

# Untersuchung des Wirkmechanismus neuroprotektiver Autoantikörper auf retinale Ganglienzellen

Dissertation zur Erlangung des Grades „Doktor der  
Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der Johannes-  
Gutenberg-Universität in Mainz

Von

Corina Wilding

Geb. am 21.03.1986 in Frankenthal

Mainz, Februar 2015

Dekan: Prof. Dr. H. Zischler

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2016

## **Anmerkungen**

Teile der Dissertation wurden auf Kongressen vorgestellt sowie in Fachzeitschriften veröffentlicht.

## **Veröffentlichungen und Beiträge auf Konferenzen**

### **Veröffentlichungen**

K. Bell., **C. Wilding**, S. Funke, Norbert Pfeiffer, Franz H. Grus “Protective effect of 14-3-3 antibodies on stressed neuroretinal cells via the mitochondrial apoptosis pathway”, (Revision bei BMC Ophthalmology, 2015)

**C. Wilding**, K. Bell. S. Funke, S. Beck, Norbert Pfeiffer, Franz H. Grus: “GFAP antibodies show protective effect on oxidatively stressed neuroretinal cells via interaction with ERP57”, (Angenommen am 3.02.2015 im Journal of Pharmacological Science)

**C. Wilding**, K. Bell, S. Beck, S. Funke, N. Pfeiffer, F. H. Grus: „ $\gamma$ -Synuclein Antibodies Have Neuroprotective Potential on Neuroretinal Cells via Proteins of the Mitochondrial Apoptosis Pathway“, PlosOne (2014)

K. Bell, O. W. Gramlich, N. Von Thun Und Hohenstein-Blaul, S. Beck, S. Funke, **C. Wilding**, N. Pfeiffer, F. H. Grus: „Does autoimmunity play a part in the pathogenesis of glaucoma?“, Progress in Retinal and Eye Research 36 (2013) 199-216

O. W Gramlich, K. Bell, N.von Thun Und Hohenstein-Blaul, **C. Wilding**, S. Beck, N. Pfeiffer and F.H. Grus: „Autoimmune biomarkers in glaucoma patients“, Current Opinion in Pharmacology 2013, 13:90–97

### **Veröffentlichungen in Vorbereitung**

**C. Wilding**, K. Bell, S. Funke, N. Perumal, D. Wolters, Norbert Pfeiffer, Franz H. Grus, “Protective effects of antibodies on retinal ganglion cells in a adult retina organ culture”

### **Vorträge auf Kongressen**

**C. Wilding**, K. Bell, N. Pfeiffer, F.H. Grus: “Protective effect of  $\gamma$ - synuclein antibody on stressed retinal ganglion cells”, ARVO, Ft Lauderdale, FL, USA 2011

**C. Wilding**, K. Bell, N. Pfeiffer, F.H. Grus: “Changed antibodies of glaucoma patients have protective potential for retinal ganglion cells under oxidative stress”, 109. Kongress der deutschen Ophthalmologischen gesellschaft, Berlin 2011

## Posterbeiträge auf Kongressen

**C. Wilding**, K. Bell, S. Funke, N. Pfeiffer, F.H. Grus: "Effect of  $\gamma$ - synuclein antibody on RGC5 and mitochondrial apoptosis pathways", ARVO, Ft Lauderdale, FL, USA 2012

**C. Wilding**, K. Bell, S. Funke, N. Pfeiffer, F.H. Grus: " $\gamma$ - synuclein antibody effects mitochondrial apoptosis pathways of RGC5 cells", Optic Nerv degeneration and ageing, Obergurgl, Österreich 2012

**C. Wilding**, K. Bell, S. Beck, S. Funke, N. Pfeiffer, F.H. Grus: "Protective effect of GFAP antibody on RGC5 cells via actin cytoskeleton pathways", ARVO, Seattle, Washington 2013

**C. Wilding**, K. Bell, S. Funke, N. Pfeiffer, F.H. Grus: "GFAP antibodies effect actin cytoskeleton pathway of RGC5 cells and have prosurvival potential against oxidative stress", 111. Kongress der deutschen Ophthalmologischen gesellschaft, Berlin 2013

**C. Wilding**, K. Bell, S. Funke, N. Pfeiffer, F.H. Grus: "GFAP antibodies interact with ERP57 on the cell membrane of RGC5 cells and have prosurvival potential against oxidative stress", Annual Meeting of the IAK Molecular and Cellular Neurobiology, Mainz 2013

**C. Wilding**, K. Bell, S. Funke, N. Pfeiffer, F.H. Grus: "GFAP antibodies interact with ERP57 on the cell membrane of RGC5 cells and have prosurvival potential against oxidative stress", ARVO, Orlando, 2014



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	XII
Tabellenverzeichnis .....	XIV
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Sinnesorgan Auge .....	1
1.1.2 Aufbau der Retina .....	2
1.2. Glaukom .....	4
1.2.1 Glaukomformen .....	4
1.2.2 Pathogenese des Glaukoms .....	5
1.3 Immunsystem .....	6
1.3.2 Immunprivileg des Auges .....	8
1.3.1 Autoimmunität .....	9
1.3.3 Autoimmunität im Rahmen der Glaukompathogenese .....	10
1.4 Theorie der protektiven Autoimmunität .....	12
1.5 Herunterregulierte Antikörper identifiziert in Glaukompatienten .....	15
1.5.1 $\gamma$ -synuclein Ak .....	15
1.5.2 14-3-3 Ak .....	16
1.5.3 GFAP Ak .....	16
1.7 Modelle zur Untersuchung von retinalen Fragestellungen .....	17
1.7.1 Kultivierung von RGC5 .....	17
1.7.2 Retinale Organkultur .....	18
1.8 Massenspektrometrische Untersuchung als Tool zur Analyse von Signalwegen .....	19
1.8.1 Massenspektrometrie .....	20
1.8.2 Micoarray .....	23
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>24</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungen .....	26
3.2 Geräte und Software .....	31
3.3 Kultivierung RGC5 .....	32
3.4 Massenspektrometrische Untersuchung von Ak behandelten RGC5 .....	33

3.4.1 Zellyse .....	33
3.4.2 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA) Kit.....	33
3.4.3 Protein Auftrennung mittels eindimensionaler Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D SDS-Page) .....	34
3.4.4 Protein Verdau im Gel.....	35
3.4.5 Proteinaufreinigung mittels C18 ZipTip Spitzen .....	36
3.4.6 Protein Identifikation mittels HPLC/ESI MS.....	36
3.4.7 Daten Auswertung.....	37
3.5 Validierung der LC/ESI MS Ergebnisse mittels Antikörper-Mikroarray .....	38
3.5.1 Labeling der Zellysatproteine mittels Cy3.....	39
3.5.2 Herstellung und Inkubation der Ak-Mikroarray .....	39
3.5.3 Datenauswertung .....	39
3.6 Immunhistologische Untersuchung der Ak-Bindung an RGC5.....	40
3.7 Identifikation von GFAP Ak Interaktionspartner .....	43
3.7.1 2D-Gelelektrophorese .....	43
3.7.2 Westernblot.....	44
3.7.3 Immundetektion.....	45
3.7.4 Identifikation von 2D Spots mittels Maldi TOF/TOF .....	45
3.7.5 Validierung von GFAP Ak Interaktionspartnern mittels Antigen-Microarray sowie immunhistologischen Färbungen .....	46
3.8 Retinale Organkultur aus den Schwein .....	47
3.8.1 Präparation der Retina/Pigmentepithels.....	47
3.8.2 Histologische Bearbeitung der Retinakultur .....	50
3.8.3 Immunhistologische Färbung der Retinakultur .....	50
3.8.4 Tunel Assay .....	51
3.8.5 Auswertung der histologisch gefärbten Retinaexplantate .....	52
3.9 Untersuchung des Effektes von Ak auf retinale Explantate .....	52
3.9.1 Massenspektrometrische Analyse der mit Ak inkubierten Retinaexplantate .....	53
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1 Proteomanalyse Ak behandelter RGC5 .....	54
4.1.1 Effekt von $\gamma$ -synuclein-Ak auf Signalwege in RGC5.....	54
4.1.2 Effekt von 14-3-3 Ak auf Signalwege in RGC5 .....	56
4.1.3 Effekt von GFAP-Ak auf Signalwege in RGC5 .....	58

4.2 Untersuchung der Aufnahme/Bindung von Ak behandelten RGC5 .....	59
4.2.1 Aufnahme von $\gamma$ -synuclein Ak in RGC5 .....	60
4.2.2 Aufnahme von 14-3-3 Ak in RGC5 .....	61
4.2.3 Bindung von GFAP Ak an die Zellmembran von RGC5 .....	63
4.3 Etablierung einer retinalen Organkultur aus dem adulten Hausschwein .....	66
4.4 Effekt von Ak auf retinale Organkultur .....	69
4.4.1 Quantifizierung von RGZ sowie TUNEL positive RGZ .....	69
4.5 Massenspektrometrische Analyse von Ak behandelte retinaler Organkultur .	70
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>74</b>
5.1 Effekt von Ak auf intrazelluläre Signalwege von RGC5 .....	74
5.1.1 Einfluss von $\gamma$ -synuclein Ak auf Proteine des intrinsischen sowie extrinsischen Apoptose Signalweges .....	74
5.1.2 Einfluss von 14-3-3 Ak auf Proteine des mitochondrialen Apoptoseweges	79
5.1.3 Einfluss von GFAP Ak auf Proteine des Aktin-Zytoskeletts .....	80
5.1.4 Korrelation mit glaukomatösen pathophysiologischen Ereignissen .....	83
5.2 Ak Aufnahme/Bindung in RGC5 .....	84
5.2.1 Aufnahme von 14-3-3 Ak und $\gamma$ -synuclein Ak in RGC5 .....	84
5.2.2 Bindung von GFAP Ak an die Zellmembran von RGC5 .....	84
5.3 Etablierung einer retinalen Organkultur aus dem Schwein .....	86
5.3.1 Effekt von Ak auf retinale Organkultur des Schweines .....	87
5.3.2 Einfluss von Ak auf Müllerzellen .....	88
5.3.3 Verminderte Stressantwort in Ak behandelten Retinaexplantaten .....	89
5.3.4 Rolle von mitochondrialer Dysfunktion in ER-Stress induzierter Apoptose	92
5.4 Hypothese der Funktion von verminderten Autoantikörperreaktionen in Glaukopatienten .....	93
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>7. Fazit und Ausblick .....</b>	<b>96</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>108</b>
<b>10. Eidesstaatliche Erklärung .....</b>	<b>135</b>



**Abkürzungen**

ACN	Acetonitril
AIF	Apoptose induzierter Faktor
Ak	Antikörper
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
Aqua dest	Aqua destilliert
ARP 2/3	Actin regulated protein 2/3
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-antagonist of cell death
BAX	Bcl-2-associated- X-protein
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BCA	Bicichoninic Acid
BIRC6	baculoviral IAP repeat-containing 6
BSA	Bovine serum albumin
Bsp	Beispiel
bzw	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CDS	Cell dissociation solution
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
CID	Collision induced dissociation

C <sub>H</sub>	Constant <sub>Heavy</sub>
C <sub>L</sub>	Constant <sub>Light</sub>
DCF	2',7'-Dichlorfluorescin
DCFH	2',7'-Dichlorfluorescin (2',7'- Dichlordihydrofluorescin)
DCFH-DA	2',7'-Dichlorfluorescin-diacetat (2',7'- Dichlordihydrofluorescin-diacetat)
DD	Death domain
DDM	Dodecyl-D-β-Maltosid
Dest	Destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithithreitol
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	Elektrospray Ionisation
FCS	Fetal calve serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fox	Forkhead-Box protein
GABA	γ-Aminobuttersäure
GCL	Ganglion cell layer (Ganglienzellschicht)

GFAP	Glial fibrillary acid protein (saures Gliafaserprotein)
HE	Hämatoxilin-Eosin
HPLC	High performance liquid chromatography
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hsp	Hitzschockprotein
IAA	Iodacetamid
IAP	Inhibitor of Apoptosis
Ig	Immunglobulin
ILM	Inner limiting membrane
INL	Inner nuclear layer (innere Körnerzellschicht)
IOP	Intraocular pressur (Augeninnendruck)
IPA	Ingenuity pathway analysis
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPL	Inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht)
JNK	C-JunN-terminal kinase
kDa	Kilodalton
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/ Ionisation
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute

ml	Milliliter
mol	Mol
mM	Millimol
NAC	Non-A-beta-component
NACP	Non-A-beta-component-precursor
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NTG	Normal tension glaucom (Normaldruckglaukom)
OFL	Optic Fiber Layer
ONL	Outer nuclear layer, (äußere Körnerzellschicht)
OPL	Outer plexiform layer (Äußere plexifome Schicht)
PBS	Phosphate buffered saline
P-ERK	Phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase
PEX	Pseudoexfoliationsglaukom
PFA	Paraformaldehyd
PK	Phosphorylase kinase
POAG	Primary open angle glaucoma (primäres Offenwinkelglaukom)
PRAF2	PRA1 domain family, member 2
PRS	Photorezeptorschicht
RGZ	Retinale Ganglienzellen

RPE	Retinales Pigmentepithel
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
sek	Sekundär
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Stab	Standardabweichung
T	Tween-20
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of flight
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tunel	Terminal <b>T</b> ransferase mediated d <b>U</b> TP <b>N</b> ick <b>E</b> nd <b>L</b> abeling
UPR	Unfolded protein response
UV	Ultraviolett
VDAC	Voltage dependent anion channel
V <sub>H</sub>	Variabel <sub>Heavy</sub>
V <sub>L</sub>	Variabel <sub>Light</sub>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Aufbau des Auges und Querschnitt der Retina nach HE Färbung	3
<b>Abbildung 2:</b>	Schematischer Aufbau eines Antikörpers	8
<b>Abbildung 3:</b>	Antikörperprofile gegen Sehnerv-Antigene verschiedener Glaukomformen	11
<b>Abbildung 4:</b>	Viabilität und ROS-Level von $\gamma$ -synuclein Ak behandelten und mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gestressten RGC5	14
<b>Abbildung 5:</b>	Schematischer Aufbau einer LTQ-Orbitrap XL	21
<b>Abbildung 6:</b>	Schematischer Versuchsaufbau zur Identifizierung von veränderten Signalwegen mittels massenspektrometrischer Analyse	38
<b>Abbildung 7:</b>	Graphische Darstellung des Versuchsablaufes zur Identifizierung von veränderten Proteinen mittels Microarray	40
<b>Abbildung 8:</b>	Präparation der retinale Organkultur	49
<b>Abbildung 9:</b>	Schematischer Aufbau der 5 Tage Retinakultur sowie der immunhistologischen Auswertung der retinalen Explantaten	52
<b>Abbildung 10:</b>	Regulation von Proteinen des mitochondrialen Apoptose Signalweges in $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 identifiziert mittels LTQ-Orbitrap XL	55
<b>Abbildung 11:</b>	Regulation von Proteinen des mitochondrialen Apoptose Signalweg in $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 identifiziert mittels Microarray	56
<b>Abbildung 12:</b>	Regulation von Proteinen des mitochondrialen Apoptose Signalweges in 14-3-3 Ak behandelten RGC5 mittels LTQ-Orbitrap XL	57
<b>Abbildung 13:</b>	Regulation von Proteinen des Apoptose Signalweg in 14-3-3 Ak behandelten RGC5 mittels Microarray	58
<b>Abbildung 14:</b>	Regulation von Proteinen des Aktin Zytoskelett Signalweges in GFAP Ak behandelten RGC5 mittels LTQ Orbitrap XL	59
<b>Abbildung 15:</b>	Expression von $\gamma$ -synuclein in RGC5	60
<b>Abbildung 16:</b>	$\gamma$ -synuclein Ak Aufnahme in RGC5	61
<b>Abbildung 17:</b>	Expression von 14-3-3 in RGC5	62
<b>Abbildung 18:</b>	14-3-3 Ak Aufnahme in RGC5	63
<b>Abbildung 19:</b>	Expression von GFAP in RGC5	64
<b>Abbildung 20:</b>	Identifikation von GFAP Ak Interaktionspartnern mittels Westernblot und Microarray	65
<b>Abbildung 21:</b>	Kolokalisation von GFAP Ak und ERP57 an der Zellmembran von RGC5	66
<b>Abbildung 22:</b>	Immunhistologische Färbung von RGZ und TUNEL positiven Zellen an verschiedenen Kultivierungstagen	67

<b>Abbildung 23:</b> Beginnende Degeneration der Photorezeptorzellen am 3. Kultivierungstag	68
<b>Abbildung 24:</b> Quantifizierung von RGZ sowie TUNEL positive Zellen an verschiedenen Kultivierungstagen	69
<b>Abbildung 25:</b> Effekt verschiedener Ak auf retinale Explantate	70
<b>Abbildung 26:</b> Massenspektrometrische Analyse des Effektes von GFAP Ak auf retinale Explantate	71
<b>Abbildung 27:</b> Massenspektrometrische Analyse des Effektes von 14-3-3 Ak auf retinale Explantate	72
<b>Abbildung 28:</b> Massenspektrometrische Analyse von $\gamma$ -synuclein Ak behandelten Retinaexplantaten	73
<b>Abbildung 29:</b> Schematischer Aufbau des apoptotischen Signalweges.	76
<b>Abbildung 30:</b> Darstellung von veränderten Proteinen des mitochondrialen Apoptoseweges in 14-3-3 und $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5	80
<b>Abbildung 31:</b> Veränderte Proteine des Aktin Zytoskelett Signalweges in GFAP Ak behandelten RGC5	82
<b>Abbildung 32:</b> Validierung des Effektes von $\gamma$ -synuclein Ak auf mitochondriale apoptotische Signalwege mittels Microarray	123
<b>Abbildung 33:</b> Validierung des Effektes von 14-3-3 Ak auf mitochondriale apoptotische Signalwege mittels Microarray	124
<b>Abbildung 34:</b> Validierung des Effektes von GFAP Ak auf Proteine des Aktin Zytoskeletts mittels Microarray.	125

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Chemikalienliste .....	26
<b>Tabelle 2:</b> Lösungen.....	27
<b>Tabelle 3:</b> Geräte.....	31
<b>Tabelle 4:</b> Software .....	32
<b>Tabelle 5:</b> Peptidaufräufreinigung mittel C18 ZipTip Spitzen.....	36
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht der immunhistologischen Färbung zum Nachweis der Expression von 14-3-3, GFAP und $\gamma$ -synuclein .....	41
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht der immunhistologischen Färbung zur Untersuchung der Ak Aufnahme .....	42
<b>Tabelle 8:</b> Geräteeinstellung der isoelektrischen Fokussierung .....	44
<b>Tabelle 9:</b> Übersicht der verschiedenen Inkubationsschritte zur Immundetektion von GFAP Ak Interaktionspartner.....	45
<b>Tabelle 10:</b> Übersicht der immunhistologischen Färbung der Kollokalisierung von ERP57 und GFAP Ak .....	47
<b>Tabelle 11:</b> Inkubationsschritte der immunhistologischen Färbung von BRN3a.....	51
<b>Tabelle 12:</b> Signifikant veränderte Proteine in $\gamma$ -synuclein Ak inkubierten RGC5 ..	108
<b>Tabelle 13:</b> Signifikant veränderte Proteine in 14-3-3 Ak behandelten RGC5.....	114
<b>Tabelle 14:</b> Signifikant veränderte Proteine in GFAP Ak behandelten RGC5 .....	120
<b>Tabelle 15:</b> Signifikant veränderte Proteine in 14-3-3 Ak behandelten Retinaexplantaten.....	125
<b>Tabelle 16:</b> Signifikant veränderte Proteine in GFAP Ak behandelten Retinaexplantaten.....	128
<b>Tabelle 17:</b> Signifikant veränderte Proteine von $\gamma$ -synuclein Ak behandelten Retinaexplantaten.....	131



# 1. Einleitung

## 1.1 Sinnesorgan Auge

Glaukom, im Volksmund auch als grüner Star bekannt, ist eine Sammelbezeichnung für eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen Augenerkrankungen, die mit einem Verlust von retinalen Ganglienzellen (RGZ) und deren Axone einhergehen. Dies führt zu Ausfällen des Gesichtsfeldes bis hin zur Blindheit [1]. Zum besseren Verständnis der Entstehung und Pathogenese von Glaukom Erkrankungen wird das Sinnesorgan Auge näher beschrieben.

Das Auge ist ein lichtempfindliches, paariges Sinnesorgan, das elektromagnetische Wellen des Lichtes in Nervenimpulse umwandelt und es uns ermöglicht unsere Umwelt visuell wahrzunehmen. Der Augapfel (*Bulbus oculi*) besteht aus 3 Schichten: Die äußere Augenhaut (*Tunica fibrosa bulbi*), die sich aus der Lederhaut (Sclera) und der Hornhaut (*Cornea*) zusammensetzt, die mittlere Augenhaut (*Tunica vasculosa bulbi*), die aus Aderhaut (*Choroidiae*), Ziliarkörper und Iris besteht, sowie die innere Augenhaut (*Tunica interna bulbi*), die von der Netzhaut (*Retina*) gebildet wird. Die Lederhaut ist eine weiße Schicht, die den Augapfel fast vollständig umschließt. Sie dient als Schutz und zur Formgebung und geht im vorderen Bereich in die gefäßfreie Hornhaut über. Die Hornhaut bildet vor der Linse und der Iris eine glasklare Kuppel. Sie ist stark lichtbrechend und stellt zusammen mit der Linse das optische System dar. Am hinteren Pol des Auges bildet die Sklera eine siebförmige Platte (*Lamina cribrosa*), durch die der Sehnerv das Augeninnere verlässt. Zwischen Retina und Sklera befindet sich die gefäßreiche Aderhaut, die die mittlere Augenhaut bildet. Sie setzt sich im vorderen Bereich in Ziliarkörper und Regenbogenhaut (*Iris*) fort und ist verantwortlich für die Versorgung der Photorezeptorzellen und des Pigmentepithels (RPE). Die innere Augenhaut wird von der Retina gebildet, welche das Augeninnere auskleidet und für die Lichtwahrnehmung verantwortlich ist. In der Retina stellen die retinalen Ganglienzellen (RGZ) ein Bindeglied zwischen Photorezeptoren und den bildverarbeitenden Gehirnbereichen dar. Sie erhalten ihre Informationen von den Bipolarzellen, die wiederum Signale von den erregten Photorezeptorzellen erhalten [2]. Im vorderen Bereich des Auges befinden sich die Augenkammern. Es wird

zwischen der vorderen Augenkammer, die sich zwischen der Iris und der Hornhaut befindet und der kleineren, hinteren Augenkammer unterschieden. Diese wird begrenzt von der Iris, dem vorderen Teil des Glaskörpers und der Linse. Gefüllt sind die Augenkammern mit Kammerwasser, welches sich hauptsächlich aus Elektrolyten, Eiweißen und Zucker zusammensetzt [3]. Das Kammerwasser dient der Versorgung der Linse und der Hornhaut und stabilisiert durch den hydrostatischen Druck, der durch Kammerwasserproduktion und Abfluss entsteht, das Auge. Produziert wird es durch den Ziliarkörper, der sich im hinteren Teil der hinteren Augenkammer befindet. Von hier aus kann das Kammerwasser durch einen kleinen Spalt zwischen Linse und Iris in die vordere Augenkammer gelangen. Von der vorderen Augenkammer kann das Kammerwasser im Kammerwinkel, der von der Hornhaut und der Iris gebildet wird, über den Schlemmschenkanal abfließen. Durch diesen Kanal wird das Kammerwasser in die Blutbahn abgeführt [4]. Die Regulation des Kammerwassers findet im Schlemmchenkanal über muskelverwandte Trabekelmaschenwerkszellen statt. Beteiligt an der visuellen Wahrnehmung unserer Umwelt ist die Retina, die für die Umwandlung von optischen Signalen in elektrische Impulse verantwortlich ist und diese an den Sehnerven weiterleitet. Der Sehnerv, der aus den Axonen der RGZ gebildet wird, leitet die Informationen weiter an den visuellen Cortex des Zwischenhirns wo sie verarbeitet werden können. Im nächsten Abschnitt wird der Aufbau der Retina im Detail erläutert.

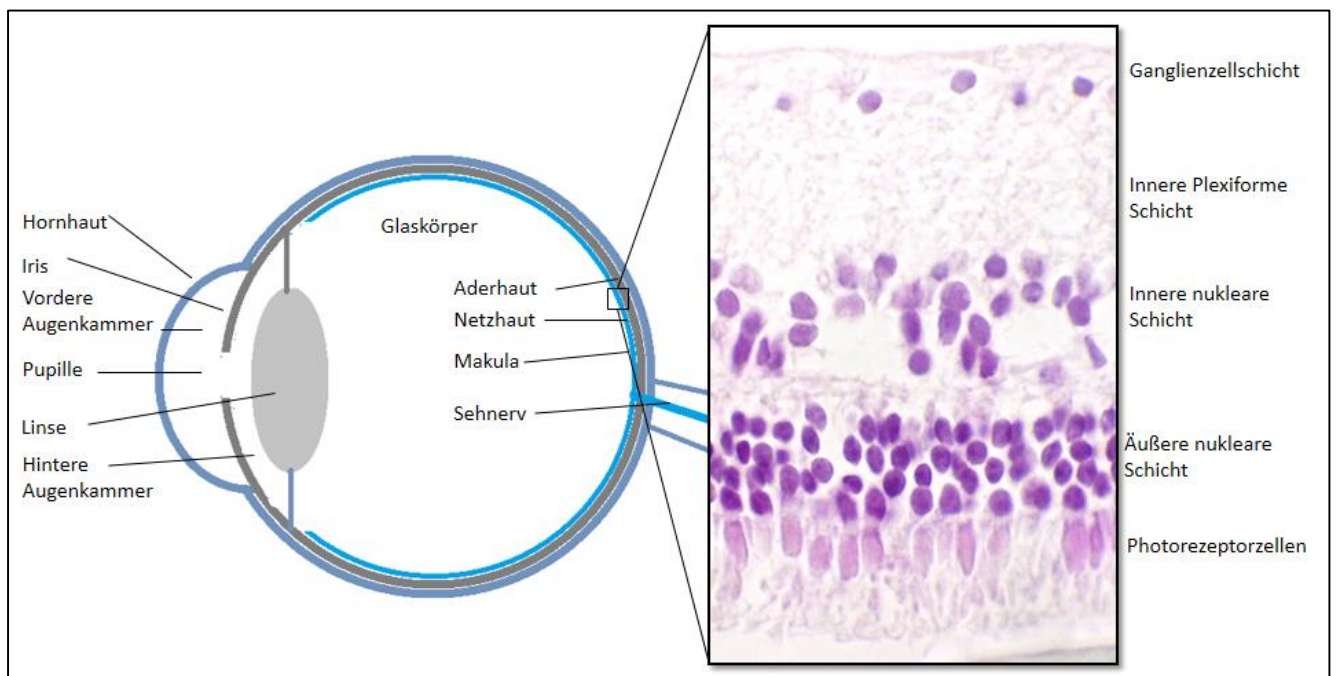
### 1.1.2 Aufbau der Retina

Die Retina ist der sensorische Bereich, der das Innere des Augapfels auskleidet. Sie lässt sich im Querschnitt von außen nach innen in folgende Schichten einteilen, die in Abbildung 1 nochmal verdeutlicht werden:

Die äußerste Schicht stellt das **RPE** dar. Sie grenzt die Retina von der Aderhaut ab und enthält viele Melanin reiche Melanosomen. Ihre Aufgabe besteht darin die Reflektion des einfallenden Lichtes zu verhindern. Des Weiteren befinden sich apikal des RPE Mikrovillifortsätze, die die Photorezeptorzellen umschließen und somit die Photorezeptorzellen versorgen [5].

In der **Photorezeptorschicht** (PRS) befinden sich die Innensegmente und Außensegmente der Stäbchen und Zapfen, wobei im Außensegment die Lichtwahrnehmung stattfindet. Dort transformieren die Photorezeptorzellen das einfallende Licht in elektrische Signale. Daran schließt die **äußere Grenzmembran** (Membrana limitans externa) an.

Die **äußere nukleare Schicht** beinhaltet die Zellkörper der Photorezeptorzellen. Danach folgt die **äußere plexiforme Schicht**. Sie ist das Bindeglied zwischen Photorezeptorzellen, Dendriten der Bipolarzellen und Horizontalzellen. Darauf folgt die **innere nukleare Schicht**. Diese enthält die Zellkörper von Bipolar-, Amakrin-, Horizontal-, sowie von Müllerzellen. Die darauffolgende **innere plexiforme Schicht** ist gekennzeichnet durch die Dendriten der Bipolar-, Horizontal- und Ganglienzellen. Hier wird die Information über die Bipolar- und Horizontalzellen an die Ganglienzellen weitergeleitet, die sich in der nächstliegenden **Ganglienzellschicht** befinden. Die Informationen werden dann durch die Axone der Ganglienzellen, welche die **Nervenfaserschicht** und den **Nervus Opticus** bilden, weitergeleitet. Der Nervus Opticus verlässt das Auge an der Lamina Cribrosa und leitet die Informationen weiter an den visuellen Cortex [6].



**Abbildung 1: Aufbau des Auges und Querschnitt der Retina nach HE Färbung**  
Quelle: Corina Wilding

## 1.2. Glaukom

Glaukom, eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen okularen Erkrankungen, geht mit einem progressiven Verlust der RGZ sowie dessen Axone einher. Dies führt von Gesichtsfeldausfällen bis hin zur Blindheit. Die Erkrankung wird meist erst sehr spät diagnostiziert. Gesichtsfeldausfälle beginnen in der Peripherie der Retina und können so durch das Gehirn kompensiert werden, weshalb der Patient eine Beeinträchtigung des Sehvermögens erst sehr spät bemerkt. Glaukom ist nach dem Katarakt die zweithäufigste Erblindungsursache weltweit. Schätzungen zur Folge sind 70 Millionen Menschen davon betroffen [7]. Berechnungen zur Folge werden im Jahr 2010 60.5 Millionen und im Jahr 2020 79.6 Millionen Menschen an Glaukom erkranken. Von diesen werden im Jahr 2010 voraussichtlich 8.4 Millionen und in 2012 11.1 Millionen beidseitig erblinden [8]. Grundsätzlich sind alle Altersklassen betroffen, jedoch zeigen über 40-jährige ein erhöhtes Risiko an Glaukom zu erkranken [8].

### 1.2.1 Glaukomformen

Glaukom kann in verschiedene Formen eingeteilt werden. Grundsätzlich wird zwischen dem primären und dem sekundären Glaukom unterschieden. Letzteres tritt als eine Begleiterscheinung einer Krankheit oder eines Medikamentes auf. Zu den primären Glaukomformen gehören das primäre Offenwinkelglaukom (POAG), das Normaldruckglaukom (NTG), das primäre Winkelblockglaukom, sowie das kongenitale Glaukom. Das POAG ist mit einer Prävalenz in Europa von 60-90% die am häufigsten auftretende Form des Glaukoms. Trotz eines offenen Kammerwinkels kommt es zu einer Abflussstörung des Kammerwassers und somit zu einer Erhöhung des intraokulären Druckes (IOP) über 21 mmHg. Dies wird zurückgeführt auf eine Abflussbehinderung des Kammerwassers im Bereich des Trabekelmaschenwerkes. Das Normaldruckglaukom ist dagegen gekennzeichnet durch einen im Normbereich liegenden IOP, der zwischen 10 und 22 mmHg liegt. In Europa und den USA beträgt der Anteil dieser Glaukomform an der Gesamtheit der Glaukom Erkrankungen 35%. In Japan hingegen weisen 50-70% der Glaukopatienten NTG auf [1]. Das Winkelblockglaukom tritt, im Vergleich zu den vorher beschriebenen Formen, mit 5%

Prävalenz eher selten auf [1]. Es wird zwischen einer akuten Form, auch als Glaukomanfall bezeichnet und einer chronischen Form unterschieden. Das primäre, akute Winkelblockglaukom ist an einem plötzlich erhöhten IOP (über 60 mmHg) und einer plötzlich auftretenden Abflussbehinderung zu erkennen. Jedoch bleiben Kammerwasserproduktion und Trabekelwiderstand normal. Ursache für den erhöhten IOP ist die Blockierung des Abflusses des Kammerwassers durch die Iris. Bei dem kongenitalen Glaukom handelt es sich um eine angeborene Form des Glaukoms. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 1:20000 Geburten auf [1] und ist gekennzeichnet durch eine Entwicklungsstörung des Kammerwinkels und des Trabekelwerkes, wodurch es zur Abflussbehinderung des Kammerwassers kommt. Zu den sekundären Glaukomformen gehört zum Bsp. das Pseudoexfoliationglaukom, bei dem eine verstärkte fibrilläre Ablagerung im Kammerwinkel den Abfluss des Kammerwassers vermindert.

### **1.2.2 Pathogenese des Glaukoms**

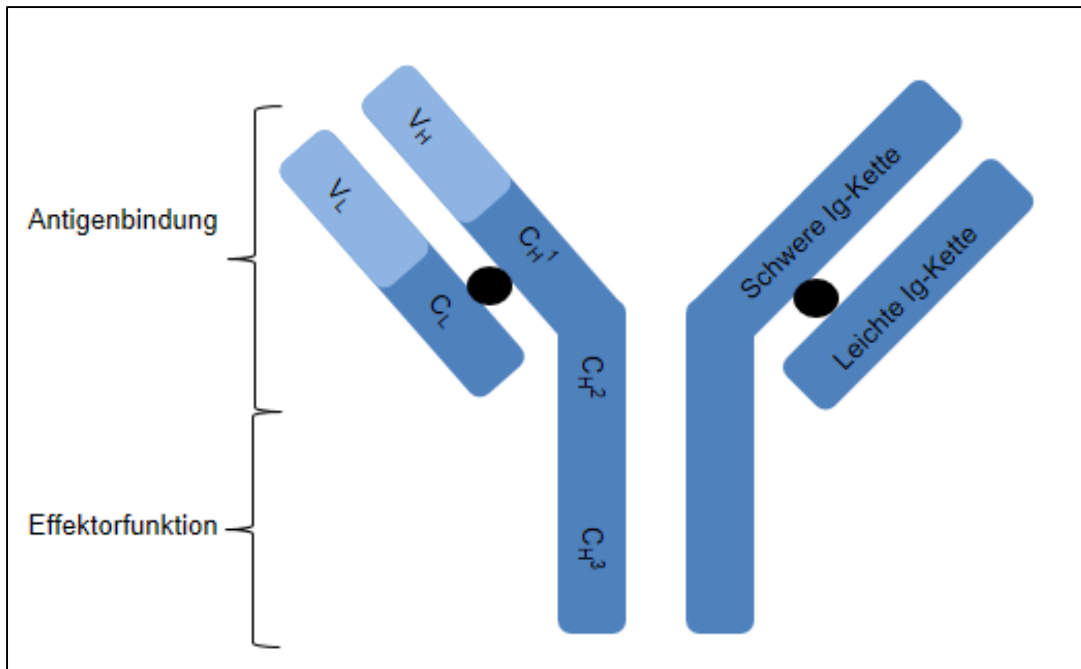
Ursprünglich wurde die Glaukomerkrankung hauptsächlich über einen erhöhten IOP definiert. Heutzutage wird jedoch von einem multifaktoriellen Pathomechanismus ausgegangen, der zu einem Absterben der RGZ führt. Ein erhöhter IOP stellt einen Hauptrisikofaktor dar, jedoch zeigen 30% der Glaukomerkranken nicht diese Manifestation [9], weshalb ein erhöhter IOP heute nicht mehr Teil der Definition des Glaukoms ist. Ein erhöhter IOP kann die Entstehung des NTG, sowie der okulären Hypertension, bei der ein erhöhter IOP vorliegt, jedoch kein glaukomatöser Schaden festgestellt werden kann, nicht erklären. Als weitere Risikofaktoren wurden erhöhte Level an reaktive Sauerstoffspezies (ROS) festgestellt, die an der Neurodegeneration der RGZ beteiligt sind. Dabei wird vor allem die Oxidation von Proteinen durch ROS, sowie eine Fehlfunktion von Gliazellen für den Verlust der RGZ verantwortlich gemacht [10]. ROS sind eine Gruppe von hochreaktiven Molekülen, die unter physiologischen Bedingungen in geringen Mengen produziert werden und unter anderem an der Signaltransduktion mitwirken. Eine übermäßige Produktion von ROS verursacht zytotoxische Schäden, die wiederum durch die Oxidation von Proteinen, Lipiden oder der DNA entstehen. Des Weiteren werden erhöhte Glutamatkonzentrationen als

Risikofaktor bei der Entstehung eines Glaukoms diskutiert. So konnte im Glaskörper von Glaukompatienten, sowie in einem Glaukom-Tiermodell eine erhöhte Konzentration von Glutamat gemessen werden [11]. Außerdem spielen eine positive Familienanamnese mit genetischer Disposition, sowie vaskuläre Dysfunktionen bei der Entwicklung eines Glaukoms eine Rolle [12, 13]. In der Glaukopathogenese wird ebenfalls eine autoimmune Komponente vermutet [14-16]. Da diese für die vorliegende Arbeit von hoher Bedeutung ist wird die Rolle des Immunsystems in der Glaukopathogenese in den nächsten Abschnitten genauer erläutert.

### **1.3 Immunsystem**

Das Immunsystem ist ein Abwehrsystem gegen Pathogene, wie Viren, Bakterien und Parasiten, aber auch gegen körpereigene funktionslose, tote oder entartete Zellen. Klassisch wird es in das natürliche, angeborene (nicht adaptive) und das spezifisch erworbene (adaptive) Immunsystem eingeteilt. Eine erste anatomische Barriere gegen Pathogene stellen die Epithelzellschicht und die Schleimhäute der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes dar. Gelingt es dem Pathogen, die anatomische Barriere zu überwinden, bilden Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie Granulozyten, Phagozyten, natürliche Killerzellen, sowie das Komplementsystem, die nächste Hürde. Pathogene werden entweder phagozytiert und verdaut, oder es werden Moleküle gebildet, die diese abtöten. Darüber hinaus wird die Bildung von Zytokinen angeregt, die zur Verstärkung der Immunantwort und zur Kommunikation zwischen dem adaptiven und angeborenen Immunsystem dienen [17]. Das adaptive Immunsystem kommt erst 5-6 Tage nach dem Eindringen des Antigens in den Organismus zum Einsatz und zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Es setzt sich aus einer zellulären Komponente (T-Lymphozyten) und einer humoralen Immunantwort zusammen, die durch Antikörper-produzierende B-Zellen (Plasmazellen) gewährleistet wird. Durch die spezifische Bildung eines Rezeptors auf ihrer Oberfläche können sie bestimmte Antigene binden und werden dadurch aktiviert. Nach erfolgreicher Aktivierung findet die Differenzierung der T-Zellen in zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen, sowie die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-sezernierende Plasmazellen statt. Diese

Antikörper (Ak) zirkulieren im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit von Geweben und sind durch die spezifische Bindung an ihr Antigen an der Erkennung und Beseitigung von eingedrungenen Fremdstoffen beteiligt. Zum einem sind Ak in der Lage Antigene zu neutralisieren und somit deren toxische Wirkung zu verhindern. Zum anderen opsonieren sie Antigene, wodurch diese markiert und von Phagozyten erkannt und eliminiert werden können. Darüber hinaus führt die Bindung des Ak an sein Antigen zur Aktivierung des Komplementsystems. Die Basisstruktur der Ak (ca. 150 kDa) oder auch Immunglobuline (Ig) genannt, besteht aus 2 identischen, schweren Ketten und 2 identischen, leichten Ketten. Die schweren Ketten bestehen wiederum aus 3 variablen und 3 oder 4 konstanten Regionen, wobei die leichten Ketten jeweils aus einer variablen und einer konstanten Region bestehen. Disulfidbrücken sorgen dabei für die Stabilisierung der Ak. Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette bilden die Antigenbindungsstelle (Abbildung 2). In Wirbeltieren gibt es 5 verschiedene Klassen von Ig (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), die nach ihrer konstanten Region der schweren Ketten in diese Klassen eingeordnet werden. Das Antikörperreservoir eines Organismus wird auf  $10^9$  Ak mit unterschiedlicher Spezifität geschätzt [18]. Dies basiert auf der sogenannten somatischen Rekombination, bei der es durch einen zufälligen genetischen Umlagerungsprozess von Genabschnitten kommt, die für die Kodierung der Rezeptoren verantwortlich sind. Zudem entstehen Punktmutationen in der variablen Region, wodurch die Spezifität des Ak nochmals gesteigert wird. Dieser Prozess wird als somatische Hypermutation bezeichnet [19]. Das Auge nimmt im Immunsystem eine besondere Stellung ein, weshalb das Immunprivileg des Auges im nächsten Abschnitt genauer erläutert wird.



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Antikörpers**

Quelle: Corina Wilding

### 1.3.2 Immunprivileg des Auges

Das Auge, das Gehirn, die Hoden und die Plazenta sind Organe, die eine spezielle Stellung im Immunsystem einnehmen [20]. Dieser immunprivilegierte Status zeichnet sich durch eine limitierte Immunantwort aus. Geprägt wurde dieser Begriff von P. Medawar, der fremdes Gewebe in die vordere Augenkammer transplantierte ohne eine akute Abstoßungsreaktion auszulösen [21]. In Organen oder Geweben mit nicht regenerationsfähigen Zellen werden fremde Antigene wie z. B. ein Virus toleriert, da ein Zellverlust durch inflammatorische Prozesse nicht tragbar wäre. Eine inflammatorische Reaktion im Auge kann zu erheblichen Einschränkungen des Sehvermögens führen, weshalb es vor Einflüssen des Immunsystems geschützt werden muss. Im Gegensatz zu früheren Ansichten, dass das Immunprivileg des Auges durch den Ausschluss von Immunzellen durch die Blut-Retina Schranke erhalten wird, ist heute bekannt, dass durch lokale Mechanismen die Immunantwort unterdrückt oder limitiert wird. Nach heutigem Verständnis üben die immunprivilegierten Organe keine Ignoranz aus, sondern verfügen, wie es am Bsp. des Auges gezeigt wurde, über anatomische Barrieren, wie die Blut-Retina Schranke, eine immunsuppressive Umgebung und eine aktive Regulation der systemischen



Immunantwort, die die Einflüsse des Immunsystems limitieren [22, 23]. Unsere Arbeitsgruppe konnte komplex veränderte Autoantikörperprofile im Kammerwasser sowie im Serum von Glaukompatienten im Vergleich zu gesunden Probanden identifizieren, weshalb Autoimmunität und die Beteiligung in der Glaukopathogenese im folgenden Abschnitt genauer beschrieben wird.

