. 3.3.4). Die gelisteten Parameter sind dabei in die beiden erfassten Massenbereiche unterteilt (1000-1700Da, 1700-4000Da). Desweiteren liegt eine Unterteilung in allgemeine Parameter (die sowohl für MS als auch für Ms/MS Messungen gelten), Parameter für Peptidspektren und Parameter für die Analyse von Fragmentspektren vor.

| Messbereich: 1000-1700 Da | | Messbereich: 1700-4000 Da | |
|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------------|
| <u>Allgemein</u> | | <u>Allgemein</u> | |
| Bewegungsmodus | CPS | Bewegungsmodus | spiral inwards |
| Anz. der Experimente. | 2 | Anz. der Experimente | 2 |
| Auto. Spektrum Filter | Off | Auto. Spektrum Filter | Off |
| <u>Peptidspektren (MS)</u> | | <u>Peptidspektren (MS)</u> | |
| Analysator | FTMS | Analysator | FTMS |
| Massenbereich | High | Massenbereich | High |
| Auflösung (FWMH bei 400m/z) | 100000 | Auflösung (FWMH bei 400m/z) | 100000 |
| Scan Modus | Full | Scan Modus | Full |
| Polarität | Positive | Polarität | Positive |
| Datentyp | centroid | Datentyp | centroid |
| Erste Masse | 1000 Da | Erste Masse | 1700 Da |
| Letzte Masse | 1700 Da | Letzte Masse | 4000 Da |
| <u>Fragmentspektren (MS/MS)</u> | | <u>Fragmentspektren (MS/MS)</u> | |
| Analysator | Ion Trap | Analysator | Ion Trap |
| Massenbereich | High | Massenbereich | High |
| Scan Modus | normal | Scan Modus | normal |
| Datentyp | profile | Datentyp | profile |
| Anz. MS/MS | 50 | Anz. MS/MS | 30 |
| Min. Signal Schwellenwert (Ionen) | 500 | Min. Signal Schwellenwert (Ionen) | 500 |
| Fragmentierungs-Methode | CID | Fragmentierungs-Methode | CID |
| Ladung | 1 | Ladung | 1 |
| Isolationsbreite | 4 Da | Isolationsbreite | 4 Da |
| Normalisierte Kollisionsenergie | 50eV | Normalisierte Kollisionsenergie | 50eV |
| Aktivierungs Q | 0,25 | Aktivierungs Q | 0,25 |
| Aktivierungszeit | 30 ms | Aktivierungszeit | 30 ms |
| Ausschlussmassebreite niedrig | 2 Da | Ausschlussmassenbreite niedrig | 2 Da |
| Ausschlussmassenbreite hoch | 5 Da | Ausschlussmassenbreite hoch | 5 Da |

Tab. 4: Aufstellung der verschiedenen Einstellungen und Suchparameter, die für Datenbanksuche zwecks Proteinidentifizierung verwendet wurden. Die Parameter gelten sowohl für die Datenbanksuche mittels P²M als auch für die mit dem Proteome Discoverer.

| <u>Parameter für die Datenbanksuche zwecks Proteinidentifikation</u> | |
|---|---|
| Suchmaschine | Mascot |
| Datenbank | Swiss-Prot |
| Taxonomie | Homo sapiens |
| Enzym | Trypsin |
| fehlende Schnittstellen | 2 |
| Ladung der Ionen | 1;2 |
| Massentoleranz Peptidionen | 10 ppm |
| Massentoleranz Fragmentionen | 0.7 Da |
| globale Modifikationen | Carbamidomethylierung |
| Variable Modifikationen | Amidierung Ammonium-Verlust Deamidierung Oxidation (HW) Oxidation (M) Phosphorylierung (S,T) Phosphorylierung (Y) |
| Min. Peptide-Score für Prot. Identifizierung | 25 |
| Anz. zugeordn. Peptide | 1 |
| Peptid-Schwellenwert | 10 |

Anhang

Tab. 5: Aufstellung der Proteinzuordnungen und dem durchschnittlichen Peptidscore der hier zutreffenden Peptide. Zusätzlich sind die Peptidanzahlen der jeweiligen Kategorie sowie die SD des jeweiligen Peptidscores gelistet

| <u>Anzahl Protein- Zuordnungen</u> | <u>Peptid-Score (ME)</u> | <u>N</u> | <u>Peptid- Score (SD)</u> |
|--|------------------------------|----------|-----------------------------------|
| 0 | 12,97159 | 24697 | 2,43794 |
| 1 | 22,66912 | 8787 | 12,70714 |
| 2 | 23,31203 | 548 | 11,55202 |
| 3 | 26,95605 | 81 | 18,68082 |
| 4 | 22,16137 | 168 | 10,49035 |
| 5 | 24,55536 | 97 | 13,08165 |
| 6 | 23,95859 | 184 | 14,26063 |
| 7 | 20,31300 | 30 | 6,45974 |
| 8 | 18,46846 | 65 | 6,16411 |
| 9 | 20,00769 | 52 | 7,91240 |
| 14 | 20,79889 | 18 | 9,26524 |
| 18 | 19,50455 | 11 | 8,19901 |

Tab. 6A-L: Auflistung der identifizierten Retinaproteine. Für jedes Protein wurde neben dessen Namen die zugehörige Swiss-Prot Identifikationsnummer, die erreichte Sequenzabdeckung, die Anzahl der zugeordneten Peptide (redundante Peptide wurden berücksichtigt), das Molekulargewicht des Proteins sowie der erreichte Mascot-Score aufgeführt.

| <u>ID</u> | <u>Seq. Abd.</u> | <u>Anz. Peptide</u> | <u>MW [kDa]</u> | <u>kalk. pI</u> | <u>Score</u> | <u>Proteinname/Kurzbeschreibung</u> |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|--|
| P61604 | 43,14 | 11 | 10,9 | 8,92 | 77,30 | 10 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hsp10) |
| P31946 | 28,86 | 33 | 28,1 | 4,83 | 157,91 | 14-3-3 protein beta/alpha (Protein kinase C inhibitor protein 1) |
| P62260 | 38,82 | 41 | 29,2 | 4,74 | 191,87 | 14-3-3 protein epsilon (14-3-3E) |
| P61983 | 13,77 | 21 | 28,3 | 4,89 | 99,26 | 14-3-3 protein gamma |
| P27348 | 13,88 | 11 | 27,7 | 4,78 | 21,67 | 14-3-3 protein theta (14-3-3 protein tau) |
| P63104 | 40,41 | 37 | 27,7 | 4,79 | 148,27 | 14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein 1) |
| P10809 | 10,99 | 6 | 61,0 | 5,87 | 24,78 | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) |
| P05387 | 28,70 | 2 | 11,7 | 4,54 | 65,66 | 60S acidic ribosomal protein P2 |
| P11021 | 35,17 | 108 | 72,3 | 5,16 | 538,50 | Heat shock 70 kDa protein 5 |
| Q99798 | 17,56 | 81 | 85,4 | 7,61 | 455,11 | Aconitate hydratase, mitochondrial precursor |
| P68035 | 28,91 | 216 | 42,0 | 5,39 | 1359,87 | Actin, alpha cardiac muscle 1 |
| P60711 | 45,60 | 339 | 41,7 | 5,48 | 3327,61 | Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) |
| Q9H2P0 | 5,90 | 9 | 123,5 | 7,34 | 0,00 | Activity-dependent neuroprotector |
| P02489 | 54,91 | 139 | 19,9 | 6,20 | 563,78 | Alpha crystallin A chain (Heat-shock protein beta-4) (HspB4) |
| P02511 | 54,29 | 71 | 20,1 | 7,33 | 452,95 | Alpha crystallin B chain (Heat-shock protein beta-5) |
| P01009 | 10,77 | 4 | 46,7 | 5,59 | 23,20 | Alpha-1-antitrypsin precursor |
| P30533 | 8,68 | 4 | 41,4 | 8,78 | 0,00 | Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein precursor |
| P06733 | 51,84 | 128 | 47,1 | 7,39 | 1654,62 | Alpha-enolase |
| Q53TS8 | 2,09 | 1 | 71,1 | 7,02 | 20,84 | Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene 11 protein |
| P36575 | 12,63 | 5 | 42,8 | 5,77 | 28,83 | Arrestin-C (Retinal cone arrestin-3) |
| O95568 | 10,22 | 4 | 42,1 | 6,76 | 22,47 | Arsenic-transactivated protein 2 |

Tab. 6B: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| ID | Seq. Abd. | Anz. Peptide | MW [kDa] | kalk. pI | Score | Proteinname/Kurzbeschreibung |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|---|
| P25705 | 8,50 | 13 | 59,7 | 9,13 | 53,73 | ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor |
| P06576 | 42,34 | 179 | 56,5 | 5,40 | 1180,89 | ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor |
| Q8WWZ4 | 1,75 | 9 | 175,6 | 6,65 | 0,00 | ATP-binding cassette sub-family A member 10 |
| O14497 | 12,87 | 76 | 241,9 | 6,70 | 23,57 | AT-rich interactive domain-containing protein 1A |
| P53672 | 22,84 | 13 | 22,1 | 6,38 | 33,30 | Beta crystallin A2 |
| P05813 | 44,19 | 47 | 25,1 | 6,20 | 401,87 | Beta crystallin A3 |
| P53673 | 55,10 | 41 | 22,4 | 6,25 | 250,93 | Beta crystallin A4 |
| P53674 | 59,13 | 128 | 28,0 | 8,56 | 759,57 | Beta crystallin B1 |
| P43320 | 68,29 | 296 | 23,4 | 7,01 | 2954,97 | Beta crystallin B2 |
| P26998 | 15,64 | 4 | 24,2 | 6,43 | 20,21 | Beta crystallin B3 |
| P22914 | 44,94 | 69 | 21,0 | 6,89 | 942,76 | Beta crystallin S (Gamma crystallin S) |
| P62161 | 22,15 | 18 | 16,8 | 4,22 | 61,36 | Calmodulin |
| P27824 | 6,93 | 48 | 67,5 | 4,60 | 309,28 | Calnexin precursor (Major histocompatibility complex binding protein p88) |
| P27797 | 18,94 | 52 | 48,1 | 4,44 | 316,98 | Calreticulin precursor (CRP55) |
| P17612 | 3,70 | 27 | 40,6 | 8,79 | 36,31 | cAMP-dependent protein kinase |
| Q8NET6 | 3,81 | 13 | 38,9 | 10,55 | 0,00 | Carbohydrate sulfotransferase 13 |
| P00918 | 28,85 | 66 | 29,2 | 7,40 | 471,14 | Carbonic anhydrase 2 |
| O75828 | 35,02 | 7 | 30,8 | 6,18 | 33,98 | Carbonyl reductase (NADPH-dependent carbonyl red |
| P12271 | 13,88 | 13 | 36,5 | 5,05 | 31,19 | Cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) |
| P29762 | 38,69 | 72 | 15,6 | 5,38 | 643,58 | Cellular retinoic acid-binding protein 1 |
| Q92674 | 11,11 | 6 | 86,7 | 8,76 | 0,00 | Centromere protein I (CENP-I) |
| Q9NWW5 | 10,61 | 28 | 35,9 | 8,87 | 20,85 | Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 6 |
| Q00610 | 4,36 | 6 | 191,5 | 5,69 | 20,19 | Clathrin heavy chain 1 (CLH-17) |