### 1.3.1 Autoimmunität

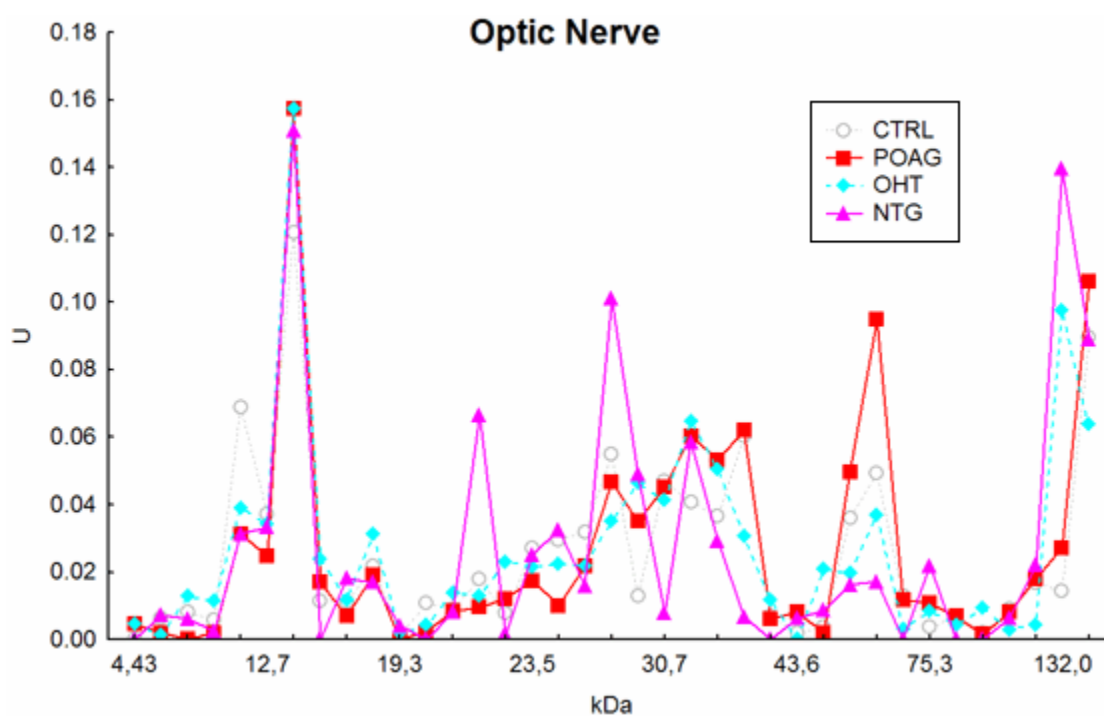
Das Immunsystem dient zum Schutz des Körpers vor schädlichen Umwelteinflüssen und Erregern. Durch den Mechanismus der Selbsttoleranz ist das Immunsystem in der Lage zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Ist es dazu nicht in der Lage, kommt es zu einer Autoimmunität, bei der bestimmte Organe oder der ganze Körper angegriffen werden können. Um diese Autoreaktivität zu verhindern finden zentrale und periphere Selektionsprozesse statt. Bei der zentralen Toleranz kommt es während der Lymphozytenentwicklung in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark oder des Thymus) zu der Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten. Basierend auf der positiven Selektion überleben nur diejenigen Lymphozyten, welche die Fähigkeit besitzen MHC Moleküle auf epithelialen Stromazellen mit mittlerer Affinität zu binden. Findet die Erkennung von Autoantigenen statt, tritt die negative Selektion ein, welche zur Einleitung der Apoptose führt. Ein zweites Sicherheitsnetz entsteht durch die periphere Toleranz. Durch Anergie, Deletion und eine Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen werden autoreaktive Lymphozyten eliminiert. Fehler in der peripheren oder zentralen Toleranz, sowie hormonelle Faktoren, Umwelteinflüsse, Medikamente usw. können so zu Autoimmunkrankheiten führen [18]. Diese können Organe betreffen oder systemisch auftreten. Ersteres ist bei Multipler Sklerose zu beobachten, bei der die Myelinscheiden im ZNS angegriffen werden. Wohingegen bei dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) nukleare Proteine angegriffen werden. Viele Jahre galten Autoantikörper ausschließlich als Auslöser von Autoimmunerkrankungen sowie als Zeichen für den Ausfall von Toleranzmechanismen. Im Gegensatz dazu befinden sich auch im gesunden Immunsystem natürliche autoreaktive Ak, sowie autoreaktive B- und T-Zellen, ohne im Rahmen einer Autoimmunkrankheit eine Erkrankung des

Organismus auszulösen [24-26]. Diese treten ohne externe Stimulation von Antigenen auf und werden als natürliche Autoimmunität bezeichnet. Dies zeigt sich in sogenannten „keimfreien“ Mäusen die nicht in Kontakt mit Pathogenen oder Bakterien stehen und trotzdem IgM produzieren [27]. Natürliche Autoantikörper werden in allen Wirbeltieren gefunden und werden zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr ausgebildet [28]. Sie sind meist vom IgM, IgG und IgA Isotyp und werden von B-Lymphozyten des Types B1 produziert. Sie sind niedrig affin und polyspezifisch [28-30]. Die physiologische Rolle natürlicher Ak ist weitgehend unklar. Es werden verschiedene Funktionen postuliert wie z. B. erste Abwehr von Pathogenen durch Opsonierung [31, 32], Beseitigung von Stoffwechselprodukten und seneszenten Zellen [33, 34], anti-inflammatorische Eigenschaften [35], Kontrolle der Immunhomöostase, sowie der Autoreaktivität [36]. Trotz der zahlreichen Fortschritte im Bereich der Immunologie bleiben viele Fragen bezüglich natürlichen Autoantikörpern, dem Zusammenbruch der Selbsttoleranz, sowie der Entstehung pathogener Autoantikörper z. B. aufgrund einer Dysregulation von natürlichen Autoantikörpern, unbeantwortet.

### **1.3.3 Autoimmunität im Rahmen der Glaukopathogenese**

Bereits 1992 wurde von Cartwright et al. ein Zusammenhang zwischen NTG und Erkrankungen des Immunsystems, wie z. B. Arthritis und Hypothyroidismus (Schilddrüsenunterfunktion) vermutet. In 30% der NTG Patienten wurde eine Verbreitung von Immunkrankheiten identifiziert, während in einer Kontrollgruppe nur eine Verbreitung von 8% gefunden wurde [37]. Dieser Zusammenhang wurde 1994 von Wax et al. bestätigt. Sie zeigten ein erhöhtes Auftreten von Paraproteinen und Autoantikörpern in NTG-Patienten gegen verschiedene nukleare Antigene, wie z. B. das Sjögren's syndrome A Antigen [38]. In den letzten Jahren fanden mehrere Arbeitsgruppen Autoantikörper, die im Serum von Glaukompatienten verändert waren z. B. gegen Hitzeschockprotein 60 (Hsp) [39], kleine Hsp's ( $\alpha$ -Crystallin und Hsp27) [40],  $\gamma$ -Enolase [41], Glutathion-s-transferase [42], Antiphosphatidylserine [43] und Glykosaminoglykanen [44]. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist konnten darüber hinaus komplex veränderte Autoantikörperprofile gegen retinale- und Sehnerv-Antigene im Serum, sowie im Kammerwasser von Glaukompatienten identifiziert werden. Dabei

wurden nicht nur erhöhte Autoantikörper, wie z. B. gegen  $\alpha$ -fodrin [45], myelin basisches Protein [46] sondern auch erniedrigte Autoantikörper, wie z. B. saures Gliafaserproteine (GFAP) und Vimentin [46] gefunden. Des Weiteren konnten erniedrigte Antikörperreaktionen im Kammerwasser von Glaukompatienten gegen  $\alpha$ B Crystallin, Vimentin, sowie erhöhte Reaktionen gegen Hsp 70 gezeigt werden [47]. Darüber hinaus wurden komplexe, veränderte Autoantikörperprofile gegen humane, retinale Antigene, wie z. B. erhöhte Autoantikörper gegen zelluläre retinaldehydbindende Proteine, Histon H4, sowie erniedrigte Reaktionen gegen Retinal-S-Antigen identifiziert [48]. Die hier beschriebenen Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung von Autoantikörpern des Immunsystems an der Pathogenese des Glaukoms hin, jedoch nicht im Rahmen einer klassischen Autoimmunerkrankung. In klassischen Autoimmunerkrankungen wie z. B. Myasthenia gravis, zeigen erhöhte Autoantikörper gegen Acetylcholin Rezeptoren autoaggressives Potential, die zu einer Muskelschwäche führen [49, 50]. Die Frage, ob natürliche Autoantikörper eine Autoimmunkrankheit auslösen oder eine protektive Rolle spielen bleibt unbeantwortet. Die Rolle der herunterregulierten Autoantikörper ist weitgehend unbekannt. Vermutet wird ein Verlust der protektiven Autoimmunität. Aufgrund dessen wird die Theorie der protektiven Autoimmunität im nächsten Abschnitt weiter erläutert.



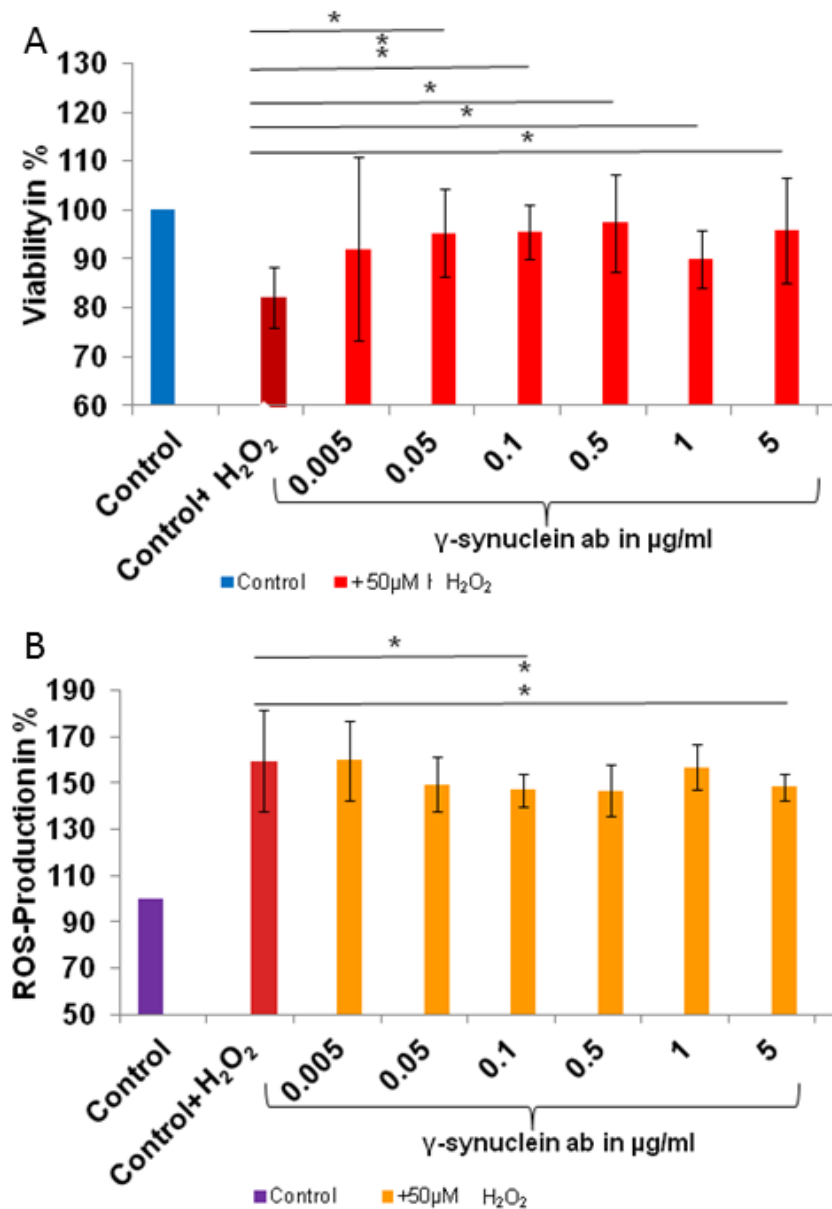
**Abbildung 3: Antikörperprofile gegen Sehnerv-Antigene verschiedener Glaukomformen**

In allen Glaukomgruppen konnten komplex veränderte Antikörperreaktionen detektiert werden. Auf der x-Achse ist das Molekulargewicht in kDa und auf der y-Achse die Antikörperreaktion in U zusehen [51].

## 1.4 Theorie der protektiven Autoimmunität

Paul Ehrlich postulierte Anfang des 20. Jahrhunderts das Prinzip des „Horror autotoxicus“. Demnach ist das Auftreten von Autoantikörpern immer assoziiert mit einer Schädigung des Organismus und gilt als Anzeichen einer autoimmunen Erkrankung. Seitdem konnten jedoch mehrere Studien zeigen, dass Autoimmunität nicht immer destruktive, sondern auch protektive Eigenschaften besitzt, wodurch die Theorie der natürlichen protektiven Autoimmunität immer mehr an Anerkennung erlangte. Moalem et al. konnte in einem Ratten-Tiermodell mit Schädigungen am optischen Nerv zeigen, dass die systemische Injektion von aktivierten anti-Myelin-assoziierten T-Zellen einen Verlust von Neuronen reduzieren kann. Bei den mit myelin-spezifischen T-Zellen behandelten Ratten konnte eine erhöhte Überlebensrate von RGZ beobachtet werden [52, 53]. Die protektive Autoimmunität scheint nicht nur auf zelluläre Prozesse des Immunsystems beschränkt zu sein, sondern die humorale Autoimmunität scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen. So konnten mehrere Studien das Auftreten von natürlichen Ak in gesunden Menschen sowie dessen protektives Potenzial zeigen. In SLE, einer autoimmunen Erkrankung, korreliert das Auftreten von IgM anti-double-stranded DNA Ak negativ mit dem Schweregrad von Glomerulonephritis. Die Gabe von IgM anti-double-stranded DNA Ak in einem Lupus Mausmodell verhindert die Entwicklung einer Nephritis, weshalb eine protektive Rolle dieser Ak vermutet wird [54, 55]. Des Weiteren wird die protektive Funktion von IgM anti-oxLDL Ak in Atherosklerose vermutet. In verschiedenen Tiermodellen führte die Immunisierung mit einem modifizierten low density lipoprotein zu einem steigenden Titer von Ak gegen dieses Antigen und zu einer Unterdrückung von Atherosklerose [56, 57]. Auch in der Pathogenese des Glaukoms scheinen protektive Autoantikörper eine Rolle zu spielen. In Glaukompatienten wurden neben erhöhten Autoantikörperreaktionen interessanterweise auch erniedrigte Reaktionen detektiert. Viele hochregulierte Antikörperreaktionen, die in klassischen Autoimmunerkrankungen bekannt sind, zeigen autoaggressives Potenzial. Im Gegenteil dazu ist die Funktion der herunterregulierten Ak weitgehend unbekannt. Die Arbeitsgruppe von Grus et al. konnte erstmals zeigen, dass die Inkubation von R-28-Zellen, einer immortalisierten, neuroretinalen Zelllinie, mit Serum von Glaukompatienten im Vergleich zu R-28-Zellen, die mit Serum von gesunden Patienten behandelt wurden, eine verändertes Protein-

Profil zeigen. Zusätzlich konnte eine veränderte Reaktion der Zellen auf POAG Serum nach Entfernung der Ak detektiert werden [58]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Effekt von herunterregulierten Antikörpern genauer untersucht. Es konnte ein protektiver Effekt von GFAP, 14-3-3 und  $\gamma$ -synuclein Ak, welche im Serum von Glaukompatienten herunterreguliert vorliegen, auf gestresste neuroretinale Zellen nachgewiesen werden. Dies zeigte sich in einer erhöhten Viabilität, sowie in einer erniedrigten ROS-Produktion, welche in Abbildung 4 zusehen ist [59, 60]. Kommt es zu einem Ungleichgewicht von Autoantikörpern so können Autoimmunerkrankungen die Folge sein. Möglicherweise reflektieren die herunterregulierten Ak ein Verlust der protektiven Autoimmunität, wodurch RGZ anfälliger sind für Stressfaktoren wie z. B. einen erhöhten IOP oder erhöhte ROS-Level. In anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, konnten ebenfalls erniedrigte Autoantikörper gegen A $\beta$  identifiziert werden [61]. Amyloid-beta Ablagerungen, sogenannte Plaques, spielen eine wichtige Rolle in Morbus Alzheimer und führen womöglich zur Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit. In einem Tiermodell sowie in einer klinischen Studie führte die Immunisierung mit A $\beta$  zu einer verminderten Bildung von  $\beta$ -amyloid Plaques [62, 63]. Möglicherweise sind natürliche Autoantikörper in den Metabolismus von fehlgefalteten Proteinen beteiligt. Im folgenden Abschnitt werden die relevanten, in Glaukom identifizierten herunterregulierten Ak und dessen Funktion genauer beschrieben.



**Abbildung 4: Viabilität und ROS-Level von  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestressten RGC5**  
 RGC5 wurden präinkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von  $\gamma$ -synuclein Ak und zusätzlich gestresst mit 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 1 h. Die Zellviabilität wurde mit Kristallviolett und das ROS-Level mit DCFH-DA bestimmt (\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ) [64].

**A:** Signifikant und hoch signifikante Zellviabilität in Zellen, die mit 0,05-5  $\mu$ g/ml  $\gamma$ -synuclein Ak präinkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst wurden.

**B:** Signifikant und hoch signifikante erniedrigte ROS-Produktion in Zellen, die mit 0,1 und 5  $\mu$ g/ml  $\gamma$ -synuclein Ak inkubiert wurden und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst wurden.

## 1.5 Herunterregulierte Antikörper identifiziert in Glaukompatienten

Die im nachfolgenden Abschnitt vorgestellten Ak konnten durch unsere Arbeitsgruppe als herunterreguliert im Serum von Glaukom Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe identifiziert werden (Daten unveröffentlicht).

### 1.5.1 $\gamma$ -synuclein Ak

$\gamma$ -synuclein ist ein kleines, zytosolisches Protein, welches neben  $\alpha$ -synuclein und  $\beta$ -synuclein zur Familie der Synucleine gehört. Sie sind abundant in neuronalen Geweben vorhanden [65] und sind assoziiert mit neurodegenerativen Erkrankungen. Die physiologische Funktion von Synucleinen ist nicht vollständig geklärt, jedoch gibt es Hinweise auf eine chaperonähnliche Aktivität [66]. Synucleine werden oft im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen genannt. Ueda et al. identifizierte in Amyloid-Ablagerungen von Morbus Alzheimer neben dem bereits bekannten beta/A4 Proteinfragment 2 weitere Peptide. Bei diesen handelte es sich um NAC (non-A-beta-component) und seinem Vorläufer NACP (non-A-beta-component-precursor) [67]. NACP wurde kurze Zeit später als  $\alpha$ -synuclein und NAC als  $\beta$ -synuclein identifiziert [68].  $\alpha$ -synuclein wurde ebenfalls als Hauptbestandteil von Lewy-Körperchen in Neuronen von Morbus Parkinson gefunden [69]. Dadurch gerieten Synucleine immer mehr in den Mittelpunkt der Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen, weshalb der Begriff Synucleinopathien geprägt wurde [70]. Dieser Begriff ist eine Sammelbezeichnung für eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, denen allen eine intrazelluläre Ablagerung von fehlgefalteten  $\alpha$ -synuclein gemein ist. Alle Mitglieder der Synucleine werden in der Retina sowie im optischen Nerv exprimiert [65]. Speziell  $\gamma$ -synuclein ist assoziiert mit neurodegenerativen und okularen Krankheiten [71, 72] und hoch exprimiert in RGZ [73]. Im Vergleich zu gesunden Probanden konnte in Glaukompatienten eine veränderte Lokalisation von  $\gamma$ -synuclein im optischen Nerv und der Retina gefunden werden [71, 74]. Des Weiteren konnte in einem Glaukom-Maus-Modell die Herunterregulierung von  $\gamma$ -synuclein im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden [75].

### 1.5.2 14-3-3 Ak

14-3-3 Proteine sind eine Gruppe von hochkonservierten, kleinen, sauren Polypeptiden, die in allen Eukaryoten exprimiert werden. In Menschen existieren 7 Isoformen, die in jedem Gewebe exprimiert werden [76, 77]. Sie sind, durch die Möglichkeit der Bindung mit vielen Interaktionspartnern, beteiligt an einer Vielzahl von Zell-regulatorischen Prozessen wie Zellwachstum, Apoptose, Stressantwort und Zytoskelettorganisation. Sie können die Aktivität und Lokalisation von Proteinen beeinflussen, sowie als Adaptermoleküle fungieren [78]. Dabei ist die Bindung des Interaktionspartners oft abhängig von dessen Phosphorylierungsstatus, da 14-3-3 in der Lage ist phosphorylierte Serin- und Threoninreste zu erkennen. Neben dem zuvor beschriebenen  $\alpha$ -synuclein wurden noch weitere Proteine in Lewis-Körpern identifiziert wie z. B. 14-3-3 [79]. Ebenso wurde dieses in neurofibrillären Tangles bei Morbus Alzheimer-Patienten gefunden [80]. 14-3-3 Proteine scheinen ebenfalls beteiligt zu sein an dem Verlust von RGZ im Glaukom. Möglicherweise ist 14-3-3 in der Bindung des pro-apoptotischen Proteins BAD involviert, welches an der Einleitung des intrinsischen Apoptoseweges und dem Absterben von RGZ mitwirkt. Yang et al. konnte zeigen, dass im Zytoplasma phosphoryliertes BAD an 14-3-3 gebunden vorliegt. In hypertensiven Augen wurde die Translokation von BAD zu den Mitochondrien beobachtet, nachdem 14-3-3 phosphoryliert und BAD dephosphoryliert wurde [81]. Für die Phosphorylierung von 14-3-3 wurde c-JunN-terminal Kinase (JNK), welches durch Stresssignale aktiviert wird, verantwortlich gemacht. Die Aktivierung von JNK durch Stresssignale wie  $H_2O_2$  hat die Phosphorylierung von 14-3-3 und dadurch die Freigabe von BAD zur Folge, welches letztendlich zur Einleitung der intrinsischen Apoptose führt [82].

### 1.5.3 GFAP Ak

GFAP gehört zu den Typ II Intermediärfilamenten des Zytoskelettes und wurde als erstes aus Plaques von Multiple Sklerose Patienten isoliert [83]. Intermediärfilamente spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellstabilität sowie in der Zellbewegung, Zellwachstum, Vesikelbewegung und in der Interaktion zwischen



Neuronen und Astrozyten [84]. GFAP ist Hauptbestandteil in Astrozyten des zentralen Nervensystems. Nach einer Verletzung des Gehirns oder nach der Degeneration des ZNS werden Astrozyten aktiviert, was als reaktive Gliose bezeichnet wird. Dieser Vorgang wird begleitet durch eine erhöhte Expression von GFAP [85] und steht im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer [86, 87] und Parkinson [88]. Aktivierte Gliazellen wurden ebenso in einem Glaukom Tiermodell [89], sowie in glaukomatösen Spenderaugen gefunden [90] und wurde begleitet von einem erhöhten Level an GFAP. Der Wirkungsmechanismus der hier beschriebenen Ak wurde in Zellkulturversuchen sowie in einer retinalen Organkultur untersucht, weshalb diese Modelle nun genauer erläutert werden.

## **1.7 Modelle zur Untersuchung von retinalen Fragestellungen**

### **1.7.1 Kultivierung von RGC5**

Zellkulturversuche stellen die notwendigen Informationen bereit um sie später in in vivo Studien zu übertragen. Dabei bieten immortalisierte Zelllinien viele Vorteile gegenüber primären Zellkulturen. Sie präsentieren eine homogene Population, die die Produktion von reproduzierbaren Ergebnissen erleichtert. Außerdem sind sie mit einem geringen Kostenaufwand leicht über einen längeren Zeitraum passagierbar. Jedoch besitzen immortalisierte Zelllinien auch Nachteile, wie etwa morphologische und genetische Varianzen in höheren Zellpassagen. Außerdem repräsentieren sie nicht die in vivo-Bedingungen in einem Zellverband wieder. Bis vor kurzem waren in vitro Studien über RGZ limitiert auf die zeitaufwendige Herstellung von primären RGZ Kulturen. 2001 wurde eine immortalisierte RGZ Zelllinie (RGC5) von Neeraj Agarwal (University of North Texas Health Science Center) entwickelt. Dabei handelt es sich um eine adhärenz Zelllinie, isoliert aus der Sprague Dawley Ratte, die mit dem  $\Psi 2$  E1A Virus transformiert wurde. Die Charakterisierung der RGC5 Zellen ergab eine positive Expression der retinalen Ganglienzellmarker Thy-1 und Brn-3A sowie des neuronalen Zellmarkers Neuritin und Synaptophysin. Des Weiteren wurden eine Expression von NMDA- und GABA-B-Rezeptoren, sowie eine geringe Expression des Müllerzellmarkers GFAP gefunden. Eine negative Expression wurde für den

Amakrinzellmarker Syntaxin gezeigt [91]. Viele Forschungsinstitute nutzen seitdem diese Zelllinie für die Untersuchung von retinalen Vorgängen als Ersatz für eine primäre Zellkultur, weshalb über 100 Publikationen existieren [92]. Kürzlich wurde die Herkunft der RGC5 Zelllinie angezweifelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die RGC5 Zelllinie nicht von der Ratte, sondern von der Maus abstammt [93]. Andere Studien zeigten, dass sie neuronenhähnliche Eigenschaften und teils auch eine neuronenspezifische Expression aufwies, jedoch nicht ein spezifisches Proteinprofil von RGZ [92]. Deshalb wird vermutet, dass es sich um eine neuronale Vorläuferzelle handelt. Seitdem gibt es kontroverse Meinungen über die Herkunft und Identifizierung von RGC5. Während manche Studien die Expression von Thy.1 einem RGZ Marker [94, 95] sowie charakteristische Eigenschaften von RGZ nachweisen konnte [96], wurden in anderen Studien die RGC5 Zelllinie als eine Photorezeptorzelllinie identifiziert [97].

### **1.7.2 Retinale Organkultur**

Die retinale Organkultur stellt ein zusammenhängendes Organsystem dar, welches erlaubt den Effekt von bestimmten Agenzien auf die intakte Retina sowie Zell-Zell Interaktionen zu untersuchen, weshalb eine retinale Organkultur aus dem adulten Schwein entwickelt wurde. Der Vorteil der Verwendung einer Retina aus dem Hausschwein besteht zum einem aus den ähnlichen morphologischen und funktionellen Eigenschaften zu der human Retina sowie die leichte Beschaffung des Probenmaterials von einem örtlichen Metzger [98-100]. 1954 wurde erstmals eine Methode zur Kultivierung einer retinalen Organkultur vorgestellt. Bei dieser wird das Gewebe an der Luft-Medium-Grenze in einer Kulturkammer kultiviert [101]. Schon damals wurde die Bedeutung der Sauerstoffversorgung erkannt. Caffè et al. vereinfachte diese Methode, indem er anstatt der komplizierten Kulturkammer Petrischalen verwendete. Um dies zu ermöglichen wurde das Gewebe auf ein Filterpapier, welches auf ein Gitter platziert wurde, in einer mit Medium gefüllten Petrischale gelegt. Dies hat den Vorteil, dass das Gewebe mit Nährstoffen sowie mit Sauerstoff versorgt und der Mediumwechsel erleichtert wird. In diesem Fall fand die CO<sub>2</sub>-Versorgung in einem Brutschrank statt [102]. Während die Netzhautkultur von

Ratten und Mäusen häufig in der Literatur beschrieben wird, ist über die Kultivierung von Schweinenetzhäuten nur wenig Literatur zu finden. Des Weiteren werden häufig postnatale anstatt adulte Netzhäute kultiviert, weil an ihnen die Morphogenese untersucht werden kann. Lucas beschrieb als erster die Kultivierung von adulten Meerschweinnetzhäuten [103]. Der Vorteil einer Kultivierung von adulten Geweben besteht in den gleichbleibenden Zelleigenschaften, da diese Zellen schon ausdifferenziert sind. Später wurde von Kobuch et al. ein Modell zur Kultivierung von adulten Schweinenetzhäuten in Zusammenhang mit dem RPE entwickelt [104]. Der Vorteil einer gemeinsamen Kultivierung von Netzhaut und RPE besteht in der verringerten Degeneration der Photorezeptorzellen, da sie besser mit Nährstoffen versorgt und schädliche Stoffwechselprodukte leichter abtransportiert werden können. Für die Etablierung einer retinalen Organkultur wurden in dieser Arbeit Retinapräparate aus adulten Schweinen entfernt und zusammen mit dem RPE kultiviert. Hierzu wurde die Methode von Caffè et al. modifiziert.

## **1.8 Massenspektrometrische Untersuchung als Tool zur Analyse von Signalwegen**

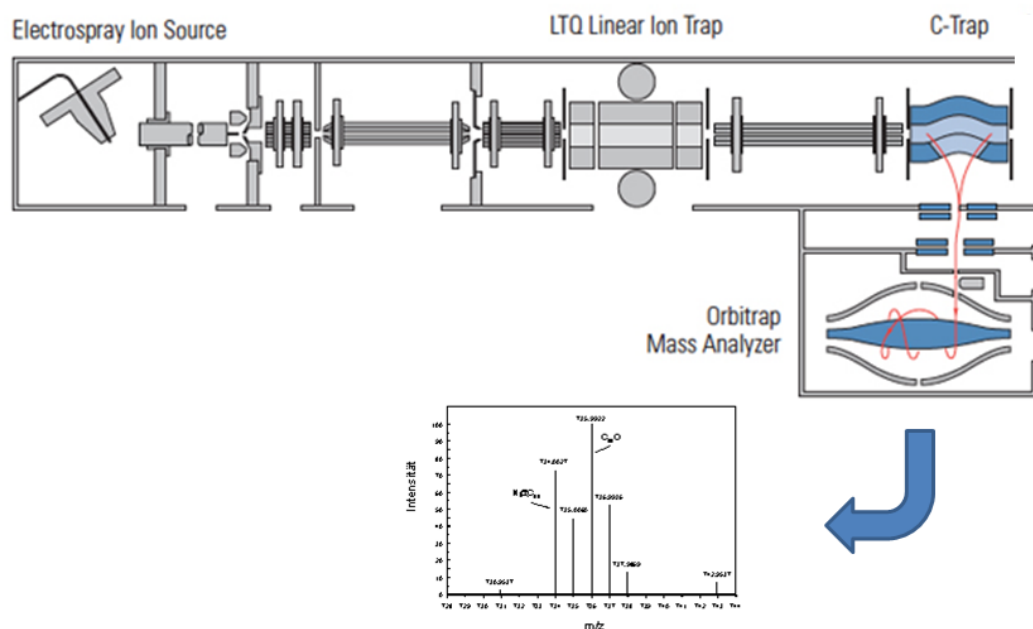
Das Genom ist ein statisches Gebilde, das von äußeren Einflüssen weitgehend unbeeinflusst ist. Im Gegensatz dazu ist das Proteom, welches die Gesamtheit der Proteine in einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt darstellt, ein sehr dynamisches Netzwerk, welches Umwelteinflüssen unterliegt. Das Proteom ist in der Lage auf intra- oder extrazelluläre Einflüsse dynamisch z. B. durch Änderung der Proteinexpression oder Modifikation zu reagieren [105]. Dabei ermöglicht die quantitative Proteomanalyse zelluläre Vorgänge in jeder biologischen Probe auf molekularbiologischer Ebene, wie zum Bsp. intrazelluläre Signalwege zu erforschen. Innerhalb der Proteomforschung stellt die Massenspektrometrie die beste Möglichkeit dar dieses zu untersuchen. Sie ermöglicht die explorative Untersuchung zweier oder mehrerer Proben und zeigt erste Hinweise auf veränderte Signalwege in den unterschiedlich behandelten Gruppen. Sie dienen als Vorbereitung für fortführende nicht explorative Studien wie z. B. die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ak-Microarray Methode, die zur Validierung der zuvor identifizierten veränderten

Proteinen mittels Massenspektrometrie, zum Einsatz kommt. Da in dem folgenden Versuch hauptsächlich die LC/ESI MS/MS Methode zur Anwendung kam werden die Grundprinzipien dieser Methode im folgenden Kapiteln genauer vorgestellt.

### 1.8.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ermöglicht durch physikalische Verfahren die Molekülmasse von Ionen im Hochvakuum zu bestimmen. Dabei werden Ionen in einer Ionenquelle erzeugt und in einem Massenanalysator beschleunigt und nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt. Die anschließende Detektionseinheit detektiert die Ionen und ermöglicht mit Hilfe einer Datenbank die detektierten Massen zu identifizieren. Der Durchbruch der Proteomanalyse ist in den 80ziger Jahren durch die Entwicklung der Elektrospray-Ionisierung (ESI) und des matrixunterstützten Laser Desorption/Ionisation (MALDI) Ionisierungsverfahren zu verzeichnen. Diese stellen die 2 gängigsten Techniken der Ionisierung von Molekülen dar. Bei der ESI Methode werden die Proben in einem Gemisch aus Wasser und organischem Lösungsmittel gelöst und aus einer Kapillare gesprüht, an der eine Spannung angelegt ist. Makroskopisch betrachtet entsteht zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode ein Flüssigkeitskonus (Taylor Konus), der an der Oberfläche einen Überschuss an positiver Ladung trägt. Dort lösen sich geladene Flüssigkeitstropfen, die durch das Verdampfen des Lösungsmittels explosionsartig zerfallen. Am Ende bleiben gasförmige, geladene Ionen übrig, die in die Einlassöffnung des Massenanalysators transferiert werden [106]. Karas et al entwickelte 1988 die MALDI Methode [107]. Diese beruht auf einer Kokristallation von einem Analyten mit einer Matrixsubstanz, wodurch der Analyt in einen Kristall eingebettet wird. Durch den Beschuss eines Lasers auf die Probe werden Matrix und Analytmoleküle in die Gasphase desorbiert. Die Matrix verhindert durch die Absorption von Energie den Verfall des Analyten. Die Kombination dieser Ionisierungsverfahren mit verschiedenen Massenanalysatoren, wie dem time of flight (TOF), der Ionenfalle oder dem Quadrupol ermöglicht die Identifizierung von Proteinen. Am häufigsten werden mit der MALDI Ionisierung TOF Analysatoren eingesetzt. Die Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt und erreichen durch ihre unterschiedlichen Massen unterschiedliche Geschwindigkeiten. Die

Geschwindigkeit ist dabei proportional zu ihrer Molekülmasse. Der Physiker Wolfgang Paul entwickelte zu Beginn der 50ziger Jahre die Ionenfalle. Dabei werden Ionen durch magnetische und elektronische Feldern festgehalten. Im nachfolgenden Versuch wurde die LTQ-Orbitrap verwendet. Diese noch junge Technologie ist eine Ionenfalle die von Marakov entwickelt wurde und die Ionen durch elektrostatische Felder fängt. [108, 109]. Dort oszillieren die Ionen aufgrund von elektrostatischen Kräften auf Kreisbahnen um die spindelförmige Zentralelektrode. Die axiale Schwingung der Ionen wird detektiert und durch Fouriertransformation in ein Frequenzspektrum und anschließend in ein Massenspektrum umgewandelt. In den nachfolgenden Versuchen wurde eine LTQ-Orbitrap XL der Firma Thermo Scientific verwendet. Der Aufbau ist in Abbildung 5 gezeigt. Im vorderen Bereich befindet sich die ESI Ionenquelle, die die Ionen in die Gasphase überführt und dem Massenanalysator zuführt. Die Ionen werden dann über Multipole transferiert und in einem Ionenstrahl gebündelt. Anschließend gelangen die Ionen in eine lineare Ionenfalle (LTQ) in der die MS und MS/MS Spektren aufgenommen werden. Danach werden sie in der C-trap in einer Ionenwolke fokussiert und puls förmig in die Orbitrap geleitet, in der sie um die Zentralelektrode oszillieren.



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer LTQ-Orbitrap XL**

Im vorderen Bereich befindet sich die ESI Ionenquelle die die Ionen in die Gasphase überführt und dem Massenanalysator zuführt. Die Ionen werden dann über Multipole transferiert und in einen Ionenstrahl gebündelt. Anschließend gelangen die Ionen in eine lineare Ionenfalle (LTQ) in der die MS und MS/MS Spektren aufgenommen werden. Danach werden sie in die C-trap und anschließend in die Orbitrap geleitet, in der sie um die Zentralelektrode oszillieren. (Modifizierte Abbildung von Thermo Scientific, <http://www.thermoscientific.com>)

Während der Messung des  $m/Z$  Verhältnisses wird ein spezifisches Muster von Peptiden eines Proteins detektiert, der sogenannte mass fingerprint, der zur Identifizierung der Proteine dient. Oft ist dieser nicht ausreichend um alle Proteine zu identifizieren, weshalb eine Methode zur massenspektrometrischen Sequenzierung von Peptiden (MS/MS Analyse) verwendet wird. Bei dieser Tandem Massenspektroskopie werden ausgewählte Peptidionen (Parent-Ion) in der MS Analyse separiert und anschließend durch den Zusammenstoß mit einem Inert Gas fragmentiert und wiederum analysiert. Durch spezielle Algorithmen kann die Aminosäuresequenz eines Peptides berechnet werden. Für die Fragmentierung der Peptide stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Im nachfolgenden Versuch wurde die Technik des Kollisions-induzierten Verfalls (CID) verwendet, bei der es bei dem Zusammenstoß mit Heliumgas zur Fragmentierung der Peptide entlang ihres Rückgrades kommt. Durch das Muster der Fragmente können Rückschlüsse auf die Sequenz des Peptides geschlossen werden. Die Auftrennung der Peptide wird mit einer vorgeschalteten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Bei der HPLC handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei der der Analyt zusammen mit einem Laufmittel (mobile Phase) über eine Trennsäule geschickt wird, die eine Matrix (Stationäre Phase) enthält. Die Reverse Phase- HPLC Methode wird in der Proteomforschung häufig zur Trennung von Peptiden eingesetzt. Hierbei besteht die stationäre Phase aus Silikagel, welches an der Oberfläche Kohlenwasserstoffketten trägt (C18), während die mobile Phase aus einem wässrigen Lösungsmittelgemisch besteht. Die Trennung der Moleküle beruht auf der Bindung von polaren hydrophobischen Molekülen in der mobilen Phase an die stationäre Phase, wobei hydrophile Moleküle in der mobilen Phase die Säule passieren und als erstes eluiert werden. Die hydrophoben Moleküle können dann durch steigende Polarität der mobilen Phase von der Säure eluiert werden. Die Reverse Phase-HPLC ist direkt mit dem Massenspektrometer gekoppelt, damit die Peptide direkt mit dem ESI ionisiert werden können.

### 1.8.2 Micoarray

Die Mikroarray Technologie ist eine Hochdurchsatzmethode die als Hilfsmittel in der klinischen Diagnostik sowie in der molekularbiologischen Forschung zum Einsatz kommt. Sie ermöglicht die parallele Untersuchung von tausenden Proben und benötigt nur eine geringe Menge an Probenmaterial. Sie beruht auf der Souther blot Technologie, die die Hybridisierung immobilisierter einzelsträngiger DNA an komplementäre Sequenzen beschreibt [110]. Die Anwendungsmöglichkeiten sind dabei vielseitig und reichen von DNA oder RNA Arrays bis zu Ak-, Protein- oder Peptidarrays. Bei der Ak-Mikroarray Methode werden zuvor ausgewählte Ak auf einen mit Nitrocellulose beschichteten Objektträger gespottet und mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Mit einem sekundären Ak, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, findet die Detektion der gebundenen Ak Moleküle mit einem speziellen Scanner statt. Mit der entsprechenden Software werden die Intensitäten der einzelnen Spots gemessen und erlauben somit die quantitative Berechnung der zu untersuchenden Proteinen.

## 2. Zielsetzung

Die Pathogenese des Glaukoms ist weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren wird die Beteiligung einer autoimmunen Komponente an der Pathogenese des Glaukoms vermutet. Mehrere Studien konnten komplex veränderte Autoantikörperprofile in Glaukompatienten nachweisen, weshalb eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese des Glaukoms vermutet wird. Des Weiteren konnte der Einfluss von Glaukomseren auf das Proteinprofil von neuroretinalen Zellen (RGC5 und R28) nachgewiesen werden. Dabei spielen besonders die im Serum befindlichen Ak eine Rolle. Die Rolle von herunterregulierten Ak ist weitgehend unbekannt, weshalb der Effekt auf neuroretinale Zellen untersucht wurde. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde der Einfluss von beim Glaukom bekannten, veränderten Ak auf RGC5 weiter untersucht. Die Untersuchungen zeigten einen protektiven Effekt von GFAP, 14-3-3 und  $\gamma$ -synuclein Ak auf gestresste RGC5 Zellen, welcher in einer erhöhten Viabilität, sowie in einer erniedrigten ROS-Produktion zu sehen war.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es den protektiven Effekt der zuvor ausgewählten Ak im Detail zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk soll dabei auf der Untersuchung der Signalwege von Ak behandelten RGC5 durch massenspektrometrische Analysen liegen. Durch eine quantitative Analyse des Proteoms mittels eines LC-ESI-MS Systems sollen veränderte Signalwege in Ak behandelten RGC5 aufgezeigt werden. Darüber hinaus sollen die identifizierten veränderten Signalwege sowie zusätzlich relevante Proteine mittels Microarray validiert werden. Der genaue Mechanismus, der der veränderten Proteinexpression zugrunde liegt ist unbekannt. Aus diesem Grund stellt ein weiteres Teilprojekt die Lokalisierung der Ak-Bindung/Aufnahme an RGC5 dar. Mittels indirekter immunzytochemischer Färbung und unter Zuhilfenahme der 2D-Elektrophorese und massenspektrometrischen Analysen soll die Bindung des Ak an der Zellmembran oder die Aufnahme des Ak in das Zellinnere analysiert werden.

Des Weiteren soll eine retinale Organkultur etabliert werden, die es erlaubt den Effekt der Ak auf RGZ in ihrer natürlichen Umgebung sowie Zell/Zell Interaktionen zu untersuchen. Hierfür soll die Retina aus adulten Hausschweinen verwendet werden, die von einem lokalen Metzger bezogen werden. Nach einer ersten morphologischen Begutachtung über den Aufbau und Erhalt der Retina nach einer 5 Tage Kultur sollen



die Anfärbung von RGZ mittels immunhistologischen Färbungen sowie die Quantifizierung von apoptotischen Zellen mittels eines Tunel Assays stattfinden. Nach der erfolgreichen Etablierung der retinalen Organkultur soll der Effekt der zuvor ausgewählten Ak, auf RGZ sowie apoptotische Prozesse untersucht werden. Anschließend sollen massenspektrometrische Analysen von Ak behandelten Retinaexplantaten erste Hinweise auf die Interaktion retinaler Zellen im Zusammenhang mit dem protektiven Effekt von Ak auf RGZ liefern. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Dissertation sollen weiteren Aufschluss über die Beteiligung einer autoimmunen Komponente und insbesondere einen tieferen Einblick in die Rolle von herunterregulierten Ak in der Pathogenese des Glaukoms geben.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

*Tabelle 1: Chemikalienliste*

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
4% Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
4-Chloronaphtol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Vereinigte Staaten)
Acetonitril (ACN)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Agarose	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
Ammoniumbicarbonate	Merck (Darmstadt, Deutschland)
B27-Supplement	Invitrogen (Carlsbad, CA, Vereinigte Staaten)
Bicinchonin Assay Kit	Thermo Scientific (Waltham, MA, Vereinigte Staaten)
Bovin serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Cell Dissociation Solution	Sigma-Aldrich
CHAPS	Sigma-Aldrich
Cover fluid	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth
Dodecyl-D- $\beta$ -Maltosid (DDM)	Sigma-Aldrich
Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich
Dylight 649	Pierce Biotechnologie (Rockford, IL, Vereinigte Staaten)
ERP57 human	Abcam
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Fisher Scientific (Waltham, MA, Vereinigte Staaten)
Fetal calf serum (FCS)	Sigma-Aldrich
Chicken polyclonal anti GFAP Ak	Abcam (Cambridge, England)
Glycerol	Applichem
Goat anti rabbit IgG-Cy3	Linaris (Dossenheim, Deutschland)
Goat anti IgY-HRP	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, Vereinigte Staaten)
Goat Serum	Vector Laboratories (Burlingame, CA, Vereinigte Staaten)
Polyclonal sheep anti $\gamma$ -synuclein Ak	Abcam
H <sub>2</sub> O	Applichem
HCl	Merck
In situ cell detection kit, Fluorescein	Roche (Penzberg, Deutschland)
Iodacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich

L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Methanol	Fisher Scientific
Mouse monoclonal anti ERP57 Ak	Abcam
NUPAGE MOPS SDS Running Puffer	Invitrogen
N2-Supplement	Invitrogen
Natriumchlorid	Carl Roth
Neurobasal A	Invitrogen
NP-40	Sigma-Aldrich
NuPAGE 12% Bis/Tris Polyacrylamidgel	Invitrogen
Paraffinwachs	Sakura Aplhen aan den Rijn, Niederlande)
Penicilin/Streptomycin Solution	Sigma-Aldrich
Penicillin	Sigma-Aldrich
Peptid calibration standard	Bruker Daltonics (Billerica, CA, Vereinigte Staaten)
Phosphat buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
rabbit anti-BRN3a Ak	Bioss (Woburn, MA, Vereinigte Staaten)
NUPAGE Sample Reducing Agent	Invitrogen
Rabbit polyclonal anti mouse IgG-H&L (TRITC)	Abcam
Resuspensionspuffer	Promega (Madison, WI, Verreinigte Staaten)
Sea blue plus II standard	Invitrogen
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Thiourea	Sigma-Aldrich
Trifluoroessigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich
Tris	Carl Roth
Triton-X-100	Sigma Aldrich
Trypsin	Promega
Tween-20	ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Urea	Sigma-Aldrich
Xylol	Merck
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (CHCA)	Sigma-Aldrich
Polyclonal rabbit anti 14-3-3 Ak	Abnova (Taipei City, Taiwan)

Tabelle 2: Lösungen

Lösungen	Mengenangabe
<b>Immunhistologische Färbungen RGC5</b>	
3% PFA	4% PFA PBS
0.025% Triton-X-100	Triton-X-100 PBS
0,05% Tween-20 (T)	T PBS
1% BSA	BSA 0,05%T

Polyclonal rabbit anti 14-3-3 Ak	14-3-3 Ak 1% BSA in TPBS
Polyclonal sheep anti $\gamma$ -synuclein Ak	$\gamma$ -Synuclein Ak 1% BSA in TPBS
Chicken polyclonal anti GFAP Ak	GFAP Ak 1% BSA in TPBS
Sek. Ak goat polyclonal anti rabbit IgG-H&L (FITC)	goat polyclonal anti rabbit IgG 1% BSA in PBS
Sek. Ak rabbit anti sheep IgG-H&L (FITC)	1:1000 rabbit anti sheep IgG 1% BSA in PBS
Sek. Ak rabbit polyclonal to chicken IgY-H&L (FITC)	rabbit polyclonal to chicken IgY 1% BSA in PBS
<b>Immunhistologische Färbung retinale Organkultur</b>	
1x Antigen Retrieval Lösung	10x Antigen Retrieval Lösung PBS
Blockpuffer	2% BSA 0,3% Triton-X-100 5 % Goat Serum
Rabbit anti-BRN3a Ak	1:100 Blockpuffer
Goat anti rabbit IgG-Cy3	1:1000 PBS
Tunel Reagenz	450 $\mu$ l Labeling Lösung 50 $\mu$ l Enzym Lösung
<b>Kultivierung RGC5</b>	
DMEM	DMEM 10% FCS 100 U/ml penicillin 100 U/ml streptomycin 4% L-alanyl-L-glutamin
Zell Dissoziation Lösung	
<b>Präparation/Kultivierung retinale Organkultur</b>	
Neurobasal A Medium	Grundmedium Neurobasal A 1% N2 2% B27 100 U/ml Penicillin 0,8 mM L-Alanyl-L-Glutamin
<b>Massenspektrometrische Untersuchung</b>	
Lysispuffer (RGC5)	0,1% Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid 0,25% Proteinase inhibitor Cocktail
Lysispuffer (Retinale Organkultur)	20 mM Tris 150 mM NaCl 0,5% DDM
MOPS Laufpuffer (20X)	50 ml MOPS Laufpuffer 950 ml H <sub>2</sub> O dest.

Fixierlösung	40 ml H <sub>2</sub> O 50 ml Methanol 10 ml Essigsäure
Färbelösung	66 ml H <sub>2</sub> O 20 ml Methanol 20 ml Stainer A 5 ml Stainer B Zugabe nach 10min
Waschlösung	5 ml 100mM Ammoniumbicarbonat 5 ml ACN
Trypsinpuffer	8 ml H <sub>2</sub> O 1 ml ACN 1 ml 100 mM Ammoniumbicarbonat
Trypsinlösung	20 µg Trypsin 200 µl Resuspensions Puffer 1500 µl Trypsinpuffer
Extraktionslösung	3,8 ml H <sub>2</sub> O 8 ml ACN 200 µl Ameisensäure
Equilibrierungspuffer	10 ml HPLC-H <sub>2</sub> O 10 µl TFA
Elutionspuffer	5 ml ACN 5 ml HPLC-H <sub>2</sub> O 10 µl TFA
<b>Microarray</b>	
Dylight 649 Lösung	9 µl H <sub>2</sub> O 1 µl Dylight649
Tris-Hcl pH 8.8	3,025 g Tris 50 ml H <sub>2</sub> O pH einstellen mit HCl
0,5% BSA in 0,5% TPBS	0,5% BSA 0,5% Tween-20 PBS
<b>2-D-Gelelektrophorese</b>	
Probenpuffer	2% Chaps 8 M Urea 2 M Thiourea 0,8% Bromophenol blau 0,8% Proteinase inhibitor 1% IPG buffer 3-10 non linear Dest. H <sub>2</sub> O
Equilibrierungspuffer 1	6 M Urea 75 mM Tris-HCl pH 8.8 3% Glycerol 2% SDS 0.002% Bromphenol blau 2,5% DTT Dest. H <sub>2</sub> O
Equilibrierungspuffer 2	6 M Urea 75 mM Tris-HCl pH 8.8 3% Glycerol

	2% SDS 0,002% Bromophenol blau 3,2% IAA Dest. H <sub>2</sub> O
Agarosepuffer	4% Agarose Mops Laufpuffer
<b>Westernblot</b>	
Towbin Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% v/V Methanol Dest. H <sub>2</sub> O
Waschpuffer (TBS-T)	20 mM Tris 150 mM NaCl 0,1% Tween-20 1000 ml pH=7,5
4% non fat dry milk	4% non fat dry milk HPLC H <sub>2</sub> O
TBS	20 mM Tris 150 mM NaCl 1000 ml dest. H <sub>2</sub> O
4-Chloronaphtol Färbelösung	20 ml TBS 12 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 4 ml Methanol 12 mg 4-Chloronaphtol
Chicken polyclonal anti GFAP Ak	6 µg/ml TBS-T
Goat anti chicken IgY-HRP	1:5000 TBS-T
<b>Massenspektrometrische Identifizierung mittels MALDI TOF/TOF</b>	
Matrix	20 mg CHCA 60% ACN 40% H <sub>2</sub> O 0,1% TFA
<b>Identifizierung GFAP Ak Interaktionspartner</b>	
Mouse monoclonal anti ERP57	5 µg/ml ERP57 Ak 1% BSA in PBS
Chicken polyclonal anti GFAP Ak	2 µg/ml GFAP Ak 1% BSA in PBS
Rabbit polyclonal anti mouse IgG-H&L (TRITC)	1:500 1% BSA in PBS
Rabbit polyclonal anti chicken IgY-H&L (FITC)	1:1000 1% BSA in PBS

### 3.2 Geräte und Software

**Tabelle 3: Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
μ-slide IV	Ibidi GmbH (München, Deutschland)
24 Well Platte	Nalgene Nunc (Penfield, NY, Vereinigte Staaten)
80 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Nalgene Nunc
96 Well-Platte	Greiner-Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Array Scanner	Affymetrix (Santa Clara, CA, Vereinigte Staaten)
BIOCUT Mikrotom 2030	Reichert-Jung (Heidelberg, Deutschland)
Brutschrank	Thermo Scientific
Einbett Automat Tissue Tek VIP	Sakura
Einbettförmchen	Sakura
Einbettkassetten	Sakura
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Histo Bad	Reichert-Jung
Histo Plate	Reichert-Jung
LTQ Orbitrab XL	Thermo Scientific
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon (Tokio, Japan)
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Biorad (Hercules, CA, Vereinigte Staaten)
Multiscan Ascent	Thermo Labssystem
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior (Lauda Königshofen, Deutschland)
Nitrozellulose	GE Healthcare
Non contact array spotter	Scienion (Monmouth Junction, NJ, Vereinigte Staaten)
Objektträger 76x26	Diagonal (Münster, Deutschland)
Petrischale	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Polished steel maldi target	Bruker Daltonics
Rocking Plattform	Biometra (Göttingen, Deutschland)
SciFlexArrayer S3	Scienion
Sterilbank	Nalgene Nunc
Thincerts	Greiner-Bio-One
Tissue Tek Cryo Console	Sakura
Tissue Tek Dispensing Console	Sakura
Tissue Tek Thermal Console	Sakura
Ultraschallbad	Bandelin Electronic (Berlin, Deutschland)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifuge	Thermo Scientific
ZipTip	Merck Millipore

BioBasic C-18 Vorsäule (30 mm x 0.5 mm)	Thermo Scientific
BioBasic C18 Analysensäule (150 mm x 0.5 mm)	Thermo Scientific
Rheos Allegro HPLC Pumpsystem	Thermo Scientific

Tabelle 4: Software

<b>Software</b>	
Adobe Illustrator	Adobe
ImageJ	NIH
Imagene	BioDiscovery
Ingenuity	Qiagen
Lucia G/F	Leica
MaxQuant	Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried
Office 2013	Microsoft
Photoshop	Adobe
Statistica	Statsoft

### 3.3 Kultivierung RGC5

RGC5 Zellen wurden von Dr. Neeraj Agarwal bereitgestellt. Es handelt sich um eine neuronale Vorläuferzelllinie aus der Maus, die mit dem  $\psi$ 2E1A Virus immortalisiert wurde [91, 93]. Die Zellen wurden in 80 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus DMEM, welches mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin und 4% L-Alanyl-L-Glutamin versetzt war. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80% wurden diese passagiert. Hierfür wurden sie zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit 1,5 ml CDS für 12 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 3 ml Medium überführt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellanzahl bestimmt. Abhängig von dem jeweiligen Versuch wurden anschließend verschiedene Zellanzahlen in Zellkulturflaschen, Petrischalen oder Well-Platten überführt.



### **3.4 Massenspektrometrische Untersuchung von Ak behandelten RGC5**

Für die massenspektrometrische Untersuchung wurden RGC5 in 60X15 mm Petrischalen kultiviert und am darauffolgenden Tag mit bestimmten Konzentrationen des jeweiligen Ak inkubiert. Aus den Vorstudien wurden Konzentrationen ausgewählt, die den größten protektiven Effekt zeigten. RGC5 wurden jeweils für 3 h mit 0,5 µg/ml rabbit polyclonal anti 14-3-3 Ak, 0,5 µg/ml goat polyclonal anti  $\gamma$ -synuclein Ak oder 1 µg/ml chicken polyclonal anti GFAP Ak inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit dem Ak behandelt wurden.

#### **3.4.1 Zellyse**

Nach der Inkubation der zuvor beschriebenen Ak wurden diese durch Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die RGC5 mittels CDS von den Petrischalen abgelöst, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C, 300 g für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Lysieren der Zellmembran fand bei -80°C für 30 min statt. Nach dem Versetzen der Zellpellets mit Lysispuffer wurde die Zellmembran nochmals permeabilisiert, indem die Lösung für 5 min in ein Ultraschallbad getaucht wurde. Damit restliche Zelltrümmer entfernt werden fand ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C, 1500 g für 10 min statt. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

#### **3.4.2 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA) Kit**

Zur Bestimmung der Proteinmenge im Zelllysate wurde das BCA-Kit gemäß Angaben des Herstellers verwendet. Dieser Test beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der in alkalischer Lösung eine Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine stattfindet. Durch die Komplexbildung von  $\text{Cu}^+$  mit BCA entsteht eine lila gefärbte Lösung, dessen Absorption bei 562 nm photometrisch bestimmt werden kann. Zunächst wurden die im

Kit enthaltenen Reagenzien A und B im Verhältnis von 1:50 gemischt. Anschließend wurden 10 µl des Zelllysates, sowie eine Eichkurve, die aus verschiedenen Konzentrationen von BSA bestand, in eine 96 Well-Platte pipettiert. Durch die Zugabe von 190 µl Reagenzien-AB wurde die Reaktion gestartet und nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption mittels eines Photometers bei 562 nm bestimmt. Anhand der Eichkurve wurde die Konzentration des Zelllysates berechnet.

### **3.4.3 Protein Auftrennung mittels eindimensionaler Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D SDS-Page)**

Die SDS-Page ist eine analytische Methode zur Separation von Molekülen anhand ihrer Molekülmassen in einem elektrischen Feld, welche von U.K. Laemmli beschrieben wurde [111]. Dabei wird SDS verwendet, welches als anionisches Tensid die Eigenladung von Proteinen überlagert. Zusammen mit dem Erhitzen der Proteine werden diese denaturiert und können somit in einem Polyacrylamid-Gel aufgrund ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Durch die Zugabe von Reduktoren werden zusätzlich Disulfidbrücken aufgebrochen. Die denaturierten Proteine werden in die Taschen eines Polyacrylamidgeles, welches sich in einer Elektrolytlösung befindet, aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die Proteine durch die Gelmatrix, wobei kleinere Proteine im Vergleich zu großen Molekülen schneller durch das Gel migrieren [112]. Für die eindimensionale Auftrennung von Proteinen wurde eine XCell Sure Lock™ Mini Cell Gelelektrophoresekammer, sowie ein Novex NuPAGE 12% Bis/Tris Polyacrylamidgel verwendet. Vor der Auftragung der Proben auf das Gel, wurden diese durch die Zugabe von 4x NuPAGE LDS Sample Puffer sowie 10x NuPAGE Reducing Agent denaturiert und für 10 min bei 70°C im Brutschrank erhitzt. Für den Proteinstandard wurde Sea Blue plus 2 aufgetragen. Als äußerer Laufpuffer wurde NuPage MOPS Puffer verwendet und der innere Puffer enthielt zusätzlich 500 µl Antioxidans. Die Gelelektrophorese wurde bei 130 V und 4°C durchgeführt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel entnommen und in einer Fixierlösung auf dem Schüttler für 10 min inkubiert. Die Proteinfärbung im Gel wurde mit dem Colloidal Coomassie Blue staining kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und beruht auf der Methode von Neuhoff et al [113]. Dieses Kit gewährleistet die Anfärbung von Proteinen im ng Bereich. Das fixierte Gel wurde

für 10 min in der Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 5 ml Stainer B. Die Färbung erfolgte für mindestens 3 h auf dem Schüttler bei RT. Die Entfärbung wurde mit dest. H<sub>2</sub>O über Nacht durchgeführt.

#### **3.4.4 Protein Verdau im Gel**

Nach der Auftrennung der Zelllysateproteine in der Gelelektrophorese erfolgte der enzymatische In-Gel-Verdau der Proteine mittels Trypsin in Anlehnung an das Protokoll von Shevchenko et al [114, 115]. Trypsin ist eine Serinproteinase, welche selektiv am C-Terminale Ende von Arginin und Lysin Proteine spaltet. Dabei werden die Proteine durch Trypsin in kleinere Peptidfragmente zerlegt, die mit ihrer jeweiligen charakteristischen Masse zur Messung und Identifizierung im Massenspektrometer dienen. Als erstes wurde eine Spur des Geles mit Hilfe eines Skalpell in 17 Stücke geteilt. Zur besseren Diffusion des später verwendeten Trypsins wird jede einzelne Bande in kleine Stücke geschnitten. Diese zerteilten Gelbanden wurden für 15 min in Waschlösung und anschließend für 2 min mit 100% ACN inkubiert und somit dehydriert. Der Überstand wurde entfernt und die Gelstücke wurden anschließend für 1 min in der Zentrifuge bei 30°C getrocknet. Vor der Verwendung von Trypsin wurde dieses zuerst mit 200 µl Resuspension Puffer vermischt und für 10 min im Wasserbad bei 37°C aktiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1500 µl Trypsinpuffer. Die Gelstücke wurden dann mit 60 µl der zuvor hergestellten Trypsinlösung (12,5 ng/µl) bedeckt und nach einer 30 min Inkubation im Kühlschrank durch die Inkubation bei 37°C im Brutschrank gestartet. Am darauffolgenden Tag nach einer 20 h Inkubation fand die Extraktion der Peptide aus dem Gel statt. Hierfür wurde als erstes der Überstand entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die restlichen Gelstücke wurden für 30 min mit der Extraktionslösung auf der Rocking Plattform inkubiert. Anschließend wurde die Extraktionslösung entnommen und zu dem vorherigen Überstand zusammengefasst. Diese Mischprobe wurde in der Zentrifuge bei 30°C vollständig verdampft und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.4.5 Proteinaufreinigung mittels C18 ZipTip Spitzen

Für die Aufreinigung und Entsalzung der Peptide wurde eine ZipTip Spitze verwendet, die mit einer chromatographischen C18 Matrix befüllt ist. Die Bindung der Peptide findet durch hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten an die C18 Matrix statt. Die eingedampften Proben wurden dafür aufgetaut und mit 20 µl einer 0,1% TFA Lösung versetzt und für 5 min im Ultraschallbad gelöst. Anschließend erfolgten mehrere Aktivierungs- und Waschschriffe, die in Tabelle 5 aufgelistet sind. Nach der Elution der Proben wurden diese bei 30°C in der Zentrifuge eingedampft und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

*Tabelle 5: Peptidreinigung mittel C18 ZipTip Spitzen*

<b>1. Aktivierung</b>	3x10 µl ACN
<b>2. Equilibrierung</b>	3x10 µl Equilibrierungspuffer
<b>3. Peptidbindung</b>	20x10 µl Probe
<b>4. Waschschriff</b>	3x10 µl 0,1% TFA
<b>5. Elution</b>	2x10 µl Elutionspuffer

### 3.4.6 Protein Identifikation mittels HPLC/ESI MS

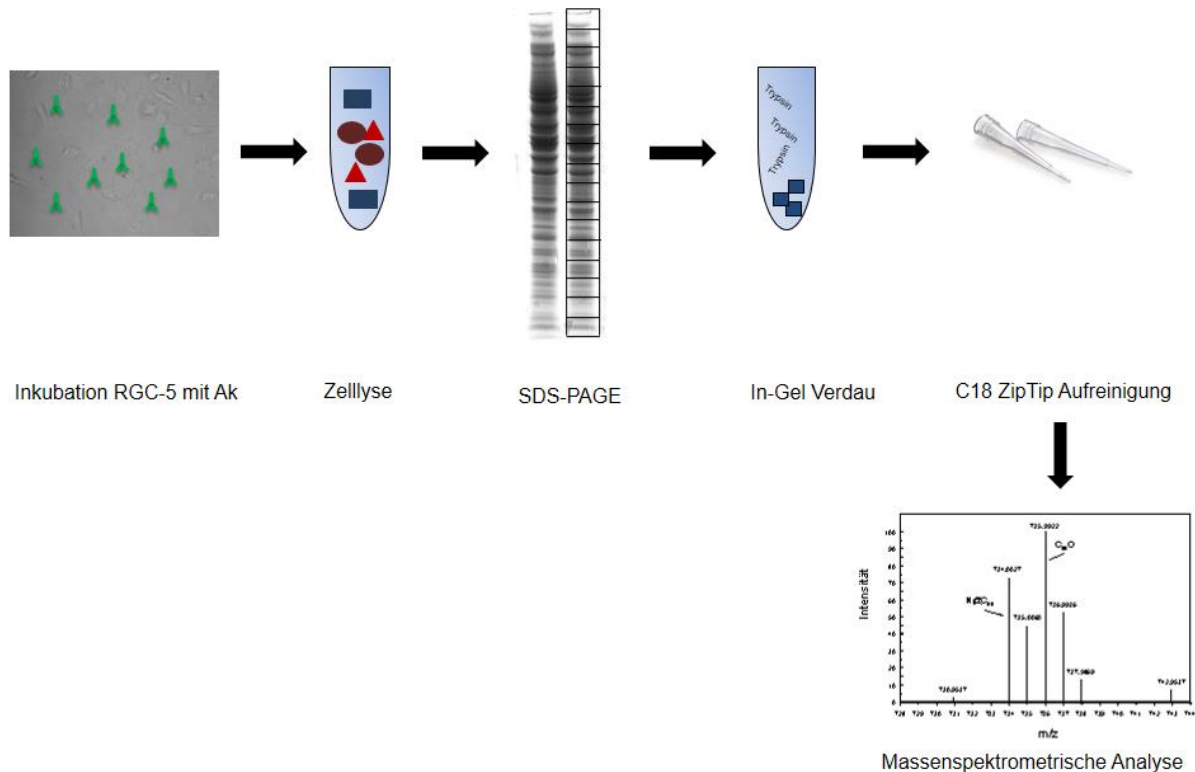
Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Bestimmung der molekularen Massen von Molekülen oder Ionen anhand ihres m/Z-Verhältnis. Dieses Verfahren setzt die Überführung von Proteinen und Peptiden in die Gasphase voraus. Bewerkstelligt wird dies durch das ESI-Verfahren, bei der die Peptidlösung durch eine dünne Kapillare geführt wird, die mit einer Metallspitze endet. Auf dieser liegt eine Spannung an, wodurch die Peptide in die Gasphase überführt werden. Durch eine HPLC-Säule (Analytische C18 Säule), die online mit der ESI gekoppelt ist, findet die von der Polarisierung abhängige Auftrennung der Peptide statt. Analysiert wurden die Peptide mit einem LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer, die mit einer vorgeschalteten HPLC Säule gekoppelt ist. Hierfür wurden die zuvor aufgereinigten Proben in 20 µl einer 0,1% TFA Lösung gelöst und für 5 min in Ultraschallbad mit Eis resolubilisiert. Anschließend wurden die Proben in einer 96-Well Platte mit V-Boden überführt und in die

Probenhalterung des Roboters eingesetzt. Die HPLC-Anlage besteht aus einer BioBasic C-18 Vorsäule (30 mm x 0.5 mm) und einer anschließenden BioBasic C18 Analysensäule (150 mm x 0.5 mm). Es wurde ein Rheos Allegro HPLC Pumpsystem mit einer Flussrate von 200 µl/min verwendet, die durch einen Micro-Splitter in der Säule auf 10 µl/min reduziert wurde. Es wurden folgende Laufpuffer verwendet: Laufpuffer A bestand aus 98% H<sub>2</sub>O, 1.94% ACN, 0.06% Methanol, 0.05% TFA und Laufpuffer B aus 95% ACN, 3% Methanol, 2% H<sub>2</sub>O und 0.05% TFA. In einem Zeitraum von 80 min wurde ein linearer Gradient verwendet (0-47 min: 0-100% B, 47-49 min: 100% B, 49-58: 100% -0% B, 58-80 min: 0% B). Der detektierte Massenbereich lag zwischen 300-2000 m/z mit einer Auflösung von 30.000 fwhm (fullWidth at Half Maximum/Halbwertszeit). Zur Fragmentierung wurde eine CID verwendet mit einer Kollisionsenergie von 35% und einer Aktivierungszeit von 30 ms. Zusätzlich wurde ein dynamischer Ausschluss von 30 s und einer Ausschlusszeit von 90 ms eingestellt. Nach einer erneuten Detektion des gleichen Peaks innerhalb von 30 ms wurde dieser in den nächsten 90 ms von der Fragmentierung ausgeschlossen. Dies ermöglichte die bessere Detektion von gering abundanten Peaks. Die Massenspektren wurden in den "profile" Modus aufgenommen, damit sie später mittels Maxquant analysiert werden können. Der experimentelle Aufbau ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

### 3.4.7 Daten Auswertung

Die erhaltenen Rohdaten aus der massenspektrometrischen Analyse wurden für die Identifikation und Quantifizierung der Proteine mit der Software MaxQuant benutzt. Dabei wurden folgende Einstellungen gewählt: Modifikation Carbamidomethylierung, Taxonomie Mus musculus, Datenbank Swiss prot, Enzym Trypsin, Minimal peptide 2 Minimum unique peptide 2, Massentoleranz 2 sowie eine peptid fals discovery rate von 0,01. Für die Berechnung der signifikant veränderten Proteine wurden die normalisierten Intensitäten verwendet und ein Verhältnis zwischen den behandelten Ak Gruppen und der unbehandelten Kontrollgruppe gebildet. Die Signifikanzschwelle lag bei einer 2fach erhöhten oder erniedrigten veränderten Proteinexpression. Um die erhaltene Datenmenge auf ihre biologische Bedeutung und möglich veränderte Signalkaskaden zu untersuchen wurde eine spezielle Software verwendet. Dieses

kommerziell erhältliche Programm „Ingenuity Pathway Analysis“ greift auf aktuelle wissenschaftliche Literatur zurück und zeigt Quervernetzungen sowie Signalkaskaden auf, sowie deren Zusammenhang mit den verschiedensten Erkrankungen. Mit Hilfe dieser Software wurden mittels Fisher-Exakt-Test signifikant veränderte Signalwege aufgezeigt ( $p < 0.05$ ).



**Abbildung 6: Schematischer Versuchsaufbau zur Identifizierung von veränderten Signalwegen mittels massenspektrometrischer Analyse**

Nach der Inkubation von RGC5 mit dem jeweiligen Ak wurden die Zellen lysiert und anschließend mittels eines 1D-Geles aufgetrennt. Die Zellysatspur wurde in 17 Bereiche aufgeteilt und tryptisch verdaut. Nach der Aufreinigung mittels C18 ZipTip Spitzen erfolgten die massenspektrometrischen Analysen. Quelle: Corina Wilding

### 3.5 Validierung der LC/ESI MS Ergebnisse mittels Antikörper-Mikroarray

In dieser Arbeit wurde zur Validierung der signifikant veränderten Proteine, welche in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert wurden, ein Ak-Mikroarray verwendet. Die Ak der zu untersuchenden Proteine sowie zusätzlich Proteine die in den jeweiligen Signalwegen von Bedeutung sind wurden kommerziell erworben und auf einen mit Nitrocellulose beschichteten Glasobjektträger mittels eines non contact Array-Spotter aufgetragen. Diese Methode erlaubt die simultane Untersuchung von mehreren Proteinen, wobei nur geringe Probenvolumina eingesetzt werden müssen.

Die Proteine des zu untersuchenden Zelllysates wurden durch die auf dem Microarray immobilisierten Ak gebunden. Mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, der an die Proteine des Zelllysates gekoppelt wurde können diese dann detektiert und quantitativ bestimmt werden.

### **3.5.1 Labeling der Zelllysateproteine mittels Cy3**

Wie in Kapitel 3.5 beschrieben wurden RGC5 mit den jeweiligen Konzentrationen des Ak für 3 h behandelt und anschließend lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Es wurden 6 µg Zelllysateproteine mit 3,6 µl Dylight 649 Lösung für 1 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 100 µl einer 1,5 M Tris-HCl Lösung abgestoppt und für 1 h im Dunkeln inkubiert (n=12).

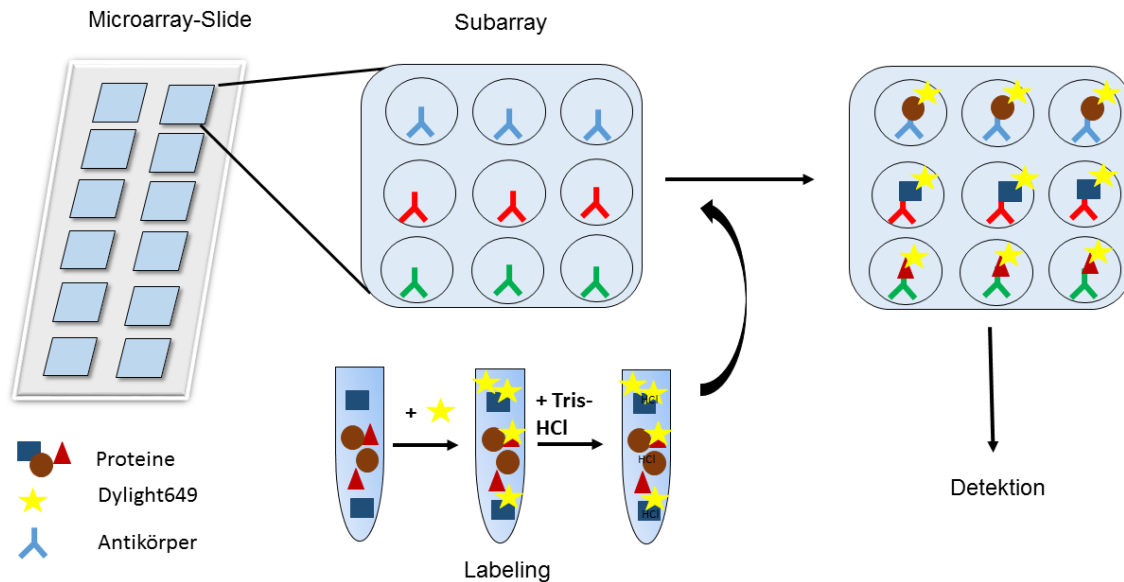
### **3.5.2 Herstellung und Inkubation der Ak-Mikroarray**

Die Ak-Mikroarray Objektträger wurden automatisiert mittels eines Piezo-Element basierendem Spot-Verfahren hergestellt, das die kontaktfreie Aufbringung der Ak ermöglicht. Die Ak wurden in PBS verdünnt und jeweils in Triplikaten gespottet. Der hergestellte Slide wurde anschließend mit 0,5% BSA und 0,5% Tween PBS für 1 h in einer feuchten Kammer auf dem Schüttler inkubiert. Nach 3maligem Waschen mit TPBS für jeweils 10 min wurde der Objektträger mit dem gelabelten Zelllysate für 2,5 h inkubiert. Danach wurde der Objektträger 2x mit TPBS und 1x mit HPLC-H<sub>2</sub>O gewaschen und die Reaktionen mit Hilfe eines Affimetrix 428 Array-Scanners detektiert (Abbildung 7).

### **3.5.3 Datenauswertung**

Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der Software Imagene 5.0 durchgeführt. Durch Anlegen eines Rasters, welches dem Spottingmuster angepasst wurde, wurde die Fluoreszenzintensität gemessen. Defekte Spots wurden manuell ausgeschlossen und

der Signalmedian von 3 Replikaten wurde gemittelt. Die erhaltenen Daten wurden mit Statistica analysiert und mittels eines studentischen T-tests ausgewertet.



**Abbildung 7: Graphische Darstellung des Versuchsablaufes zur Identifizierung von veränderten Proteinen mittels Microarray**

Ausgewählte Ak wurden mit Hilfe eines Spotters auf Nitrocellulosebeschichtete Microarray Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine des Zellysats mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dylight649 versehen und mit Tris-HCl wurde die Reaktion gestoppt. Die gelabelten Proteine wurden dann auf dem Microarray-Slide inkubiert und mittels eines Array Scanner wurden die Fluoreszenzintensitäten detektiert. Quelle: Corina Wilding.

### 3.6 Immunhistologische Untersuchung der Ak-Bindung an RGC5

Zur Untersuchung der Antikörperbindung oder Antikörperaufnahme in RGC5 wurde die indirekte Immunfluoreszenzmethode verwendet. Nach Kultivierung der RGC5 in  $\mu$ -slide IV Objektträgern folgte die Fixierung mit einer 3% PFA-Lösung. Anschließend wurden nach mehrmaligem Waschen der RGC5 mit PBS ein Permeabilisationsschritt mit Triton-X-100 sowie ein Blockierungsschritt mit einer BSA-TPBS-Lösung durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit dem primären Ak und nach mehrmaligem Waschen mit dem sek. Ak inkubiert. Zur Untersuchung der Ak-Bindung an lebenden RGC5 wurden lebende RGC5 für 3 h mit dem jeweiligen Ak präinkubiert und anschließend wie zuvor beschrieben fixiert und gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und mit Hilfe der Software Lucia G/F. Die



Inkubationszeiten sowie die Konzentrationen der verwendeten Lösungen sind in den nachfolgenden Tabellen 6 und 7 zusammengefasst.

**Tabelle 6: Übersicht der immunhistologischen Färbung zum Nachweis der Expression von 14-3-3, GFAP und  $\gamma$ -synuclein**

Schritt	Epitop 14-3-3	Epitop $\gamma$ -synuclein	Epitop GFAP
<b>Fixierung</b>	3% PFA, 15 min		
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min		
<b>Permeabilisation</b>	0,25% Triton-X-100, 12 min		
<b>Waschen</b>	PBS, 3x 5min		
<b>Blockieren</b>	1% BSA in TPBS, 20 min		
<b>Inkubation Prim. Ak</b>	2 $\mu$ g/ml rabbit polyclonal anti 14-3-3 sigma, ü. N.	2 $\mu$ g/ml sheep polyclonal anti- $\gamma$ -synuclein Ak, ü. N.	2 $\mu$ g/ml chicken polyclonal anti GFAP, ü. N
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min		
<b>Inkubation sek. Ak</b>	Goat polyclonal anti rabbit IgG-H&L (FITC), 1,5 h	rabbit anti sheep IgG-H&L (FITC), 1,5 h	rabbit polyclonal to chicken IgY-H&L (FITC) 1,5 h

Tabelle 7: Übersicht der immunhistologischen Färbung zur Untersuchung der Ak Aufnahme

Schritt	Epitop 14-3-3	Epitop $\gamma$ -synuclein
<b>Präinkubation prim. Ak</b>	10 $\mu$ g/ml rabbit polyclonal anti 14-3-3 sigma Ak, 3 h	15 $\mu$ g/ml sheep polyclonal anti $\gamma$ -synuclein Ak, 3 h
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min	
<b>Fixierung</b>	3% PFA, 15 min	
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min	
<b>Zellmembranfärbung</b>	6 $\mu$ g/ml WGA, 10 min	----
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min	
<b>Permeabilisation</b>	0,25% Triton-X-100 12 min	
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min	
<b>Blockieren</b>	1% BSA in TPBS, 20 min	
<b>Inkubation sek. Ak</b>	Goat polyclonal anti rabbit IgG-H&L (FITC), 1,5 h	rabbit anti sheep IgG-H&L (FITC) 1,5 h
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min	

### 3.7 Identifikation von GFAP Ak Interaktionspartner

#### 3.7.1 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese stellt eine hochauflösende Methode zur Auftrennung von komplexen Proteingemischen dar. Dies findet in zwei unabhängigen Schritten statt. In der 1. Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt, dabei wandern sie in eine Gelmatrix auf einen pH-Gradient, der durch ein elektrisches Feld aufgebaut wird, bis zu dem Punkt an dem Ihre Nettoladung Null ist. Dabei wurden immobilisierte pH-Gradienten (IPG) verwendet [116]. In der 2. Dimension erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem SDS-Polyacrylamidgel [117]. Dadurch entsteht ein zweidimensionales Punktmuster, wobei bei einer geeigneten Auflösung jedem Spot in der danach folgenden massenspektrometrischen Analyse ein Protein zugeordnet werden kann [118]. Wie in 3.5.1 und 3.5.2 beschrieben wurden RGC5 lysiert und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Für die Separation der Proteine in der 1. Dimension wurden 100 µg des Zelllysates in 125 µl des Probenpuffers gelöst und für 30 min bei 4°C inkubiert. Für die Auftrennung der Proteine nach dem isoelektrischen Punkt wurde ein Gelstreifen (Immobiline dry strip pH 3-10, nicht linear) verwendet der nach der Entfernung der Schutzfolie in eine Dehydrierungskassette gelegt wurde. Anschließend wurde das Zelllysate in dem entsprechenden Puffer auf den Gelstreifen gegeben und mit Silikonöl bedeckt. Das Spannungsprogramm der 1. Dimension erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers und ist in der nachfolgenden Tabelle 8 zu sehen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gelstreifen entnommen und mit dest. H<sub>2</sub>O gespült. Anschließend fand eine Reduzierung der Disulfidbrücken sowie eine Beladung mit SDS und DTT statt, indem die Streifen jeweils für 12 min in Equilibrierungspuffer I inkubiert wurden. Die entstandenen SH-Gruppen wurden anschließend alkyliert, indem sie für 12 min in Equilibrierungspuffer II auf dem Schüttler bei RT inkubiert wurden. Parallel wurde ein 4%iger Agarosepuffer hergestellt. Die equilibrierten Gelstreifen wurden auf ein 12% Polyacrylamidgel gelegt und luftblasenfrei mit Agarosepuffer bedeckt. Nachdem die Agarose ausgehärtet war wurde die Gelelektrophorese bei 130 V und 4°C gestartet. Die Gelelektrophorese wurde beendet, als die Lauffront das Untere des Gelrandes erreicht hatte. Wie in vorherigem Abschnitt beschrieben wurden

die Gele fixiert und gefärbt um den entsprechenden Massenbereich später auszuschneiden. Das Schwesterigel wurde für das Anfertigen eines Westernblots verwendet.

**Tabelle 8: Geräteeinstellung der isoelektrischen Fokussierung**

Die Oberflächentemperatur wurde auf 20°C und die Spannung auf 50 µA pro Streifen eingestellt.

Schritt	Spannung in V	Inkubationsdauer in h
Rehydration	--	2
Spannung halten	20	12
Gradient	500	1
Spannung halten	500	1
Gradient	1000	0,5
Spannung halten	100	1
Gradient	4000	0,5
Spannung halten	4000	2
Gradient	8000	2
Spannung halten	8000	2

### 3.7.2 Westernblot

Für die Immundetektion von Proteinen wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Nitrocellulosemembran wurde auf die Größe eines Geles zurecht geschnitten und für 20 min in Towbin-Puffer equilibriert. Die verwendeten Filter und Schwämme wurden ebenfalls mit Towbin-Puffer getränkt. In einer SemiDry-Blotkammer, beginnend bei der Anode, wurde ein luftblasenfreies Sandwich aus folgenden Materialien hergestellt: Filterschwamm, 3x Filtermembran, Nitrocellulose, Gel, 3x Filterpapier. Der Transfervorgang wurde bei 100 V für 70 min durchgeführt.

### 3.7.3 Immundetektion

Die Immundetektion von GFAP Ak Interaktionspartnern wurden nach folgenden Schritten durchgeführt, die in Tabelle 9 zusammengefasst sind. Zur Detektion wurde ein sek. Ak verwendet, der an eine Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Die Immunreaktionen wurde visualisiert mit einer 4-Chloronaphtol Lösung, welche für 20 min auf dem Blot im Dunkeln inkubiert wurde.

**Tabelle 9: Übersicht der verschiedenen Inkubationsschritte zur Immundetektion von GFAP Ak Interaktionspartner**

Schritt	Lösung	Inkubationszeitraum
Blockierung	4% Milchpulver	1 h
3x Waschen	Waschpuffer	5, 15, 5 min
Inkubation GFAP. Ak	Chicken anti GFAP Ak Waschpuffer	Über Nacht
3x Waschen	Waschpuffer	5, 15, 5 min
Inkubation sek. Ak	1:5000 Goat anti chicken IgY- HRP Waschpuffer	2 h
3x Waschen	Waschpuffer	5, 15, 5
Visualisierung	Färbelösung	20 min

### 3.7.4 Identifikation von 2D Spots mittels MALDI TOF/TOF

Die identifizierten Spots auf der Nitrocellulosemembran wurden aus dem entsprechenden Schwesterngel mit einem Skalpell ausgeschnitten und wie im vorherigen Abschnitt beschrieben verdaut. Die Peptidaufreinigung wurde mit C18 ZipTip Spitzen durchgeführt und direkt auf ein 386 MTP polished steel maldi target eluiert. Parallel wurden für die externe Kalibration 2 µl des Peptidstandards mit 18 µl Matrix vermischt und ebenfalls auf das Target appliziert. Nachdem die Proben unter der Sterilbank getrocknet waren, wurde die Matrix aufgetragen und bei RT getrocknet. Die Massenspektren wurden auf einem Ultraflex II MALDI-TOF/TOF MS der Firma Bruker Daltonics aufgenommen, welches mit einem Stickstofflaser ausgestattet ist. FlexControl/Flex Analysis Version 2.4 wurde als Software verwendet. Die Spektren wurden im Reflektor-Modus in einem Detektionsbereich für die Vorläufer Massen von 900-37000 m/z aufgenommen. Der S/N Schwellenwert für die Vorläufermasse lag bei

>10 und für die Intensität bei >700. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mit Hilfe der Software Biotoools und der Datenbank Mascot, mit folgenden Einstellungen der Suchkriterien: Es wurde die Datenbank Swissprot und der Organismus Mus Musculus gewählt. Trypsin wurde als Enzym ausgewählt und als fixe Modifikation Carbamidomethylierung der Cysteine. Des Weiteren wurde mit einer Massentoleranz von 100 ppm für MS Vorläufer und 0,8 Da für MS/MS Fragmente gesucht.

### **3.7.5 Validierung von GFAP Ak Interaktionspartnern mittels Antigen-Microarray sowie immunhistologischen Färbungen**

Die mittels Massenspektrometrie identifizierten GFAP Ak Identifikationspartner wurden mittels eines Antigen-Microarrays validiert. Hierfür wurde das Antigen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, auf einen mit Nitrozellulose beschichteten Objektträger gespottet und anschließend mit dem GFAP Ak inkubiert. Für die Visualisierung der Spots wurde ein sek. Ak gegen IgY, der mit FITC gekoppelt ist, verwendet. Die Auswertung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskopie sowie der Software Lucia G/F durchgeführt. Des Weiteren wurde die Kolo-kalisation von ERP57 und GFAP Ak in RGC5 mittels immunhistologischen Färbungen untersucht. Hierfür wurden RGC5 Zellen wie in Tabelle 10 angegeben fixiert, blockiert und anschließend mit anti ERP57 Ak und anti GFAP Ak über Nacht inkubiert. Danach wurden die RGC5 gewaschen und mit dem sek. Ak gegen IgG-H&L (TRITC) und dem sek. Ak gegen IgY-H&L (FITC) für 2 h inkubiert. Die Auswertung wurde ebenfalls mit dem Fluoreszenzmikroskop sowie der Software Lucia G/F durchgeführt.

Tabelle 10: Übersicht der immunhistologischen Färbung der Kolo-kalisation von ERP57 und GFAP Ak

Schritt	Epitop GFAP	Epitop ERP57
<b>Fixierung</b>	3% PFA, 15 min	
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min	
<b>Blockieren</b>	1% BSA	
<b>Inkubation prim. Ak</b>	2 µg/ml polyclonal anti GFAP Ak, ü. N	5 µg mouse monoclonal anti ERP57 Ak, ü. N.
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min	
<b>Inkubation sek. Ak</b>	rabbit polyclonal anti chicken IgY-H&L (FITC) 1:1000, 2 h	Rabbit polyclonal anti mouse IgG-H&L (TRITC) 1:500, 2 h
<b>Waschen</b>	PBS, 3x5 min	

### 3.8 Retinale Organkultur aus den Schwein

Für die Gewinnung der Retina wurden Schweineaugen verwendet, die von einem lokalen Metzger bezogen wurden. Bis zur Präparation der Augen wurden diese in gekühltem PBS gelagert. Die Präparation wurde bis spätestens 3 h nach der Eukleation und in Anlehnung an die von Caffé et al entwickelte Methode durchgeführt [102]. Es wurde eine retinale Organkultur über 5 Kultivierungstage angelegt und pro Kultivierungstag wurden 4 Retinaexplantate angefertigt (Abbildung 9). Die 4 Retinaexplantate des entsprechenden Kultivierungstages wurden aus den Inserts entfernt und weiterverarbeitet für die histologische Färbung.

#### 3.8.1 Präparation der Retina/Pigmentepithels

**Desinfektion und Säuberung:** Zu Beginn der Präparation wurden die Schweineaugen in 70% Ethanol für 1 min desinfiziert und anschließend in PBS gewaschen. Zur Erleichterung der Präparation wurden die Gewebereste mit Hilfe einer Schere entfernt (Abbildung 8A).

**Öffnen des Bulbus:** Der Bulbus wurde mit Hilfe eines Skalpell im Bereich der Pars plana eingeschnitten und mit einer Schere zirkulär aufgeschnitten. Der vordere Augenabschnitt wurde verworfen und der Glaskörper im hinteren Augenabschnitt entfernt (Abbildung 8B).

**Präparation der Retina:** Die Retina liegt locker auf dem Pigmentepithel auf und kann mit Hilfe von PBS und einem Pinsel von dieser leicht gelöst werden. Anschließend wurde mit einer Schere die Retina im Bereich des Sehnerves durchtrennt und in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt.

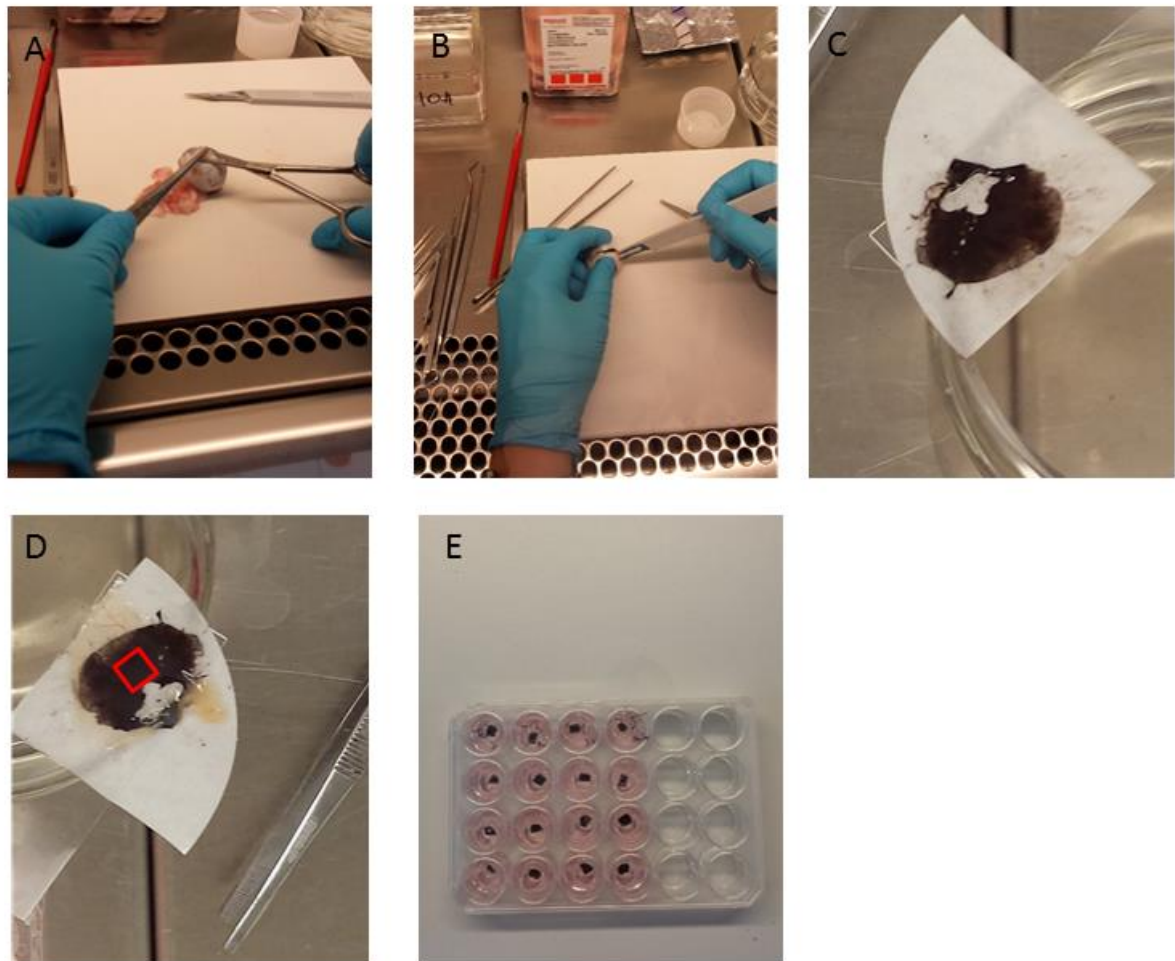
**Präparation des RPE:** Als nächstes wurde das Pigmentepithel zusammen mit der Choroidea entfernt. Diese sind fest mit der Lederhaut verbunden und müssen daher mit einem Skalpell abgeschabt werden. Hierfür wurde der Bulbus umgestülpt und das RPE in Richtung Sehnerv abgeschabt. Im Bereich des Sehnerves ist das RPE noch mit dem Bulbus verbunden. Dieses wurde mit einer Schere durchtrennt und in eine Petrischale mit PBS überführt (Abbildung 8C).