Tab. 6C: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| <u>ID</u> | <u>Seq. Abd.</u> | <u>Anz. Peptide</u> | <u>MW [kDa]</u> | <u>kalk. pI</u> | <u>Score</u> | <u>Proteinname/Kurzbeschreibung</u> |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|--|
| P09497 | 5,68 | 17 | 25,2 | 4,64 | 0,00 | Clathrin light chain B (Lcb) |
| O43809 | 13,22 | 4 | 26,2 | 8,82 | 22,99 | Cleavage and polyadenylation specificity factor 5 |
| P00488 | 5,74 | 3 | 83,2 | 6,09 | 0,00 | Coagulation factor XIII A chain precursor |
| P12277 | 52,23 | 175 | 42,6 | 5,59 | 762,27 | Creatine kinase B-type |
| Q9Y697 | 2,63 | 9 | 50,2 | 8,31 | 0,00 | Cysteine desulfurase |
| P99999 | 10,48 | 13 | 11,7 | 9,57 | 72,80 | Cytochrome c |
| P14854 | 56,98 | 15 | 10,2 | 7,05 | 37,42 | Cytochrome c oxidase subunit VIb isoform 1 |
| Q7Z5Q1 | 7,20 | 6 | 65,9 | 7,81 | 0,00 | Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein |
| P09622 | 9,04 | 4 | 54,1 | 7,68 | 25,20 | Dihydrolipoyl dehydrogenase |
| Q16555 | 19,41 | 33 | 62,3 | 6,38 | 43,14 | Dihydropyrimidinase-related protein 2 |
| Q9H4B8 | 25,82 | 12 | 53,7 | 7,96 | 0,00 | Dipeptidase 3 precursor |
| Q96PD2 | 3,23 | 35 | 85,0 | 7,17 | 0,00 | Discoidin |
| P45985 | 10,53 | 41 | 44,3 | 8,07 | 0,00 | Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4) |
| Q13561 | 7,23 | 4 | 44,2 | 5,21 | 0,00 | Dynactin subunit 2 (Dynactin complex 50 kDa subunit) |
| Q9UQ16 | 7,68 | 7 | 96,6 | 8,22 | 0,00 | Dynamamin-3 (Dynamamin, testicular) (T-dynamamin) |
| Q6XZF7 | 3,17 | 9 | 177,2 | 5,39 | 23,98 | Dynamamin-binding protein (Scaffold protein Tuba) |
| P63167 | 12,36 | 4 | 10,4 | 7,40 | 24,62 | Dynein light chain 1, cytoplasmic |
| P30040 | 11,49 | 6 | 29,0 | 7,31 | 33,16 | Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor |
| P14625 | 7,97 | 15 | 92,4 | 4,84 | 21,48 | Endoplasmin precursor (Heat shock protein 90 beta m) |
| P84090 | 10,58 | 5 | 12,3 | 5,92 | 20,26 | Enhancer of rudimentary homolog |
| Q9UBC2 | 6,94 | 4 | 94,2 | 5,11 | 22,64 | Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 |
| P05198 | 11,75 | 6 | 36,1 | 5,08 | 0,00 | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 |
| Q86XX4 | 4,72 | 14 | 442,6 | 5,59 | 0,00 | Extracellular matrix protein FRAS1 precursor |

Tab. 6D: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| ID | Seq. Abd. | Anz. Peptide | MW [kDa] | kalk. pI | Score | Proteinname/Kurzbeschreibung |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|---|
| Q96ME1 | 5,34 | 4 | 88,3 | 8,32 | 0,00 | F-box/LRR-repeat protein 18 |
| Q9P2Q2 | 6,35 | 12 | 113,9 | 8,88 | 0,00 | FERM domain-containing protein 4A |
| Q6ZUT3 | 1,68 | 47 | 81,6 | 7,90 | 0,00 | FERM domain-containing protein 7 |
| Q9Y4F1 | 4,02 | 5 | 118,6 | 8,15 | 0,00 | FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein |
| P02794 | 8,20 | 28 | 21,2 | 5,55 | 74,24 | Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit) |
| P02792 | 8,57 | 10 | 20,0 | 5,78 | 69,15 | Ferritin light chain (Ferritin L subunit) |
| P21802 | 5,97 | 3 | 92,0 | 5,88 | 0,00 | Fibroblast growth factor receptor 2 precursor |
| P20930 | 38,09 | 229 | 434,9 | 9,25 | 26,72 | Filaggrin |
| P04075 | 41,21 | 83 | 39,4 | 8,09 | 530,27 | Fructose-bisphosphate aldolase A |
| P09972 | 53,30 | 83 | 39,4 | 6,87 | 246,89 | Fructose-bisphosphate aldolase C |
| P09382 | 39,26 | 33 | 14,7 | 5,50 | 176,00 | Galectin-1 (Putative MAPK-activating protein MP12) |
| P17931 | 18,80 | 6 | 26,2 | 8,56 | 21,73 | Galectin-3 (Mac-2 antigen) (IgE-binding protein) |
| P09104 | 45,39 | 63 | 47,2 | 5,03 | 879,98 | Gamma-enolase (Neuron-specific enolase) |
| O76070 | 25,20 | 5 | 13,3 | 4,86 | 24,42 | Gamma-synuclein (Breast cancer-specific gene 1 protein) |
| P06396 | 9,97 | 22 | 85,6 | 6,28 | 75,76 | Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor) (ADP) |
| Q9NQX3 | 7,20 | 9 | 79,7 | 5,43 | 27,77 | Gephyrin |
| P14136 | 32,41 | 228 | 49,8 | 5,52 | 864,11 | Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) |
| P06744 | 2,69 | 1 | 63,1 | 8,32 | 23,60 | Glucose-6-phosphate isomerase |
| P14314 | 4,55 | 10 | 59,4 | 4,41 | 109,43 | Glucosidase 2 subunit beta precursor |
| P00367 | 21,33 | 51 | 61,4 | 7,80 | 131,52 | Glutamate dehydrogenase 1 |
| P15104 | 18,77 | 54 | 42,0 | 6,89 | 188,54 | Glutamine synthetase |
| P09211 | 40,00 | 33 | 23,3 | 5,64 | 253,81 | Glutathione S-transferase P |
| P04406 | 28,36 | 88 | 36,0 | 8,46 | 965,47 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |

Tab. 6E: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| <u>ID</u> | <u>Seq. Abd.</u> | <u>Anz. Peptide</u> | <u>MW [kDa]</u> | <u>kalk. pI</u> | <u>Score</u> | <u>Proteinname/Kurzbeschreibung</u> |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|--|
| P35573 | 3,59 | 10 | 174,7 | 6,76 | 29,35 | Glycogen debranching enzyme |
| Q92896 | 0,93 | 7 | 134,5 | 6,92 | 0,00 | Golgi apparatus protein 1 precursor |
| P62873 | 22,35 | 16 | 37,4 | 6,00 | 49,80 | Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta (Transducin beta chain 1) |
| P11488 | 9,71 | 16 | 40,0 | 5,62 | 220,55 | Guanine nucleotide-binding protein G(t), alpha-1 subunit (alpha-1 chain) |
| P63244 | 11,67 | 4 | 35,1 | 7,69 | 0,00 | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like |
| Q9HAV0 | 18,53 | 3 | 37,5 | 6,00 | 29,85 | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 4 (Transducin beta chain 4) |
| Q96PP8 | 6,14 | 4 | 66,6 | 5,55 | 0,00 | Guanylate-binding protein 5 (GTP-binding protein 5) |
| P08107 | 19,19 | 100 | 70,0 | 5,66 | 464,12 | Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70.1) |
| P34931 | 14,51 | 41 | 70,3 | 6,02 | 242,76 | Heat shock 70 kDa protein 1L |
| P11142 | 32,66 | 121 | 70,9 | 5,52 | 481,07 | Heat shock cognate 71 kDa protein |
| P07900 | 8,88 | 12 | 84,6 | 5,02 | 34,43 | Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86) |
| P04792 | 13,17 | 12 | 22,8 | 6,40 | 75,21 | Heat-shock protein beta-1 (Heat shock 27 kDa protein) |
| O14558 | 40,00 | 17 | 17,1 | 6,40 | 34,45 | Heat-shock protein beta-6 (Heat-shock 20 kDa-like protein) |
| P69905 | 21,83 | 19 | 15,2 | 8,68 | 407,96 | Hemoglobin subunit alpha |
| P68871 | 36,73 | 11 | 16,0 | 7,28 | 30,40 | Hemoglobin subunit beta |
| P09651 | 27,96 | 126 | 38,8 | 9,23 | 403,21 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) |
| P31943 | 6,01 | 7 | 49,2 | 6,30 | 46,70 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H) |