**Zusammenführung von RPE/Choroidea und Retina:** Für die in vivo Zusammenführung der Retina und des RPE wurde ein Objektträger sowie eine Nitrocellulosemembran verwendet. Die Nitrocellulose wurde mit PBS befeuchtet und auf den Objektträger gelegt. Als erstes wurde das RPE mit der skleralen Seite nach unten auf die Nitrocellulose aufgezogen und anschließend wurde die Retina mit der Photorezeptorseite nach unten auf das RPE gelegt. Das Aufnehmen des RPE sowie der Retina fand in einer mit PBS gefüllten Petrischale statt. Der RPE/Retina Komplex wurde nun in 5x5 mm Stücke zugeschnitten. Zur Gewährleistung der gleichbleibenden Anzahl von RGZ wurde für die Kultivierung ausschließlich ein 1 cm<sup>2</sup> großer Bereich über dem Sehnerv verwendet, der eine hohe Anzahl an RGZ enthält [119] (Abbildung 8D).

**Kultivierung des RPE/Retina Komplexes:** Die Kultivierung der Organkultur fand in Inserts statt, die in 24 Well Platten positioniert werden können. Diese enthalten an der unteren Seite eine permeable Membran, die den Austausch von Stoffen ermöglicht. Der RPE/Retina Komplex wurde in Inserts flach auf dem Boden platziert und in Medium gefüllte 24 Well Platten eingesetzt. Der Füllstand des Medium wurde so gewählt, dass die Organkultur flach mit Medium benetzt war, um einen optimalen



Sauerstoffaustausch zu gewährleisten. Der Retina/RPE Komplex wurde anschließend im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sup>2</sup> kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus Neurobasal A Grundmedium, welches mit 2% B27, 1% N2, 0,8 mM L-Alanyl-L-Glutamin sowie 1% Penicillin versetzt wurde. Die Retina/RPE Kultur wurde alle 24 h mit frischem Medium versorgt (Abbildung 8E).



**Abbildung 8: Präparation der retinale Organkultur**

**A:** Säuberung des Bulbus von Gewebsresten

**B:** Öffnen des Bulbus

**C:** Präparation des RPE

**D:** Zusammenführung von RPE und Retina auf Nitrozellulose. Der rot markierte Bereich stellt die retinale Fläche da, die für die Kultivierung verwendet wurde.

**E:** Kultivierung RPE/Retina Explantate (Quelle: Corina Wilding)

### 3.8.2 Histologische Bearbeitung der Retinakultur

Nach Beendigung der Retina Kultur wurden die Explantate entnommen, in Einbettkassetten verschlossen und für 1 h mit 4% PFA fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung mit Hilfe eines Einbettautomaten bei dem folgendes Programm voreingestellt war.

1. Entwässerung in 70% Ethanol 45 min bei 40°C

2x 96% Ethanol 45 min bei 40°C

3x100% Ethanol 45 min bei 40°C

3x Xylol 45 min bei 40°C

2. Inkubation in Paraffin bei 60°C über Nacht

Die in Paraffin inkubierten Gewebe wurden in Ausgießförmchen aufrecht platziert und mit Paraffin ausgegossen. Nach Erkalten des Paraffins konnte der Paraffinblock aus den Ausgießförmchen entfernt werden und mittels Mikrotom erfolgte die Anfertigung von 16 µm dicken Schnitten, die auf Objektträger aufgezogen wurden. Danach konnten die Schnitte bis zur immunhistologischen Färbung in einem Inkubator bei 37°C aufbewahrt oder direkt zum Entparaffinieren in einem Inkubator bei 62-65°C für 1 h inkubiert werden. Um das restliche Paraffin zu entfernen wurden die Schnitte 2x5 min in Xylol inkubiert und jeweils einige Sekunden in einer absteigenden Alkoholreihe von 100%, 96% und 70% Ethanol sowie anschließend in Leitungswasser eingetaucht.

### 3.8.3 Immunhistologische Färbung der Retinakultur

Für die immunhistologische Färbung von RGZ in der Retinakultur wurde die indirekte Immunfluoreszenzmethode gewählt. Hierbei wurde der RGZ Marker BRN3a ausgewählt. Die Färbung wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt und um die Schnitte wurde mit Hilfe eines PAP Pen eine wasserabweisende Barriere gezogen. Die Schritte der immunhistologischen Färbung sind in nachfolgender Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Inkubationsschritte der immunhistologischen Färbung von BRN3a

Schritte	Lösung	Inkubationszeit
<b>Antigen Retrieval</b>	1x Antigen Retrieval Solution	20 min im Dampfgarer, 70°C
<b>Waschen</b>	PBS	5 min, RT
<b>Blockieren/ Permeabilisieren</b>	2% BSA 0,3% Triton-X-100 5% Goat Serum	60 min, RT
<b>Inkubation prim. Ak</b>	1:100 rabbit anti BRN3a Ak	Ü. Nacht, 4°C
<b>Waschen</b>	PBS	6x5 min, RT
<b>Inkubation sek. Ak</b>	1:1000 goat anti rabbit IgG-Cy3	2 h, RT
<b>Waschen</b>	PBS	3x5 min
<b>Eindecken</b>	Mounting Medium mit Dapi	

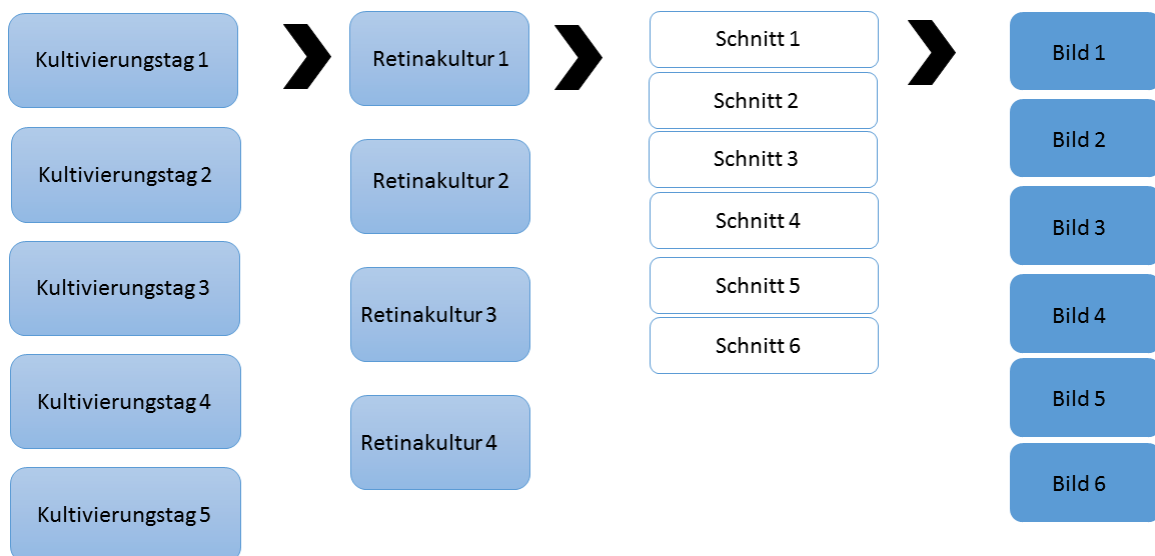
### 3.8.4 Tunel Assay

Der Tunel Assay (Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) dient der Detektierung und Visualisierung von DNA Fragmenten, welche ein Kennzeichen von apoptotischen Zellen darstellt. Bei dieser Methode werden Fluoreszein markierte Nukleotide an freie 3'OH-Gruppen der DNA Fragmente enzymatisch angeheftet. Zur Durchführung des Tunel Assay's wurde das In situ cell detection Kit, Fluorescein, laut den Angaben des Herstellers verwendet. Zu Beginn wurde die Enzym-Lösung und die Labeling Lösung 1:10 gemischt. Anschließend fand die Inkubation der zuvor gefärbten Schnitte mit dem Tunel-Reagenz bei 37°C im Dunklen in einer feuchten Kammer für 60 min statt. Als negative Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit der Labeling Lösung inkubiert wurden und als positive Kontrolle wurden Schnitte verwendet bei denen DNA Strang Brüche induziert wurden. Hierfür wurden die Schnitte vor der Zugabe des Tunel Reagenz mit 3000 U/ml DNase I für 30 min bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Schnitte 3x5 min in PBS gewaschen und mit Mounting Medium, welches DAPI

beinhaltet, eingedeckt. Die Visualisierung wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Extinktion von 488 nm und einer Emission zwischen 515-560 nm durchgeführt.

### 3.8.5 Auswertung der histologisch gefärbten Retinaexplantate

Die Auswertung der immunhistologischen Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes. Mit der Nikon Imaging Software wurden die Bilder nach dem Schema in Abbildung 9 aufgenommen und anschließend mit der Software ImageJ ausgewertet. Zellen, die eine positive BRN3a Färbung und einen gefärbten Zellkern aufwiesen, sowie in der retinalen Ganglienzellschicht lagen, wurden als RGZ positiv markiert. Des Weiteren wurden Tunel positive RGZ markiert. Die statistische Auswertung wurde mit der Software Statistica durchgeführt, wobei ein studentischer T-test im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle angewandt wurde.



**Abbildung 9:** Schematischer Aufbau der 5 Tage Retinakultur sowie der immunhistologischen Auswertung der retinalen Explantate

### 3.9 Untersuchung des Effektes von Ak auf retinale Explantate

Um den Effekt von Ak auf RGZ zu untersuchen wurden die Retinaexplantate am 1. Kultivierungstag mit 0,5 µg/ml rabbit polyclonal anti 14-3-3 Ak, 0.5 µg/ml goat

polyclonal anti  $\gamma$ -synuclein Ak oder 1  $\mu\text{g/ml}$  chicken polyclonal anti GFAP Ak  $\mu\text{g/ml}$  für 24 h inkubiert. Es wurden jeweils 8 Retinaexplantate für den entsprechenden Ak angefertigt. Anschließend wurden 4 Retinaexplantate wie in Kapitel 3.8.2 für die histologische Färbung weiterverarbeitet, sowie 4 Retinaexplantate für die massenspektrometrische Analyse verwendet. Dies ist im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

### **3.9.1 Massenspektrometrische Analyse der mit Ak inkubierten Retinaexplantate**

Nach der Kultivierung der Retinaexplantate mit den entsprechenden Ak wurden diese aus den Inserts entfernt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellyse fand mit Hilfe von flüssigem Stickstoff statt. Dafür wurden die Retinastücke mit flüssigem Stickstoff übergossen bis sie vollständig gefroren waren. Mit Hilfe eines im flüssigen Stickstoff vorgekühlten Pistills wurden die Retinastücke zu einem feinen Pulver gemörsert. Dieses wurde mit 150  $\mu\text{l}$  Lysispuffer und zusätzlich mit 1  $\mu\text{l}$  Proteinase Cocktail und 1  $\mu\text{l}$  NP-40 versetzt. Nach einer Inkubation bei 4°C für 1 h wurden die Proben im Ultraschallbad für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1400 g, 4°C für 20 min. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Zellpellet in 100  $\mu\text{l}$  Lysispuffer gelöst. Als nächstes erfolgte die Bearbeitung der Proben mit dem Ultraschallstab bei einer Amplitude von 60% und einem Zyklus von 0,5, dem sich ein weiterer Zentrifugationsschritt, wie oben beschrieben, anschloss. Der Überstand wurde zusammen mit dem vorherigen Überstand in ein gemeinsames Reaktionsgefäß überführt. Als letztes erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 700 g für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die weitere Verwendung bei -20°C eingefroren. Die anschließende Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie erfolgte wie in den vorherigen Kapiteln 3.4.2-3.4.7 beschrieben.

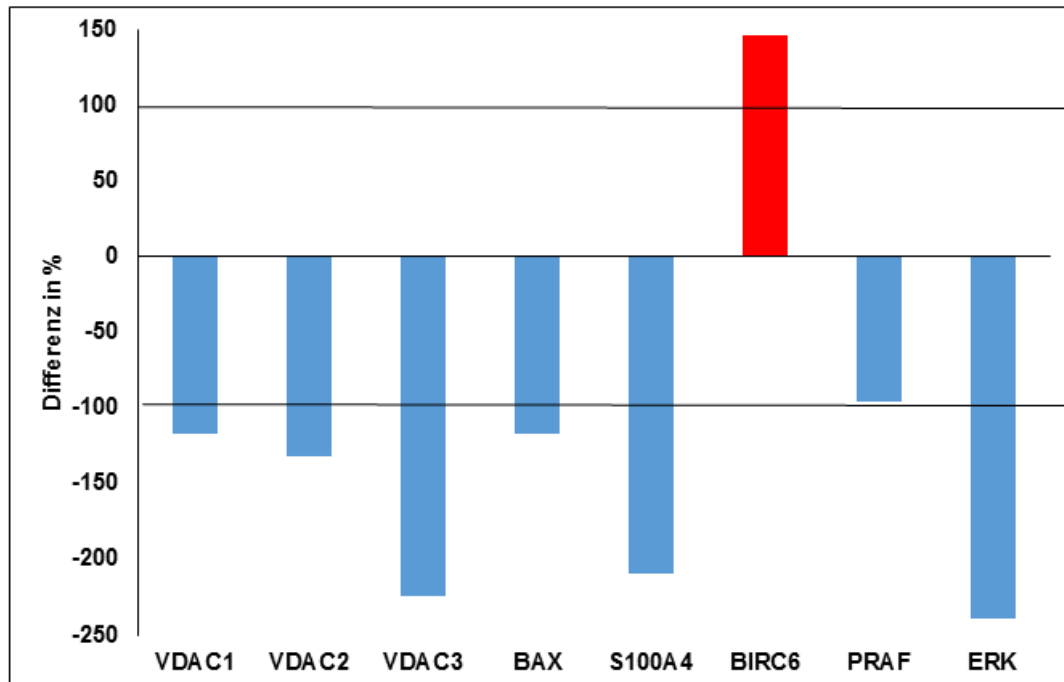
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Proteomanalyse Ak behandelter RGC5

Die massenspektrometrische Analysen gaben Aufschluss auf mögliche veränderte Signalwege in Ak behandelten RGC5. RGC5 wurden mit bestimmten Ak Konzentrationen inkubiert, die in den Vorstudien einen protektiven Effekt auf gestresste RGC5 zeigten und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Proteine, die im Vergleich zu unbehandelten RGC5 2fach verändert reguliert waren, wurden als signifikant angegeben. Diese veränderten Proteine sowie speziell ausgewählte Proteine, die in dem entsprechenden Signalweg eine wichtige Rolle einnehmen, wurden mittels Ak Microarray validiert.

#### 4.1.1 Effekt von $\gamma$ -synuclein-Ak auf Signalwege in RGC5

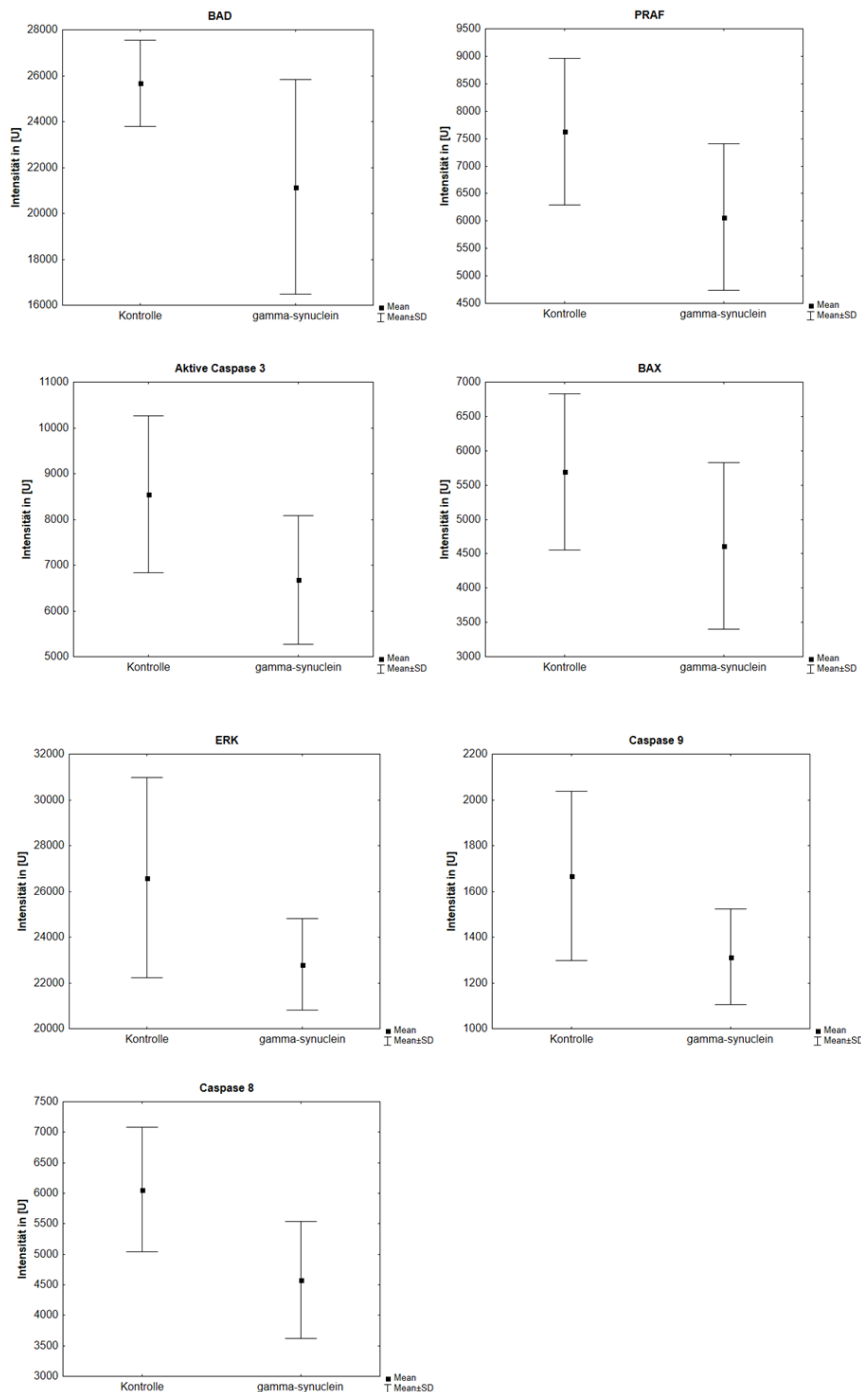
Insgesamt wurden 1110 Proteine identifiziert von denen 200 in den  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 signifikant verändert waren (>2fach erhöht oder erniedrigt) (Anhang Tabelle 12). Diese wurden mit Hilfe von IPA analysiert und in veränderte Signalwege klassifiziert. Zu diesen Signalwegen gehörte der intrinsische apoptotische Signalweg, in dem 6 Proteine identifiziert werden konnten, die signifikant verändert waren (Abbildung 10). Darunter befand sich voltage dependent anion channel 1/2/3 (VDAC1/2/3), bcl-2 associated bax protein (BAX), S100A4, PRA1 domain family, member 2 (PRAF2) und extracellular regulated protein kinase (ERK), welche signifikant herunterreguliert, sowie baculoviral IAP repeat-containing protein (BIRC6), welches signifikant hochreguliert war .



**Abbildung 10: Regulation von Proteinen des mitochondrialen Apoptose Signalweges in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 identifiziert mittels LTQ-Orbitrap XL**

RGC5 wurden mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -synuclein Ak präinkubiert und anschließend lysiert, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Die Differenz wurde im Vergleich zu unbehandelten RGC5 berechnet. Proteine die 2fach reguliert auftraten wurden als signifikant angegeben [64].

Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines Ak-Microarrays validiert. Zusätzlich wurde die Regulierung von Proteinen untersucht, die eine wichtige Rolle im intrinsischen sowie extrinsischen Apoptose Signalweg einnehmen. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse konnten mittels Microarray Analyse validiert werden. BAX, ERK und PRAF2 waren signifikant herunterreguliert. Es konnten keine signifikanten Ergebnisse bei den Proteinen S100A4 und VDAC1/2/3 detektiert werden, jedoch korreliert die Tendenz mit den massenspektrometrischen Ergebnissen (Anhang Abbildung 32). BIRC 6 zeigte ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse und die Tendenz stimmt nicht mit der Regulierung der massenspektrometrischen Ergebnisse überein. Zusätzlich konnten signifikant veränderte Proteine des intrinsischen sowie extrinsischen Apoptose Signalweges identifiziert werden. Darunter befand sich aktive Caspase 3, Caspase 9, Caspase 8 und bcl-2-associated death promoter (BAD), welche signifikant herunterreguliert waren sowie phosphorylated extracellulare regulated proteinkinase (p-ERK), welche hochreguliert war (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Regulation von Proteinen des mitochondrialen Apoptose Signalweg in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 identifiziert mittels Microarray**

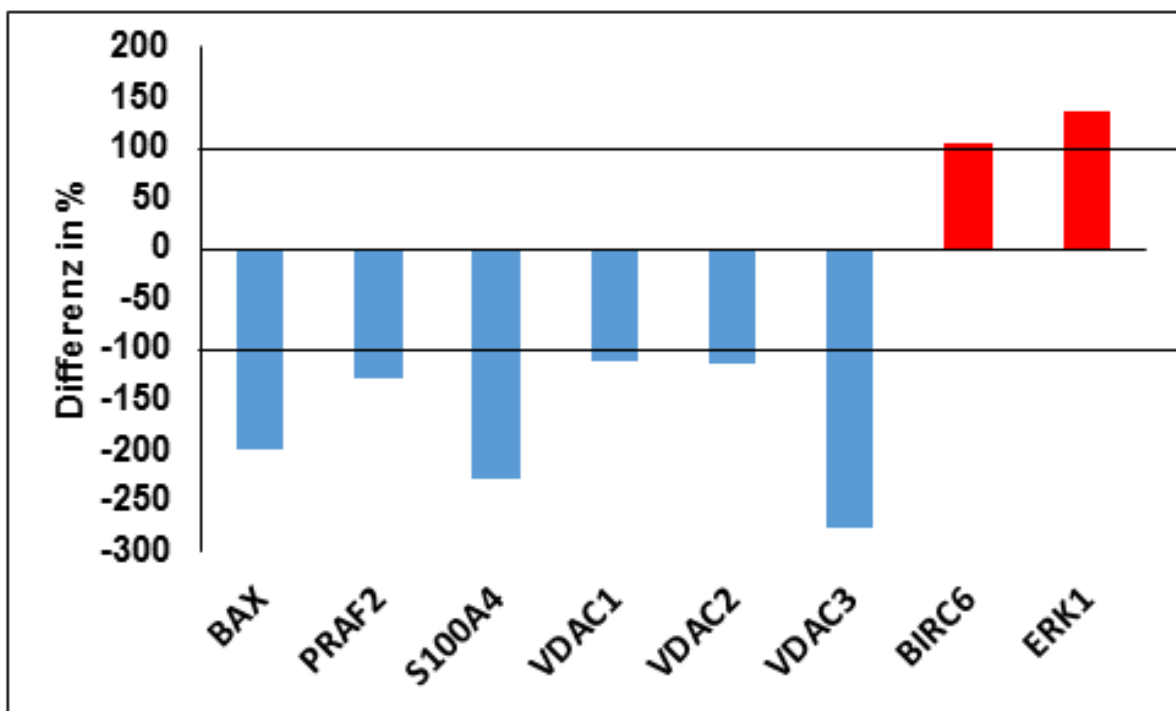
RGC5 wurden präinkubiert mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -synuclein Ak für 3 h und anschließend lysiert und mittels Microarray die Expression bestimmt. Als Kontrolle wurden unbehandelte RGC5 verwendet ( $n=12$ ,  $p<0,05$ ) [64].

#### 4.1.2 Effekt von 14-3-3 Ak auf Signalwege in RGC5

In 14-3-3 Ak behandelten RGC5 konnten insgesamt 1204 Proteine identifiziert werden, wovon 225 signifikant verändert waren. Diese Proteine wurden ebenfalls mit IPA



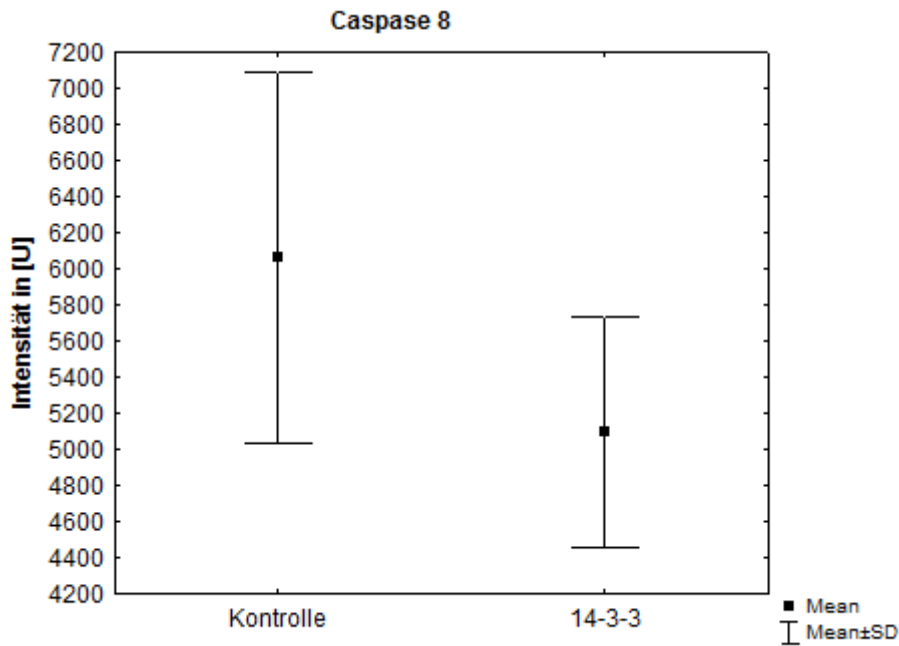
untersucht und in veränderte Signalwege klassifiziert. Darunter konnten ebenfalls 7 signifikant veränderte Proteine des intrinsischen Apoptose Signalweges identifiziert werden. BAX, PRAF2, S100A4, VDAC1/2/3 waren signifikant herunterreguliert sowie BIRC6 und ERK1/2, welche signifikant hochreguliert waren (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Regulation von Proteinen des mitochondrialen Apoptose Signalweges in 14-3-3 Ak behandelten RGC5 mittels LTQ-Orbitrap XL**

RGC5 wurden mit 0,5 µg/ml 14-3-3 Ak präinkubiert und anschließend lysiert, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Die Differenz wurde im Vergleich zu unbehandelten RGC5 berechnet. Proteine die 2fach reguliert auftreten werden als signifikant angegeben (Revision BMC Ophthalmology, 2015).

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse konnten mittels Ak-Microarray teilweise validiert werden. BAX, PRAF2, S100A4, VDAC1 und ERK1 zeigten keine signifikant veränderte Regulierung in 14-3-3 Ak behandelten RGC5, jedoch korrelierte die Tendenz mit den massenspektrometrischen Analysen. BIRC6 zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung und auch die Tendenz stimmt nicht mit den massenspektrometrischen Analysen überein. Zusätzlich untersuchte Proteine wie aktive Caspase 3, Caspase 9 und p-ERK zeigten keine signifikanten Veränderungen (Anhang Abbildung 33). Caspase 8 zeigte eine signifikante Herunterregulierung in 14-3-3 Ak behandelten RGC5 (Abbildung 13).

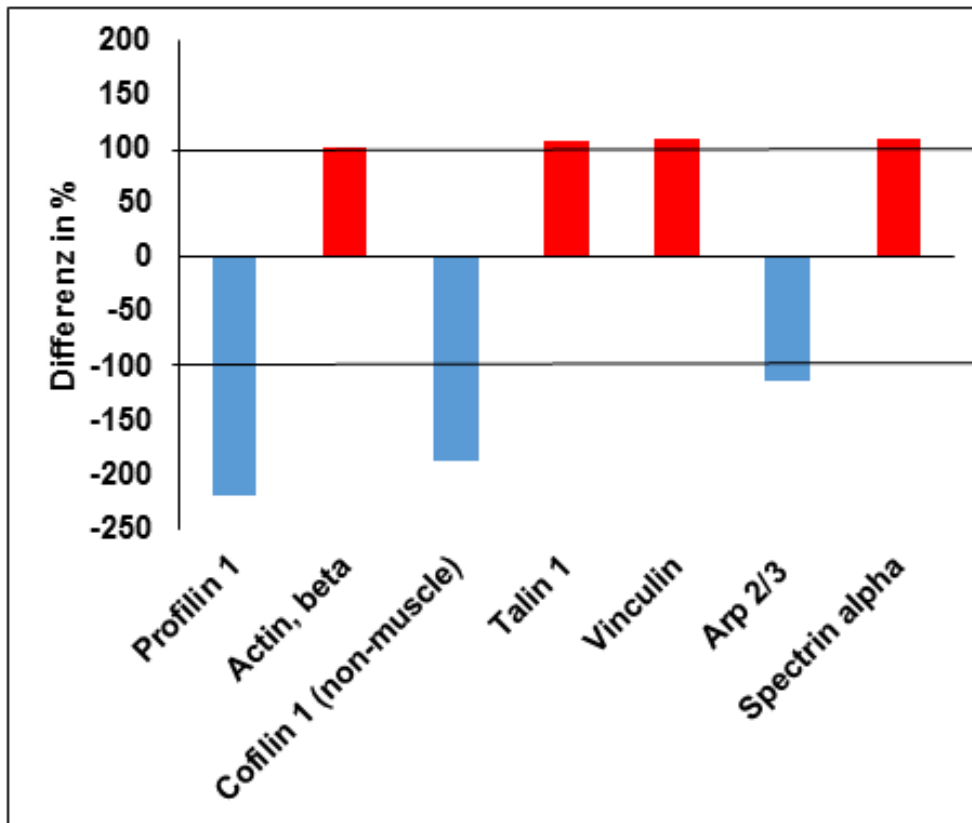


**Abbildung 13: Regulation von Proteinen des Apoptose Signalweg in 14-3-3 Ak behandelten RGC5 mittels Microarray**

RGC5 wurden präinkubiert mit 0,5 µg/ml 14-3-3 Ak für 3 h und anschließend lysiert und mittels Microarray die Expression der zu untersuchenden Proteine bestimmt. Als Kontrolle wurden unbehandelte RGC5 verwendet (n=12, p>0,05).

#### 4.1.3 Effekt von GFAP-Ak auf Signalwege in RGC5

In GFAP Ak behandelten RGC5 konnten 486 Proteine identifiziert werden, wovon 102 signifikant verändert waren. Diese Proteine wurden mit IPA untersucht und in veränderte Signalwege gegliedert. Darunter befanden sich 9 signifikant veränderte Proteine, die an der Organisation des Aktin Zytoskeletts beteiligt sind. Profilin 1, Cofilin1, Actin related protein 2/3 (ARP 2/3) und α-Spectrin waren signifikant herunterreguliert und Actin beta, Talin 1 und Vinculin waren signifikant hochreguliert (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Regulation von Proteinen des Aktin Zytoskelett Signalweges in GFAP Ak behandelten RGC5 mittels LTQ Orbitrap XL**

RGC5 wurden mit 1 µg/ml GFAP Ak präinkubiert und anschließend lysiert, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Die Differenz wurde im Vergleich zu unbehandelten RGC5 berechnet. Proteine die >2fach reguliert auftreten werden als signifikant angegeben (Wilding et al., Angenommen im Journal of Pharmacological Science, 03.02.2015).

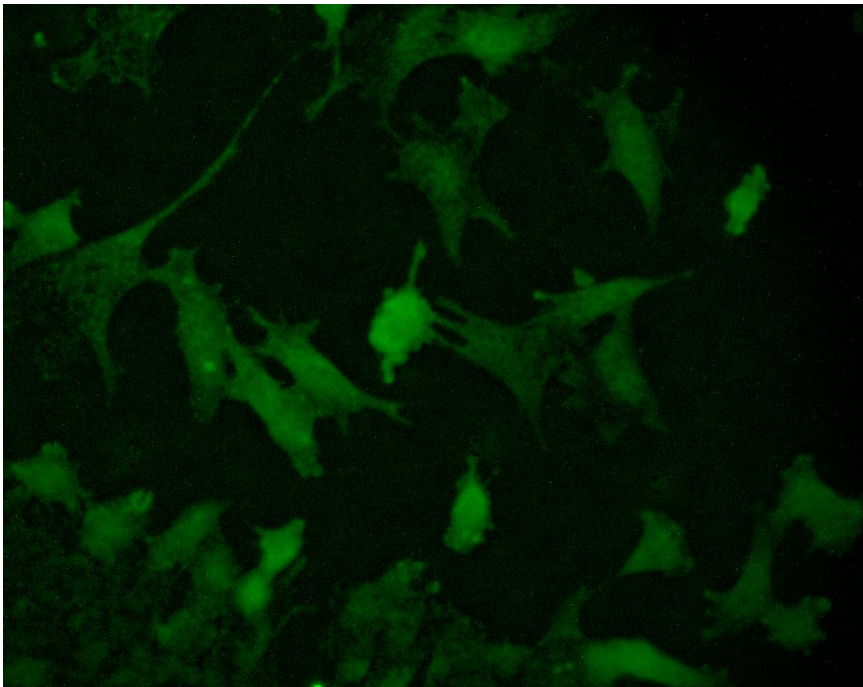
Die massenspektrometrischen Ergebnisse konnten nicht mittels Ak-Microarray validiert werden. Actin beta, Cofilin, Talin 1 und Vinculin zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die aktivierte Form von Cofilin (Cofilin(pSer3)) wies ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen GFAP Ak behandelten RGC5 und unbehandelten RGC5 auf (Anhang Abbildung 34).

#### 4.2 Untersuchung der Aufnahme/Bindung von Ak behandelten RGC5

Zur Untersuchung der Ak Aufnahme oder Bindung in RGC5 wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dabei wurde zum einem das jeweilige Antigen in permeabilisierten RGC5 nachgewiesen sowie die Ak Aufnahme oder Bindung an die Zellmembran in lebenden RGC5 untersucht.

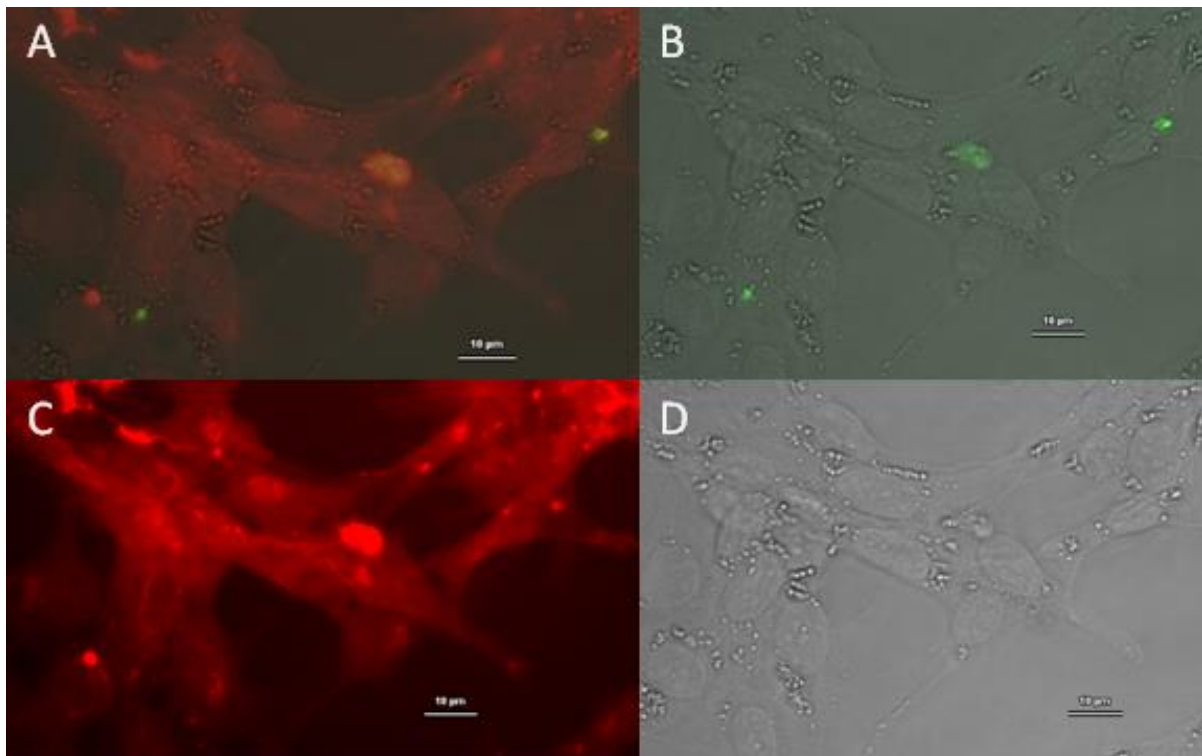
#### 4.2.1 Aufnahme von $\gamma$ -synuclein Ak in RGC5

Die Bestimmung der Expression von  $\gamma$ -synuclein in RGC5 wurde mittels indirekter immunhistologischer Fluoreszenzfärbung untersucht. Die Fluoreszenzfärbung und somit die Expression von  $\gamma$ -synuclein zeigte eine diffuse Färbung im zytoplasmatischen Raum (Abbildung 15). Es wurde ebenfalls die Bindung von  $\gamma$ -synuclein Ak in lebenden RGC5 untersucht. Hierzu wurde die Zellwand mit WGA angefärbt, welches in Rot zusehen ist (Abbildung 16A). Eine Ak-Aufnahme in lebenden RGC5 war nach 3 h zu beobachten. Die punktuelle Färbung von  $\gamma$ -synuclein Ak lässt auf die Aufnahme in Vesikeln schließen (Abbildung 16B).



**Abbildung 15: Expression von  $\gamma$ -synuclein in RGC5**

RGC5 wurden fixiert, permeabilisiert, geblockt und inkubiert mit Ak gegen  $\gamma$ -synuclein. Visualisiert wurde die Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop [64].



**Abbildung 16:  $\gamma$ -synuclein Ak Aufnahme in RGC5**

Lebende RGC5 wurden präinkubiert mit anti  $\gamma$ -synuclein Ak und anschließend fixiert, permeabilisiert, geblockt und mit einem sek. Ak rabbit anti sheep (FITC) inkubiert. Die Zellmembran wurde mit WGA gefärbt. Visualisiert wurde die Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop [64].

A: Durchlicht+Zellmembran (rot)+ $\gamma$ -synuclein Ak (grün)

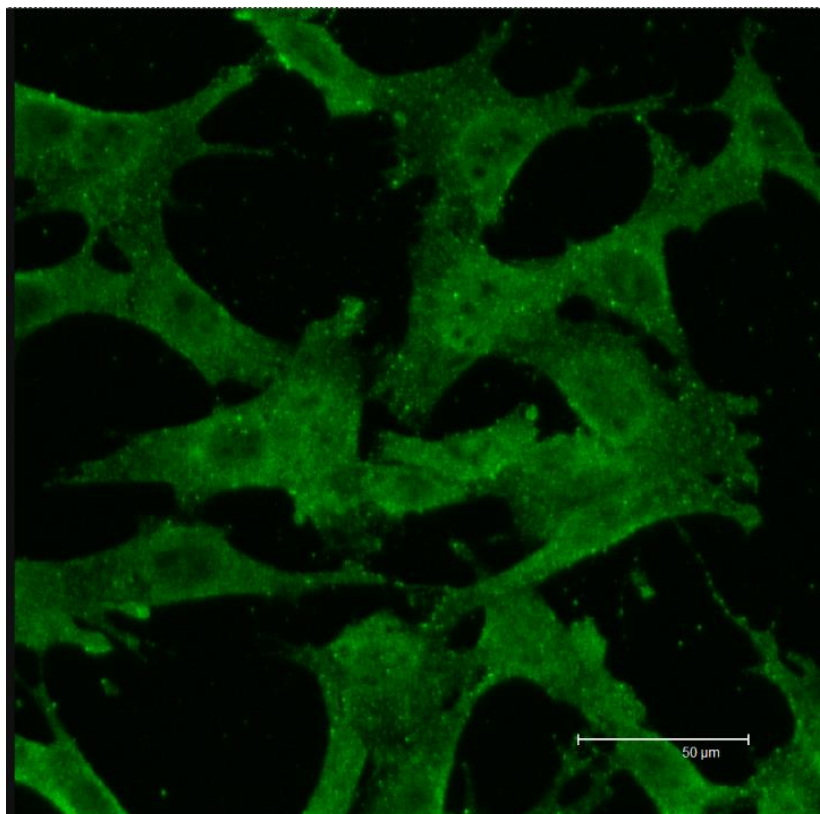
B: Durchlicht+ $\gamma$ -synuclein Ak (grün)

C: Zellmembran (rot)

D: Durchlicht

#### 4.2.2 Aufnahme von 14-3-3 Ak in RGC5

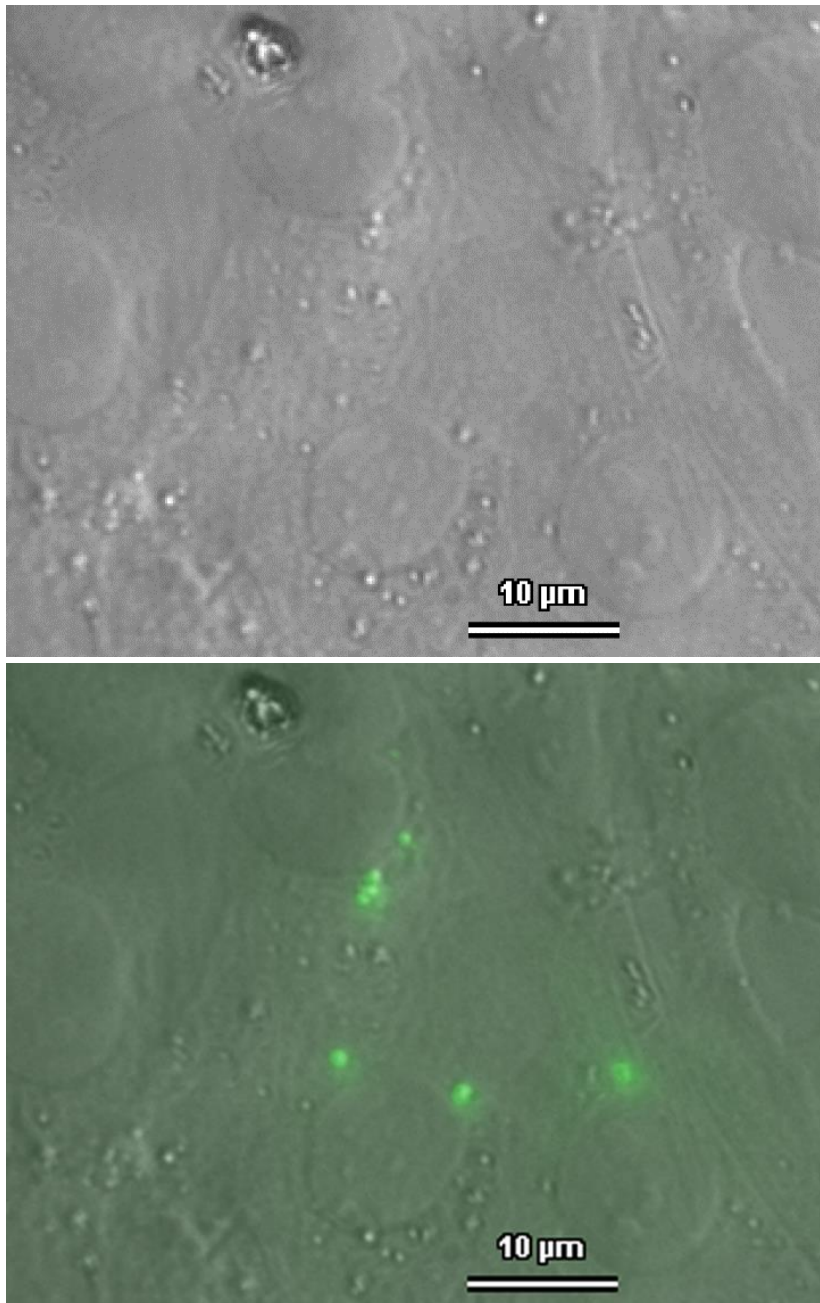
In RGC5 konnte ebenfalls mittels immunhistologischer Fluoreszenzfärbung die Expression von 14-3-3 im zytoplasmatischen Raum beobachtet werden (Abbildung 17). In lebenden RGC5 konnte die Aufnahme von 14-3-3 Ak in Vesikeln von lebenden Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 18).



**Abbildung 17: Expression von 14-3-3 in RGC5**

RGC5 wurden fixiert, permeabilisiert, geblockt und inkubiert mit Ak gegen 14-3-3. Visualisiert wurde die Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Revision BMC Ophthalmology, 2015).





**Abbildung 18: 14-3-3 Ak Aufnahme in RGC5**

Lebende RGC5 wurden präinkubiert mit 14-3-3 Ak und anschließend fixiert, permeabilisiert, geblockt und mit einem sek. Ak rabbit anti sheep (FITC) inkubiert. Visualisiert wurde die Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop, (Revision BMC Ophthalmology, 2015).

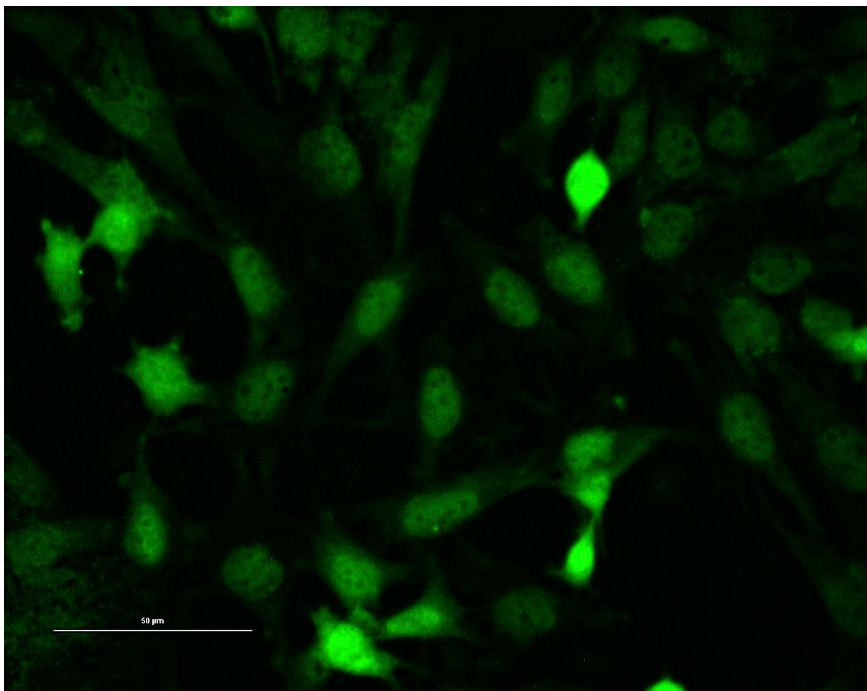
A: Durchlicht

B: Durchlicht + 14-3-3 Ak (grün)

#### 4.2.3 Bindung von GFAP Ak an die Zellmembran von RGC5

Die Expression von GFAP konnte in RGC5 mittels indirekter Fluoreszenzfärbung im Bereich des Zellkerns nachgewiesen werden (Abbildung 19). In lebenden Zellen

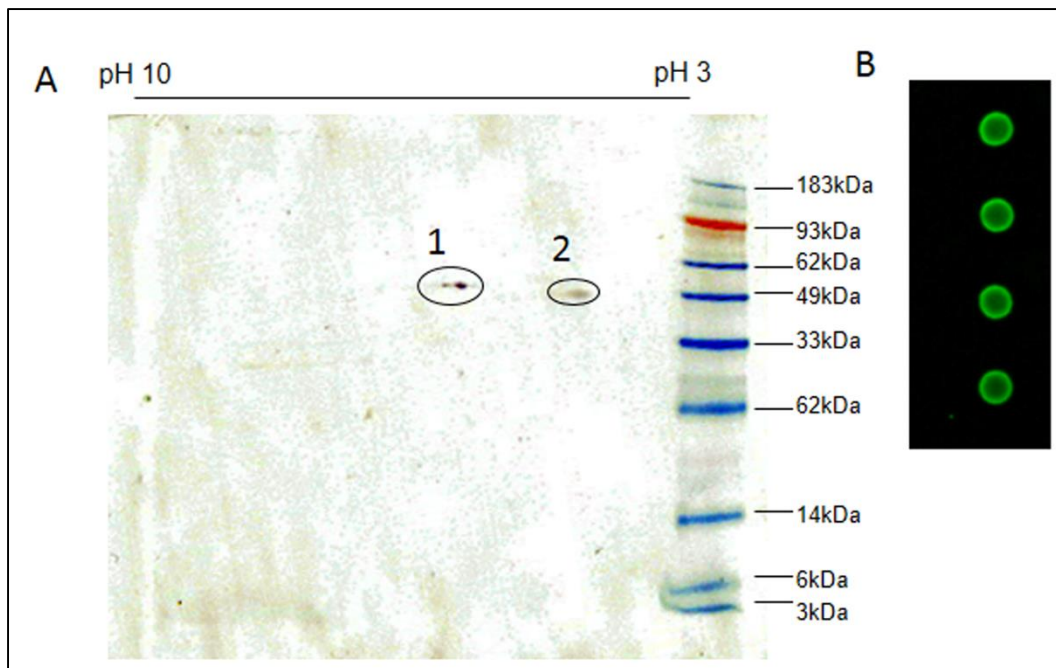
konnte keine GFAP Ak Aufnahme oder Bindung beobachtet werden. Zur Identifizierung von GFAP Ak Bindungspartner wurde ein Westernblot durchgeführt. Dieser zeigte im Massenbereich von 56 kDa eine positive Färbung, welche mit der Größe von GFAP korreliert sowie einen zweiten positiven Spot bei 49 kDa. Mittels massenspektrometrischen Analysen wurde dieser Bereich analysiert und als möglicher Bindungspartner konnte ERP57 identifiziert werden (Abbildung 20A). Micoarray Untersuchungen konnten die Bindung von GFAP Ak an ERP57 validieren. Dies ist an der positiven Färbung in Abbildung 20B zu erkennen. Des Weiteren konnte die Expression von ERP57 an nicht permeabilisierten, fixierten RGC5 sowie die Kollokalisierung von GFAP Ak und ERP57 an der Zellmembran gezeigt werden (Abbildung 21).



**Abbildung 19: Expression von GFAP in RGC5**

*RGC5 wurden fixiert, permeabilisiert, geblockt und inkubiert mit Ak gegen GFAP. Visualisiert wurde die Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop, (Wilding et al., Angenommen im Journal of Pharmacological Science, 03.02.2015).*

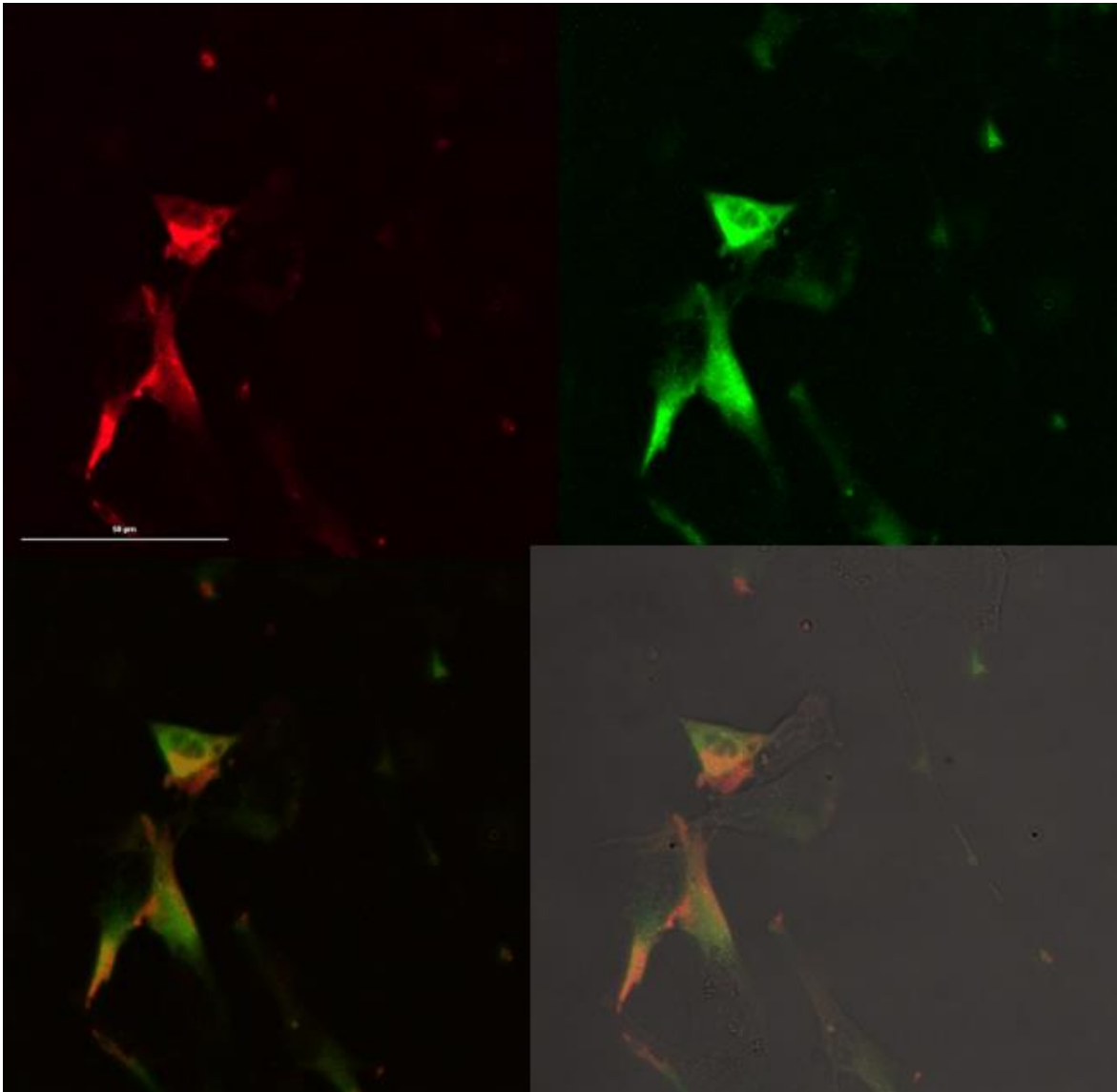




**Abbildung 20: Identifikation von GFAP Ak Interaktionspartnern mittels Westernblot und Microarray**

A: 2-D-Gelelektrophorese. Nach der Extraktion von Proteinen aus RGC5 Zelllysat wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit GFAP Ak über Nacht inkubiert. Die identifizierten Spots wurden auf dem Schwesterngel ausgeschnitten, verdaut und mittels Ultraflex II Maldi TOF/TOF identifiziert. 1: ERP57. 2: GFAP, (Wilding et al., Angenommen im Journal of Pharmacological Science, 03.02.2015).

B: Antigen Microarray: ERP57 wurde auf eine Nitrocellulosemembran gespottet und mit GFAP Ak inkubiert.



**Abbildung 21: Kolokalisation von GFAP Ak und ERP57 an der Zellmembran von RGC5**

RGC5 wurden fixiert, blockiert und anschließend mit anti GFAP Ak und anti ERP57 Ak über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag fand die Inkubation mit den sek. Ak anti chicken IgY-H&L (FITC) und anti IgG-H&L-(TRITC) für 2 h statt. Visualisiert wurde die Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop, (Wilding et al., Angenommen im Journal of Pharmacological Science, 03.02.2015).

A: ERP57 (rot)

B: GFAP Ak (grün)

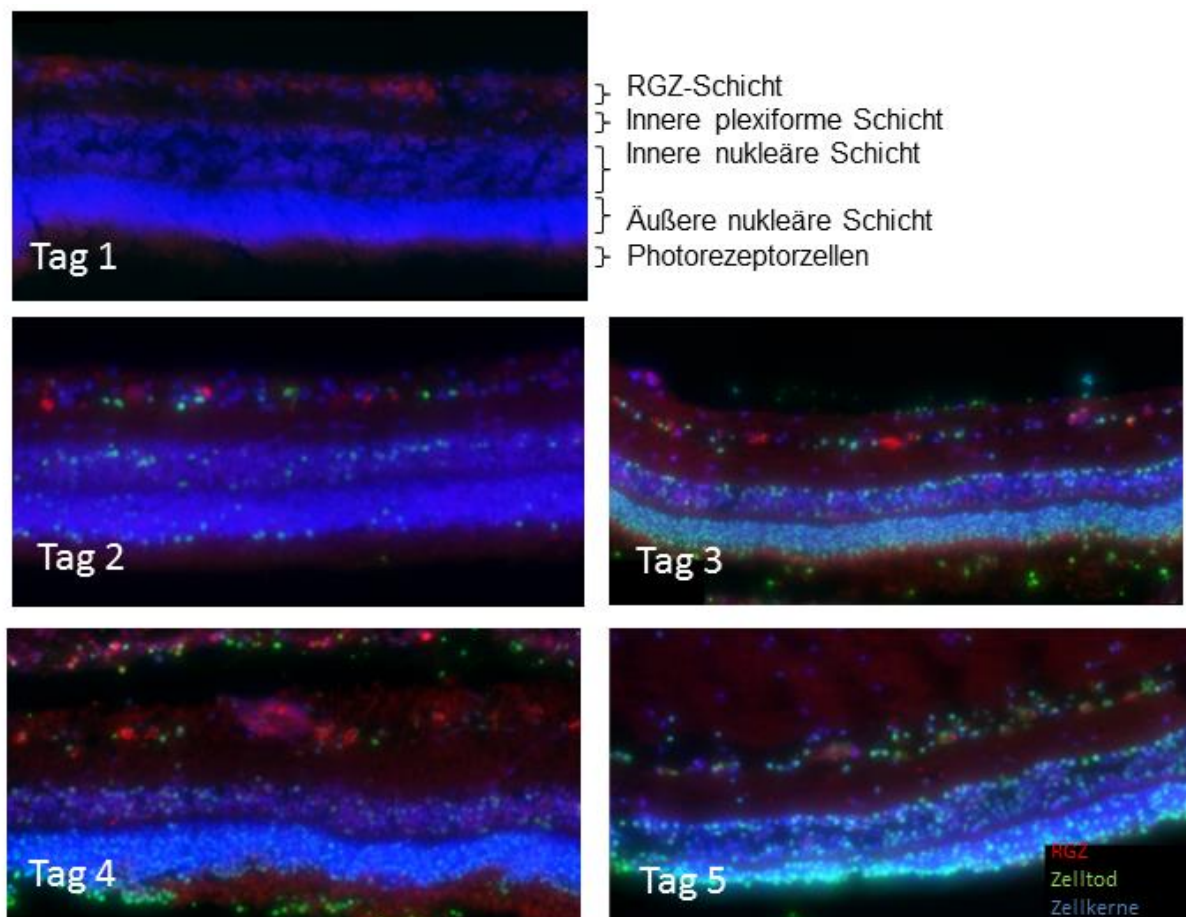
C: ERP57 (rot) + GFAP Ak (grün)

D: Durchlicht+ ERP57 (rot)+ GFAP Ak (grün)

### 4.3 Etablierung einer retinalen Organkultur aus dem adulten Hausschwein

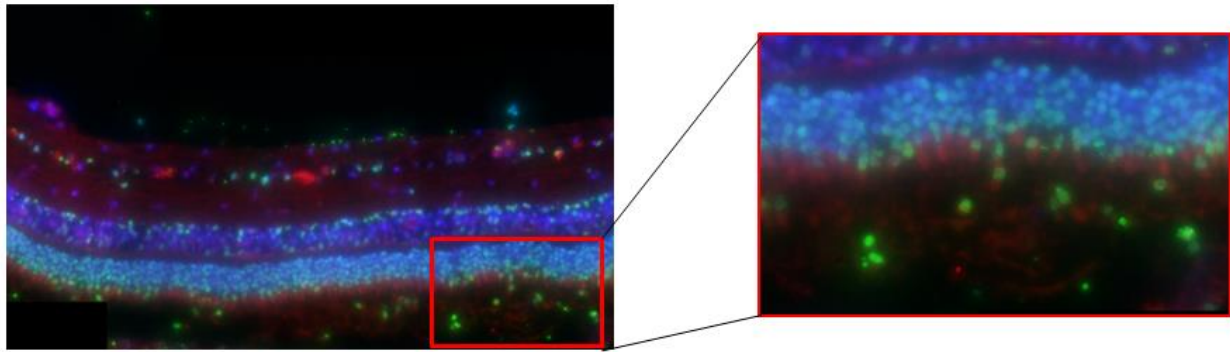
Die kultivierten Retinaexplantate wurden nach verschiedenen Kultivierungstagen fixiert und anschließend immunhistologisch gefärbt um morphologische Aussagen und apoptotische Vorgänge in RGZ zu untersuchen. Abbildung 22 zeigt die immunhistologische Färbung einer 5 Tage Retina Organkultur. Die Zellkerne wurden

mit DAPI gefärbt und sind in blau zu sehen. Die RGZ sind in rot und apoptotische Zellen in grün dargestellt. Die Morphologie der Retina war in Tag 1 und 2 gut erhalten und entspricht dem charakteristischen Aufbau einer Retina. An Tag 3 war die beginnende Degeneration der Photorezeptorzellen zu beobachten, die mit Fortschreiten der Kultivierungstage zunahm (Abbildung 23). Am ersten Kultivierungstag waren keine apoptotischen Zellen zu beobachten. Mit zunehmenden Kultivierungstagen stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen von einzelnen Zellen, die am 2. Tag zu beobachten waren, bis hin zu mehreren Zellen in allen Schichten der Retina an Tag 5.



**Abbildung 22: Immunhistologische Färbung von RGZ und TUNEL positiven Zellen an verschiedenen Kultivierungstagen**

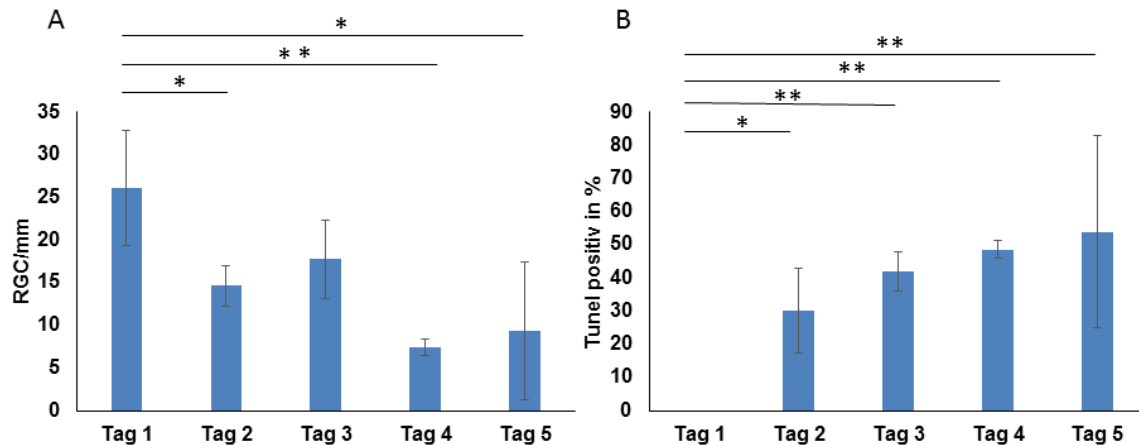
Adulte Schweine Retinaexplantate wurden verschiedene Tage kultiviert und anschließend fixiert, in Paraffin eingebettet und immunhistologisch gefärbt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt und wurden durch DAPI gefärbt. In rot sind RGZ und in grün TUNEL positive Zellen dargestellt (Manuskript in Vorbereitung).



**Abbildung 23: Beginnende Degeneration der Photorezeptorzellen am 3. Kultivierungstag**

Adulte Schweine Retinaexplantate wurden verschiedene Tage kultiviert und anschließend fixiert, in Paraffin eingebettet und immunhistologisch gefärbt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt und wurden durch DAPI gefärbt. In rot sind RGZ und in grün TUNEL positive Zellen dargestellt (Manuskript in Vorbereitung).

Nach der Fluoreszenzaufnahme der immunhistologisch gefärbten Retinaexplantate der verschiedenen Kultivierungstage wurde eine Quantifizierung der RGZ sowie TUNEL positiven RGZ durchgeführt. Am ersten Kultivierungstag wurden 21,1 RGZ/mm detektiert. Mit steigendem Kultivierungstag nahm die Anzahl der RGZ/mm ab. Am 2. Kultivierungstag wurden 14,6 am 3. 17,8, am 4. 7,4 und am 5. 9,4 RGZ/mm detektiert. Die statistische Auswertung mit einem studentischen T-test zeigte im Vergleich zum 1. Kultivierungstag eine signifikant verringerte Anzahl an RGZ am 2. ( $p=0,017$ ) und 5. Tag ( $p=0,018$ ), sowie eine hochsignifikant verringerte Anzahl an Tag 4 ( $p=0,0014$ ). Anschließend wurden TUNEL positive RGZ quantifiziert. Am 1. Kultivierungstag waren keine Tunel positiven Zellen detektierbar. Mit zunehmendem Kultivierungstag stieg die Anzahl der TUNEL positiven Zellen. Am 2. Tag wurden 30,1%, am 3.Tag 42%, am 4. Tag 48,5% und am 5. Tag 53,9% TUNEL positive RGZ quantifiziert. Der Vergleich der Tunel positiven RGZ im Vergleich zum 1. Kultivierungstag zeigte einen hochsignifikanten Anstieg am 2. ( $p=0,0031$ ), 3. ( $p=0,000009$ ), 4. ( $p=0,00000003$ ) und am 5. Tag ( $p=0,009$ ) (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Quantifizierung von RGZ sowie TUNEL positive Zellen an verschiedenen Kultivierungstagen**  
 Adulte Schweine Retinaexplantate wurden verschiedene Tage kultiviert und anschließend fixiert und immunhistologisch gefärbt. Die darauffolgende Quantifizierung der RGZ und der Tunel positiven Zellen fand an zuvor angefertigten Fluoreszenzaufnahmen statt und wurden durch die Software ImageJ durchgeführt. Als Kontrolle dienen Retinaexplantate die direkt nach der Präparation fixiert wurden ( $n=4$ ,  $*=p<0,01$ ,  $**p<0,01$ , Manuskript in Vorbereitung).

A: Quantifizierung von RGZ

B: Quantifizierung von TUNEL positiven RGZ

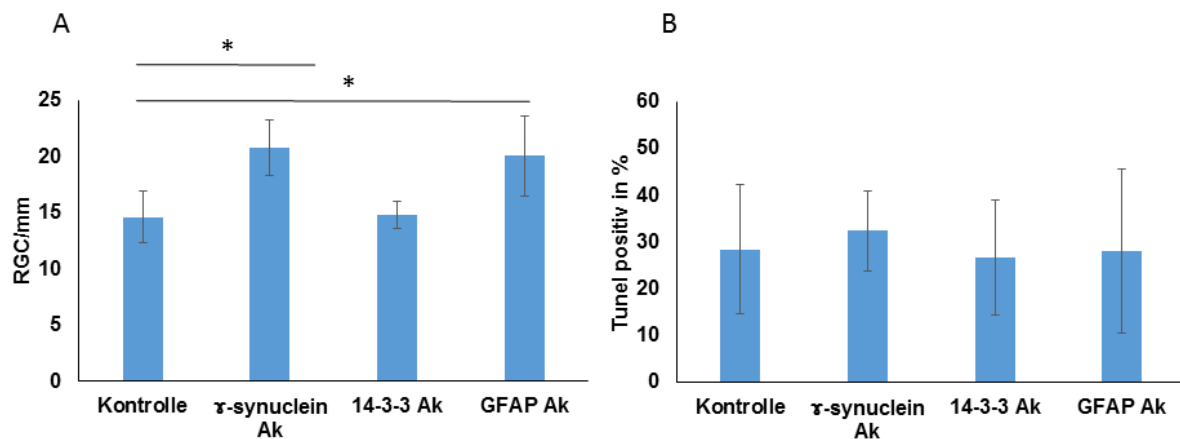
#### 4.4 Effekt von Ak auf retinale Organkultur

Um den Effekt von Ak auf RGZ zu untersuchen wurden die Retinaexplantate mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  rabbit polyclonal anti 14-3-3 Ak, 0,5  $\mu\text{g/ml}$  goat polyclonal anti  $\gamma$ -synuclein Ak oder 1  $\mu\text{g/ml}$  chicken polyclonal anti GFAP Ak  $\mu\text{g/ml}$  für 24 h inkubiert. Zur Durchführung der immunhistologischen Färbungen wurden die Retinaexplantate fixiert und in Paraffin eingebettet. Des Weiteren wurden die behandelten Retinaexplantate vorbereitet für die massenspektrometrischen Messungen.

##### 4.4.1 Quantifizierung von RGZ sowie TUNEL positive RGZ

Die Quantifizierung der RGZ zeigte einen signifikanten Anstieg von 20,84 RGZ/mm in der mit  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten Retinaexplantate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $p=0,00104$ ). Des Weiteren konnte einen signifikanten Anstieg mit 20,12 RGZ/mm in der mit GFAP Ak behandelten Retinaexplantaten beobachtet werden. Die mit 14-3-3 Ak behandelten Retinaexplantate zeigten mit 14,83 RGZ/mm keinen Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Quantifizierung der TUNEL

positiven RGZ zeigte in allen behandelten Gruppen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Effekt verschiedener Ak auf retinale Explantate**

Retinaexplantate wurden für 24 h mit 14-3-3 Ak, γ-synuclein Ak, GFAP Ak inkubiert und anschließend fixiert und immunhistologisch gefärbt. Die Quantifizierung wurde an zuvor angefertigten Fluoreszenzaufnahmen mit der Software Image J durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Retinaexplantate. (n=4, \*p<0,05, Manuskript in Vorbereitung).

A: Quantifizierung von RGZ

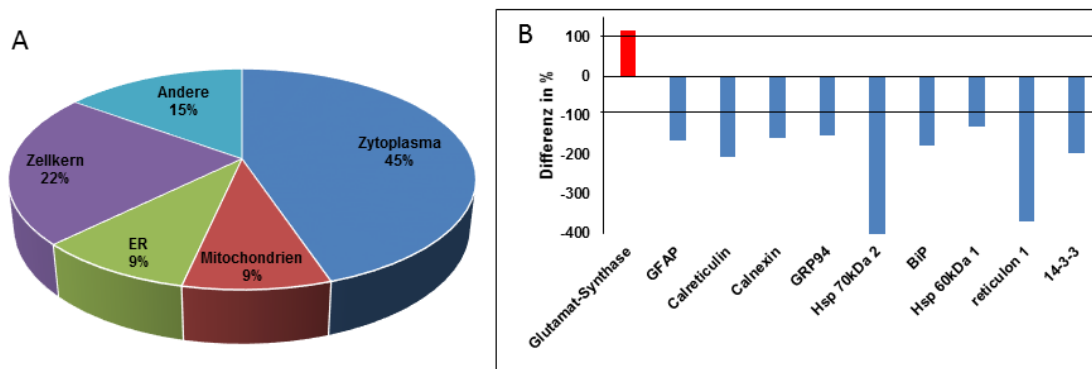
B: Quantifizierung von TUNEL positiven RGZ

#### 4.5 Massenspektrometrische Analyse von Ak behandelter retinaler Organkultur

In der massenspektrometrischen Analyse der mit GFAP Ak behandelten Retinaexplantate konnten 211 Proteine identifiziert werden, von denen 106 signifikant verändert waren. Mit Hilfe der Software Cytoscape wurden diese Proteine in 4 verschiedene Zellkompartimente gruppiert. 45% der signifikant veränderten Proteine gehören zu dem Zytoplasma, 9% zu den Mitochondrien, 9% zu dem ER und 22% der Proteine waren im Zellkern zu finden. Zusätzlich wurden die signifikant veränderten Proteine mittels IPA untersucht um mögliche veränderte Signalwege aufzuzeigen. Es konnten 7 Proteine identifiziert werden, die dem ER-Stress Antwort Signalweg zuzuordnen waren. Darunter befanden sich Calreticulin (-4,1), Calnexin (-3,2), Glucose related Protein 94 (GRP94) (-3), Hsp 70kDa 2 (-8,3), Binding immunoglobulin protein (BiP) (-3,533), HSP60kDa 1 (-2,572) und Reticulon 1 (-7,365), welche signifikant herunterreguliert waren. Des Weiteren konnte ein Müllerzell spezifisches Protein



Glutamin-Synthetase (+2,4) identifiziert werden, welches signifikant erhöht vorlag, sowie das für Astrozyten charakteristische Protein GFAP (-3,3). Außerdem konnten 6 Isoformen des 14-3-3 Proteins (-3,9) identifiziert werden, welche signifikant herunterreguliert vorlagen (Abbildung 26).



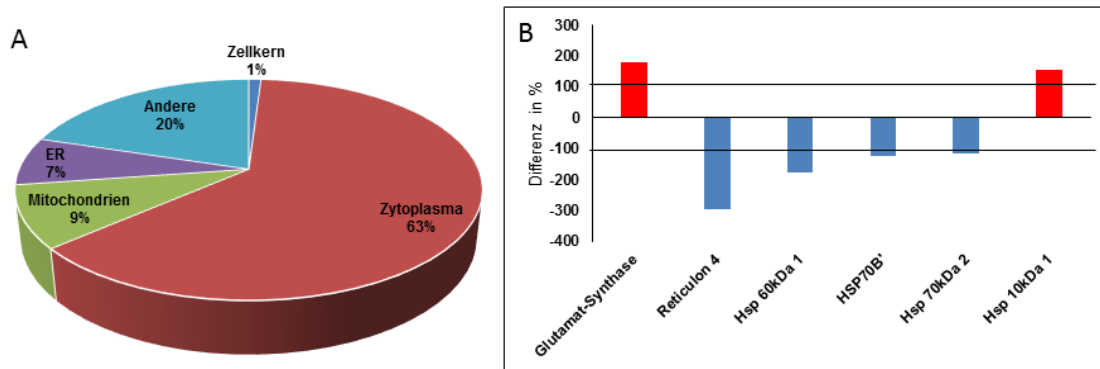
**Abbildung 26: Massenspektrometrische Analyse des Effektes von GFAP Ak auf retinale Explantate**

Retinaexplantate wurden für 24 h mit 1 µg/ml GFAP Ak inkubiert und anschließend lysiert, tryptisch verdaut und für die massenspektrometrische Analyse aufgearbeitet (Manuskript in Vorbereitung).

**A:** Klassifizierung der signifikant veränderten Proteine in verschiedene Zellkompartimente mittels der Software Cytoscape

**B:** Detaillierte Ansicht der signifikant veränderten Proteine in GFAP Ak behandelten Retinaexplantaten

In der massenspektrometrischen Analyse von 14-3-3 Ak behandelten Retinaexplantaten wurden insgesamt 304 Proteine identifiziert von denen 83 signifikant verändert vorlagen. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um zytoplasmatische Proteine mit 63%. 7% der Proteine wurden in das ER gruppiert und 9% zu den Mitochondrien. Nur 1% der Proteine befand sich im Zellkern. Die detaillierte Analyse der veränderten Proteine zeigte die signifikante Erhöhung von Glutamin-Synthetase (3,6) sowie signifikant veränderte Proteine der zellulären Stressantwort wie Reticulon 4 (-5,9), Hsp 60kDa 1 (-3,6), Hsp70B' (-2,3), Hsp 70kDa 2(-2,3) und Hsp10kDa 1 (3,1) (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Massenspektrometrische Analyse des Effektes von 14-3-3 Ak auf retinale Explantate**

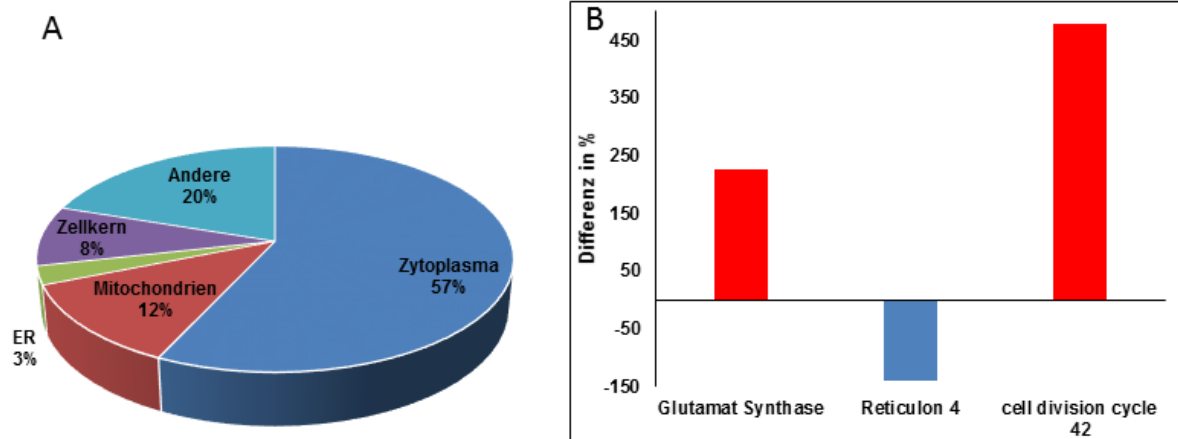
Retinaexplantate wurden für 24 h mit 0,5 µg/ml 14-3-3 Ak inkubiert und anschließend lysiert, tryptisch verdaut und für die massenspektrometrische Analyse aufgearbeitet (*Manuskript in Vorbereitung*).

**A:** Klassifizierung der signifikant veränderten Proteine in verschiedene Zellkompartimente mittels der Software Cytoscape

**B:** Detaillierte Ansicht der signifikant veränderten Proteine in γ-synuclein Ak behandelten Retinaexplantaten

In der mit γ-synuclein Ak behandelten retinalen Organkultur konnten mittels massenspektrometrischer Analyse insgesamt 406 Proteine identifiziert werden, wovon 124 signifikant verändert waren. Der Hauptanteil der signifikant veränderten Proteine mit 57% war im Zytoplasma lokalisiert. 12% der Proteine waren in den Mitochondrien, 8% im Zellkern und 3% im ER zu finden. Die detaillierte Betrachtung der veränderten Proteine zeigte eine Hochregulierung von Glutamin-Synthetase (4,5) und CDC24 (9,6) und eine Herunterregulierung von Reticulon 4 (-2,8) (Abbildung 28).





**Abbildung 28: Massenspektrometrische Analyse von  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten Retinaexplantaten**

Retinaexplantate wurden für 24 h mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -synuclein Ak inkubiert und anschließend lysiert, tryptisch verdaut und für die massenspektrometrische Analyse aufgearbeitet (Manuskript in Vorbereitung)..

**A:** Klassifizierung der signifikant veränderten Proteine in verschiedene Zellkompartimente mittels der Software Cytoscape

**B:** Detaillierte Ansicht der signifikant veränderten Proteine in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten Retinaexplantaten

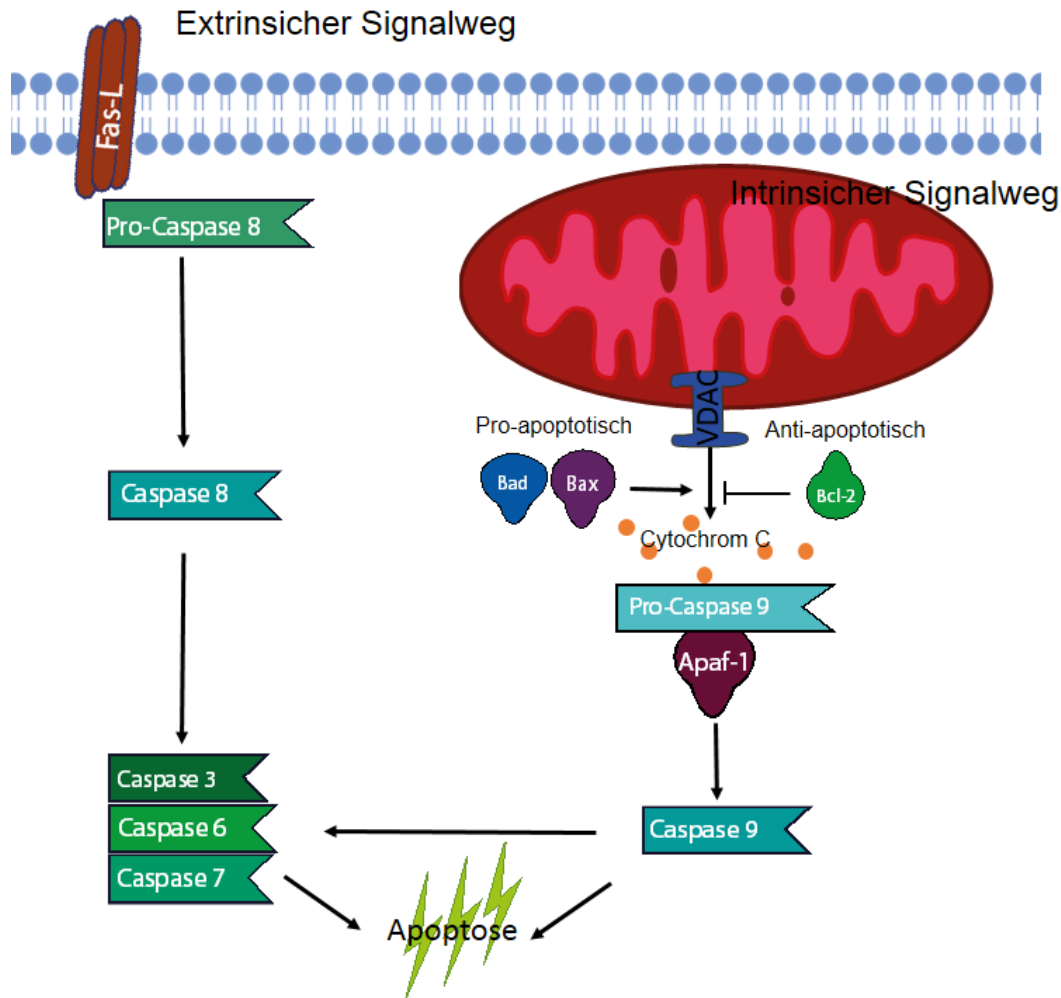
## 5. Diskussion

### 5.1 Effekt von Ak auf intrazelluläre Signalwege von RGC5

#### 5.1.1 Einfluss von $\gamma$ -synuclein Ak auf Proteine des intrinsischen sowie extrinsischen Apoptose Signalweges

Der Begriff Apoptose steht für eine Form des programmierten Zelltodes, wobei Zellen eliminiert werden ohne eine inflammatorische Antwort auszulösen. Dieser Prozess spielt eine wichtige Rolle während der Embryogenese und in physiologischen Prozessen, wie der Kontrolle der Zellpopulation, der Eliminierung von entarteten Zellen und im Immunsystem [120-122]. Charakteristisch sind morphologische Veränderung der Zelle, wie das Lösen der Zelle aus dem Zellverband, schrumpfen der Zelle, Bläschenbildung an der Membran und letztendlich die Fragmentierung in einzelne Membran umschlossene apoptotische Körperchen [123]. In einem gesunden Organismus liegt eine Balance zwischen Zelltod und Zellproliferation vor. Treten Dysregulationen auf kann es zur Entstehung von Krebs, Immunkrankheiten und degenerative Krankheiten kommen. Hinweise deuten ebenfalls auf die Beteiligung von apoptotischen Vorgängen bei dem Verlust von RGZ in Glaukom. In Tiermodellen nach der Durchtrennung des Sehnerves, einer Erhöhung des IOPs sowie in POAG Patienten konnten apoptotische Ereignisse beobachtet werden [124-126]. Im Mittelpunkt der Apoptose steht eine Familie von Cystein Proteasen den sogenannten „Caspasen“. Diese liegen in einem inaktivierten Zustand in der Zelle vor und können durch verschiedene Stimulantien aktiviert werden und durch die Degradierung von essentiellen zellulären Komponenten zum Tod der Zelle führen [127]. Zurzeit werden 2 verschiedene, sehr komplexe Hauptsignalwege diskutiert, die zur Aktivierung der Caspasen führen. Dabei handelt es sich um den intrinsischen oder mitochondrialen Signalweg und den extrinsischen, auch bekannt als Todesrezeptor Signalweg. Der extrinsische Signalweg, welcher in Abbildung 29 graphisch dargestellt ist, hat seinen Ursprung an der Zellmembran. Dort bindet ein externer Ligand (Bsp. FasL oder tumor necrosis factor (TNF)) an der Zellmembran an einen transmembranständigen Rezeptor der TNF Rezeptorfamilie, der sogenannte „Todesrezeptor“ (Bsp. FasL Rezeptor) und induziert somit die Oligomerisierung des Rezeptors [128]. Die

Oligomerisierung bildet eine Signalplattform die eine death domain (DD) beinhaltet, welche DD-tragende Adaptermoleküle rekrutiert und somit den death-inducing-signaling-complex bildet [129]. Diese Proteine wiederum rekrutieren Procaspase-8, die durch autokatalytische Spaltung aktiviert und freigesetzt wird. Diese initiiert anschließend die Aktivierung von Effektorcaspasen wie Caspase 3 und 7 und löst somit die Apoptose aus. In dem intrinsischen Apoptose Signalweg spielen die Mitochondrien eine essentielle Rolle, weshalb er auch als mitochondrialer Apoptose Signalweg bezeichnet wird. Dieser Signalweg wird von apoptotischen Faktoren, die innerhalb der Zelle auftreten wie z. Bsp. DNA Schäden, oxidativer Stress, ER-Stress und Entzug von Zellüberlebensfaktoren initiiert. Dabei werden pro-apoptotische Faktoren wie Zytochrom C und der Apoptose induzierte Faktor (AIF) aus den Mitochondrien freigesetzt [130]. Zusammen mit dem Apoptose aktivierendem Faktor (APAF-1) und Caspase-9 bildet Zytochrom C einen katalytischen Komplex, das sogenannte Apoptosom und löst somit eine Signalkaskade aus, die zur Aktivierung von Procaspase-9 und letztendlich zur Aktivierung von Effektorcaspasen wie Procaspase-3, -6, -7 führt [131, 132] (Abbildung 29). Die Proteine der Bcl-2 Familie spielen eine zentrale Rolle in der Regulierung der intrinsischen Apoptose, indem sie pro- sowie anti-apoptotische Eigenschaften besitzen. Zu dieser Familie gehört das proapoptotische Protein Bcl-2-associated-X Proteine (BAX) und Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak), welches durch die Bildung einer Membranpore in den Mitochondrien zum Austritt von pro-apoptotischen Faktoren wie Zytochrom C führt [133, 134]. Das pro-apoptotische BAD gehört ebenfalls zur Bcl-2 Familie. Durch die Dimerisierung mit dem anti-apoptotischen Faktor Bcl-2 wird dessen pro-apoptotische Funktion gehemmt [135]. Eine zweite Gruppe von regulatorischen Proteinen stellt die inhibitor of apoptosis proteins (IAP) dar, indem sie direkt an Caspasen binden und deren Aktivität hemmen [136].



**Abbildung 29: Schematischer Aufbau des apoptotischen Signalweges.**

Angefertigt mit Hilfe von Adobe Illustrator und Biocarta ([www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)), Quelle: Corina Wilding.