Tab. 6F: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| <u>ID</u> | <u>Seq. Abd.</u> | <u>Anz. Peptide</u> | <u>MW [kDa]</u> | <u>kalk. pI</u> | <u>Score</u> | <u>Proteinname/Kurzbeschreibung</u> |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|---|
| P22626 | 24,65 | 276 | 37,4 | 8,95 | 734,81 | Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP B1) |
| P07910 | 3,59 | 7 | 33,6 | 5,08 | 20,41 | Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (hnRNP C2) |
| P09429 | 19,07 | 27 | 24,9 | 5,74 | 51,91 | High mobility group protein B1 (High mobility group protein B1) |
| P26583 | 25,36 | 27 | 24,0 | 7,81 | 149,86 | High mobility group protein B2 (High mobility group protein B2) |
| P17096 | 41,12 | 64 | 11,7 | 10,32 | 571,02 | High mobility group protein HMG-I/HMG-Y (HMG-I/Y) |
| Q96KK5 | 14,84 | 15 | 13,9 | 10,89 | 155,65 | Histone H2A type 1-H |
| Q8IUE6 | 17,69 | 2 | 14,0 | 10,89 | 42,04 | Histone H2A type 2-B |
| Q99880 | 34,13 | 38 | 13,9 | 10,32 | 119,54 | Histone H2B type 1-L (H2B.c) (H2B/c) |
| Q8N257 | 34,13 | 39 | 13,9 | 10,32 | 135,04 | Histone H2B type 3-B (H2B type 12) |
| Q6NXT2 | 6,67 | 16 | 15,2 | 11,11 | 19,87 | Histone H3-like |
| P62804 | 44,66 | 89 | 11,4 | 11,36 | 703,77 | Histone H4 |
| Q15011 | 2,81 | 3 | 43,7 | 5,25 | 23,52 | Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resistance domain member 1 protein |
| Q86YZ3 | 31,79 | 233 | 282,2 | 10,04 | 817,96 | Hornerin |
| P42858 | 5,76 | 11 | 347,6 | 6,20 | 0,00 | Huntingtin (Huntington disease protein) |
| P01834 | 48,11 | 6 | 11,6 | 5,87 | 31,06 | Ig kappa chain C region |
| Q969P0 | 11,09 | 21 | 65,0 | 8,00 | 22,81 | Immunoglobulin superfamily member 8 precursor |
| Q12906 | 12,30 | 120 | 95,3 | 8,76 | 0,00 | Interleukin enhancer-binding factor 3 (Nuclear factor- κ B inhibitor 3) (cells 90 kDa) |
| Q17R60 | 7,03 | 18 | 89,3 | 4,89 | 76,17 | Interphotoreceptor matrix proteoglycan 1 precursor |
| P10745 | 12,27 | 31 | 135,3 | 5,11 | 60,88 | Interphotoreceptor retinoid-binding protein precursor |

Tab. 6G: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| ID | Seq. Abd. | Anz. Peptide | MW [kDa] | kalk. pI | Score | Proteinname/Kurzbeschreibung |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|--|
| P78385 | 12,98 | 27 | 54,2 | 5,40 | 129,04 | Keratin type II cuticular Hb3 |
| Q15323 | 10,10 | 14 | 47,2 | 4,92 | 72,55 | Keratin, type I cuticular Ha1 |
| P13645 | 16,53 | 229 | 59,5 | 5,21 | 1300,35 | Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin-10) |
| P35527 | 49,44 | 680 | 62,1 | 5,30 | 8138,97 | Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) |
| P04264 | 47,98 | 854 | 66,0 | 8,12 | 5402,06 | Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) |
| Q7Z794 | 11,46 | 188 | 61,7 | 5,85 | 371,56 | Keratin, type II cytoskeletal 1b (Keratin-77) |
| P35908 | 24,19 | 125 | 65,8 | 8,00 | 322,28 | Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2) |
| P19013 | 5,99 | 11 | 57,2 | 6,61 | 44,18 | Keratin, type II cytoskeletal 4 (Cytokeratin-4) |
| P13647 | 11,36 | 71 | 62,4 | 8,06 | 114,08 | Keratin, type II cytoskeletal 5 (Cytokeratin-5) |
| P04259 | 14,18 | 78 | 60,0 | 8,00 | 119,45 | Keratin, type II cytoskeletal 6B (Cytokeratin-6B) |
| Q15058 | 5,89 | 14 | 186,4 | 7,91 | 21,91 | Kinesin-like protein KIF14 |
| P00338 | 13,25 | 3 | 36,7 | 8,27 | 36,84 | L-lactate dehydrogenase A chain |
| P14174 | 7,83 | 7 | 12,5 | 7,88 | 29,89 | Macrophage migration inhibitory factor (MIF) |
| P40925 | 9,58 | 11 | 36,4 | 7,36 | 37,41 | Malate dehydrogenase, cytoplasmic |
| P40926 | 47,63 | 86 | 35,5 | 8,68 | 641,04 | Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor |
| Q9BZ71 | 6,57 | 8 | 106,7 | 7,14 | 0,00 | Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein |
| Q13330 | 9,09 | 9 | 80,7 | 9,33 | 0,00 | Metastasis-associated protein MTA1 |
| P51608 | 10,08 | 7 | 52,4 | 9,95 | 35,37 | Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP-2 protein) |
| O60307 | 5,35 | 17 | 143,0 | 8,06 | 0,00 | Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase |
| Q96BX8 | 11,52 | 2 | 25,4 | 8,63 | 20,87 | Mps one binder kinase activator-like 2A |
| Q8IZD4 | 1,94 | 2 | 67,8 | 8,56 | 0,00 | mRNA decapping enzyme 1B |
| Q9NXH9 | 1,67 | 5 | 72,2 | 7,64 | 21,24 | N(2),N(2)-dimethylguanosine tRNA methyltransferase |
| P13592 | 6,83 | 25 | 83,7 | 4,87 | 88,69 | Neural cell adhesion molecule 1, 120 kDa isoform precursor |

Tab. 6H: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| ID | Seq. Abd. | Anz. Peptide | MW [kDa] | kalk. pI | Score | Proteinname/Kurzbeschreibung |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|--|
| P12036 | 3,51 | 20 | 112,4 | 6,05 | 21,60 | Neurofilament triplet H protein |
| P07197 | 5,35 | 18 | 102,4 | 4,91 | 21,60 | Neurofilament triplet M protein |
| Q14697 | 7,84 | 15 | 106,8 | 6,14 | 68,88 | Neutral alpha-glucosidase AB precursor |
| O94760 | 4,21 | 6 | 31,1 | 5,81 | 27,09 | NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 |
| Q9UK39 | 6,96 | 2 | 48,1 | 7,39 | 0,00 | Nocturnin (CCR4 protein homolog) |
| P62937 | 35,15 | 11 | 18,0 | 7,81 | 58,54 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (Cyclophilin A) |
| Q9BXM0 | 3,42 | 3 | 154,9 | 7,69 | 0,00 | Periaxin |
| P41219 | 4,68 | 37 | 53,6 | 5,47 | 49,29 | Peripherin |
| Q06830 | 16,58 | 7 | 22,1 | 8,13 | 69,79 | Peroxiredoxin-1 (Natural killer cell-enhancing factor |
| P32119 | 14,65 | 9 | 21,9 | 5,97 | 179,70 | Peroxiredoxin-2 (Natural killer cell-enhancing factor |
| P30041 | 23,66 | 15 | 25,0 | 6,38 | 86,38 | Peroxiredoxin-6 (Antioxidant protein 2) |
| P30086 | 59,89 | 33 | 21,0 | 7,53 | 255,39 | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP-1 |
| P00558 | 8,15 | 6 | 44,6 | 8,10 | 36,85 | Phosphoglycerate kinase 1 |
| P18669 | 29,53 | 61 | 28,8 | 7,18 | 233,33 | Phosphoglycerate mutase 1 |
| Q9UIW2 | 3,48 | 4 | 211,0 | 6,96 | 0,00 | Plexin-A1 precursor (Semaphorin receptor NOV) |
| Q9Y4D7 | 7,32 | 76 | 212,0 | 7,20 | 0,00 | Plexin-D1 precursor |
| Q15022 | 17,73 | 25 | 83,0 | 8,81 | 0,00 | Polycomb protein SUZ12 |
| Q16342 | 2,62 | 3 | 38,6 | 5,38 | 27,44 | Programmed cell death protein 2 (Zinc finger protein 1 |
| P25786 | 9,89 | 5 | 29,5 | 6,61 | 30,74 | Proteasome subunit alpha type 1 |
| O14818 | 5,65 | 2 | 27,9 | 8,46 | 25,01 | Proteasome subunit alpha type 7 |
| P30101 | 21,58 | 52 | 56,7 | 6,35 | 150,70 | Protein disulfide-isomerase A3 precursor |
| P07237 | 8,46 | 20 | 57,1 | 4,87 | 34,63 | Protein disulfide-isomerase precursor |
| Q99497 | 38,10 | 9 | 19,9 | 6,79 | 69,99 | Protein DJ-1 (Oncogene DJ1) |