Die massenspektrometrische sowie die Microarray-Analyse zeigte in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 eine signifikant veränderte Expression von Proteinen des intrinsischen und extrinsischen Apoptose Signalweges. Darunter befand sich VDAC1/2/3, BAX, BAD, aktive Caspase 3, Caspase 9, S100A4, PRAF2 und ERK, welche signifikant herunterreguliert sowie BIRC6, welches signifikant hochreguliert ist. Zusätzlich konnte Caspase 8 identifiziert werden, welches im extrinsischen Apoptose Signalweg eine wichtige Rolle spielt und signifikant herunterreguliert war (Abbildung 30). Diese Proteine waren anti-apoptotisch reguliert und könnten deshalb beteiligt sein an dem protektiven Effekt des  $\gamma$ -synuclein Ak gegen Stressfaktoren wie  $H_2O_2$  und Glutamat. Das pro-apoptotische Protein BAX ist beteiligt an der Freisetzung von Cytochrom C und somit an der Einleitung der Apoptose [137]. In einem Glaukom Mausmodell mit erhöhten IOP konnte eine erhöhte Expression von BAX in

hypertensiven Augen im Vergleich zu Kontrollaugen nachgewiesen werden [80]. Außerdem konnte in Tiermodellen nachgewiesen werden, dass die Defizienz von BAX sowie die Gabe von BAX hemmenden Peptiden zu einem geringeren Absterben von RGC5 führt [138, 139]. Die Expression von BAX wird durch den Transkriptionsfaktor p53 reguliert, der wiederum durch das Protein S100A4 gesteuert wird. Die Induktion von S100A4 führt in einer Mauszelllinie zu einer erhöhten Expression von BAX, welches letztendlich zur Apoptose führt [140]. Die Herunterregulierung von BAX in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 könnte vermutlich zurückzuführen sein auf eine geringere Expression von S100A4, welche in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 nachgewiesen wurde. PRAF2 gehört zu der Familie der Prenylated Rab Acceptor Familie, dabei handelt es sich um kleine transmembrane Proteine die hauptsächlich am Golgi-Apparat und am ER lokalisiert sind [141]. Studien beobachteten die pro-apoptotische Aktivität von PRAF2, welche sich in einer Caspase Aktivität und der Einleitung der Apoptose zeigt. In Zellkulturversuchen konnte die Translokation von Bax zu den Mitochondrien in Folge einer Überexpression von PRAF2 beobachtet werden [142]. Das anti-apoptotische Proteine BIRC6 gehört zu der Familie der „apoptosis inhibitor proteins“ und war hochreguliert in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten Zellen. Die Hochregulierung von BIRC6 wurde ebenfalls in Tumorzellen gefunden, wodurch aktive Caspase-3 und somit die Einleitung der Apoptose inhibiert wurde [143]. In einem okularen hypertensiven Glaukom Tiermodell begünstigt die Überexpression von BIRC4, einem anderen Mitglied der IAP Familie, das Überleben von Sehnerv Axonen [144]. VDAC 1/2/3, signifikant herunterreguliert in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5, spielt eine wichtige Rolle in der Einleitung der mitochondrialen Apoptose. Es ist lokalisiert in der äußeren Membran der Mitochondrien und an der Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, wie z. B. Zytochrom C aus den Mitochondrien, beteiligt. In Endothelzellen konnte durch eine Reduktion des VDAC Levels, die durch Endostatin induzierte Apoptose abgeschwächt werden [145]. Aktive Caspase 3, Caspase 9 und BAD waren herunterreguliert, wohingegen die aktivierte Form von ERK (p-ERK) hochreguliert war in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5. Der ERK Signalweg ist beteiligt an der Weiterleitung von externen Signalen in den Nukleus von Zellen. Er setzt sich aus mehreren Kinasen zusammen die ERK phosphorylieren und somit aktivieren. Die aktivierte Form von ERK ist in der Lage, viele zytoplasmatische und nukleare Zielgene zu phosphorylieren, welche letztendlich zur Proliferation der Zelle führen

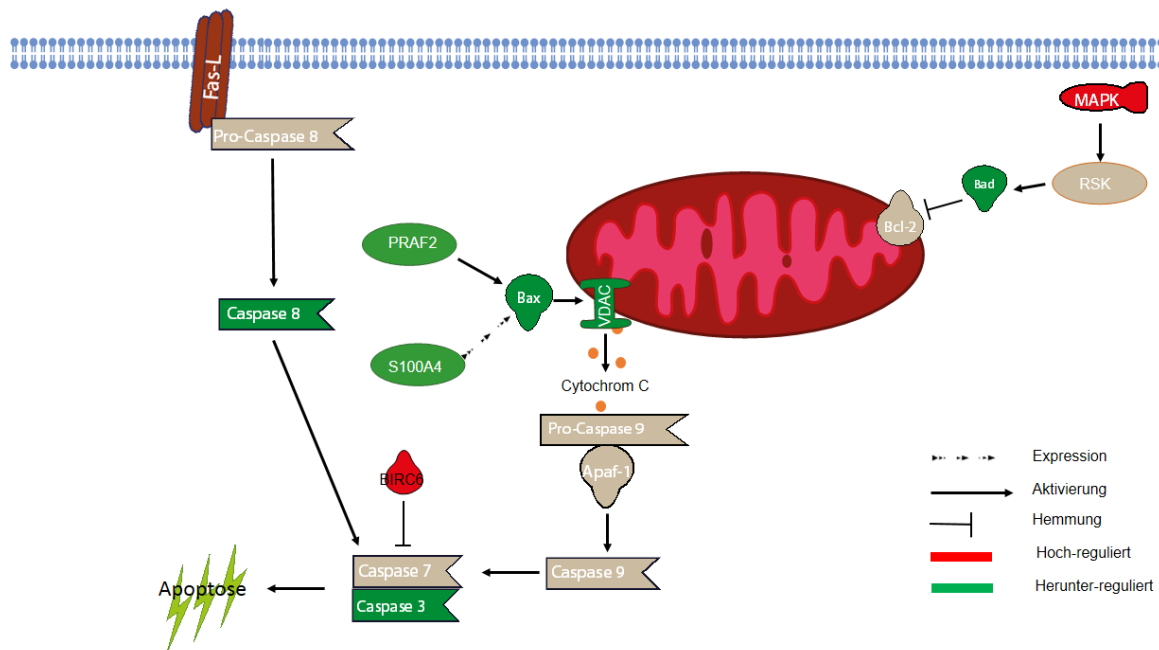
[146, 147]. In einem Glaukom-Ratten-Modell konnte durch die Aktivierung des ERK1/2 Signalweges eine Neuroprotektion von RGZ nach Erhöhung des IOP nachgewiesen werden [148]. Es wurde ein ERK Signalweg identifiziert, wobei die Phosphorylierung von BAD durch aktivierte MAPK zur Unterstützung des Zellüberlebens führt [149]. BAD ist ein Mitglied der Bcl-2 Protein Familie und ist beteiligt an der Einleitung der Apoptose. Tierversuche deuten auf eine Beteiligung von BAD bei der Pathogenese des Glaukoms hin [81, 150]. Die im vorherigen Abschnitt erläuterten Proteine sind zum besseren Verständnis graphisch in Abbildung 30 zusammengefasst. Sie spielen eine wichtige Rolle im intrinsischen Apoptose Signalweg, welcher in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 anti-apoptotisch reguliert war. Die Aktivierung von Caspase 9 und letztendlich von Caspase 3, welche in  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 verringert waren, spiegelt einen gemeinsamen Endpunkt des Apoptose Signalweges wieder. Zudem scheint der extrinsische Apoptoseweg ebenfalls eine Rolle in der Neuroprotektion von  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 gegen Stressfaktoren zu spielen. In  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 konnte eine signifikant verringerte Expression von Caspase 8 nachgewiesen werden. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass in diesem Versuch nicht zwischen der aktivierten und nicht aktivierten Form unterschieden werden konnte. Der extrinsische Apoptose Signalweg scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation des RGZ Verlustes im Glaukom zu spielen [64, 151].

Die Frage bleibt bestehen wie die veränderten Proteinexpressionen in den  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 ausgelöst wurden. Mehrere Studien konnten zeigen, dass  $\gamma$ -synuclein die Fähigkeit besitzt an Transkriptionsfaktoren wie z. Bsp. JunB, CREB1, MECP2 und ATF3 zu binden und somit die Expression deren Zielgene zu steuern [152, 153]. Des Weiteren ist  $\gamma$ -synuclein beteiligt an der Regulation des intrinsischen Apoptose Signalweges durch die transkriptionelle Regulation von Phosphatasen und Kinasen, die wiederum den Phosphorylierungsstatus von Bad kontrollieren [74]. Die Arbeitsgruppe von Tezel et al. untersuchte den Apoptose-Mechanismus der durch exogen applizierte Hsp27 Ak ausgelöst wird. Es wird vermutet, dass die Bindung von Hsp27 Ak an sein Antigen Hsp27 dessen Fähigkeit, das Aktin Zytoskelett zu stabilisieren, inaktiviert oder hemmt [154]. Es wurden ebenfalls Recoverin Ak detektiert, die in Photorezeptorzellen und Bipolarzellen internalisiert wurden und deren Apoptose auslösten [155]. Deshalb wäre es vorstellbar, dass internalisierte  $\gamma$ -synuclein

Ak an ihr Antigen binden und dessen Funktionen verändern. Möglicherweise könnte die modulierte Funktion von  $\gamma$ -synuclein zu einer veränderten Bindung an Transkriptionsfaktoren und somit zu einer veränderten Expression von Proteinen des Apoptose Signalweges führen [64].

### **5.1.2 Einfluss von 14-3-3 Ak auf Proteine des mitochondrialen Apoptoseweges**

Die massenspektrometrische Untersuchung von 14-3-3 Ak behandelten RGC5 zeigte 225 signifikant veränderte Proteine, die mit IPA in verschiedene Signalwege klassifiziert wurden. Darunter befanden sich 7 signifikant anti-apoptotisch veränderte Proteine des intrinsischen Apoptosesignalweges wie BAX, PRAF2, S100A4, VDAC1/2/3, welche signifikant herunterreguliert und BIRC6 sowie ERK1/2 welche signifikant hochreguliert waren. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben gehört Bax zu den pro-apoptotischen Proteinen der BCL-2 Familie und ist assoziiert, wie sein Transkriptionsfaktor p53, mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie auch mit der Pathogenese des Glaukoms [156, 157]. P53 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Stress, wie z. Bsp. DNA Schäden oder oxidativer Stress, aktiviert wird und die Expression von Genen steuert, die am Zellzyklus sowie an der Apoptose beteiligt sind [158]. 14-3-3 interagiert mit p53 und moduliert dessen Transkriptionsaktivität sowie dessen nukleären Export. Vorstellbar wäre eine Modulation von 14-3-3 durch die Bindung des 14-3-3 Ak, wodurch die Interaktion von 14-3-3 und p53 verändert wird. Dadurch könnte es zu einer geringen Expression von Bax und letztendlich zu einer Verhinderung der Apoptose führen. S100A4 ist ein Calcium bindendes Protein, welches mit p53 interagiert und die Transkription und p53 Zielgene beeinflusst, wie z. B. BAX [140]. Die Herunterregulierung von S100A4 in 14-3-3 Ak behandelten RGC5 könnte zu einer geringeren Expression von BAX und somit zu einer erhöhten Viabilität von RGC5 gegenüber Stressfaktoren führen (Bell et al., Revision in BMC Ophthalmology, 2015).



**Abbildung 30: Darstellung von veränderten Proteinen des mitochondrialen Apoptoseweges in 14-3-3 und  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5**  
 Angefertigt mit Hilfe von Adobe Illustrator und Biocarta ([www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)), Quelle: Corina Wilding.

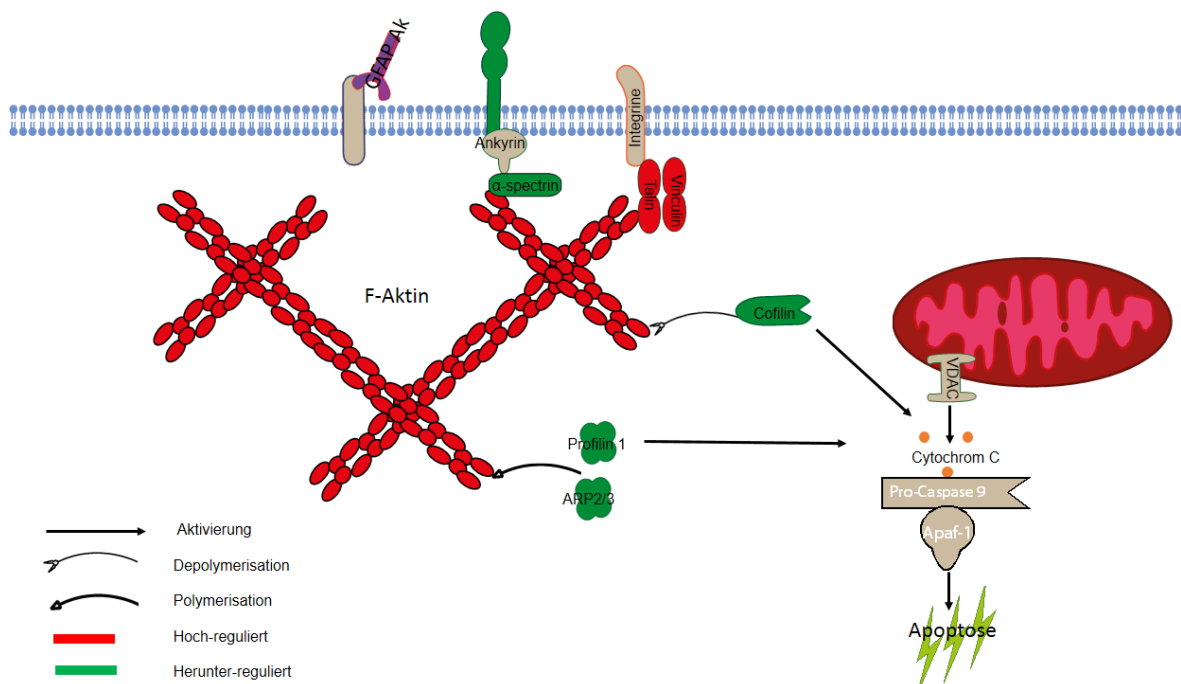
### 5.1.3 Einfluss von GFAP Ak auf Proteine des Aktin-Zytoskeletts

Die massenspektrometrische Untersuchung von GFAP Ak behandelten RGC5 im Vergleich zu unbehandelten RGC5 zeigte eine signifikante Veränderung von Proteinen des Aktin Zytoskeletts. Insgesamt konnten 7 signifikant veränderte Proteine, die an der Organisation des Aktin Zytoskeletts beteiligt sind identifiziert werden. Dies waren Profilin 1, Cofilin1, Actin related proteine 2/3 und Spectrin alpha (herunterreguliert), sowie Actin beta, Talin 1 und Vinculin (hochreguliert) (Abbildung 31). Das Aktin Zytoskelett stellt eines der Hauptmikrofilamente in Axonen dar und besteht aus einem dynamischen Auf- und Abbau von Filamenten. Dies ist relevant für viele biologische Prozesse wie z. B. mechanische Zellstabilität, Zellmotilität, Vesikeltransport, Endozytose, sowie die Regulation von Zellsignalwegen, wie apoptotische Prozesse [159]. Die Polymerisation von Aktin wird durch das schrittweise Anlagern von weiteren G-Aktin an bereits bestehendes filamentöses F-Aktin bewerkstelligt. Dieser Prozess wird reguliert durch verschiedene Aktin bindende Proteine wie z. B. Profilin oder Arp2/3, welches die Polymerisation fördert indem es G-Aktin und das wachsende F-



Aktin rekrutiert. Im Gegensatz fördert Cofilin die Dissoziation von G-Aktin und trägt somit zur Depolymerisation bei. Die Funktion dieser Aktin regulierenden Proteine ist wiederum abhängig von deren Phosphorylierungsstatus [160-162]. Talin und Vinculin sind Hauptbestandteile des fokalen Adhäsionskomplex, der die strukturelle Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Aktin Zytoskelett über Integrine herstellt [163].  $\alpha$ -spectrin ist ein Membran assoziiertes und Aktin bindendes Protein. Zusammen mit Aktin bilden sie ein Netzwerk zur Stabilisierung der Plasmamembran. Zudem bildet  $\alpha$ -Spectrin zusammen mit Ankerproteinen eine Verknüpfung zwischen integralen Proteinen der Membran und zytosolischen Proteinen und bildet somit eine Plattform für die Organisation von Signalmolekülen, Membran sowie Strukturproteinen [164]. Die Aktin Polymerisation sowie Depolymerisation spielt nicht nur bei Bewegungsvorgängen eine große Rolle, sondern ist auch an Signaltransduktionswegen, wie der Regulation von apoptotischen Signalwegen, beteiligt. Mehrere Studien konnten durch die Verwendung von Aktin beeinflussenden Medikamenten zeigen, dass die Aktin-Dynamik eine entscheidende Rolle in der Einleitung der Apoptose besitzt. Cytochlasasin D, welches die Polymerisation von monomerem Aktin verhindert, induziert in T-Lymphozyten eine Caspase 3 abhängige Apoptose [165]. Phalloidin, eine F-Aktin stabilisierte Substanz, verhindert die durch Cysplatin ausgelöste Apoptose in Nierenzellen [166]. Die Überexpression von Gelsolin, welches ebenfalls zu den Aktin regulatorischen Proteinen gehört, ist in der Lage in Jurkat Zellen Apoptose zu verhindern [167]. Dieser protektive Effekt konnte auch in Neuronen beobachtet werden, in denen Gelsolin die Aktivierung von Caspase 3 verhindert [168]. Zusätzlich konnte ein direkter Einfluss von Aktin und Aktin regulatorischen Proteinen auf die mitochondriale Apoptose beobachtet werden. Aktin ist direkt an der Regulation von VDAC beteiligt [169]. VDAC ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und an dem Austritt von pro-apoptotischen Faktoren beteiligt. Das Aktin regulatorische Proteine Profilin, welches in GFAP Ak behandelten RGC5 herunterreguliert vorlag, ist ebenfalls an der Regulation der mitochondrialen Apoptose beteiligt [170]. Cofilin transloziert bei der Induktion der Apoptose von dem Zytosol zu den Mitochondrien und ist beteiligt an dem Zytocrom C Austritt aus den Mitochondrien [171] (Abbildung 31). Die Signalwege, über welches das Aktin Zytoskelett mit apoptotischen Signalwegen verknüpft ist, sind noch weitgehend unklar. Jedoch belegen diese Studien eindeutig die direkte Beteiligung des Aktin Zytoskeletts

an apoptotischen Signalwegen und insbesondere der mitochondrialen Apoptose. Ebenfalls deuten sie darauf hin, dass die dynamische Umgestaltung des Aktin Zytoskeletts durch Polymerisation und Depolymerisation eine wichtige Rolle auf die Antwort von Stress spielen. Ein weniger dynamisches Aktin Zytoskelett kann nicht effektiv auf Stress reagieren [172]. Massenspektrometrische Untersuchungen können keine ultrastrukturellen Veränderungen, wie eine Depolymerisation/Polymerisation, sichtbar machen. Jedoch sind eindeutige Veränderungen in der Regulation des Aktin Zytoskeletts detektierbar. Die veränderten Proteine des Aktin Zytoskeletts in GFAP Ak behandelten RGC5 könnten möglicherweise an dem protektiven Effekt gegenüber oxidativem Stress beteiligt sein. Die Micorarray Untersuchungen in GFAP Ak behandelten RGC5 ergab leider keine signifikante Veränderung von Proteinen des Aktin Zytoskeletts, was möglicherweise in der Verwendung von verschiedenen Methoden sowie Probenaufbereitungen begründet sein könnte (Abbildung 31)(Wilding et al., Angenommen im Journal of Pharmacological Science, 03.02.2015).



**Abbildung 31: Veränderte Proteine des Aktin Zytoskelett Signalweges in GFAP Ak behandelten RGC5**

Die grün markierten Proteine liegen in GFAP Ak inkubierten RGC5 herunterreguliert und die roten hochreguliert vor. Angefertigt mit Hilfe von Adobe Illustrator und Biocartra ([www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)), (Wilding et al., Angenommen im Journal of Pharmacological Science, 03.02.2015).

#### 5.1.4 Korrelation mit glaukomatösen pathophysiologischen Ereignissen

Die Untersuchung der veränderten Signalwege in  $\gamma$ -synuclein und 14-3-3 Ak behandelten RGC5 zeigten veränderte Proteine des mitochondrialen Apoptosesignalweges. Mitochondriale Fehlfunktionen sind an der Pathogenese vieler neurodegenerativer Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson, beteiligt [173, 174]. Sie sind ebenfalls assoziiert mit dem Glaukom. In einer klinischen Studie konnten mitochondriale Mutationen sowie eine Reduktion der mitochondrialen Funktionen in POAG Patienten detektiert werden [175]. Mitochondrien sind in hoher Anzahl am Sehnervenkopf vorzufinden, da dort ein erhöhter Verbrauch von ATP stattfindet [176]. Sie sind nicht nur essentiell für die Energiegewinnung, sondern spielen auch bei der Einleitung der Apoptose eine wichtige Rolle. Dies ist häufig ein zentrales Ereignis in neurodegenerativen Erkrankungen, welches für den Verlust von Neuronen verantwortlich ist [177]. In der Retina von humanen Glaukospenderaugen wurden ebenfalls Hinweise auf die Beteiligung von apoptotischen Ereignissen gefunden, die am Verlust der RGZ beteiligt sind [124]. In vielen in vivo Studien konnte die Beteiligung der mitochondrialen Apoptose nachgewiesen werden. Dabei spielen Proteine wie Caspasen [178, 179] und die Bcl-2 Protein Familie [180] eine große Rolle. Im Vordergrund steht das pro-apoptische Protein BAX [138, 181], welches ebenfalls in 14-3-3 und  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten RGC5 verändert vorlag. Da auch das Zytoskelett einen Einfluss auf mitochondriale Ereignisse ausübt, könnte die veränderte Expression von Aktin Zytoskelett Proteinen an dem protektiven Effekt von GFAP Ak gegenüber Stressfaktoren beteiligt sein. Im Zusammenhang mit Glaukom konnte eine Disorganisation des Zytoskeletts in einem Glaukom Ratten Tiermodell mit erhöhten IOP gezeigt werden. Im Vergleich zu den Kontrolltieren, die eine gleichmäßige Verteilung von F-Aktin in Nervenfaserbündeln aufwiesen, zeigten die Tiere mit einem erhöhten IOP eine diffuse Verteilung von F-Aktin [182].

## 5.2 Ak Aufnahme/Bindung in RGC5

### 5.2.1 Aufnahme von 14-3-3 Ak und $\gamma$ -synuclein Ak in RGC5

Um einen genaueren Einblick in den Mechanismus von protektiven Ak zu erlangen wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt, die die Bindung oder die Aufnahme der Ak untersuchten. In früheren Studien konnte die zytoplasmatische Expression von  $\gamma$ -synuclein in permeabilisierten RGC5 gezeigt werden [73]. Dies konnte in unseren Färbungen bestätigt werden. Eine zytoplasmatische Expression von 14-3-3 in permeabilisierten RGC5 konnte ebenfalls gezeigt werden. In lebenden RGC5 wurde eine Aufnahme von 14-3-3 und  $\gamma$ -synuclein Ak in Vesikeln beobachtet. Mehrere in vivo und in vitro Studien konnten ebenfalls eine Ak Aufnahme in Zellen zeigen [183, 184]. Ak sind sehr große Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 140 und 150 kDa. Der Mechanismus, mit dem Ak internalisiert oder zu bestimmten Organellen transportiert werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Es existieren viele Hypothesen über die Internalisierung von Ak. Neben Endozytose wird die Aufnahme über Fc-Rezeptoren, sowie über Myosin-1 beschrieben [185-187]. Ebenfalls konnte der Transport von Ak in den Zellkern sowie das Ak Recycling auf die Zelloberfläche gezeigt werden [186]. Es konnte keine Akkumulation oder die Aufnahme von größeren Mengen des  $\gamma$ -synuclein oder 14-3-3 Ak gezeigt werden. Dies könnte zurückzuführen sein auf eine begrenzte Ak Aufnahme, welche auch in primärer neuronaler Zellkultur gezeigt wurde [188]. Eine andere Erklärung wäre die intrazelluläre Fragmentierung der Ak in Lysosomen oder dem Golgi-Apparat [189]. Eine Fragmentierung der Ak hätte zur Folge, dass diese nicht mehr durch den sek. Ak erkannt werden und somit nicht detektierbar sind [64] (Bell et al., Revision in BMC Ophthalmology, 2015).

### 5.2.2 Bindung von GFAP Ak an die Zellmembran von RGC5

Die immunhistologische Färbung zeigte eine Bindung des GFAP Ak in permeabilisierten RGC5 im Bereich des Zellkernes sowie an der Zellmembran auf. Jedoch zeigten die Färbungen kein charakteristisches Färbemuster von GFAP wie es in der Literatur beschrieben wird [190]. Dies ist auch nicht zu erwarten, da es sich um

neuronalen Zellen und nicht um Astrozyten handelt. In lebenden Zellen konnte keine Ak Aufnahme oder Bindung nachgewiesen werden, weshalb mittels Westernblot und massenspektrometrischer Analyse mögliche Interaktionspartner analysiert wurden. Diese Analyse zeigte, dass GFAP Ak nicht exklusiv mit GFAP interagieren, sondern ebenfalls mit ERP57. Dies konnte in immunhistologischen Färbungen bestätigt werden. An der Zellmembran zeigten ERP57 und GFAP Ak das gleiche Färbemuster, weshalb eine Kolo-kalisation vermutet wird. Die Bindung des GFAP Ak an ERP57 erklärt auch das Färbemuster im Bereich des Zellkerns in permeabilisierten RGC5, da ERP57 hauptsächlich im ER exprimiert wird. ERP57 ist eine Thiol-Oxidoreduktase und gehört zur Familie der Protein Disulfid Isomerasen (PDI). Alle Mitglieder dieser Familie sind im ER exprimiert und an der Faltung von Proteinen beteiligt. Dort katalysieren sie die Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von Disulfidbrücken in Proteinen [191]. Heutzutage konnten jedoch mehrere Studien das Auftreten von Mitgliedern der PDI Familie in anderen Kompartimenten, sowie eine abweichende Funktion derer im ER zeigen [192]. Während die Funktion von ERP57 im Lumen des ER fast vollständig aufgeklärt ist, bleibt die Funktion in anderen Kompartimenten weitgehend unbekannt. PDI, sowie ERP57, wurden auf der Zelloberfläche von Hepatozyten [193], Endothelzellen [194] und NG108-15 identifiziert. Es scheint ebenfalls in Signaltransduktion Prozessen von der Zellmembran in den Nukleus und bei der Reifung von Osteoblasten beteiligt zu sein [195]. Die Beteiligung von ERP57 in dem Stat3 Signalweg konnte ebenfalls beobachtet werden [196], sowie die Lokalisation von ERP57 im Nukleus. Dort konnte die Interaktion von ERP57 und  $\beta$ -Aktin gezeigt werden [197]. Bis heute gibt es keine Korrelation von membranassoziiertem ERP57 mit dem Aktin Zytoskelett, jedoch wurde ein Komplex im Nukleus identifiziert, in dem ERP57 assoziiert ist mit Zytoskelettproteinen, wie  $\beta$ -Actin und Vimentin [197]. Es wäre vorstellbar, dass ERP57 an der Zellmembran ebenfalls assoziiert ist mit dem Zytoskelett und somit GFAP Ak durch die Bindung an ERP57 einen Einfluss auf das Aktin Zytoskeletts ausüben. Die Frage bleibt bestehen, warum in lebenden RGC5 die Bindung von GFAP Ak an ERP57 nicht gezeigt werden konnte. ERP57 katalysiert die Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von Disulfidbrücken in Proteinen. Eine Erklärung könnte die, durch Bindung an ERP57 ausgelöste, Umlagerung von Disulfidbrücken in GFAP Ak sein, wodurch dessen Epitope nicht mehr durch den sek.

Ak erkannt werden (Wilding et al., Angenommen im Journal of Pharmacological Science, 03.02.2015).

### **5.3 Etablierung einer retinalen Organkultur aus dem Schwein**

Die Meinungen über die Herkunft und Identifizierung von RGC5 sind sehr kontrovers [95-97]. Im Laufe der Anfertigung der vorliegenden Dissertation häuften sich immer mehr Zweifel an der Herkunft von RGC5, weshalb es umso dringlicher wurde die Validierung der Ergebnisse mittels einer retinalen Organkultur durchzuführen. Die retinale Organkultur stellt ein zusammenhängendes Organsystem dar, welches im Gegenteil zu der Zellkultur erlaubt den Effekt von bestimmten Agenzien auf die intakte Retina sowie Zell-Zell Interaktionen zu untersuchen. Sie stellt ein Bindeglied zwischen der einfachen Zellkultur und der Komplexität eines Organismus dar. Der Nachteil einer Organkultur stellt die begrenzte Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit dar. Selbst unter optimalen Kultivierungsbedingungen ist dieses Zeitfenster im Vergleich zur Kultivierung von Zellen sehr begrenzt, jedoch eignet sie sich sehr gut für Kurzzeitversuche. Die hier beschriebenen Versuche wurden an einer adulten Schweineretina durchgeführt. Sie stellt ein attraktives Modell dar, da sie viele Gemeinsamkeiten, wie Größe und funktionelle sowie morphologische Eigenschaften, mit der humanen Retina teilt [98-100]. Während viele retinale Organkulturen von postnatalen oder embryonalen Geweben stammen sind die Vorteile einer adulten Organkultur die gleichbleibenden histologischen Eigenschaften [198, 199]. Die Präparation sowie die Kultivierung der Retina wurden nach einer modifizierten Methode von Caffé et al. durchgeführt. Die immunhistologischen Färbungen der Retinaquerschnitte am 1. Kultivierungstag zeigten den typischen morphologischen Aufbau, sowie die Anzahl der RGZ/mm einer gesunden adulten Schweineretina, welche mit Literaturangaben vergleichbar ist [119, 200]. Durch die Präparation der Retina scheinen keine sichtbaren Schäden entstanden zu sein. Die charakteristische morphologische Struktur der Retina blieb bis zu dem 5. Kultivierungstag erhalten. Jedoch war ab dem 3. Kultivierungstag eine Degeneration der Photorezeptorzellen zu sehen, was die Folge der Ablösung der Retina vom RPE sein könnte. Erste apoptotische Prozesse ließen sich bei vereinzelt Zellen sowohl in der RGZ-Schicht

als auch in der Photorezeptorschicht ab dem 2. Kultivierungstag beobachten. Dies spiegeln auch in vitro Studien wieder, in denen am 1. Tag nach der Axotomie erste apoptotische Prozesse auftraten [201, 202]. Mit zunehmenden Kultivierungstag nahm die Anzahl der apoptotisch gefärbten Zellkerne zu. Die in dieser Arbeit entwickelte Präparation und Kultivierung der adulten Schweineretina stellt ein gutes Modell zu Untersuchung von ophthalmologischen Fragestellungen dar. Es ermöglicht im Vergleich zu einer gesunden Retina die erfolgreiche Präparation der Retina ohne morphologische Veränderungen hervorzurufen. Des Weiteren war es möglich die Retina über mehrere Tage in Kultur zu halten. Da die Degenerationsprozesse am 2. Tag noch sehr gering waren wurden für die folgenden Versuche Retinaexplantate des 2. Kultivierungstages verwendet (Manuskript in Vorbereitung).

### **5.3.1 Effekt von Ak auf retinale Organkultur des Schweines**

Ziel dieses Versuches war es die vorherigen Ergebnisse des protektiven Effektes von Ak auf RGC5 mittels eines retinalen Organmodelles zu validieren. Des Weiteren sollten diese Versuche ein besseres Verständnis über die Rolle der natürlichen Umgebung von RGZ, im Zusammenhang mit dem protektiven Effekt von Ak, liefern. Die Untersuchung des Effektes von Ak auf retinale Explantate bestätigten teilweise die Ergebnisse, die in RGC5 beobachtet wurden. Die immunhistologische Untersuchung der mit Ak inkubierten Retinaexplantate zeigte einen signifikanten protektiven Effekt von  $\gamma$ -synuclein und GFAP Ak im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dies zeigte sich in einer erhöhten RGZ Anzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dagegen zeigten, die mit 14-3-3 Ak behandelten Retinaexplantate keinen Effekt. Dies könnte auf die verschiedenen Stressstimuli zurückzuführen sein. Während die RGC5 mit bestimmten Stressfaktoren, wie Glutamat, Staurosporin und  $H_2O_2$  behandelt wurden, stellt in der Organkultur die Durchtrennung des Sehnerves den Stressfaktor dar. Vorherige Studien, die den protektiven Effekt von Ak auf RGC5 untersuchten, zeigten ebenfalls, dass nicht jeder der verwendeten Ak gegen dieselben Stressfaktoren protektiv wirkte. Dies könnte zum Teil zurückzuführen sein auf die unterschiedliche Aktivierung von Signalwegen durch den Stressfaktor. 14-3-3 Ak zeigten einen protektiven Effekt auf RGC5 in den Konzentrationen zwischen 0.05

$\mu\text{g/ml}$  und  $10 \mu\text{g/ml}$ . Möglicherweise war die gewählte Konzentration von  $0.05 \mu\text{g/ml}$ , mit welcher die retinalen Explantaten inkubiert wurden, zu gering gewählt um einen protektiven Effekt auszulösen. Die Untersuchung der apoptotischen Zellen zeigte leider keinen signifikanten Unterschied in der mit Ak behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies könnte auf den geringen Zeitrahmen des apoptotischen Prozesses zurückzuführen sein. Abhängig vom Zelltyp und dem apoptotischen Insult dauert dieser Prozess zwischen 6 und 24 h [203]. Die Endphase der Apoptose, die gekennzeichnet ist durch morphologische Veränderungen, wie der DNA Fragmentierung, findet in weniger als 2 h statt [204]. Durch dieses geringe Zeitfenster sind nur eine geringe Anzahl von apoptotischen Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt sichtbar [205]. Möglicherweise führt dies dazu, dass geringe Unterschiede in der Apoptoserate nicht identifiziert werden können (Manuskript in Vorbereitung).

### **5.3.2 Einfluss von Ak auf Müllerzellen**

Zusätzlich wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt, um erste Hinweise auf den Einfluss von Ak in dem interagierenden Netzwerk von retinalen Zellen zu erhalten. In allen Retinaexplantaten, die mit dem Ak behandelt wurden konnte eine signifikant gesteigerte Expression des Proteins Glutamin-Synthetase festgestellt werden. Dieses Protein wird in der Retina ausschließlich in Müllerzellen exprimiert und dient als spezifischer Marker zur Identifizierung [206]. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung des neuronalen Transmitters Glutamat in Glutamin, welches anschließend den Nervenzellen wiederum zur Synthese von Neurotransmittern zur Verfügung steht [207]. Müllerzellen, die Gliazellen der Retina, durchziehen die gesamte Retina und treten in Kontakt mit allen retinalen Zellen, einschließlich den RGZ. Sie spielen eine wichtige Rolle in dem Recycling von Neurotransmittern, in der Homöostase des extrazellulären Milieus, der Aufrechterhaltung der Blut-Retina Schranke, der Entfernung von metabolischen Endprodukten, sowie in der Bereitstellung von neurotrophen und antioxidativen Faktoren [208]. Letztere Funktionen sind maßgeblich am Überleben von RGZ beteiligt. Studien zeigten die Beteiligung von erhöhten Glutamatkonzentrationen an dem Absterben von RGZ in POAG Patienten sowie in einem experimentellen Glaukom Affen-Modell [11]. In



physiologischen Konzentrationen dient Glutamat als Neurotransmitter von RGZ. Bei erhöhten Konzentrationen führt dieses jedoch zum Zelltod von RGZ [209, 210]. Mehrere Studien zeigten den protektiven Effekt von Müllerzellen gegen toxische Effekte von erhöhten Glutamatkonzentrationen. Dabei spielten verschiedene Faktoren eine Rolle. Zum einen zeigte die erhöhte Expression von Glutamin-Synthetase in Retinae von Hühnern einen neuroprotektiven Effekt gegenüber Glutamat Toxizität [211]. Zum anderen scheint der Glutamat-Transporter GLAST eine bedeutende Rolle bei dem protektiven Effekt von Müllerzellen zu spielen [212]. Die erhöhte Expression von Glutamin-Synthetase in Ak behandelten Retinaexplantaten könnte an der erhöhten Anzahl von RGZ/mm beteiligt sein. Die hier erhaltenen Ergebnisse geben erste Hinweise auf die Beteiligung von Müllerzellen bei dem protektiven Effekt von Ak auf RGZ. Leider liefern die Ergebnisse keine detaillierten Informationen über die Interaktion zwischen RGZ und Müllerzellen im Zusammenhang mit dem protektiven Effekt der Ak. Auch lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob der Ak direkt in Interaktion mit Müllerzellen tritt oder die veränderte Proteinexpression in Müllerzellen wiederum durch die Bindung der Ak an RGZ verursacht wird. Studien in gemischten neuronalen/Gliazellkulturen zeigten den erforderlichen Zellkontakt für die erhöhte Expression von Glutamin-Synthetase [213, 214], weshalb ein indirekter Einfluss der Ak vorstellbar wäre (Manuskript in Vorbereitung).

### **5.3.3 Verminderte Stressantwort in Ak behandelten Retinaexplantaten**

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Organell das in allen eukaryotischen Zellen zu finden ist. Seine Hauptaufgabe besteht in der Protein-Synthese, -Transport und -Modifikation, Phospholipidsynthese und der Kalzium Homöostase [215-217]. Daneben zählt aber auch die korrekte Faltung und Modifikation von Proteinen zu seinen Aufgaben. Kommt es zu einer Akkumulation von fehlgefalteten oder nicht gefalteten Proteinen aufgrund von verschiedenen Stimuli wird die sogenannte „unfolded protein response“ (UPR) ausgelöst. Eine zentrale Rolle bei der Einleitung der UPR spielen die transmembranen Proteinkinasen Inositol requiring enzym 1 (IRE1), Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) sowie activating transcription factor 6 (ATF6). Bei physiologischen Bedingungen liegen diese

Proteine durch das Protein Immunoglobulin binding protein (BiP) inaktiviert vor. Bei erhöhtem Stress diffundiert dieses von den Stresssensoren ab und aktiviert diese dadurch. Ziel der UPR ist es durch eine Inhibition der Translation, einer gesteigerten Expression von Chaperonen, sowie die Degradierung von fehlgefalteten Proteinen dem ER-Stress entgegen zu wirken [218]. Gelingt dies nicht führt sie letztendlich zur Apoptose der Zelle. Somit werden durch die UPR anti- aber auch pro-apoptotische Signalwege aktiviert [219]. IRE1 aktiviert Gene für die Degradierung [220], sowie für die korrekte Faltung von Proteinen [221], interagiert aber auch mit Proteinen des mitochondrialen Apoptose Signalweges. So sind Bcl-2 Proteine nicht nur an der Regulierung der mitochondrialen Apoptose beteiligt sondern treten auch in Interaktion mit ER-Stress Proteinen. Bei länger anhaltendem Stress werden nachfolgende Signalmoleküle des IRE1 Weges wie Jnk und Chop aktiviert, die zur Einleitung der mitochondrialen Apoptose führen. Jnk wird durch den IRE1 Signalweg aktiviert und durch die nachfolgende Phosphorylierung von Bcl-2 Proteinen sind diese nicht mehr fähig das pro-apoptotische BH3-only Protein zu inhibieren [222]. Eine direkte Interaktion von BAX und Bak mit IRE1 wurde ebenfalls nachgewiesen [223]. Die Regulation von Bcl-2 Proteinen der mitochondrialen Apoptose durch den IRE1 Signalweg oder die direkte Interaktion liefert erste Hinweise auf die Verknüpfung des ER-Stresses mit Signalwegen der mitochondrialen Apoptose, welche bei lang anhaltendem Stress letztendlich zur Ausführung der Apoptose führt.

Die massenspektrometrische Analyse zeigte eine verminderte Stress-Antwort in den mit GFAP und  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten Retinaexplantaten, welche verantwortlich sein könnten für die erhöhte Anzahl an RGZ. Die Signalweg Analyse mittels IPA zeigte eine signifikant veränderte Expression von Proteinen, die dem ER-Stress Signalweg angehören und auf einen verminderten ER-Stress hinwiesen. Während dem ER-Stress besteht eine erhöhte Expression der Chaperone Calreticulin, Calnexin, Grp94 und Bip [224-226]. Diese waren in GFAP Ak behandelten Retinaexplantaten herunterreguliert, was auf eine verminderte ER-Stress Antwort hindeutet. Reticulin-1 gehört zu der Reticulon Familie, bei der es sich um transmembrane Proteine handelt die hauptsächlich mit dem ER assoziiert sind. Neben der Beteiligung am Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat, der Membran Morphogenese sowie an apoptotischen Prozessen konnte eine erhöhte Expression in ER-Stress induzierten HeLa Zellen nachgewiesen werden [227, 228]. Die Proteine der HSP Familie sind

ubiquitär exprimiert und agieren als Chaperone bei der Unterstützung der Proteinfaltung und verhindern die Protein Aggregation. Bei normalen physiologischen Bedingungen werden sie nur geringfügig exprimiert. In Stresssituation kommt es zur Einleitung der Hsp-Antwort und somit zu einer erhöhten Expression von Hsp [229, 230]. Die Herunterregulierung der Stress induzierten Chaperone Hsp 70 KDa 2 und Hsp 60KDa 1 in GFAP Ak behandelten Retinaexplantaten deutet auf eine verminderte Stress-Antwort der Zelle hin. Dies könnte die erhöhte RGZ-Anzahl in den GFAP Ak behandelten Retinaexplantaten erklären. In  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten Retinaexplantaten konnte ebenfalls ein Mitglied der Reticulin Familie identifiziert werden, welches herunterreguliert vorliegt. Des Weiteren gibt es Hinweise auf die Beteiligung von CDC24 in der Modulation von p53, welches wiederum an der Transkription von ER-Stress Proteinen beteiligt ist [231]. Auch in 14-3-3 Ak behandelten Retinaexplantaten konnte die Herunterregulierung von Reticulon 4 sowie 3 Stress induzierten Hsp Proteinen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte auch die erhöhte Expression von HSP 10kDa 1 beobachtet werden, welche durch Stress oder pathologische Ereignisse erhöht vorliegt [232]. Dies spiegelt sich auch in der Anzahl der RGZ in 14-3-3 Ak behandelten Retinaexplantate wieder, da kein Effekt im Vergleich zu unbehandelten Retinaexplantaten beobachtet werden konnte. In vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Parkinsons und Alzheimer, scheint ER-Stress eine bedeutende Rolle zu spielen [233]. Neben pro-apoptotischen Faktoren, wie oxidativer Stress oder mitochondriale Dysfunktionen, zeigen neueste Studien in Zellkulturversuchen sowie in einem Glaukom Ratten Modell die Beteiligung von ER-Stress am Absterben der RGZ [234-236]. Die Beteiligung von HSP als Abwehrmechanismus in Stresssituation wurde ebenfalls bei glaukomatösen Erkrankungen nachgewiesen. In vielen Tiermodellen aber auch in humanen Glaukom-Spenderaugen konnte die erhöhte Expression von HSP festgestellt werden [237-239]. In diesem Versuchsansatz wurde zur massenspektrometrischen Analyse die ganze Retina verwendet, weshalb die Ergebnisse keine Aussage über den Effekt auf einzelne Zellarten geben können. Sie liefern lediglich erste Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Signalwege und Zelltypen bei dem protektiven Effekt von Ak. Des Weiteren ist es durch den kompensativen Effekt von ubiquitär exprimierten Proteinen verschiedener Zelltypen nicht möglich signifikante Veränderungen in bestimmtem Zellarten zu identifizieren. Möglicherweise ist die Retina insgesamt einem

verminderten ER-Stress ausgesetzt. Weitere Untersuchungen sind nötig, die es ermöglichen einzelne Zelltypen in der Retina zu untersuchen und dessen Beteiligung an dem protektiven Effekt von Ak zu analysieren.

Zusätzlich zu dem Effekt von Ak auf Müllerzellen sowie auf einen verminderten Stress in der Retina konnte in den mit GFAP Ak behandelten Retinaexplantaten im Vergleich zur der unbehandelten Gruppe eine signifikante Herunterregulierung des Proteins GFAP identifiziert werden. GFAP gehört zu den Typ III Intermediärfilamenten und ist eine Hauptkomponente in Astrozyten [240]. Nach einer akuten Verletzung des Gehirns aber auch nach progressiver ZNS Degeneration, kommt es zu einer Aktivierung von Gliazellen, welche als reaktive Gliose beschrieben wird. Dies wird begleitet von einer erhöhten GFAP Expression, welche in vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer [86, 87] und Parkinsons [88], detektiert wurde. Des Weiteren konnten reaktive Astrozyten mit einem erhöhten GFAP Level in einem Glaukom-Tiermodell [89], sowie in humanen glaukomatösen Spenderaugen identifiziert werden [90]. Möglicherweise weisen eine geringere GFAP Expression in GFAP Ak behandelten Retinaexplantate auf eine verminderte reaktive Gliose hin. Zusätzlich wurden 6 Isoformen des 14-3-3 Proteins identifiziert, welche alle signifikant herunterreguliert waren. 14-3-3 Proteine sind kleine, saure, zytosolische Proteine die an vielen zellulären Prozessen beteiligt sind, wie z. B. an der Zellproliferation und an der Apoptose [76]. Zusätzlich konnte die Beteiligung von 14-3-3 an regulatorischen Signalwegen des Zelltodes in glaukomatöser Neurodegeneration nachgewiesen werden [81] (Manuskript in Vorbereitung).

#### **5.3.4 Rolle von mitochondrialer Dysfunktion in ER-Stress induzierter Apoptose**

Die Ergebnisse der veränderten Signalwege identifiziert in Ak inkubierten RGC5 können aufgrund des verschiedenen Probenmaterials nur schlecht miteinander verglichen werden, da es sich bei der Organkultur um ein komplexes Gewebe und nicht um eine einzelne Zellart handelt. Jedoch konnten Studien die Verknüpfung von ER-Stress mit mitochondrialen apoptotischen Signalwegen zeigen. Dabei spielt hauptsächlich die Bcl-2 Protein Familie, die an der mitochondrialen Membran assoziiert und an der Koordination der mitochondrialen Apoptose beteiligt ist, eine

Rolle [241]. Studien zeigten die Aktivierung von pro- sowie anti-apoptischen Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie durch ER-Stress [242, 243]. Proteine dieser Bcl-2 Familie konnten in Ak behandelten RGC5 identifiziert werden, welche anti-apoptisch reguliert waren. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der verminderten Stress-Antwort in der Retina mit der Regulation von anti-apoptischen Proteinen des mitochondrialen Apoptose Signalweges in Ak behandelten RGC5.

#### **5.4 Hypothese der Funktion von verminderten Autoantikörperreaktionen in Glaukompatienten**

In klinischen Studien, in denen das Serum sowie das Kammerwasser von Glaukompatienten untersucht wurde, wurde neben erhöhten, ebenfalls erniedrigte Autoantikörperreaktionen, wie z. B. gegen  $\gamma$ -synuclein, GFAP und 14-3-3, detektiert [46]. In klassischen Autoimmunerkrankungen zeigten erhöhte Antikörperreaktionen autoaggressives Potenzial. Dies ist in Myasthenia gravis zu beobachten in dem Autoantikörper gegen Acetylcholin Rezeptoren detektiert wurden, die zu Muskelschwäche führen [49, 50]. Die Frage bleibt bestehen welche Rolle die herunterregulierten Ak spielen. Studien konnten das Auftreten von Autoantikörpern in gesunden Menschen, sowie dessen protektives Potenzial zeigen [244]. Im Serum von Alzheimerpatienten konnten herunterregulierte Ak gegen A $\beta$  detektiert werden, die in einem Tiermodell einen protektiven Effekt zeigten, indem sie die Oligomerisierung von A $\beta$  Peptiden inhibierten [61, 245]. In einer familiären Form von Parkinsonpatienten konnten ebenfalls Autoantikörper gegen  $\alpha$ -synuclein detektiert werden, die möglicherweise eine Rolle bei protektiven Mechanismen spielen [246].

Möglicherweise spiegeln die herunterregulierten Autoantikörper in Glaukompatienten einen Verlust der protektiven Autoimmunität wider. Das Ungleichgewicht von natürlichen Autoantikörpern könnte dessen regulatorische Funktionen verändern und somit z. B. die Empfindlichkeit von RGZ gegenüber Stressfaktoren erhöhen. In der Zukunft wäre eine personalisierte Ak-Therapie vorstellbar, die den progressiven Verlust von RGZ verlangsamt oder verhindert [64].

## 6. Zusammenfassung

Glaukom bezeichnet eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen Augenerkrankungen, die mit einem langsamen, progredienten Verlust der RGZ und deren Axone einhergehen. Die Pathogenese des Glaukoms ist weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren wird die Beteiligung einer autoimmunen Komponente an der Pathogenese des Glaukoms vermutet. Neben komplex veränderten Autoantikörpermustern in Glaukompatienten konnten sowohl veränderte hoch- wie auch herunterregulierte Autoantikörper detektiert werden. Des Weiteren konnte der Effekt von Serum und insbesondere in dem Serum befindlichen Ak auf die Proteinexpression von neuroretinalen Zellen nachgewiesen werden. Die Rolle von herunterregulierten Ak ist weitgehend unbekannt, weshalb der Effekt auf neuroretinale Zellen untersucht wurde. Die Inkubation von neuroretinalen Zellen mit herunterregulierten Ak gegen 14-3-3,  $\gamma$ -synuclein und GFAP zeigten einen protektiven Effekt gegenüber Stressfaktoren, der sich in einer erhöhten Viabilität sowie in einer erniedrigten ROS-Produktion verdeutlichte. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung der Mechanismen, die sich hinter dem protektiven Effekt von herunterregulierten Ak verbergen. Für die Untersuchung von veränderten Signalwegen wurden massenspektrometrische Methoden sowie ein Ak-Microarray verwendet. Dabei konnte in  $\gamma$ -synuclein und 14-3-3 Ak behandelten RGC5 anti-apoptotisch veränderte Proteine des mitochondrialen sowie extrinsischen Apoptose Signalweges identifiziert werden. Angehörige Proteine dieses Signalweges sind anti-apoptotisch reguliert und könnten somit beteiligt sein an dem protektiven Effekt von Ak behandelten RGC5 gegenüber Stressfaktoren. Des Weiteren wurden signifikant veränderte Proteine des Aktin Zytoskelettweges in GFAP Ak inkubierten RGC5 identifiziert. Das Aktin Zytoskelett besteht aus einem dynamischen Auf- und Abbau von Filamenten, welche eine wichtige Rolle bei biologischen Prozessen wie z. Bsp. mechanische Zellstabilität, Zellbewegung, Endozytose und Apoptose, spielt. Die Verknüpfung des Aktin Zytoskettes mit mitochondrialen apoptotischen Prozessen könnte ebenfalls Hinweise auf eine verminderte Apoptoserate darstellen, wodurch der protektive Effekt von GFAP Ak erklärt werden könnte. Diese Ergebnisse konnten teilweise mittels eines Microarrays validiert werden. Der genaue Mechanismus, der der veränderten Proteinexpression zugrunde liegt, ist unbekannt, weshalb zusätzlich

immunhistologische Färbungen durchgeführt wurden. Diese zeigten die Expression von  $\gamma$ -synuclein, 14-3-3 sowie GFAP in permeabilisierten RGC5. Des Weiteren konnte die  $\gamma$ -synuclein und 14-3-3 Ak Internalisierung in Vesikel in lebenden RGC5 beobachtet werden. Da keine Aufnahme oder Bindung von GFAP Ak in lebenden RGC5 detektiert werden konnte, wurden mittels Westernblot und massenspektrometrischen Analysen mögliche Bindungspartner identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass GFAP Ak nicht exklusiv mit seinem Antigen interagiert, sondern ebenfalls mit ERP57. Dies konnte durch immunhistologische Färbungen validiert werden, welche die Bindung von GFAP Ak an ERP57 an der Zellmembran von RGC5 zeigte. Der protektive Effekt von Ak könnte zum einen durch die Bindung an ihr Antigen erklärt werden, wodurch dessen Funktion verändert und somit nachfolgende Signalwege verändert werden oder im Fall von GFAP Ak durch die Bindung an ERP57 vermittelt werden. Zur Validierung des protektiven Effektes von herunterregulierten Ak auf RGC5 und zur Untersuchung des Effektes von Ak in dem interagierenden Netzwerk von retinalen Zellen wurde eine retinale Organkultur des adulten Schweines etabliert. Dieses Modell soll ein besseres Verständnis über die Rolle der natürlichen Umgebung von RGZ, im Zusammenhang mit dem protektiven Effekt von Ak, liefern. Der protektive Effekt von  $\gamma$ -synuclein Ak sowie von GFAP Ak konnte mittels retinaler Organkultur validiert werden. Massenspektrometrische Untersuchungen deuten auf die Beteiligung von retinalen Müllerzellen hin, welche maßgeblich am Überleben von RGZ beteiligt sein könnten. Des Weiteren konnte in den Ak behandelten Retinaexplantaten ein verminderter ER-Stress detektiert werden, der für den protektiven Effekt der Ak auf RGZ verantwortlich sein könnte.

## 7. Fazit und Ausblick

Die erhaltenen Ergebnisse dieser Dissertation weisen deutlich auf die Beteiligung einer autoimmunen Komponente in der Pathogenese des Glaukoms hin. Insbesondere die Herunterregulierung von bestimmten Ak deutet auf einen Verlust der protektiven Autoimmunität hin. An dem protektiven Effekt scheinen vor allem anti-apoptotisch regulierte Proteine des mitochondrialen Apoptose Signalweges sowie eine verminderte Stress-Antwort der Zelle zu sein. Die Ergebnisse der retinalen Organkultur liefern erstmals Hinweise auf die Beteiligung verschiedener retinaler Zellarten auf den protektiven Effekt von Ak auf RGZ. Dabei scheinen Müllerzellen eine bedeutende Rolle einzunehmen. Jedoch bleibt ungeklärt, ob die Ak einen direkten oder indirekten Einfluss auf Müllerzellen ausüben. Um diese Frage zu klären wären immunhistologische Färbungen interessant die Aufschluss über die Ak Aufnahme oder Bindung an Müllerzellen geben. Des Weiteren gäbe eine Kokultur Hinweise auf die Interaktion von RGZ und Müllerzellen in Bezug auf den protektiven Effekt von Ak. Erste Hinweise über die Beteiligung von Müllerzellen in der Pathogenese des Glaukoms deuten auf eine verminderte Expression von Glutamattransportern hin, welche verantwortlich sein könnten für erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen. Vermutlich wird diese verminderte Expression gesteuert durch neurotrophe Faktoren wie GDNF [247]. Interessant wäre die Untersuchung der Expression von Glutamattransportern sowie von neurotrophen Faktoren sekretiert von Müllerzellen nach Ak Exposition. Die massenspektrometrischen Analysen der Ak behandelten Retinaexplantate konnten keinen Aufschluss auf veränderte Signalwege in bestimmten Zellarten liefern und durch den kompensatorischen Effekt von ubiquitär exprimierten Proteinen konnten veränderte Signalwege in bestimmten Zellarten nicht aufgezeigt werden. Deshalb wäre es interessant den Effekt von Ak auf bestimmte Zelltypen wie z. B. RGZ zu untersuchen. Verschiedene Zellschichten könnten mit Hilfe eines Laser Capture Microdissection Mikroskopes ausgeschnitten und anschließend massenspektrometrisch untersucht werden. Die Notwendigkeit der Untersuchung des Effektes von Ak auf RGZ auf Proteinebene ist umso dringlicher, da sich die Herkunft sowie die Identifizierung der RGC5 im Laufe der Dissertation als fragwürdig herausgestellt haben.



## 8. Literaturverzeichnis

1. Pfeiffer, N., *Glaukom-Grundlagen-Diagnostik-Therapie-Compliance*. 2001: Thieme.
2. Campbell, N.A., *Biologie*. 2005, Akademischer Verlag.
3. De Berardinis, E., et al., *The chemical composition of the human aqueous humour in normal and pathological conditions*. *Exp Eye Res*, 1965. **4**(3): p. 179-86.
4. Grehn, F., *Augenheilkunde*. 2005, Springer.
5. Steinbrück, I., Baumhoer, D., Henle, P., *Intensivkurs Anatomie*. Urban und Fischer. 2088.
6. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 2006, Urban und Fischer.
7. Quigley, H.A., *Number of people with glaucoma worldwide*. *Br J Ophthalmol*, 1996. **80**(5): p. 389-93.
8. Quigley, H.A. and A.T. Broman, *The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020*. *Br J Ophthalmol*, 2006. **90**(3): p. 262-7.
9. Gutteridge, I.F., *Normal tension glaucoma: diagnostic features and comparisons with primary open angle glaucoma*. *Clin Exp Optom*, 2000. **83**(3): p. 161-172.
10. Tezel, G., *Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences*. *Prog Retin Eye Res*, 2006. **25**(5): p. 490-513.
11. Dreyer, E.B., et al., *Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma*. *Arch Ophthalmol*, 1996. **114**(3): p. 299-305.
12. Leske, M.C., *Ocular perfusion pressure and glaucoma: clinical trial and epidemiologic findings*. *Curr Opin Ophthalmol*, 2009. **20**(2): p. 73-8.
13. Wolfs, R.C., et al., *Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study*. *Arch Ophthalmol*, 1998. **116**(12): p. 1640-5.
14. Grus, F. and D. Sun, *Immunological mechanisms in glaucoma*. *Semin Immunopathol*, 2008. **30**(2): p. 121-6.
15. Grus, F.H., et al., *Autoimmunity and glaucoma*. *J Glaucoma*, 2008. **17**(1): p. 79-84.
16. Joachim, S.C., N. Pfeiffer, and F.H. Grus, *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*, 2005. **243**(8): p. 817-23.
17. K. Murphy, T.P.W.M., *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009. **7**.
18. Kaufmann, S.H., *Basiswissen Immunologie*. Springer Verlag, 2012.
19. Lothar Rink, A.K., Hajo Haase, *Immunologie für Einsteiger*. Springer Verlag, 2011.
20. Streilein, J.W., *Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(11): p. 879-89.
21. Medawar, P.B., *Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye*. *Br J Exp Pathol*, 1948. **29**(1): p. 58-69.
22. Zhou, R., et al., *A new look at immune privilege of the eye: dual role for the vision-related molecule retinoic acid*. *J Immunol*, 2011. **187**(8): p. 4170-7.
23. Niederkorn, J.Y. and J. Stein-Streilein, *History and physiology of immune privilege*. *Ocul Immunol Inflamm*, 2010. **18**(1): p. 19-23.
24. Quintana, F.J., et al., *Cluster analysis of human autoantibody reactivities in health and in type 1 diabetes mellitus: a bio-informatic approach to immune complexity*. *J Autoimmun*, 2003. **21**(1): p. 65-75.
25. Lutz, H.U. and G. Wipf, *Naturally occurring autoantibodies to skeletal proteins from human red blood cells*. *J Immunol*, 1982. **128**(4): p. 1695-9.
26. Avrameas, S., B. Guilbert, and G. Dighiero, *Natural antibodies against tubulin, actin myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera, and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenstrom's*

- macroglobulinemia may express similar antibody specificities.* Ann Immunol (Paris), 1981. **132C**(2): p. 231-6.
27. Hashimoto, K., et al., *Germfree mice reared on an "antigen-free" diet.* Lab Anim Sci, 1978. **28**(1): p. 38-45.
  28. Avrameas, S., *Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'.* Immunol Today, 1991. **12**(5): p. 154-9.
  29. Lacroix-Desmazes, S., et al., *Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals.* J Immunol Methods, 1998. **216**(1-2): p. 117-37.
  30. Coutinho, A., M.D. Kazatchkine, and S. Avrameas, *Natural autoantibodies.* Curr Opin Immunol, 1995. **7**(6): p. 812-8.
  31. Navin, T.R., E.C. Krug, and R.D. Pearson, *Effect of immunoglobulin M from normal human serum on Leishmania donovani promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes.* Infect Immun, 1989. **57**(4): p. 1343-6.
  32. Michel, C., et al., *A concurrent increasing of natural antibodies and enhancement of resistance to furunculosis in rainbow trout.* Ann Rech Vet, 1990. **21**(3): p. 211-8.
  33. Lutz, H.U., et al., *Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7368-72.
  34. Hintner, H., et al., *Phagocytosis of keratin filament aggregates following opsonization with IgG-anti-keratin filament autoantibodies.* J Invest Dermatol, 1987. **88**(2): p. 176-82.
  35. Lutz, H.U., et al., *High doses of immunoglobulin G attenuate immune aggregate-mediated complement activation by enhancing physiologic cleavage of C3b in C3bn-IgG complexes.* Blood, 1996. **88**(1): p. 184-93.
  36. Varela, F.J. and A. Coutinho, *Second generation immune networks.* Immunol Today, 1991. **12**(5): p. 159-66.
  37. Cartwright, M.J., et al., *Immune-related disease and normal-tension glaucoma. A case-control study.* Arch Ophthalmol, 1992. **110**(4): p. 500-2.
  38. Wax, M.B., D.A. Barrett, and A. Pestronk, *Increased incidence of paraproteinemia and autoantibodies in patients with normal-pressure glaucoma.* Am J Ophthalmol, 1994. **117**(5): p. 561-8.
  39. Wax, M.B., et al., *Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma.* Am J Ophthalmol, 1998. **125**(2): p. 145-57.
  40. Tezel, G., G.M. Seigel, and M.B. Wax, *Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(12): p. 2277-87.
  41. Ikeda, Y., et al., *Clinical significance of serum antibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients.* Jpn J Ophthalmol, 2002. **46**(1): p. 13-7.
  42. Yang, J., et al., *Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(6): p. 1273-6.
  43. Kremmer, S., et al., *Antiphosphatidylserine antibodies are elevated in normal tension glaucoma.* Clin Exp Immunol, 2001. **125**(2): p. 211-5.
  44. Tezel, G., D.P. Edward, and M.B. Wax, *Serum autoantibodies to optic nerve head glycosaminoglycans in patients with glaucoma.* Arch Ophthalmol, 1999. **117**(7): p. 917-24.
  45. Grus, F.H., et al., *Serum autoantibodies to alpha-fodrin are present in glaucoma patients from Germany and the United States.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(3): p. 968-76.
  46. Joachim, S.C., et al., *Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008. **246**(4): p. 573-80.
  47. Joachim, S.C., et al., *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, 2007. **32**(6): p. 501-9.

48. Reichelt, J., et al., *Analysis of autoantibodies against human retinal antigens in sera of patients with glaucoma and ocular hypertension*. *Curr Eye Res*, 2008. **33**(3): p. 253-61.
49. Graus, Y.M. and M.H. De Baets, *Myasthenia gravis: an autoimmune response against the acetylcholine receptor*. *Immunol Res*, 1993. **12**(1): p. 78-100.
50. Drachman, D.B., *Myasthenia gravis*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(25): p. 1797-810.
51. Grus, F.H., et al., *Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma*. *Mol Vis*, 2004. **10**: p. 132-7.
52. Moalem, G., et al., *Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy*. *Nat Med*, 1999. **5**(1): p. 49-55.
53. Moalem, G., et al., *Autoimmune T cells retard the loss of function in injured rat optic nerves*. *J Neuroimmunol*, 2000. **106**(1-2): p. 189-97.
54. Werwitzke, S., et al., *Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(11): p. 3629-38.
55. Witte, T., *IgM antibodies against dsDNA in SLE*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2008. **34**(3): p. 345-7.
56. George, J., et al., *Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis*. *Atherosclerosis*, 1998. **138**(1): p. 147-52.
57. Palinski, W., E. Miller, and J.L. Witztum, *Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(3): p. 821-5.
58. Bell, K., et al., *Serum and antibodies of glaucoma patients lead to changes in the proteome, especially cell regulatory proteins, in retinal cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46910.
59. Bell, K., et al., *Does autoimmunity play a part in the pathogenesis of glaucoma?* *Prog Retin Eye Res*, 2013. **36**: p. 199-216.
60. Gramlich, O.W., et al., *Autoimmune biomarkers in glaucoma patients*. *Curr Opin Pharmacol*, 2013. **13**(1): p. 90-7.
61. Du, Y., et al., *Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease*. *Neurology*, 2001. **57**(5): p. 801-5.
62. Schenk, D., et al., *Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse*. *Nature*, 1999. **400**(6740): p. 173-7.
63. Holmes, C., et al., *Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial*. *Lancet*, 2008. **372**(9634): p. 216-23.
64. Wilding, C., et al., *gamma-Synuclein Antibodies Have Neuroprotective Potential on Neuroretinal Cells via Proteins of the Mitochondrial Apoptosis Pathway*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90737.
65. Surguchov, A., et al., *Synucleins in ocular tissues*. *J Neurosci Res*, 2001. **65**(1): p. 68-77.
66. Souza, J.M., et al., *Chaperone-like activity of synucleins*. *FEBS Lett*, 2000. **474**(1): p. 116-9.
67. Ueda, K., et al., *Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(23): p. 11282-6.
68. Jakes, R., M.G. Spillantini, and M. Goedert, *Identification of two distinct synucleins from human brain*. *FEBS Lett*, 1994. **345**(1): p. 27-32.
69. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. *Nature*, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
70. Spillantini, M.G. and M. Goedert, *The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **920**: p. 16-27.
71. Surgucheva, I., et al., *Synucleins in glaucoma: implication of gamma-synuclein in glaucomatous alterations in the optic nerve*. *J Neurosci Res*, 2002. **68**(1): p. 97-106.
72. Maurage, C.A., et al., *Retinal involvement in dementia with Lewy bodies: a clue to hallucinations?* *Ann Neurol*, 2003. **54**(4): p. 542-7.
73. Surgucheva, I., et al., *Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells*. *Mol Vis*, 2008. **14**: p. 1540-8.

74. Surgucheva, I., V.I. Shestopalov, and A. Surguchov, *Effect of gamma-synuclein silencing on apoptotic pathways in retinal ganglion cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36377-85.
75. Soto, I., et al., *Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model*. J Neurosci, 2008. **28**(2): p. 548-61.
76. Aitken, A., et al., *14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(12): p. 498-501.
77. Wang, W. and D.C. Shakes, *Molecular evolution of the 14-3-3 protein family*. J Mol Evol, 1996. **43**(4): p. 384-98.
78. Hermeking, H., *The 14-3-3 cancer connection*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(12): p. 931-43.
79. Kawamoto, Y., et al., *14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease brains*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(3): p. 245-53.
80. Ji, J., et al., *Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells*. Vision Res, 2005. **45**(2): p. 169-79.
81. Yang, X., et al., *Phosphorylation-dependent interaction with 14-3-3 in the regulation of bad trafficking in retinal ganglion cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(6): p. 2483-94.
82. Tsuruta, F., et al., *JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins*. EMBO J, 2004. **23**(8): p. 1889-99.
83. Eng, L.F., et al., *An acidic protein isolated from fibrous astrocytes*. Brain Res, 1971. **28**(2): p. 351-4.
84. Middeldorp, J. and E.M. Hol, *GFAP in health and disease*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(3): p. 421-43.
85. Eddleston, M. and L. Mucke, *Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease*. Neuroscience, 1993. **54**(1): p. 15-36.
86. Muramori, F., K. Kobayashi, and I. Nakamura, *A quantitative study of neurofibrillary tangles, senile plaques and astrocytes in the hippocampal subdivisions and entorhinal cortex in Alzheimer's disease, normal controls and non-Alzheimer neuropsychiatric diseases*. Psychiatry Clin Neurosci, 1998. **52**(6): p. 593-9.
87. Pike, C.J., B.J. Cummings, and C.W. Cotman, *Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease*. Exp Neurol, 1995. **132**(2): p. 172-9.
88. Damier, P., et al., *Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease*. Neuroscience, 1993. **52**(1): p. 1-6.
89. Wang, X., S.S. Tay, and Y.K. Ng, *An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma*. Exp Brain Res, 2000. **132**(4): p. 476-84.
90. Wang, L., et al., *Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(4): p. 1088-94.
91. Krishnamoorthy, R.R., et al., *Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **86**(1-2): p. 1-12.
92. Wood, J.P., et al., *A comparison of differentiation protocols for RGC-5 cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(7): p. 3774-83.
93. Van Bergen, N.J., et al., *Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(9): p. 4267-72.
94. Nieto, P.S., et al., *Differential responses of the mammalian retinal ganglion cell line RGC-5 to physiological stimuli and trophic factors*. Neurochem Int, 2010. **57**(3): p. 216-26.
95. Agarwal, N., et al., *Comparison of expression profile of neurotrophins and their receptors in primary and transformed rat retinal ganglion cells*. Mol Vis, 2007. **13**: p. 1311-8.
96. Lieven, C.J., et al., *Induction of axon and dendrite formation during early RGC-5 cell differentiation*. Exp Eye Res, 2007. **85**(5): p. 678-83.
97. Krishnamoorthy, R.R., et al., *A forensic path to RGC-5 cell line identification: lessons learned*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(8): p. 5712-9.

98. Ruiz-Ederra, J., et al., *Comparative study of the three neurofilament subunits within pig and human retinal ganglion cells*. Mol Vis, 2004. **10**: p. 83-92.
99. Ruiz-Ederra, J., P.F. Hitchcock, and E. Vecino, *Two classes of astrocytes in the adult human and pig retina in terms of their expression of high affinity NGF receptor (TrkA)*. Neurosci Lett, 2003. **337**(3): p. 127-30.
100. Beauchemin, M.L., *The fine structure of the pig's retina*. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol, 1974. **190**(1): p. 27-45.
101. Trowell, O.A., *A modified technique for organ culture in vitro*. Exp Cell Res, 1954. **6**(1): p. 246-8.
102. Caffè, A.R., et al., *Histotypic differentiation of neonatal mouse retina in organ culture*. Curr Eye Res, 1989. **8**(10): p. 1083-92.
103. Lucas, D.R., *In vitro maintenance of the mature guinea-pig retina*. Vision Research, 1962. **2**(1-4): p. 35-41.
104. Kobuch, K., et al., *Maintenance of adult porcine retina and retinal pigment epithelium in perfusion culture: characterisation of an organotypic in vitro model*. Exp Eye Res, 2008. **86**(4): p. 661-8.
105. Wilkins, M.R., et al., *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996. **13**: p. 19-50.
106. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(7): p. 804-17.
107. Hillenkamp, F. and M. Karas, *Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization*. Methods Enzymol, 1990. **193**: p. 280-95.
108. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Anal Chem, 2000. **72**(6): p. 1156-62.
109. Makarov, A., et al., *Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer*. J Am Soc Mass Spectrom, 2006. **17**(7): p. 977-82.
110. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol, 1975. **98**(3): p. 503-17.
111. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
112. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie: mit Pathochemie*. 2008, Springer.
113. Neuhoff, V., et al., *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. Electrophoresis, 1988. **9**(6): p. 255-62.
114. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2856-60.
115. Shevchenko, A., et al., *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. Anal Chem, 1996. **68**(5): p. 850-8.
116. Bjellqvist, B., et al., *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods, 1982. **6**(4): p. 317-39.
117. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
118. Klose, J., *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals*. Humangenetik, 1975. **26**(3): p. 231-43.
119. Garca, M., et al., *Topography of pig retinal ganglion cells*. J Comp Neurol, 2005. **486**(4): p. 361-72.
120. Vaux, D.L. and S.J. Korsmeyer, *Cell death in development*. Cell, 1999. **96**(2): p. 245-54.
121. Ekert, P.G. and D.L. Vaux, *Apoptosis and the immune system*. Br Med Bull, 1997. **53**(3): p. 591-603.
122. Lowe, S.W. and A.W. Lin, *Apoptosis in cancer*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 485-95.

123. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
124. Kerrigan, L.A., et al., *TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma*. Arch Ophthalmol, 1997. **115**(8): p. 1031-5.
125. Quigley, H.A., et al., *Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(5): p. 774-86.
126. Guo, L., et al., *Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(1): p. 175-82.
127. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
128. Bhardwaj, A. and B.B. Aggarwal, *Receptor-mediated choreography of life and death*. J Clin Immunol, 2003. **23**(5): p. 317-32.
129. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
130. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
131. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
132. Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin, *Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis*. Cell Death Differ, 1999. **6**(11): p. 1067-74.
133. Brunelle, J.K. and A. Letai, *Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 4): p. 437-41.
134. Tsujimoto, Y., *Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?* Genes Cells, 1998. **3**(11): p. 697-707.
135. Kelekar, A., et al., *Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(12): p. 7040-6.
136. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed, *IAP family proteins--suppressors of apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 239-52.
137. Kumarswamy, R. and S. Chandna, *Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them?* Mitochondrion, 2009. **9**(1): p. 1-8.
138. Qin, Q., K. Patil, and S.C. Sharma, *The role of Bax-inhibiting peptide in retinal ganglion cell apoptosis after optic nerve transection*. Neurosci Lett, 2004. **372**(1-2): p. 17-21.
139. Libby, R.T., et al., *Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by Bax gene dosage*. PLoS Genet, 2005. **1**(1): p. 17-26.
140. Grigorian, M., et al., *Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22699-708.
141. Abdul-Ghani, M., et al., *PRA isoforms are targeted to distinct membrane compartments*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6225-33.
142. Vento, M.T., et al., *Praf2 is a novel Bcl-xL/Bcl-2 interacting protein with the ability to modulate survival of cancer cells*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15636.
143. Bartke, T., et al., *Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase*. Mol Cell, 2004. **14**(6): p. 801-11.
144. Tajeddine, N., et al., *Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death*. Oncogene, 2008. **27**(30): p. 4221-32.
145. Yuan, S., et al., *Voltage-dependent anion channel 1 is involved in endostatin-induced endothelial cell apoptosis*. FASEB J, 2008. **22**(8): p. 2809-20.
146. Fisher, T.L. and J. Blenis, *Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1212-9.

147. Dalby, K.N., et al., *Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1 $\alpha$ /p90 $^{\text{rsk}}$  that are inducible by MAPK*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1496-505.
148. Zhou, Y., et al., *Activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by AAV gene transfer protects retinal ganglion cells in glaucoma*. Mol Ther, 2005. **12**(3): p. 402-12.
149. Shimamura, A., et al., *Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal*. Curr Biol, 2000. **10**(3): p. 127-35.
150. Huang, W., et al., *Calcineurin cleavage is triggered by elevated intraocular pressure, and calcineurin inhibition blocks retinal ganglion cell death in experimental glaucoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12242-7.
151. Weishaupt, J.H., et al., *Contribution of caspase-8 to apoptosis of axotomized rat retinal ganglion cells in vivo*. Neurobiol Dis, 2003. **13**(2): p. 124-35.
152. Surgucheva, I. and A. Surguchov, *Gamma-synuclein: cell-type-specific promoter activity and binding to transcription factors*. J Mol Neurosci, 2008. **35**(3): p. 267-71.
153. Surgucheva, I.G., et al., *Effect of gamma-synuclein overexpression on matrix metalloproteinases in retinoblastoma Y79 cells*. Arch Biochem Biophys, 2003. **410**(1): p. 167-76.
154. Tezel, G. and M.B. Wax, *The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells*. J Neurosci, 2000. **20**(10): p. 3552-62.
155. Adamus, G., et al., *Antibodies to recoverin induce apoptosis of photoreceptor and bipolar cells in vivo*. J Autoimmun, 1998. **11**(5): p. 523-33.
156. Morrison, R.S., et al., *p53-dependent cell death signaling in neurons*. Neurochem Res, 2003. **28**(1): p. 15-27.
157. Lin, H.J., et al., *Distributions of p53 codon 72 polymorphism in primary open angle glaucoma*. Br J Ophthalmol, 2002. **86**(7): p. 767-70.
158. Amaral, J.D., et al., *The role of p53 in apoptosis*. Discov Med, 2010. **9**(45): p. 145-52.
159. Franklin-Tong, V.E. and C.W. Gourlay, *A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals*. Biochem J, 2008. **413**(3): p. 389-404.
160. Sathish, K., et al., *Phosphorylation of profilin regulates its interaction with actin and poly (L-proline)*. Cell Signal, 2004. **16**(5): p. 589-96.
161. Moriyama, K., K. Iida, and I. Yahara, *Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin*. Genes Cells, 1996. **1**(1): p. 73-86.
162. Pollard, T.D., *Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2007. **36**: p. 451-77.
163. Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka, *Focal adhesions, contractility, and signaling*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 463-518.
164. De Matteis, M.A. and J.S. Morrow, *Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway*. J Cell Sci, 2000. **113** ( Pt 13): p. 2331-43.
165. Suria, H., et al., *Cytoskeletal disruption induces T cell apoptosis by a caspase-3 mediated mechanism*. Life Sci, 1999. **65**(25): p. 2697-707.
166. Kruidering, M., et al., *Cisplatin effects on F-actin and matrix proteins precede renal tubular cell detachment and apoptosis in vitro*. Cell Death Differ, 1998. **5**(7): p. 601-14.
167. Koya, R.C., et al., *Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15343-9.
168. Harms, C., et al., *Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization*. Mol Cell Neurosci, 2004. **25**(1): p. 69-82.
169. Xu, X., J.G. Forbes, and M. Colombini, *Actin modulates the gating of Neurospora crassa VDAC*. J Membr Biol, 2001. **180**(1): p. 73-81.
170. Yao, W., et al., *Profilin 1 potentiates apoptosis induced by staurosporine in cancer cells*. Curr Mol Med, 2013. **13**(3): p. 417-28.

171. Chua, B.T., et al., *Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(12): p. 1083-9.
172. Gourlay, C.W. and K.R. Ayscough, *A role for actin in aging and apoptosis*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 6): p. 1260-4.
173. Maruszak, A. and C. Zekanowski, *Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011. **35**(2): p. 320-30.
174. Exner, N., et al., *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences*. EMBO J, 2012. **31**(14): p. 3038-62.
175. Abu-Amero, K.K., J. Morales, and T.M. Bosley, *Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(6): p. 2533-41.
176. Barron, M.J., et al., *The distributions of mitochondria and sodium channels reflect the specific energy requirements and conduction properties of the human optic nerve head*. Br J Ophthalmol, 2004. **88**(2): p. 286-90.
177. Mattson, M.P., *Apoptosis in neurodegenerative disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(2): p. 120-9.
178. Kermer, P., et al., *Activation of caspase-3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo*. FEBS Lett, 1999. **453**(3): p. 361-4.
179. Hanninen, V.A., et al., *Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma*. Curr Eye Res, 2002. **25**(6): p. 389-95.
180. Napankangas, U., et al., *Rat retinal ganglion cells upregulate the pro-apoptotic BH3-only protein Bim after optic nerve transection*. Brain Res Mol Brain Res, 2003. **120**(1): p. 30-7.
181. Mosinger Ogilvie, J., et al., *Suppression of developmental retinal cell death but not of photoreceptor degeneration in Bax-deficient mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(9): p. 1713-20.
182. Huang, X.R. and R.W. Knighton, *Altered F-actin distribution in retinal nerve fiber layer of a rat model of glaucoma*. Exp Eye Res, 2009. **88**(6): p. 1107-14.
183. Charest-Morin, X., et al., *C-C chemokine receptor-7 mediated endocytosis of antibody cargoes into intact cells*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 122.
184. Fewou, S.N., et al., *Anti-ganglioside antibody internalization attenuates motor nerve terminal injury in a mouse model of acute motor axonal neuropathy*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 1037-51.
185. Alarcon-Segovia, D., A. Ruiz-Arguelles, and E. Fishbein, *Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors*. Nature, 1978. **271**(5640): p. 67-9.
186. Yanase, K., et al., *Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1*. J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 25-31.
187. Goldstein, J.L., R.G. Anderson, and M.S. Brown, *Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis*. Nature, 1979. **279**(5715): p. 679-85.
188. Congdon, E.E., et al., *Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcgamma Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance*. J Biol Chem, 2013. **288**(49): p. 35452-65.
189. Iglesias-Bartolome, R., et al., *Differential endocytic trafficking of neuropathy-associated antibodies to GM1 ganglioside and cholera toxin in epithelial and neural cells*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(12): p. 2526-40.
190. Gallego, B.I., et al., *IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 92.
191. Freedman, R.B., P. Klappa, and L.W. Ruddock, *Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains*. EMBO Rep, 2002. **3**(2): p. 136-40.
192. Turano, C., et al., *Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions*. J Cell Physiol, 2002. **193**(2): p. 154-63.



193. Terada, K., et al., *Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20410-6.
194. Hotchkiss, K.A., L.J. Matthias, and P.J. Hogg, *Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1388**(2): p. 478-88.
195. Chen, J., et al., *Protein-disulfide isomerase-associated 3 (Pdia3) mediates the membrane response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in osteoblasts*. J Biol Chem, 2010. **285**(47): p. 37041-50.
196. Eufemi, M., et al., *ERp57 is present in STAT3-DNA complexes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(4): p. 1306-12.
197. Cicchillitti, L., et al., *Characterisation of a multimeric protein complex associated with ERp57 within the nucleus in paclitaxel-sensitive and -resistant epithelial ovarian cancer cells: the involvement of specific conformational states of beta-actin*. Int J Oncol, 2010. **37**(2): p. 445-54.
198. Hoff, A., H. Hammerle, and B. Schlosshauer, *Organotypic culture system of chicken retina*. Brain Res Brain Res Protoc, 1999. **4**(3): p. 237-48.
199. Caffè, A.R., A. Soderpalm, and T. van Veen, *Photoreceptor-specific protein expression of mouse retina in organ culture and retardation of rd degeneration in vitro by a combination of basic fibroblast and nerve growth factors*. Curr Eye Res, 1993. **12**(8): p. 719-26.
200. Winkler, J., et al., *Cellular and cytoskeletal dynamics within organ cultures of porcine neuroretina*. Exp Eye Res, 2002. **74**(6): p. 777-88.
201. Garcia-Valenzuela, E., et al., *Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy*. J Neurobiol, 1994. **25**(4): p. 431-8.
202. Engelsberg, K., et al., *Apoptotic cell death and microglial cell responses in cultured rat retina*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2004. **242**(3): p. 229-39.
203. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
204. Messam, C.A. and R.N. Pittman, *Asynchrony and commitment to die during apoptosis*. Exp Cell Res, 1998. **238**(2): p. 389-98.
205. Saraste, A. and K. Pulkki, *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(3): p. 528-37.
206. Lewis, G.P., et al., *An immunocytochemical comparison of Muller cells and astrocytes in the cat retina*. Exp Eye Res, 1988. **47**(6): p. 839-53.
207. Bringmann, A., et al., *Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism*. Neurochem Int, 2009. **54**(3-4): p. 143-60.
208. Bringmann, A., et al., *Muller cells in the healthy and diseased retina*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(4): p. 397-424.
209. Lucas, D.R. and J.P. Newhouse, *The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina*. AMA Arch Ophthalmol, 1957. **58**(2): p. 193-201.
210. Vorwerk, C.K., et al., *Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. **37**(8): p. 1618-24.
211. Gorovits, R., et al., *Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 7024-9.
212. Kawasaki, A., Y. Otori, and C.J. Barnstable, *Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(11): p. 3444-50.
213. Vardimon, L., et al., *Cell contacts are required for induction by cortisol of glutamine synthetase gene transcription in the retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5981-5.
214. Heidinger, V., et al., *Ability of retinal Muller glial cells to protect neurons against excitotoxicity in vitro depends upon maturation and neuron-glial interactions*. Glia, 1999. **25**(3): p. 229-39.

215. Palade, G., *Intracellular aspects of the process of protein synthesis*. Science, 1975. **189**(4200): p. 347-58.
216. Koch, G.L., *The endoplasmic reticulum and calcium storage*. Bioessays, 1990. **12**(11): p. 527-31.
217. Fagone, P. and S. Jackowski, *Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S311-6.
218. Chakrabarti, A., A.W. Chen, and J.D. Varner, *A review of the mammalian unfolded protein response*. Biotechnol Bioeng, 2011. **108**(12): p. 2777-93.
219. Osowski, C.M. and F. Urano, *The binary switch between life and death of endoplasmic reticulum-stressed beta cells*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010. **17**(2): p. 107-12.
220. Yoshida, H., et al., *A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response*. Dev Cell, 2003. **4**(2): p. 265-71.
221. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
222. Bassik, M.C., et al., *Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptosis*. EMBO J, 2004. **23**(5): p. 1207-16.
223. Hetz, C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha*. Science, 2006. **312**(5773): p. 572-6.
224. Kozutsumi, Y., et al., *The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 462-4.
225. Llewellyn, D.H. and H.L. Roderick, *Overexpression of calreticulin fails to abolish its induction by perturbation of normal ER function*. Biochem Cell Biol, 1998. **76**(5): p. 875-80.
226. Guerin, R., et al., *Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): p. 4404-20.
227. Yang, Y.S. and S.M. Strittmatter, *The reticulons: a family of proteins with diverse functions*. Genome Biol, 2007. **8**(12): p. 234.
228. Wan, Q., et al., *Reticulon 3 mediates Bcl-2 accumulation in mitochondria in response to endoplasmic reticulum stress*. Apoptosis, 2007. **12**(2): p. 319-28.
229. Lindquist, S., *The heat-shock response*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 1151-91.
230. Kalmar, B. and L. Greensmith, *Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(4): p. 310-8.
231. Qu, L. and A.E. Koromilas, *Control of tumor suppressor p53 function by endoplasmic reticulum stress*. Cell Cycle, 2004. **3**(5): p. 567-70.
232. Kim, S.W. and J.K. Lee, *NO-induced downregulation of HSP10 and HSP60 expression in the postischemic brain*. J Neurosci Res, 2007. **85**(6): p. 1252-9.
233. Lindholm, D., H. Wootz, and L. Korhonen, *ER stress and neurodegenerative diseases*. Cell Death Differ, 2006. **13**(3): p. 385-92.
234. Shimazawa, M., et al., *Involvement of ER stress in retinal cell death*. Mol Vis, 2007. **13**: p. 578-87.
235. Doh, S.H., et al., *Retinal ganglion cell death induced by endoplasmic reticulum stress in a chronic glaucoma model*. Brain Res, 2010. **1308**: p. 158-66.
236. Inokuchi, Y., et al., *Effect of an inducer of BiP, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum (ER) stress-induced retinal cell death*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(1): p. 334-44.
237. Windisch, B.K., et al., *Induction of heat shock proteins 27 and 72 in retinal ganglion cells after acute pressure-induced ischaemia*. Clin Experiment Ophthalmol, 2009. **37**(3): p. 299-307.
238. Huang, W., et al., *Hsp27 phosphorylation in experimental glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(9): p. 4129-35.

239. Tezel, G., R. Hernandez, and M.B. Wax, *Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes*. Arch Ophthalmol, 2000. **118**(4): p. 511-8.
240. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. Neurochem Res, 2000. **25**(9-10): p. 1439-51.
241. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
242. McCullough, K.D., et al., *Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1249-59.
243. Galehdar, Z., et al., *Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA*. J Neurosci, 2010. **30**(50): p. 16938-48.
244. Kohler, H., et al., *Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response?* Scand J Immunol, 2003. **58**(3): p. 285-9.
245. Dodel, R., et al., *Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2011. **31**(15): p. 5847-54.
246. Papachroni, K.K., et al., *Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease*. J Neurochem, 2007. **101**(3): p. 749-56.
247. Naskar, R., C.K. Vorwerk, and E.B. Dreyer, *Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(7): p. 1940-4.