Tab. 6I: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| ID | Seq. Abd. | Anz. Peptide | MW [kDa] | kalk. pI | Score | Proteinname/Kurzbeschreibung |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|---|
| Q5VVJ2 | 1,81 | 4 | 95,0 | 5,53 | 0,00 | Protein MYSM1 |
| Q9UFN0 | 10,93 | 6 | 28,4 | 9,16 | 72,68 | Protein NipSnap3A |
| Q99584 | 12,24 | 1 | 11,5 | 6,16 | 22,51 | Protein S100-A13 (S100 calcium-binding protein A13) |
| Q7Z5N4 | 4,79 | 9 | 241,9 | 6,38 | 0,00 | Protein sidekick-1 precursor |
| Q9Y2J8 | 1,80 | 6 | 75,5 | 5,59 | 28,07 | Protein-arginine deiminase type-2 |
| Q9UN74 | 5,49 | 8 | 102,2 | 5,08 | 0,00 | Protocadherin alpha 4 precursor (PCDH-alpha4) |
| P10911 | 4,32 | 3 | 107,6 | 6,01 | 0,00 | Proto-oncogene DBL (Proto-oncogene MCF-2) |
| Q9Y3Y4 | 8,59 | 29 | 45,1 | 6,87 | 24,28 | Pygopus homolog 1 |
| P14618 | 38,79 | 109 | 57,9 | 7,84 | 529,31 | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 |
| Q86VI3 | 2,76 | 6 | 184,4 | 7,49 | 0,00 | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3 |
| P61026 | 17,50 | 12 | 22,5 | 8,38 | 49,50 | Ras-related protein Rab-10 |
| Q6NYB7 | 28,29 | 15 | 22,7 | 6,21 | 49,50 | Ras-related protein Rab-1A |
| Q9H082 | 17,47 | 13 | 25,7 | 7,18 | 49,50 | Ras-related protein Rab-33B |
| Q5U316 | 16,42 | 12 | 23,0 | 8,29 | 49,50 | Ras-related protein Rab-35 |
| Q86YS6 | 17,92 | 15 | 23,3 | 5,64 | 49,50 | Ras-related protein Rab-43 |
| P20338 | 32,86 | 17 | 23,9 | 6,07 | 49,50 | Ras-related protein Rab-4A |
| Q8TDY2 | 5,02 | 17 | 182,9 | 5,41 | 0,00 | RB1-inducible coiled-coil protein 1 |
| O43353 | 12,41 | 3 | 61,2 | 7,09 | 21,26 | Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 containing interleukin-1 beta-converting enzyme-asso |
| P35243 | 12,00 | 16 | 23,1 | 5,16 | 51,13 | Recoverin (Cancer-associated retinopathy protein) |
| Q9UKL0 | 10,79 | 23 | 53,0 | 7,03 | 26,82 | REST corepressor 1 (Protein CoREST) |
| Q15293 | 21,45 | 10 | 38,9 | 5,00 | 61,75 | Reticulocalbin-1 precursor |
| Q9NQC3 | 5,12 | 23 | 129,9 | 4,50 | 76,96 | Reticulon-4 (Neuroendocrine-specific protein) (NSP) |
| P23921 | 9,34 | 10 | 90,0 | 7,15 | 0,00 | Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit |

Tab. 6J: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| <u>ID</u> | <u>Seq. Abd.</u> | <u>Anz. Peptide</u> | <u>MW [kDa]</u> | <u>kalk. pI</u> | <u>Score</u> | <u>Proteinname/Kurzbeschreibung</u> |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|---|
| Q5T8P6 | 8,84 | 9 | 113,5 | 9,16 | 0,00 | RNA-binding protein 26 (RNA-binding motif protein |
| P10523 | 42,72 | 101 | 45,1 | 6,57 | 1196,07 | S-arrestin (Retinal S-antigen) (48 kDa protein) |
| Q8WVM8 | 1,40 | 23 | 72,3 | 6,27 | 0,00 | Sec1 family domain-containing protein 1 (Syntaxin-binding protein 2) |
| Q13275 | 3,18 | 16 | 88,3 | 8,27 | 0,00 | Semaphorin-3F precursor (Semaphorin IV) |
| O95835 | 9,29 | 9 | 126,8 | 8,70 | 0,00 | Serine/threonine-protein kinase LATS1 |
| P02787 | 32,81 | 107 | 77,0 | 7,12 | 619,63 | Serotransferrin precursor (Transferrin) |
| P02768 | 45,65 | 232 | 69,3 | 6,28 | 1298,32 | Serum albumin precursor |
| Q9UJC5 | 15,89 | 2 | 12,3 | 6,71 | 20,56 | SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 2 associated SH3 domain-binding protein) |
| O43295 | 2,55 | 6 | 124,4 | 6,68 | 0,00 | SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3 |
| P62318 | 16,67 | 1 | 13,9 | 10,32 | 20,31 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 (snRNP core protein) |
| Q13126 | 15,19 | 3 | 31,2 | 7,18 | 22,46 | S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase |
| Q9UIG8 | 4,65 | 3 | 76,5 | 6,73 | 0,00 | Solute carrier organic anion transporter family member 10 |
| Q13813 | 7,93 | 23 | 284,4 | 5,35 | 70,38 | Spectrin alpha chain, brain |
| Q07955 | 18,15 | 9 | 27,7 | 10,36 | 20,05 | Splicing factor, arginine/serine-rich 1 |
| P84103 | 14,02 | 6 | 19,3 | 11,65 | 23,60 | Splicing factor, arginine/serine-rich 3 |
| Q16629 | 9,66 | 5 | 27,4 | 11,82 | 22,68 | Splicing factor, arginine/serine-rich 7 (Splicing factor 7) |
| P38646 | 10,75 | 24 | 73,6 | 6,16 | 158,97 | Stress-70 protein, mitochondrial precursor |
| Q15772 | 1,68 | 2 | 348,7 | 8,32 | 26,70 | Striated muscle preferentially expressed protein kinase |
| Q8NDV3 | 1,70 | 12 | 143,8 | 7,66 | 0,00 | Structural maintenance of chromosomes protein 1B |
| P31040 | 4,67 | 4 | 72,6 | 7,39 | 25,18 | Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1 |
| P00441 | 9,09 | 4 | 15,9 | 6,13 | 28,03 | Superoxide dismutase [Cu-Zn] |
| P04179 | 22,97 | 21 | 24,7 | 8,25 | 245,75 | Superoxide dismutase [Mn] |

Tab. 6K: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| ID | Seq. Abd. | Anz. Peptide | MW [kDa] | kalk. pI | Score | Proteinname/Kurzbeschreibung |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|--|
| P78371 | 3,18 | 27 | 57,5 | 6,46 | 20,75 | T-complex protein 1 subunit beta (TCP-1-beta) |
| Q9UNS1 | 1,32 | 11 | 138,5 | 5,38 | 0,00 | Timeless homolog (hTIM) |
| Q04725 | 1,08 | 4 | 79,8 | 6,62 | 0,00 | Transducin-like enhancer protein 2 (ESG2) |
| Q7Z5M5 | 6,81 | 10 | 125,8 | 9,22 | 0,00 | Transmembrane channel-like protein 3 |
| Q9Y2B1 | 1,81 | 2 | 51,1 | 8,32 | 0,00 | Transmembrane protein 5 |
| P60174 | 57,83 | 98 | 26,7 | 6,90 | 439,28 | Triosephosphate isomerase |
| P68366 | 35,27 | 79 | 49,9 | 5,06 | 551,33 | Tubulin alpha-1 chain (Alpha-tubulin 1) |
| Q6P9V9 | 37,47 | 103 | 50,1 | 5,06 | 619,95 | Tubulin alpha-2 chain (Alpha-tubulin 2) |
| Q9H4B7 | 10,86 | 19 | 50,3 | 5,17 | 26,23 | Tubulin beta-1 chain |
| Q13885 | 37,30 | 75 | 49,9 | 4,89 | 367,56 | Tubulin beta-2A chain |
| P68371 | 29,66 | 79 | 49,8 | 4,89 | 418,70 | Tubulin beta-2C chain (Tubulin beta-2 chain) |
| Q13509 | 20,44 | 68 | 50,4 | 4,93 | 362,25 | Tubulin beta-3 chain (Tubulin beta-III) |
| Q9BUF5 | 19,96 | 27 | 49,8 | 4,88 | 31,39 | Tubulin beta-6 chain |
| Q9Y6Q6 | 6,01 | 12 | 66,0 | 5,34 | 0,00 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1 |
| P47985 | 2,92 | 8 | 29,6 | 8,32 | 20,28 | Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit |
| P31930 | 10,83 | 5 | 52,6 | 6,37 | 27,42 | Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core prote |
| P22695 | 7,73 | 5 | 48,4 | 8,63 | 24,31 | Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core prote |
| P62991 | 50,00 | 97 | 8,6 | 7,25 | 313,37 | Ubiquitin |
| Q8TEY7 | 7,01 | 7 | 106,7 | 6,02 | 0,00 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 33 |
| P09936 | 19,73 | 8 | 24,8 | 5,48 | 73,68 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 |
| Q86TY3 | 7,62 | 5 | 84,1 | 4,34 | 0,00 | Uncharacterized protein C14orf37 precursor |
| Q96MK2 | 5,90 | 3 | 66,1 | 6,25 | 0,00 | Uncharacterized protein C20orf175 |
| Q96LK0 | 7,36 | 1 | 19,2 | 5,35 | 22,62 | Uncharacterized protein C3orf34 |

Tab. 6L: Auflistung der identifizierten Retinaproteine

| ID | Seq. Abd. | Anz. Peptide | MW [kDa] | kalk. pI | Score | Proteinname/Kurzbeschreibung |
|-----------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------|--|
| Q6ZUB1 | 1,52 | 7 | 157,0 | 9,10 | 21,51 | Uncharacterized protein C9orf79 |
| Q96EU6 | 7,34 | 3 | 29,8 | 10,17 | 25,45 | UPF0399 protein C6orf153 |
| Q8N6Y0 | 8,53 | 11 | 76,0 | 5,80 | 27,36 | USH1C-binding protein 1 (Usher syndrome type-1C protein 1) |
| P38606 | 1,94 | 8 | 68,3 | 5,52 | 26,68 | Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A |
| P08670 | 41,20 | 492 | 53,6 | 5,12 | 1500,53 | Vimentin |
| Q8IX03 | 4,04 | 37 | 125,2 | 5,85 | 36,71 | WW domain-containing protein 1 |
| Q6P9A3 | 7,66 | 10 | 74,4 | 8,54 | 0,00 | Zinc finger protein 549 |
| Q8N184 | 6,33 | 2 | 71,5 | 9,25 | 22,99 | Zinc finger protein 567 |
| Q5HYK9 | 7,21 | 4 | 70,1 | 9,73 | 28,83 | Zinc finger protein 667 |

Abb. 1 Exemplarische Darstellung des Resultats einer Fraktionierung eines Peptidgemisches mittels ZipTip. Der erfasste Messbereich erstreckt sich jeweils von 1000-1700Da. **A-D** Peptidfraktionen, die mittels eines ansteigenden Lösungsmittelgradienten generiert wurden. **(A)** 10% ACN; **(B)** 20% ACN; **(C)** 35% ACN; **(D)** 60% ACN.

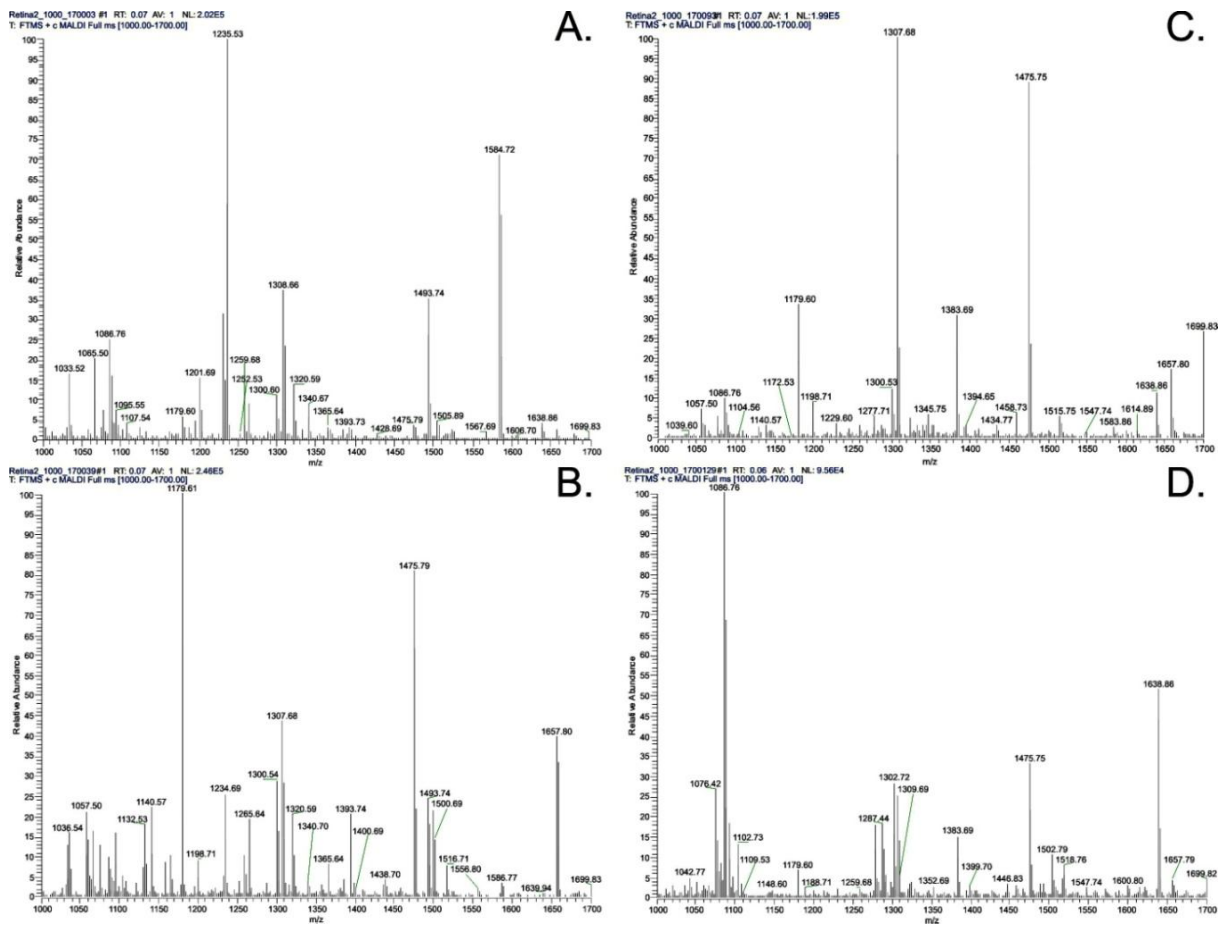


Abb. 2: Dargestellt sind die Box-und-Whisker Plots für die ermittelten IgG/A/M Titer in den Serum- und Kammerwasserproben (**A,B**). Auf der Y-Achse ist jeweils die normalisierte Intensität aufgetragen, auf der X-Achse die beiden Patientengruppen (CTRL, POAG). Die beiden Patientengruppen sind jeweils vergleichend gegenübergestellt. Der Signifikanztest (Post-hoc, Tukey HSD) für die Seruntiter ergab einen P-Wert von 0,9; der des Kammerwassers einen von 0,6.

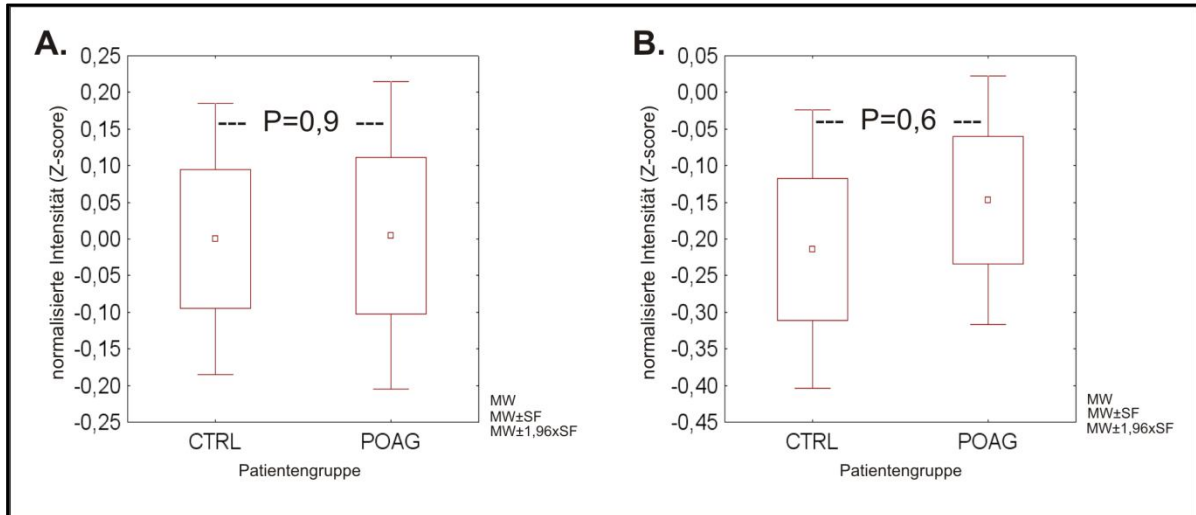


Abb. 3: Whisker-Plots für die 10 Serum-Autoantikörper mit den stärksten Gruppenunterschieden ($P \leq 0,05$). Auf der Y-Achse ist jeweils die normalisierte Intensität dargestellt, auf der X-Achse die beiden Gruppen. A-J: Whisker Plot für anti- α -1-Antitrypsin (A); anti- α -Fodrin (B); anti-Annexin V (C); anti- β -L-Crystallin (D); anti-GFAP (E); anti-HSP27 (F); anti-HSP70 (G); anti-MBP (H); anti-Protein Kinase C Inhibitor (I) und anti-Ubiquitin (J).

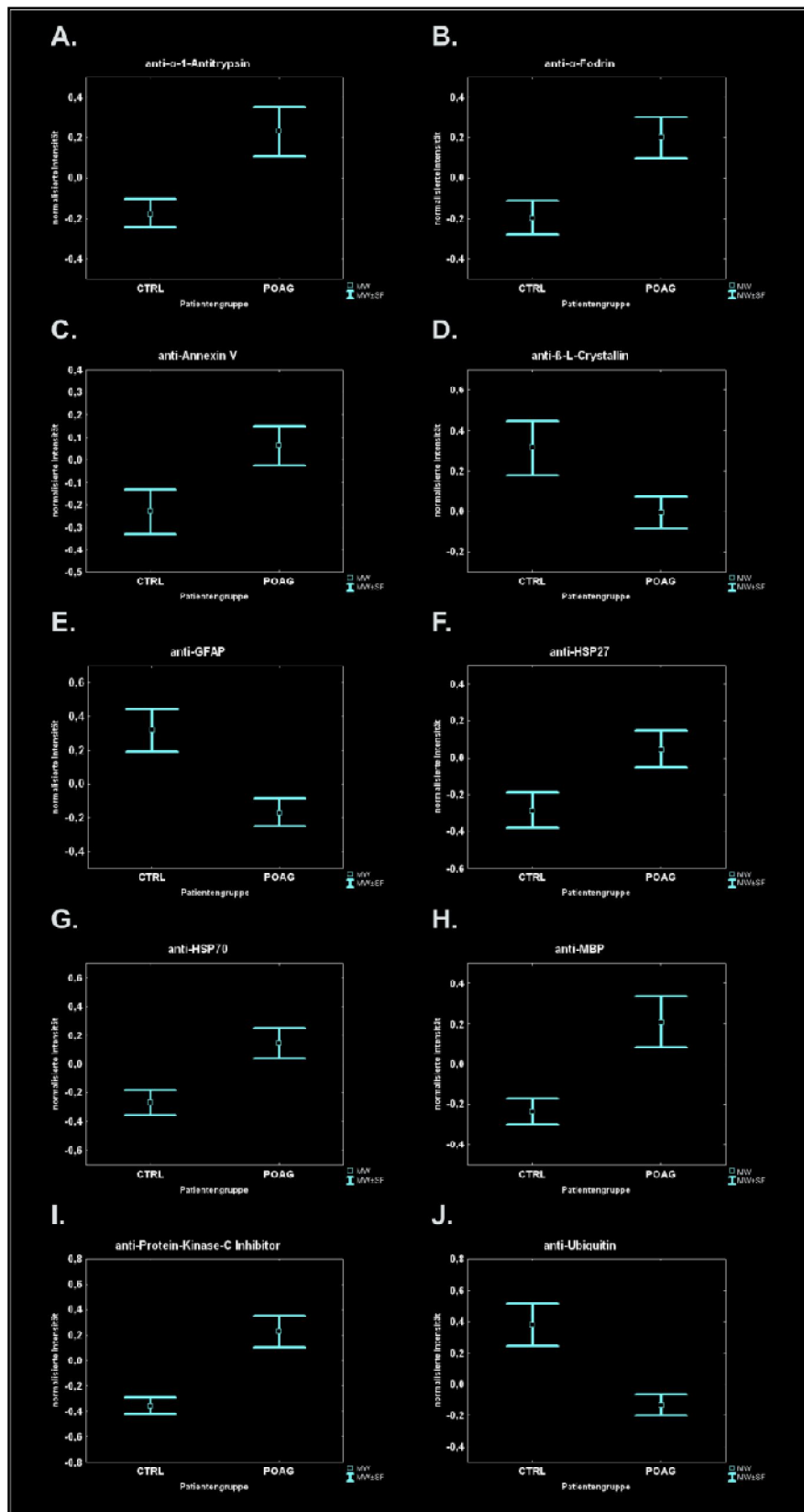


Abb. 4: Übersichtsprofil der pro Gruppe gemittelten Kammerwasser-Intensitätswerte. Auf der Y-Achse sind die normalisierten Intensitäten aufgetragen, auf der X-Achse die im Versuch eingesetzten Antigene. Die blaue Linie repräsentiert die Kontrollgruppe (CTRL), die rote Linie die Glaukomgruppe (POAG).

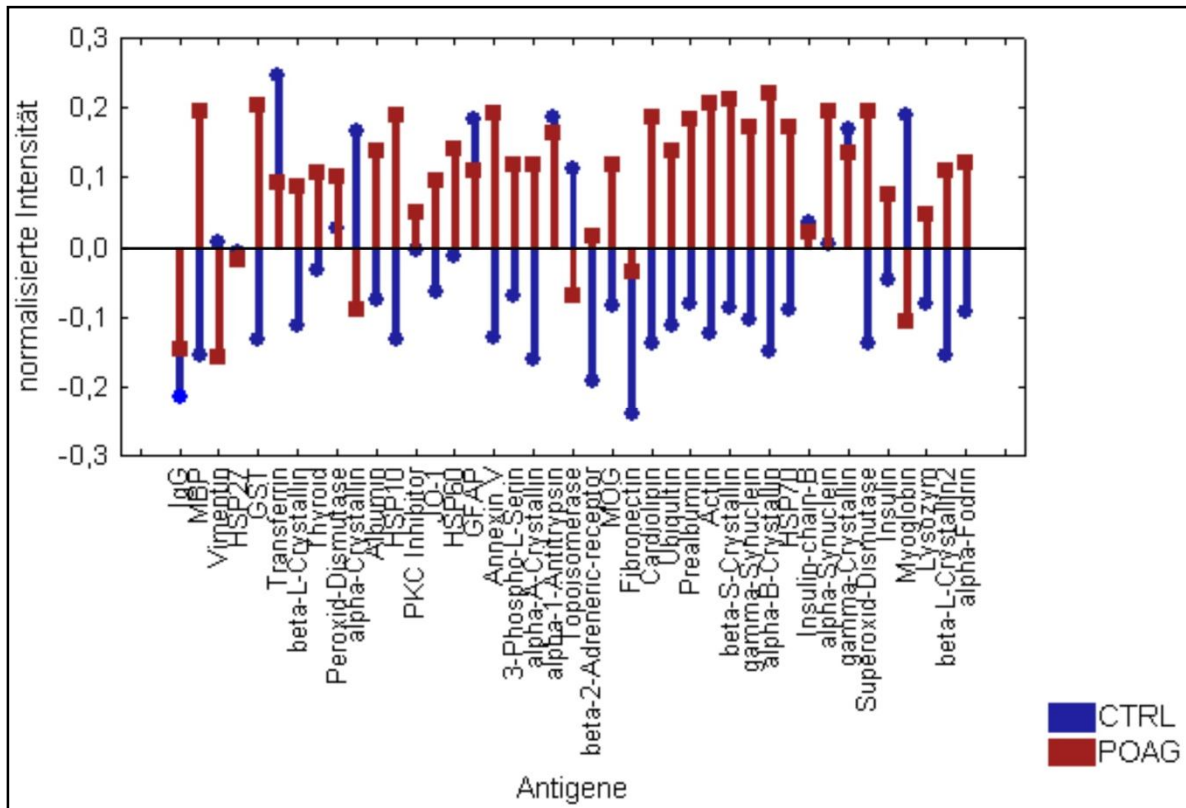


Abb. 5: Whisker-Plots für die 10 Kammerwasser-Autoantikörper mit den stärksten Gruppenunterschieden ($P \leq 0,05$). Auf der Y-Achse ist jeweils die normalisierte Intensität dargestellt, auf der X-Achse die beiden Gruppen. **A-H:** Whisker Plot für anti-Actin (**A**); anti- α -A-Crystallin (**B**); anti-Annexin V (**C**); anti- β -S-Crystallin (**D**); anti-Cardiolipin (**E**); anti-HSP10 (**F**); anti-GST (**G**) und anti-MBP (**H**).

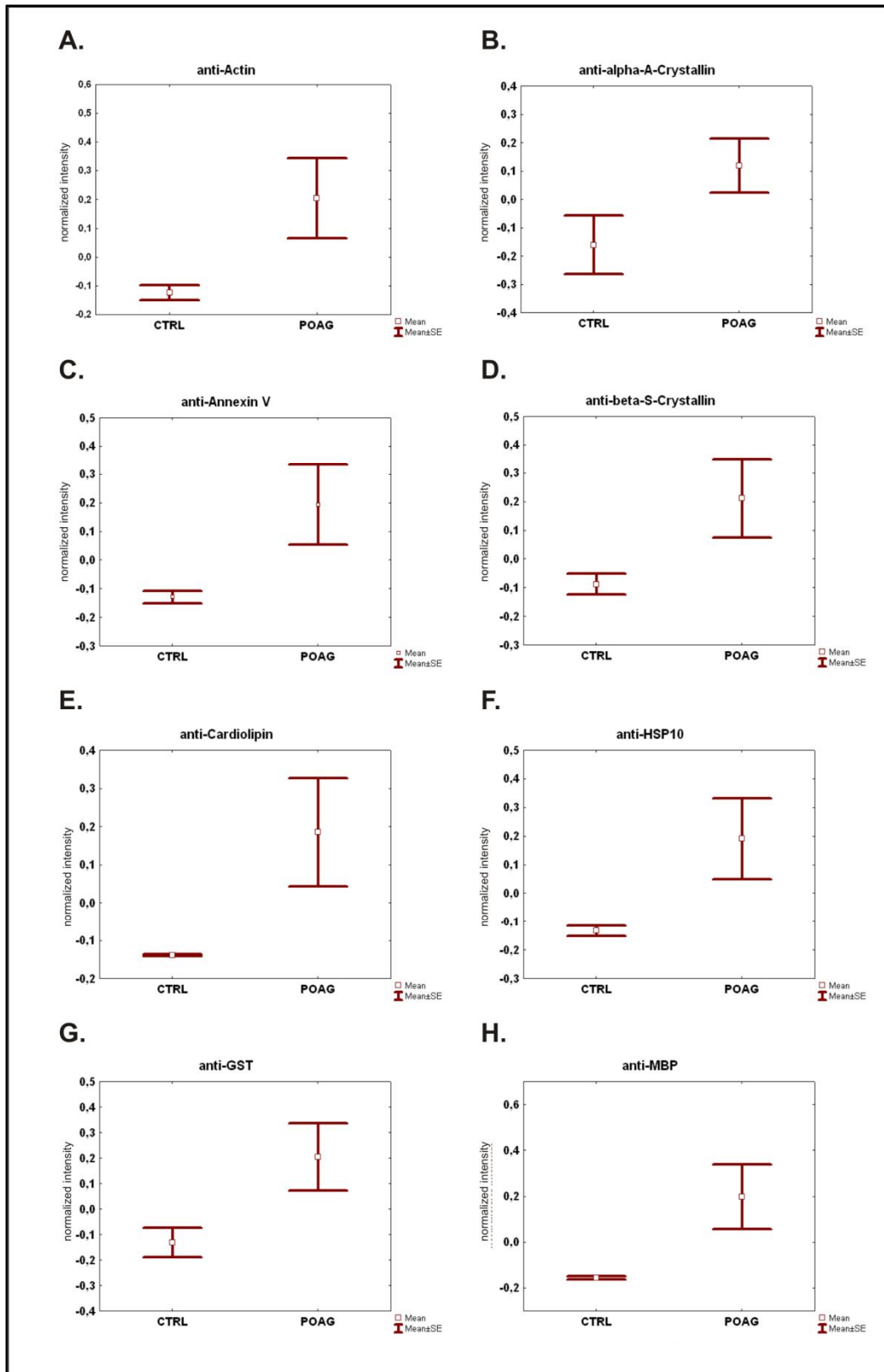


Abb. 6: Whisker-Plots für Serumproteine die einen signifikanten Gruppenunterschied zeigten ($P \leq 0,05$). Auf der Y-Achse ist jeweils die normalisierte Intensität dargestellt, auf der X-Achse die beiden Gruppen. Whisker Plot: α -Fodrin (A); β -Tubulin (B); C3/3b (C); C6 (D); GFAP (E); HSP10 (F); HSP60 (G); HSP90 (H); IL-1 β (I); IL-8 (J); Lox 1 (K); Lysozym (L); MBP (M) und Optineurin (N).

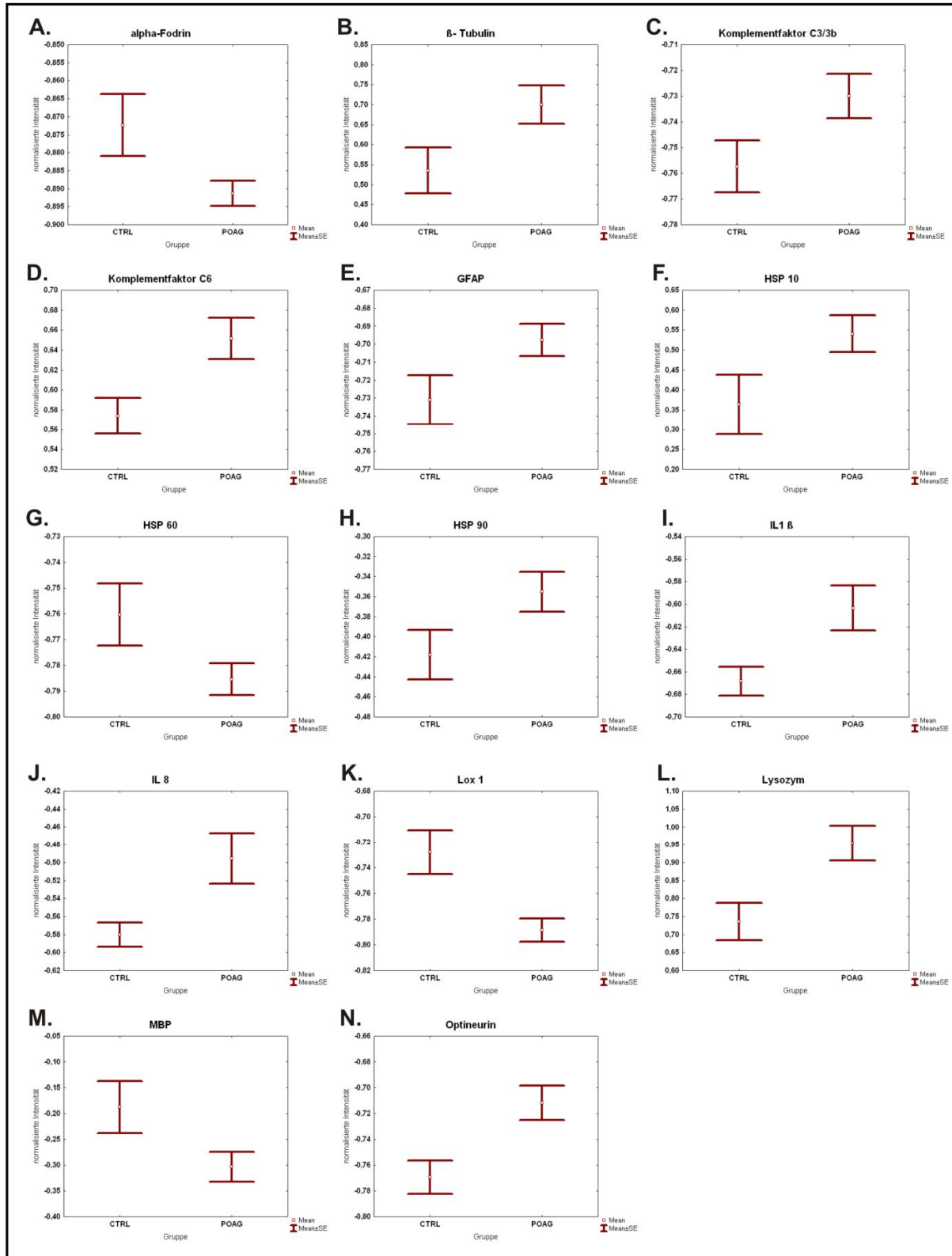


Abb. 7: Whisker-Plots für Retinaproteine die einen signifikanten Gruppenunterschied zeigten ($P \leq 0,05$). Auf der Y-Achse ist jeweils die normalisierte Intensität dargestellt, auf der X-Achse die beiden Gruppen. Whisker Plot: C1r (A); C3/3b (B); C6 (C); Cystatin (D); HSP90 (E); IBA1 (F); IL-1 β (G); IL-6 (H); Interferon- γ (I); Lipocalin 1 (J); Lox 1 (K); MBP (L); beta-2-Microglobulin (M); Optineurin (N) und TNF- α (O).

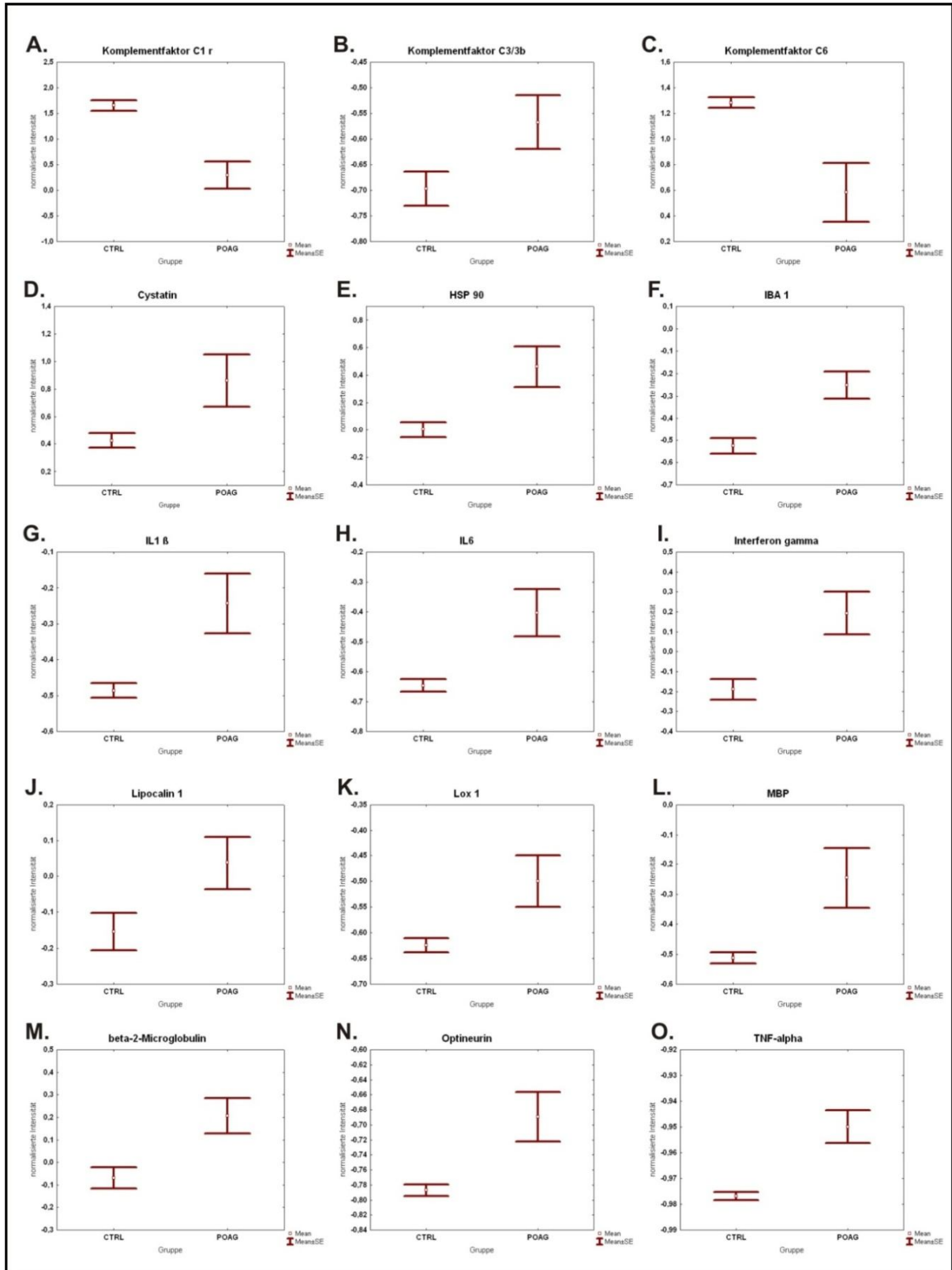


Abb. 8: Auswertung der Funktionsanalyse identifizierter Retinaproteine. Für jede funktionale Gruppe sind der Name sowie der prozentuale Anteil an der Gesamtheit der für die Datenbankauswertung verwendeten Proteine dargestellt. **(A)** Funktionsanalyse aller identifizierten Retinaproteine; **(B)** Analyse der in Glaukopatienten erhöht vorliegenden Proteine; **(C)** Analyse der Proteine die bei Glaukopatienten in geminderter Menge vorliegen.

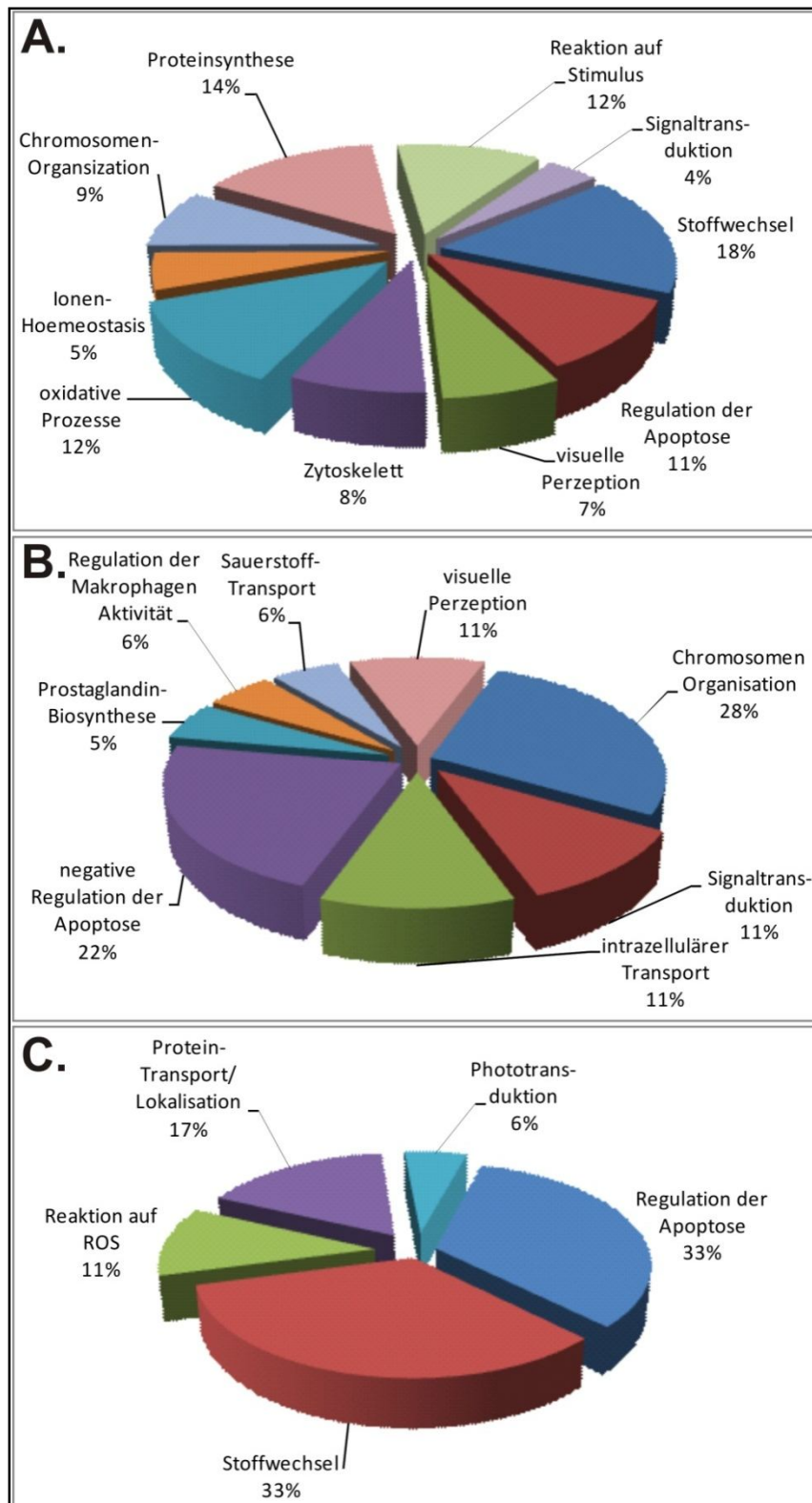
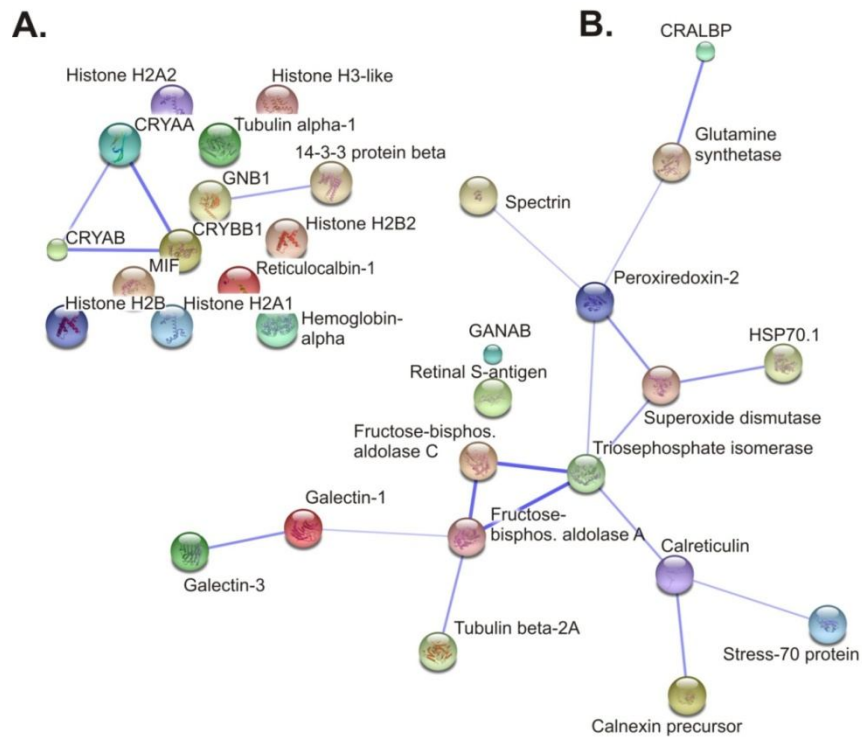


Abb. 9: Analyse von Protein-Protein-Interaktionen für bei Glaukompatienten erhöht vorliegende Proteine (**A**) und für solche, die in geminderter Menge vorlagen (**B**). Jeder Kreis symbolisiert ein Protein, jede Linie eine funktionale Verbindung, wobei die Stärke der Linie für die Stärke der Verbindung steht.



9 Abkürzungen

Im Folgenden sind im Text verwendete Abkürzungen alphabetisch aufgelistet:

| | |
|------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µJ | Mikrojoule |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| 2D | zweidimensional |
| 3D | dreidimensional |
| 2DGE | zweidimensionale Gelelektrophorese |
| Abb. | Abbildung |
| ABP | Actin bindendes Protein |
| AN | engl. <i>accession number</i> |
| ANC | Acetonitril |
| ANOVA | engl. <i>analysis of variance</i> |
| Anz. | Anzahl |
| AS | Aminosäure |
| AUC | engl. <i>area under curve</i> |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| Bit | engl. <i>binary digit</i> |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| CDR | engl. <i>complementary determining region</i> |
| CHCS | α-Cyano-4-Hydroxymzimtsäure |
| CID | engl. <i>collision induced dissociation</i> |
| CSV | engl. <i>comma separated value</i> |
| CTRL | Kontrollprobe/gruppe |
| CV | engl. <i>coefficient of variability</i> |
| Cy | Cyanin |
| Da | Dalton |
| DNA | Desoxyribonekleinsäure |
| dsDNA | doppelsträngige Desoxyribonekleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| e | Elementarladung |
| EAM | Energie absorbierendes Molekül |
| EGS | engl. <i>European glaucoma society</i> |

Abkürzungen

| | |
|----------------------|---|
| EGPS | engl. <i>European glaucoma prevention study</i> |
| E_{kin} | kinetische Energie |
| ELISA | engl. <i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i> |
| ESI | engl. <i>electrospray-ionization</i> |
| eV | Elektronenvolt |
| Fab | engl. <i>fragment of antigen binding</i> |
| Fc | engl. <i>constant fragment</i> |
| FWMH | engl. <i>full width at half maximum</i> |
| g | Schwerebeschleunigung |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase |
| GFAP | saures Gliafaserprotein |
| GO | Gene Ontology Consortium |
| GST | Gluthation-S-Transferase |
| h | Stunde |
| HCD | engl. <i>higher-energy collision induced dissociation</i> |
| H_2O_{HPLC} | H_2O der höchsten Reinheitsstufe ($\geq 99,98\%$) |
| HPLC | engl. <i>high pressure liquid chromatographie</i> |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| HTML | engl. <i>hypertext markup language</i> |
| ICAT | engl. <i>isotope-coded affinity tags</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IOD | intraokularer Druck |
| ICAT | engl. <i>isotope-coded affinity tags</i> |
| ICPL™ | engl. <i>isotope coded protein label</i> |
| iTRAQ | engl. <i>isobaric tag for relative and absolute quantitation</i> |
| kDa | Kilodalton |
| L | Flugstrecke |
| LTQ | engl. <i>linear trap quadrupole</i> |
| m | Masse |
| M | Mol |
| MALDI | engl. <i>matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i> |
| MANOVA | engl. <i>multivariate analysis of variance</i> |
| MAK | Membranangriffskomplex |
| MBP | Myelin basisches Protein |

Abkürzungen

| | |
|-----------------------------|--|
| MD | Median |
| MES | 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure |
| MHC | engl. <i>major histocompatibility complex</i> |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| min | Minute |
| MS | Massenspektrometrie |
| MS/MS | Tandemmassenspektrometrie |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| MW | Mittelwert |
| m/z | Masse-Ladungs-Verhältnis |
| N | Anzahl |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| nl | Nanoliter |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickoxid |
| NSE | engl. <i>neuron specific enolase</i> |
| NTG | Normaldruckglaukom |
| OHT | okulare Hypertension |
| O ₂ ⁻ | Hyperoxid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| pH | Potenz der Hydrogenionen |
| pl | Pikoliter |
| P ² M | Proteomics Pipeline Mainz |
| PMF | engl. <i>peptide mass fingerprint</i> |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| POAG | primäres Offenwinkelglaukom |
| ppm | engl. <i>parts per million</i> |
| PSD | engl. <i>post source decay</i> |
| PTM | posttranslationale Modifikationen |
| RGC | retinale Ganglienzelle |
| ROC | engl. <i>receiver operating characteristic</i> |
| ROS | engl. <i>reactive oxygen species</i> |
| RPE | retinales Pigmentepithel |
| rpm | engl. <i>rounds per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |

Abkürzungen

| | |
|------------------|---|
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SELDI | engl. <i>surface enhanced laser desorption ionization</i> |
| SF | Standardfehler |
| SILAC | engl. <i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i> |
| S/N | Signal-Rausch-Verhältnis |
| s.o. | siehe oben |
| s.u. | siehe unten |
| t | Flugzeit |
| Tab. | Tabelle |
| TCR | T-Zell Rezeptor |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TIFF | engl. <i>tagged information file format</i> |
| TNF- β | engl. <i>tumor necrosis factor beta</i> |
| T _{reg} | regulatorische T-Zellen |
| U | Beschleunigungsspannung |
| u.a. | unter anderem |
| v | Geschwindigkeit |
| V | Volt |
| WHO | engl. <i>world health organization</i> |
| xml | engl. <i>extensible markup language</i> |
| z | Ionenladung |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

10 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Zur Anfertigung wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet. Die Stellen, die aus anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat.“

Mainz, den 26.04.2010