## 9. Anhang

**Tabelle 12: Signifikant veränderte Proteine in  $\gamma$ -synuclein Ak inkubierten RGC5**

Swiss-Prot ID	Gen Name	Localization	Veränderte Expression
<b>P09671</b>	superoxide dismutase 2, mitochondrial	Zytoplasma	-190.056
<b>P02666</b>	casein beta	Extrazellularraum	-67.789
<b>Q9CQX2</b>	cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	Zytoplasma	-14.927
<b>Q9QYR9</b>	acyl-CoA thioesterase 2	Zytoplasma	-8.921
<b>P62075</b>	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	Zytoplasma	-8.649
<b>Q9R0P5</b>	destrin (actin depolymerizing factor)	Zytoplasma	-8.505
<b>Q924C1-1</b>	exportin 5	Nukleus	-7.036
<b>P20152</b>	vimentin	Zytoplasma	-6.789
<b>Q99LS3</b>	phosphoserine phosphatase	Zytoplasma	-5.885
<b>Q9CR86</b>	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	Zytoplasma	-5.517
<b>D3Z3G6</b>	mitogen-activated protein kinase 3	Zytoplasma	-4.778
<b>P08074</b>	carbonyl reductase 2	Zytoplasma	-4.745
<b>Q62426</b>	cystatin B (stefin B)	Zytoplasma	-4.634
<b>Q3TW96-1</b>	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1-like 1	unbekannt	-4.618
<b>P31786</b>	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)	Zytoplasma	-4.572
<b>Q3TTN3</b>	voltage-dependent anion channel 3	Zytoplasma	-4.483
<b>Q8R1I1</b>	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X	Zytoplasma	-4.38
<b>A2AEY2</b>	four and a half LIM domains 1	Zytoplasma	-4.251
<b>P07091</b>	S100 calcium binding protein A4	Zytoplasma	-4.193
<b>O35900</b>	LSM2 homolog, U6 small nuclear RNA associated ( <i>S. cerevisiae</i> )	Nukleus	-4.184
<b>Q8BH95</b>	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	Zytoplasma	-3.679
<b>P35279-1</b>	RAB6A, member RAS oncogene family	Zytoplasma	-3.666
<b>P00375</b>	dihydrofolate reductase	unbekannt	-3.552
<b>Q8C1B7-1</b>	septin 11	Nukleus	-3.436
<b>A8C1V1</b>	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	Extrazellularraum	-3.414
<b>Q05920</b>	pyruvate carboxylase	Zytoplasma	-3.383
<b>P08113</b>	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	Zytoplasma	-3.369
<b>Q91WQ3</b>	tyrosyl-tRNA synthetase	Zytoplasma	-3.306
<b>P48678-1</b>	lamin A/C	Nukleus	-3.297
<b>Q8VCW8</b>	acyl-CoA synthetase family member 2	Zytoplasma	-3.284
<b>Q62465</b>	vesicle amine transport protein 1 homolog ( <i>T. californica</i> )	Plasmamembran	-3.216

<b>Q05816</b>	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	Zytoplasma	-3.088
<b>P16110</b>	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	Extrazellularraum	-3.053
<b>P70296</b>	phosphatidylethanolamine binding protein 1	Zytoplasma	-3.027
<b>P41731</b>	CD63 molecule	Plasmamembran	-3.02
<b>E9QLV8</b>	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	Zytoplasma	-3.012
<b>P20029</b>	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	Zytoplasma	-2.97
<b>Q9DBP5</b>	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic	Nukleus	-2.959
<b>P70202</b>	latexin	Zytoplasma	-2.93
<b>Q920E5</b>	farnesyl diphosphate synthase	Zytoplasma	-2.913
<b>P08003</b>	protein disulfide isomerase family A, member 4	Zytoplasma	-2.9
<b>E9Q9H9</b>	peroxiredoxin 5	Zytoplasma	-2.868
<b>P05201</b>	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)	Zytoplasma	-2.857
<b>Q9D1D4-1</b>	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	Zytoplasma	-2.847
<b>Q8VDN2</b>	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide	Plasmamembran	-2.837
<b>Q9CVB6</b>	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa	Zytoplasma	-2.796
<b>Q9D892</b>	inosine triphosphatase (nucleoside triphosphate pyrophosphatase)	Zytoplasma	-2.765
<b>P45878</b>	FK506 binding protein 2, 13kDa	Zytoplasma	-2.745
<b>O08807</b>	peroxiredoxin 4	Zytoplasma	-2.744
<b>Q9CQB5</b>	CDGSH iron sulfur domain 2	Zytoplasma	-2.685
<b>P59999</b>	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa	unbekannt	-2.671
<b>Q9ERK4</b>	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	Nukleus	-2.671
<b>Q9CQB4</b>	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	Zytoplasma	-2.659
<b>Q61024</b>	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	Zytoplasma	-2.648
<b>Q60930</b>	voltage-dependent anion channel 2	Zytoplasma	-2.64
<b>P12382</b>	phosphofruktokinase, liver	Zytoplasma	-2.631
<b>P56135</b>	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2	Zytoplasma	-2.58
<b>P16045</b>	lectin, galactoside-binding, soluble, 1	Extrazellularraum	-2.525
<b>P61021</b>	RAB5B, member RAS oncogene family	Zytoplasma	-2.514
<b>Q9CR51</b>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1	Zytoplasma	-2.501
<b>Q9D358-1</b>	acid phosphatase 1, soluble	Zytoplasma	-2.492
<b>Q3TN39</b>	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	Plasmamembran	-2.483

<b>P47754</b>	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	Zytoplasma	-2.467
<b>P40142</b>	transketolase	Zytoplasma	-2.459
<b>E0CXH5</b>	triosephosphate isomerase 1	Zytoplasma	-2.457
<b>Q9DCT8</b>	cysteine-rich protein 2	Plasmamembran	-2.448
<b>Q9DCN2-1</b>	cytochrome b5 reductase 3	Zytoplasma	-2.427
<b>Q8BH04</b>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	Zytoplasma	-2.418
<b>P68037</b>	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	Zytoplasma	-2.389
<b>Q61425</b>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Zytoplasma	-2.36
<b>D3Z3A8</b>	myosin IXA	Zytoplasma	-2.36
<b>Q9JIF7</b>	coatamer protein complex, subunit beta 1	Zytoplasma	-2.351
<b>Q60932-1</b>	voltage-dependent anion channel 1	Zytoplasma	-2.345
<b>Q07813</b>	BCL2-associated X protein	Zytoplasma	-2.337
<b>Q99PT1</b>	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	Zytoplasma	-2.328
<b>Q3UG45</b>	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5	Plasmamembran	-2.282
<b>Q9CQI6</b>	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	Zytoplasma	-2.279
<b>P17710-1</b>	hexokinase 1	Zytoplasma	-2.276
<b>P62715</b>	protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyme	Zytoplasma	-2.26
<b>P61924</b>	coatamer protein complex, subunit zeta 1	Zytoplasma	-2.259
<b>P62835</b>	RAP1A, member of RAS oncogene family	Zytoplasma	-2.239
<b>Q920A5</b>	serine carboxypeptidase 1	Zytoplasma	-2.237
<b>Q3V2H3</b>	sorting nexin 12	unbekannt	-2.217
<b>P14211</b>	calreticulin	Zytoplasma	-2.178
<b>Q9CPT4</b>	chromosome 19 open reading frame 10	Extrazellularraum	-2.17
<b>P62334</b>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	Nukleus	-2.168
<b>O35215</b>	D-dopachrome tautomerase	Zytoplasma	-2.118
<b>Q66JR8</b>	parathymosin	Nukleus	-2.105
<b>P11031</b>	SUB1 homolog (S. cerevisiae)	Nukleus	-2.104
<b>Q3UHX2</b>	PDGFA associated protein 1	Zytoplasma	-2.09
<b>D4AFX7</b>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13	unbekannt	-2.058
<b>P13020-1</b>	gelsolin	Extrazellularraum	-2.051
<b>Q8BP47</b>	asparaginyl-tRNA synthetase	Zytoplasma	-2.039
<b>Q9QXT0</b>	canopy 2 homolog (zebrafish)	Plasmamembran	-2.037
<b>P84078</b>	ADP-ribosylation factor 1	Zytoplasma	-2.028
<b>E9Q120</b>	lon peptidase 1, mitochondrial	Zytoplasma	-2.024
<b>P26443</b>	glutamate dehydrogenase 1	Zytoplasma	-2.023
<b>O08553</b>	dihydropyrimidinase-like 2	Zytoplasma	-2.01
<b>P23198</b>	chromobox homolog 3	Nukleus	2.013

<b>P26043</b>	radixin	Zytoplasma	2.013
<b>P49312-2</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Nukleus	2.022
<b>O54734</b>	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	Zytoplasma	2.024
<b>P14685</b>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	Zytoplasma	2.029
<b>P07724</b>	albumin	Extrazellularraum	2.042
<b>Q62167</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	Nukleus	2.062
<b>P14069</b>	S100 calcium binding protein A6	Zytoplasma	2.063
<b>P14206</b>	ribosomal protein SA	Zytoplasma	2.077
<b>Q8VDM4</b>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2	Zytoplasma	2.094
<b>P29391</b>	ferritin, light polypeptide	Zytoplasma	2.1
<b>O70404</b>	vesicle-associated membrane protein 8 (endobrevin)	Plasmamembran	2.105
<b>Q9Z1N5</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39B	Nukleus	2.124
<b>P62317</b>	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa	Nukleus	2.127
<b>P62309</b>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	Nukleus	2.141
<b>P32067</b>	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	Nukleus	2.148
<b>D3YVD9</b>	40S ribosomal protein S28 pseudogene	unbekannt	2.154
<b>P84099</b>	ribosomal protein L19	Zytoplasma	2.16
<b>O55135</b>	eukaryotic translation initiation factor 6	Zytoplasma	2.162
<b>E9PXE7</b>	ribosomal protein S11	Zytoplasma	2.162
<b>Q497E1</b>	ribosomal protein S23	Zytoplasma	2.162
<b>Q99MR6-1</b>	serrate RNA effector molecule homolog (Arabidopsis)	Nukleus	2.201
<b>P47911</b>	ribosomal protein L6	Zytoplasma	2.224
<b>P70698</b>	CTP synthase	Nukleus	2.239
<b>P35527</b>	keratin 9	Zytoplasma	2.265
<b>Q9Z0N1</b>	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa	Zytoplasma	2.285
<b>P80313</b>	chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	Zytoplasma	2.305
<b>Q80V08</b>	ribosomal protein L17	Zytoplasma	2.308
<b>P35980</b>	ribosomal protein L18	Zytoplasma	2.322
<b>Q8BG05-2</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Nukleus	2.327
<b>Q8C0C7</b>	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit	Zytoplasma	2.34
<b>Q9D6R2-1</b>	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	Zytoplasma	2.34
<b>Q9EPU0-1</b>	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)	Nukleus	2.398
<b>Q61937</b>	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	Nukleus	2.4

<b>P62918</b>	ribosomal protein L8	Zytoplasma	2.402
<b>O55234</b>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5	Zytoplasma	2.423
<b>P62307</b>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	Nukleus	2.433
<b>Q60715-1</b>	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	Zytoplasma	2.467
<b>E9QMB1</b>	nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide	Nukleus	2.472
<b>Q3UEB3-1</b>	poly-U binding splicing factor 60KDa	Nukleus	2.487
<b>P46061</b>	chondroadherin-like	Nukleus	2.491
<b>Q3UM23</b>	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	Zytoplasma	2.495
<b>A2AGT5-1</b>	cytoskeleton associated protein 5	Nukleus	2.516
<b>Q9Z2X1-1</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Nukleus	2.522
<b>Q8K003</b>	coiled-coil domain containing 72	unbekannt	2.592
<b>P59325</b>	eukaryotic translation initiation factor 5	Zytoplasma	2.606
<b>P63242</b>	eukaryotic translation initiation factor 5A	Zytoplasma	2.621
<b>Q9WUK2-1</b>	eukaryotic translation initiation factor 4H	Zytoplasma	2.65
<b>P63037</b>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	Nukleus	2.684
<b>P62849-1</b>	ribosomal protein S24	Zytoplasma	2.701
<b>Q9CX86</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	Nukleus	2.715
<b>O09131</b>	glutathione S-transferase omega 1	Zytoplasma	2.725
<b>P24547</b>	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2	Zytoplasma	2.782
<b>P62192</b>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1	Nukleus	2.79
<b>A0PJ96</b>	microtubule-associated protein 1B	Zytoplasma	2.795
<b>B9EHS6</b>	mannosidase, alpha, class 2A, member 1	Zytoplasma	2.811
<b>P09055</b>	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	Plasmamembran	2.857
<b>Q3UB15</b>	ribosomal protein L3	Zytoplasma	2.88
<b>P46471</b>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2	Nukleus	2.919
<b>E9PYU6</b>	baculoviral IAP repeat containing 6	Zytoplasma	2.931
<b>Q9EQU5-1</b>	SET nuclear oncogene	Nukleus	2.936
<b>P62911</b>	ribosomal protein L32	Zytoplasma	2.942
<b>Q8BNI6</b>	translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )	Zytoplasma	2.963
<b>Q9EPL8</b>	importin 7	Nukleus	2.992
<b>P43276</b>	histone cluster 1, H1b	Nukleus	3.017
<b>P15864</b>	histone cluster 1, H1c	Nukleus	3.045
<b>P97855</b>	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1	Nukleus	3.145



<b>P46935</b>	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	Zytoplasma	3.309
<b>Q8VHY0-1</b>	chondroitin sulfate proteoglycan 4	Plasmamembran	3.424
<b>Q99M08</b>	predicted gene 2036	unbekannt	3.441
<b>E9PW43</b>	Sec61 beta subunit pseudogene	unbekannt	3.512
<b>P43274</b>	histone cluster 1, H1e	Nukleus	3.554
<b>P47963</b>	ribosomal protein L13 pseudogene 12	Nukleus	3.563
<b>Q6P814</b>	PEST proteolytic signal containing nuclear protein	Nukleus	3.586
<b>P43275</b>	histone cluster 1, H1a	Nukleus	3.592
<b>P62196</b>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5	Nukleus	3.629
<b>E9PX78</b>	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	Zytoplasma	3.659
<b>A2ALM8</b>	B-cell receptor-associated protein 31	Zytoplasma	3.77
<b>Q9D7S7-1</b>	ribosomal protein L22-like 1	unbekannt	3.774
<b>Q8BH64</b>	EH-domain containing 2	Nukleus	3.785
<b>E9PWL3</b>	NHP2-like protein 1-like	unbekannt	3.928
<b>Q61699-1</b>	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	Zytoplasma	3.988
<b>Q9DAW9</b>	calponin 3, acidic	Zytoplasma	4.14
<b>E9PW66</b>	nucleosome assembly protein 1-like 1	Nukleus	4.483
<b>P63276</b>	ribosomal protein S17	Zytoplasma	4.485
<b>P97379-1</b>	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	Nukleus	4.667
<b>Q62351</b>	transferrin receptor (p90, CD71)	Plasmamembran	4.678
<b>Q9JKB3-1</b>	cold shock domain protein A	Nukleus	4.708
<b>P00405</b>	cytochrome c oxidase subunit II	Zytoplasma	4.719
<b>Q8R1F1</b>	family with sequence similarity 129, member B	unbekannt	4.727
<b>Q9CY58-1</b>	SERPINE1 mRNA binding protein 1	Nukleus	5.584
<b>P49817-1</b>	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	Plasmamembran	5.702
<b>P52293</b>	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	Nukleus	5.741
<b>P34955</b>	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Extrazellularraum	6.688
<b>P02769</b>	albumin	Extrazellularraum	8.714
<b>P97371</b>	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	Zytoplasma	9.865
<b>Q7TPV4</b>	MYB binding protein (P160) 1a	Nukleus	11.061
<b>Q9JIK5</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	Nukleus	12.577
<b>P12763</b>	alpha-2-HS-glycoprotein	Extrazellularraum	25.132

Tabelle 13: Signifikant veränderte Proteine in 14-3-3 Ak behandelten RGC5

SwissProt-ID	Gen Name	Lokalisation	Veränderte Expression
<b>P02666</b>	casein beta	Extrazellularraum	-83,858
<b>Q99LS3</b>	phosphoserine phosphatase	Zytoplasma	-16,839
<b>Q62426</b>	cystatin B (stefin B)	Zytoplasma	-13,045
<b>P20152</b>	vimentin	Zytoplasma	-10,474
<b>Q9QYR9</b>	acyl-CoA thioesterase 2	Zytoplasma	-9,456
<b>A2AEY2</b>	four and a half LIM domains 1	Zytoplasma	-8,708
<b>Q9R0P5</b>	destrin (actin depolymerizing factor)	Zytoplasma	-8,045
<b>Q9CR86</b>	calcium regulated heat stable protein 1. 24kDa	Zytoplasma	-7,904
<b>P09671</b>	superoxide dismutase 2. Mitochondrial	Zytoplasma	-6,646
<b>P08074</b>	carbonyl reductase 2	Zytoplasma	-5,71
<b>Q3TTN3</b>	voltage-dependent anion channel 3	Zytoplasma	-5,561
<b>P62715</b>	protein phosphatase 2. catalytic subunit. beta isozyme	Zytoplasma	-5,096
<b>Q3SX09</b>	hemoglobin. Beta	Zytoplasma	-4,944
<b>Q3TW96-1</b>	UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1-like 1	unbekannt	-4,917
<b>Q3TN39</b>	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport). member 2	Plasmamembran	-4,916
<b>Q8VDN2</b>	ATPase. Na+/K+ transporting. alpha 1 polypeptide	Plasmamembran	-4,782
<b>P31786</b>	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator. acyl-CoA binding protein)	Zytoplasma	-4,674
<b>Q05920</b>	pyruvate carboxylase	Zytoplasma	-4,649
<b>P50543</b>	S100 calcium binding protein A11	Zytoplasma	-4,58
<b>Q62465</b>	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)	Plasmamembran	-4,529
<b>O08807</b>	peroxiredoxin 4	Zytoplasma	-4,395
<b>P08113</b>	heat shock protein 90kDa beta (Grp94). member 1	Zytoplasma	-4,392
<b>Q564P4</b>	adenine phosphoribosyltransferase	Zytoplasma	-4,356
<b>E9Q9H9</b>	peroxiredoxin 5	Zytoplasma	-4,31
<b>P13020-1</b>	Gelsolin	Extrazellularraum	-4,297
<b>P02769</b>	Albumin	Extrazellularraum	-4,296
<b>Q9R1P3</b>	proteasome (prosome. macropain) subunit. beta type. 2	Zytoplasma	-4,133
<b>P34955</b>	serpin peptidase inhibitor. clade A (alpha-1 antiproteinase. antitrypsin). member 1	Extrazellularraum	-4,122
<b>P35279-1</b>	RAB6A. member RAS oncogene family	Zytoplasma	-3,992
<b>Q07813</b>	BCL2-associated X protein	Zytoplasma	-3,99
<b>E0CXH5</b>	triosephosphate isomerase 1	Zytoplasma	-3,981
<b>P40142</b>	Transketolase	Zytoplasma	-3,939
<b>P23492</b>	purine nucleoside phosphorylase	Nukleus	-3,935

<b>Q9CVB6</b>	actin related protein 2/3 complex. subunit 2. 34kDa	Zytoplasma	-3,879
<b>B1ATE2</b>	ring finger protein 213	Plasmamembran	-3,876
<b>P41731</b>	CD63 molecule	Plasmamembran	-3,847
<b>P20029</b>	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein. 78kDa)	Zytoplasma	-3,828
<b>Q8VCW8</b>	acyl-CoA synthetase family member 2	Zytoplasma	-3,691
<b>Q9CQI6</b>	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	Zytoplasma	-3,68
<b>Q9D892</b>	inosine triphosphatase (nucleoside triphosphate pyrophosphatase)	Zytoplasma	-3,644
<b>Q922Q8</b>	leucine rich repeat containing 59	Zytoplasma	-3,511
<b>O88844</b>	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+). soluble	Zytoplasma	-3,497
<b>Q3V2H3</b>	sorting nexin 12	unbekannt	-3,495
<b>P68037</b>	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	Zytoplasma	-3,476
<b>P70202</b>	Latexin	Zytoplasma	-3,46
<b>P62075</b>	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	Zytoplasma	-3,456
<b>Q8BP47</b>	asparaginyl-tRNA synthetase	Zytoplasma	-3,435
<b>E9QLV8</b>	aldehyde dehydrogenase 1 family. member L2	Zytoplasma	-3,414
<b>P84078</b>	ADP-ribosylation factor 1	Zytoplasma	-3,369
<b>E9Q120</b>	lon peptidase 1. Mitochondrial	Zytoplasma	-3,361
<b>P16110</b>	lectin. galactoside-binding. soluble. 3	Extrazellularraum	-3,334
<b>Q9JJU8</b>	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like	Zytoplasma	-3,32
<b>Q05816</b>	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	Zytoplasma	-3,258
<b>Q9D1D4-1</b>	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	Zytoplasma	-3,162
<b>Q9QXS1-13</b>	Plectin	Zytoplasma	-3,145
<b>P48678-1</b>	lamin A/C	Nukleus	-3,134
<b>Q9CZD3</b>	glycyl-tRNA synthetase	Zytoplasma	-3,118
<b>Q3UMP2</b>	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA lyase	Zytoplasma	-3,11
<b>A8C1V1</b>	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	Extrazellularraum	-3,109
<b>P59999</b>	actin related protein 2/3 complex. subunit 4. 20kDa	unbekannt	-3,09
<b>Q9QYB1</b>	chloride intracellular channel 4	Plasmamembran	-3,062
<b>Q8BH95</b>	enoyl CoA hydratase. short chain. 1. Mitochondrial	Zytoplasma	-2,979
<b>Q920E5</b>	farnesyl diphosphate synthase	Zytoplasma	-2,969
<b>P70296</b>	phosphatidylethanolamine binding protein 1	Zytoplasma	-2,931
<b>Q9DCN2-1</b>	cytochrome b5 reductase 3	Zytoplasma	-2,909
<b>P29391</b>	ferritin. light polypeptide	Zytoplasma	-2,872
<b>Q9DBP5</b>	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1. Cytosolic	Nukleus	-2,785

<b>P11276</b>	fibronectin 1	Extrazellularraum	-2,751
<b>A6ZI44</b>	aldolase A. fructose-bisphosphate	Zytoplasma	-2,749
<b>Q61792</b>	LIM and SH3 protein 1	Zytoplasma	-2,74
<b>Q9DAS9</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein). gamma 12	Plasmamembran	-2,712
<b>P07091</b>	S100 calcium binding protein A4	Zytoplasma	-2,712
<b>Q3TFB5</b>	N-acetylneuraminic acid synthase	Zytoplasma	-2,69
<b>P17742</b>	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Zytoplasma	-2,69
<b>P62880</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein). beta polypeptide 2	Plasmamembran	-2,686
<b>P34884</b>	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Extrazellularraum	-2,686
<b>Q7TQI3</b>	OTU domain. ubiquitin aldehyde binding 1	unbekannt	-2,679
<b>Q9CZU6</b>	citrate synthase	Zytoplasma	-2,615
<b>O70492</b>	sorting nexin 3	Zytoplasma	-2,613
<b>Q3UG45</b>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter. y+ system). member 5	Plasmamembran	-2,612
<b>Q8R111</b>	ubiquinol-cytochrome c reductase. complex III subunit X	Zytoplasma	-2,59
<b>Q9CPT4</b>	chromosome 19 open reading frame 10	Extrazellularraum	-2,589
<b>Q9R0P3</b>	esterase D	Zytoplasma	-2,589
<b>Q9DBG9</b>	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3	Nukleus	-2,579
<b>Q9JII6</b>	aldo-keto reductase family 1. member A1 (aldehyde reductase)	Zytoplasma	-2,578
<b>Q9CQA3</b>	succinate dehydrogenase complex. subunit B. iron sulfur (Ip)	Zytoplasma	-2,569
<b>Q9JIG8</b>	PRA1 domain family. member 2	unbekannt	-2,564
<b>Q9D358-1</b>	acid phosphatase 1. Soluble	Zytoplasma	-2,559
<b>P45878</b>	FK506 binding protein 2. 13kDa	Zytoplasma	-2,556
<b>Q8K1M6-1</b>	dynamamin 1-like	Zytoplasma	-2,536
<b>P12382</b>	phosphofruktokinase. Liver	Zytoplasma	-2,533
<b>P14152</b>	malate dehydrogenase 1. NAD (soluble)	Zytoplasma	-2,515
<b>P00375</b>	dihydrofolate reductase	unbekannt	-2,494
<b>Q3UKW2</b>	calmodulin 1	Nukleus	-2,473
<b>P97869</b>	epoxide hydrolase 1. microsomal (xenobiotic)	Zytoplasma	-2,46
<b>Q3UCL0</b>	annexin A4	Plasmamembran	-2,442
<b>E9QP98</b>	serpin peptidase inhibitor. clade B (ovalbumin). member 6	Zytoplasma	-2,437
<b>O35215</b>	D-dopachrome tautomerase	Zytoplasma	-2,436
<b>P16858</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Plasmamembran	-2,435
<b>Q9Z2U1</b>	proteasome (prosome. macropain) subunit. alpha type. 5	Zytoplasma	-2,434
<b>P62245</b>	ribosomal protein S15a	Zytoplasma	-2,427
<b>P42208</b>	septin 2	Zytoplasma	-2,423

<b>Q3TFD0</b>	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	Zytoplasma	-2,403
<b>Q8C2Q7</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	Nukleus	-2,388
<b>Q99LX0</b>	Parkinson disease (autosomal recessive. early onset) 7	Nukleus	-2,386
<b>P11031</b>	SUB1 homolog (S. cerevisiae)	Nukleus	-2,385
<b>P68372</b>	tubulin. beta 2C	Zytoplasma	-2,381
<b>O55023</b>	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	Zytoplasma	-2,374
<b>P19096</b>	fatty acid synthase	Zytoplasma	-2,352
<b>P68369</b>	tubulin. alpha 1a	Zytoplasma	-2,345
<b>P24452</b>	capping protein (actin filament). gelsolin-like	Nukleus	-2,336
<b>Q9CPQ1</b>	cytochrome c oxidase subunit Vic	Zytoplasma	-2,328
<b>Q99PT1</b>	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	Zytoplasma	-2,32
<b>P10711-1</b>	transcription elongation factor A (SII). 1	Nukleus	-2,298
<b>P08249</b>	malate dehydrogenase 2. NAD (mitochondrial)	Zytoplasma	-2,297
<b>Q60930</b>	voltage-dependent anion channel 2	Zytoplasma	-2,288
<b>Q99K85</b>	phosphoserine aminotransferase 1	Zytoplasma	-2,287
<b>Q9CQW2</b>	ADP-ribosylation factor-like 8B	Plasmamembran	-2,283
<b>Q3TWN8</b>	aldehyde dehydrogenase 18 family. member A1	Zytoplasma	-2,282
<b>P17710-1</b>	hexokinase 1	Zytoplasma	-2,28
<b>P05201</b>	glutamic-oxaloacetic transaminase 1. soluble (aspartate aminotransferase 1)	Zytoplasma	-2,266
<b>O08553</b>	dihydropyrimidinase-like 2	Zytoplasma	-2,263
<b>P08003</b>	protein disulfide isomerase family A. member 4	Zytoplasma	-2,262
<b>D4AFX7</b>	DnaJ (Hsp40) homolog. subfamily C. member 13	unbekannt	-2,248
<b>P00405</b>	cytochrome c oxidase subunit II	Zytoplasma	-2,245
<b>P97372</b>	proteasome (prosome. macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	Zytoplasma	-2,234
<b>Q60932-1</b>	voltage-dependent anion channel 1	Zytoplasma	-2,229
<b>Q9DCT8</b>	cysteine-rich protein 2	Plasmamembran	-2,224
<b>Q8QZY1</b>	eukaryotic translation initiation factor 3. subunit L	Zytoplasma	-2,206
<b>P47754</b>	capping protein (actin filament) muscle Z-line. alpha 2	Zytoplasma	-2,183
<b>Q07076</b>	annexin A7	Plasmamembran	-2,182
<b>Q9CQ92</b>	fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (S. cerevisiae)	Zytoplasma	-2,174
<b>Q61598-1</b>	GDP dissociation inhibitor 2	Zytoplasma	-2,16
<b>Q8R013</b>	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1. methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase. formyltetrahydrofolate synthetase	Zytoplasma	-2,157
<b>Q3UM23</b>	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	Zytoplasma	-2,157

<b>P08207</b>	S100 calcium binding protein A10	Zytoplasma	-2,154
<b>Q9D6F7</b>	signal sequence receptor. delta (translocon-associated protein delta)	Zytoplasma	-2,154
<b>P60710</b>	actin. Beta	Zytoplasma	-2,149
<b>O08583-1</b>	THO complex 4	Nukleus	-2,144
<b>P14211</b>	Calreticulin	Zytoplasma	-2,138
<b>Q62261-1</b>	spectrin. beta. non-erythrocytic 1	Plasmamembran	-2,136
<b>Q9CR51</b>	ATPase. H+ transporting. lysosomal 13kDa. V1 subunit G1	Zytoplasma	-2,129
<b>P28352</b>	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	Nukleus	-2,104
<b>P16045</b>	lectin. galactoside-binding. soluble. 1	Extrazellularraum	-2,067
<b>Q6PGH2</b>	hematological and neurological expressed 1-like	Zytoplasma	-2,065
<b>Q61425</b>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Zytoplasma	-2,06
<b>O89086</b>	RNA binding motif (RNP1. RRM) protein 3	Nukleus	-2,059
<b>E9Q7Q3</b>	tropomyosin 3	Zytoplasma	-2,032
<b>Q9DBJ1</b>	phosphoglycerate mutase 1 (brain)	Zytoplasma	-2,026
<b>Q922R8</b>	protein disulfide isomerase family A. member 6	Zytoplasma	-2,019
<b>Q9ERK4</b>	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	Nukleus	-2,018
<b>P08228</b>	superoxide dismutase 1. Soluble	Zytoplasma	-2,014
<b>Q8BH04</b>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	Zytoplasma	-2,012
<b>P68040</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein). beta polypeptide 2-like 1	Zytoplasma	-2,006
<b>P80313</b>	chaperonin containing TCP1. subunit 7 (eta)	Zytoplasma	2,009
<b>Q3UEB3-1</b>	poly-U binding splicing factor 60kDa	Nukleus	2,021
<b>B2RWW6</b>	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)	Zytoplasma	2,024
<b>E9PWH9</b>	ribosomal protein L15	Zytoplasma	2,024
<b>Q9Z1N5</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39B	Nukleus	2,04
<b>P14069</b>	S100 calcium binding protein A6	Zytoplasma	2,062
<b>B8JL8</b>	programmed cell death 6 interacting protein	Zytoplasma	2,071
<b>E9PYU6</b>	baculoviral IAP repeat containing 6	Zytoplasma	2,111
<b>P32067</b>	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	Nukleus	2,131
<b>E9Q6R7</b>	Utrophin	Plasmamembran	2,155
<b>Q9CQR2</b>	ribosomal protein S21	Zytoplasma	2,164
<b>Q61205</b>	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b. catalytic subunit 3 (29kDa)	Zytoplasma	2,18
<b>Q921F2</b>	TAR DNA binding protein	Nukleus	2,19
<b>Q9WUK2-1</b>	eukaryotic translation initiation factor 4H	Zytoplasma	2,198

<b>O70251</b>	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	Zytoplasma	2,245
<b>A0PJ96</b>	microtubule-associated protein 1B	Zytoplasma	2,259
<b>A2AGT5-1</b>	cytoskeleton associated protein 5	Nukleus	2,28
<b>Q6ZVV7</b>	ribosomal protein L35	Zytoplasma	2,287
<b>Q61990-1</b>	poly(rC) binding protein 2	Nukleus	2,299
<b>Q8VDM4</b>	proteasome (prosome. macropain) 26S subunit. non-ATPase. 2	Zytoplasma	2,311
<b>Q9EPU0-1</b>	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)	Nukleus	2,354
<b>Q8BNI6</b>	translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A (S. cerevisiae)	Zytoplasma	2,386
<b>P48024</b>	eukaryotic translation initiation factor 1	Zytoplasma	2,392
<b>Q8VIJ6</b>	splicing factor proline/glutamine-rich	Nukleus	2,461
<b>Q6ZWY8</b>	thymosin beta 4. X-linked	Zytoplasma	2,461
<b>Q9D883</b>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	Nukleus	2,502
<b>Q80V08</b>	ribosomal protein L17	Zytoplasma	2,531
<b>E9PXE7</b>	ribosomal protein S11	Zytoplasma	2,536
<b>Q9Z2X1-1</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Nukleus	2,608
<b>P46935</b>	neural precursor cell expressed. developmentally down-regulated 4	Zytoplasma	2,635
<b>O55135</b>	eukaryotic translation initiation factor 6	Zytoplasma	2,64
<b>P63037</b>	DnaJ (Hsp40) homolog. subfamily A. member 1	Nukleus	2,71
<b>Q8VHY0-1</b>	chondroitin sulfate proteoglycan 4	Plasmamembran	2,717
<b>P47963</b>	ribosomal protein L13 pseudogene 12	Nukleus	2,722
<b>D3Z3G6</b>	mitogen-activated protein kinase 3	Zytoplasma	2,723
<b>Q6P8I4</b>	PEST proteolytic signal containing nuclear protein	Nukleus	2,737
<b>E9QK49</b>	G1 to S phase transition 1	Zytoplasma	2,822
<b>O54734</b>	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	Zytoplasma	2,877
<b>P62305</b>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E pseudogene	Nukleus	2,961
<b>Q61937</b>	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23. numatrin)	Nukleus	2,995
<b>Q9EPL8</b>	importin 7	Nukleus	3,016
<b>P09055</b>	integrin. beta 1 (fibronectin receptor. beta polypeptide. antigen CD29 includes MDF2. MSK12)	Plasmamembran	3,036
<b>P97855</b>	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1	Nukleus	3,066
<b>Q9WTQ5-1</b>	A kinase (PRKA) anchor protein 12	Zytoplasma	3,109
<b>Q9JKB3-1</b>	cold shock domain protein A	Nukleus	3,278
<b>Q99M08</b>	predicted gene 2036	unbekannt	3,297
<b>P43276</b>	histone cluster 1. H1b	Nukleus	3,344

<b>B9EHS6</b>	mannosidase. alpha. class 2A. member 1	Zytoplasma	3,348
<b>Q61699-1</b>	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	Zytoplasma	3,435
<b>Q9D0B6-1</b>	chromosome X open reading frame 26	unbekannt	3,446
<b>P97379-1</b>	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	Nukleus	3,53
<b>P63276</b>	ribosomal protein S17	Zytoplasma	3,532
<b>P35527</b>	keratin 9	Zytoplasma	3,62
<b>P15864</b>	histone cluster 1. H1c	Nukleus	4,048
<b>E9PW66</b>	nucleosome assembly protein 1-like 1	Nukleus	4,155
<b>P43274</b>	histone cluster 1. H1e	Nukleus	4,185
<b>O54724</b>	polymerase I and transcript release factor	Nukleus	4,269
<b>P46471</b>	proteasome (prosome. macropain) 26S subunit. ATPase. 2	Nukleus	4,294
<b>P43275</b>	histone cluster 1. H1a	Nukleus	4,428
<b>Q9CY58-1</b>	SERPINE1 mRNA binding protein 1	Nukleus	4,43
<b>P61290</b>	proteasome (prosome. macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	Zytoplasma	4,75
<b>Q62351</b>	transferrin receptor (p90. CD71)	Plasmamembran	4,789
<b>Q60865</b>	cell cycle associated protein 1	Plasmamembran	4,997
<b>Q8BH64</b>	EH-domain containing 2	Nukleus	5,281
<b>Q99LP6</b>	GrpE-like 1. mitochondrial (E. coli)	Zytoplasma	5,42
<b>Q9DAW9</b>	calponin 3. Acidic	Zytoplasma	6,006
<b>Q7TPV4</b>	MYB binding protein (P160) 1a	Nukleus	6,067
<b>P52293</b>	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1. importin alpha 1)	Nukleus	6,169
<b>P49817-1</b>	caveolin 1. caveolae protein. 22kDa	Plasmamembran	8,403
<b>Q9JIK5</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	Nukleus	17,764
<b>P08071</b>	Lactotransferrin	Extrazellularraum	19,498

**Tabelle 14: Signifikant veränderte Proteine in GFAP Ak behandelten RGC5**

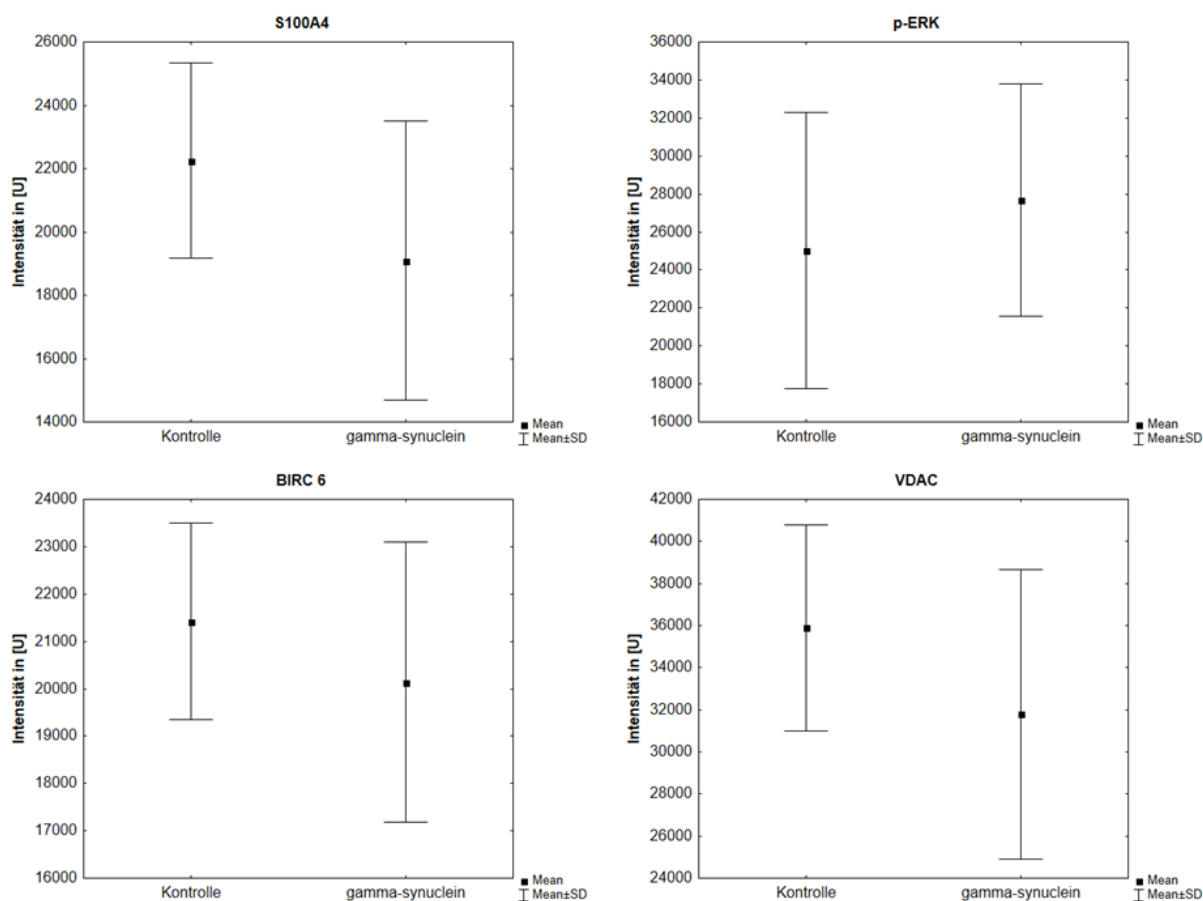
SwissProt -ID	Gen Name	Lokalisation	Veränderte Expression
<b>Q6P542</b>	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	Zytoplasma	2.123
<b>P60710</b>	actin, beta	Zytoplasma	2.036
<b>P61161</b>	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	Plasmamembran	-2.285
<b>A0JLR7</b>	AHNAK nucleoprotein	Nukleus	-2.731
<b>O08583-1</b>	Aly/REF export factor	Nukleus	2.323
<b>Q9EST5-2</b>	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B	Nukleus	-2.503
<b>P97429</b>	annexin A4	Plasmamembran	-2.009
<b>Q564P4</b>	adenine phosphoribosyltransferase	Zytoplasma	2.658
<b>P56480</b>	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	Zytoplasma	2.527
<b>Q64152-1</b>	basic transcription factor 3	Nukleus	-2.834
<b>P14211</b>	Calreticulin	Zytoplasma	3.592



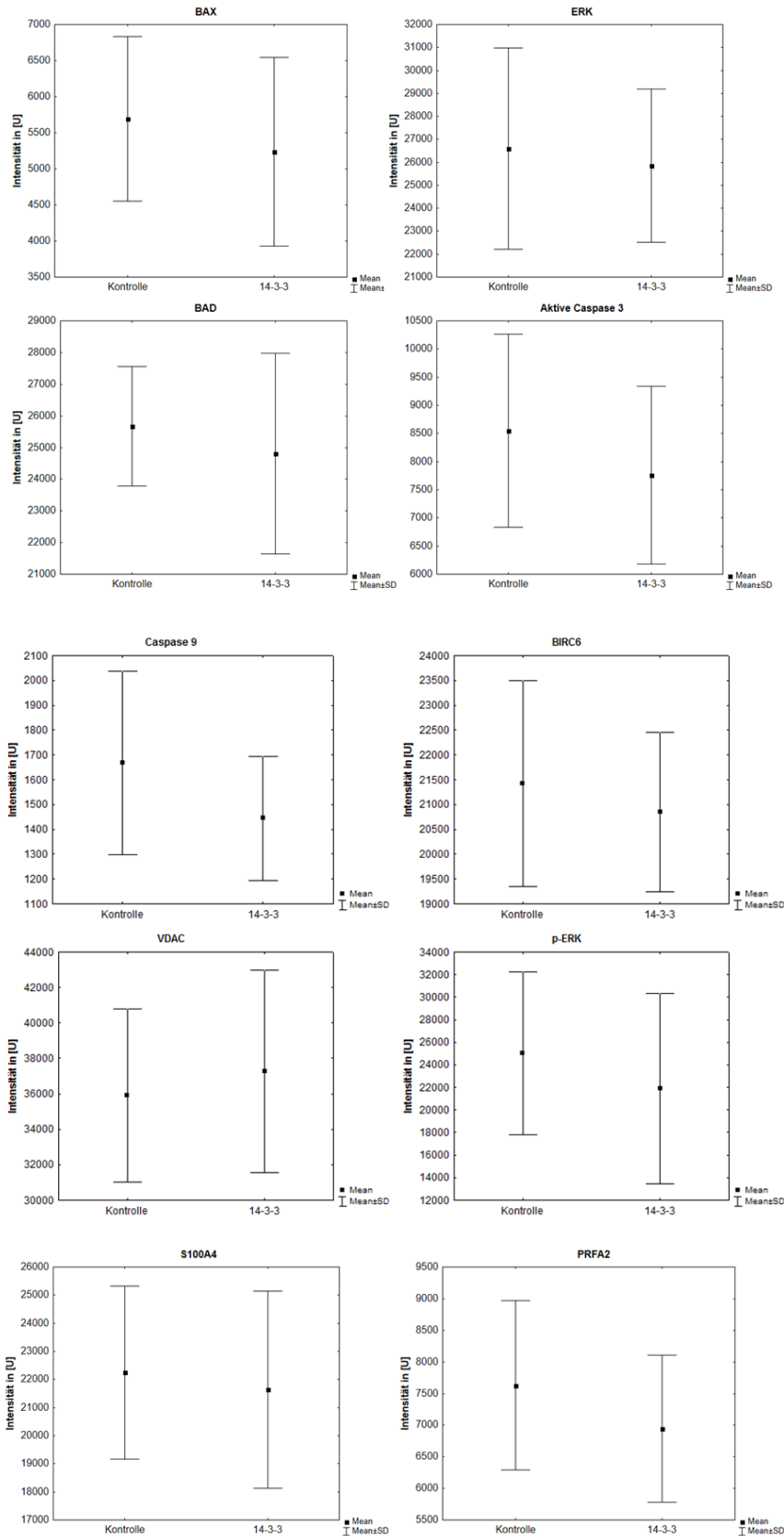
<b>P18760</b>	cofilin 1 (non-muscle)	Nukleus	-3.735
<b>Q9QYB1</b>	chloride intracellular channel 4	Plasmamembran	3.913
<b>Q9JIF7</b>	coatomer protein complex, subunit beta 1	Zytoplasma	-2.344
<b>Q9ERK4</b>	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	Nukleus	-2.557
<b>Q9JIK5</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 21	Nukleus	4.379
<b>Q9Z1N5</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39B	Nukleus	2.200
<b>O08749</b>	dihydrolipoamide dehydrogenase	Zytoplasma	2.366
<b>P42125</b>	enoyl-CoA delta isomerase 1	Zytoplasma	-2.630
<b>O70251</b>	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	Zytoplasma	-3.825
<b>Q9WVK4</b>	EH-domain containing 1	Zytoplasma	-2.000
<b>E9PX78</b>	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	Zytoplasma	-2.102
<b>Q9WUK2-1</b>	eukaryotic translation initiation factor 4H	Zytoplasma	-2.306
<b>Q8R1F1</b>	family with sequence similarity 129, member B	Zytoplasma	-2.629
<b>P19096</b>	fatty acid synthase	Zytoplasma	2.072
<b>A2A410</b>	FK506 binding protein 10, 65 kDa	Zytoplasma	-4.564
<b>Q61553</b>	fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	Zytoplasma	2.180
<b>Q9CZD3</b>	glycyl-tRNA synthetase	Zytoplasma	-4.386
<b>E9PZB3</b>	predicted gene 5093	unbekannt	4.318
<b>D3YYQ0</b>	predicted gene 5451	Zytoplasma	2.136
<b>E9Q1E3</b>	predicted pseudogene 9234	unbekannt	-113.015
<b>P68040</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	Zytoplasma	-2.059
<b>O09131</b>	glutathione S-transferase omega 1	Zytoplasma	-2.810
<b>P27661</b>	H2A histone family, member X	Nukleus	6.114
<b>P43275</b>	histone cluster 1, H1a	Nukleus	7.426
<b>P15864</b>	histone cluster 1, H1c	Nukleus	12.994
<b>Q8CGP2-2</b>	histone cluster 1, H2bd	Nukleus	10.053
<b>O88569-1</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	Nukleus	2.747
<b>Q8BG05-1</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Nukleus	4.365
<b>P61979-1</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Nukleus	2.472
<b>Q8VEK3</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	Nukleus	7.256
<b>Q9CXY6</b>	interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa	Nukleus	5.930
<b>Q8BKC5-1</b>	importin 5	Nukleus	-2.087
<b>P04264</b>	keratin 1	Zytoplasma	3.556
<b>P13645</b>	keratin 10	Zytoplasma	9.202
<b>P35908</b>	keratin 2	Zytoplasma	47.829
<b>P35527</b>	keratin 9	Zytoplasma	2.348
<b>Q9CPY7-1</b>	leucine aminopeptidase 3	Zytoplasma	2.337
<b>P16045</b>	lectin, galactoside-binding, soluble, 1	Extrazellularräum	-3.689

<b>P97311</b>	minichromosome maintenance complex component 6	Nukleus	-4.436
<b>Q3UH59</b>	myosin, heavy chain 10, non-muscle	Zytoplasma	2.487
<b>Q8VDD5</b>	myosin, heavy chain 9, non-muscle	Zytoplasma	2.578
<b>Q60605-2</b>	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	Zytoplasma	-6.279
<b>Q3TFB5</b>	N-acetylneuraminic acid synthase	Zytoplasma	2.136
<b>E9PZF0</b>	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in	Nukleus	-4.331
<b>Q61937</b>	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	Nukleus	2.045
<b>P62962</b>	profilin 1	Zytoplasma	-4.399
<b>O35129</b>	prohibitin 2	Zytoplasma	-2.083
<b>Q61753</b>	phosphoglycerate dehydrogenase	Zytoplasma	3.171
<b>Q9QXS1-2</b>	Plectin	Zytoplasma	3.474
<b>Q9DBG5</b>	perilipin 3	Zytoplasma	-2.293
<b>P49722</b>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	Zytoplasma	2.315
<b>P62334</b>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	Nukleus	-3.254
<b>Q8VDM4</b>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2	Zytoplasma	-2.080
<b>Q3U5I2</b>	polypyrimidine tract binding protein 1	Nukleus	3.459
<b>O54724</b>	polymerase I and transcript release factor	Nukleus	2.657
<b>P46638</b>	RAB11B, member RAS oncogene family	Zytoplasma	4.083
<b>Q91V41</b>	RAB14, member RAS oncogene family	Zytoplasma	-2.236
<b>P62827</b>	RAN, member RAS oncogene family	Nukleus	2.190
<b>P19253</b>	ribosomal protein L13a	Zytoplasma	3.191
<b>P35980</b>	ribosomal protein L18	Zytoplasma	2.641
<b>P62830</b>	ribosomal protein L23	Zytoplasma	-4.525
<b>P62900</b>	ribosomal protein L31	Zytoplasma	-2.103
<b>P47911</b>	ribosomal protein L6	Zytoplasma	2.134
<b>P99027</b>	ribosomal protein, large, P2	Zytoplasma	-2.129
<b>P63323</b>	ribosomal protein S12	Zytoplasma	-14.452
<b>P62301</b>	ribosomal protein S13	Nukleus	3.143
<b>P14131</b>	ribosomal protein S16	Zytoplasma	-3.388
<b>P62852</b>	ribosomal protein S25	Zytoplasma	-5.906
<b>P62855</b>	ribosomal protein S26	Zytoplasma	-9.823
<b>Q6ZWN5</b>	ribosomal protein S9	Zytoplasma	-2.189
<b>P42208</b>	septin 2	Zytoplasma	-4.613
<b>P34955</b>	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Extrazellularraum	-2.168
<b>Q8VEM8</b>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3	Zytoplasma	2.188
<b>Q78PY7</b>	staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1	Nukleus	2.152
<b>A3KGU9</b>	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	Plasmamembran	2.168
<b>Q62261-1</b>	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	Plasmamembran	3.072
<b>Q920B9</b>	suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)	Nukleus	2.733
<b>Q921F2</b>	TAR DNA binding protein	Nukleus	4.806
<b>A2AIM8</b>	talin 1	Plasmamembran	2.157

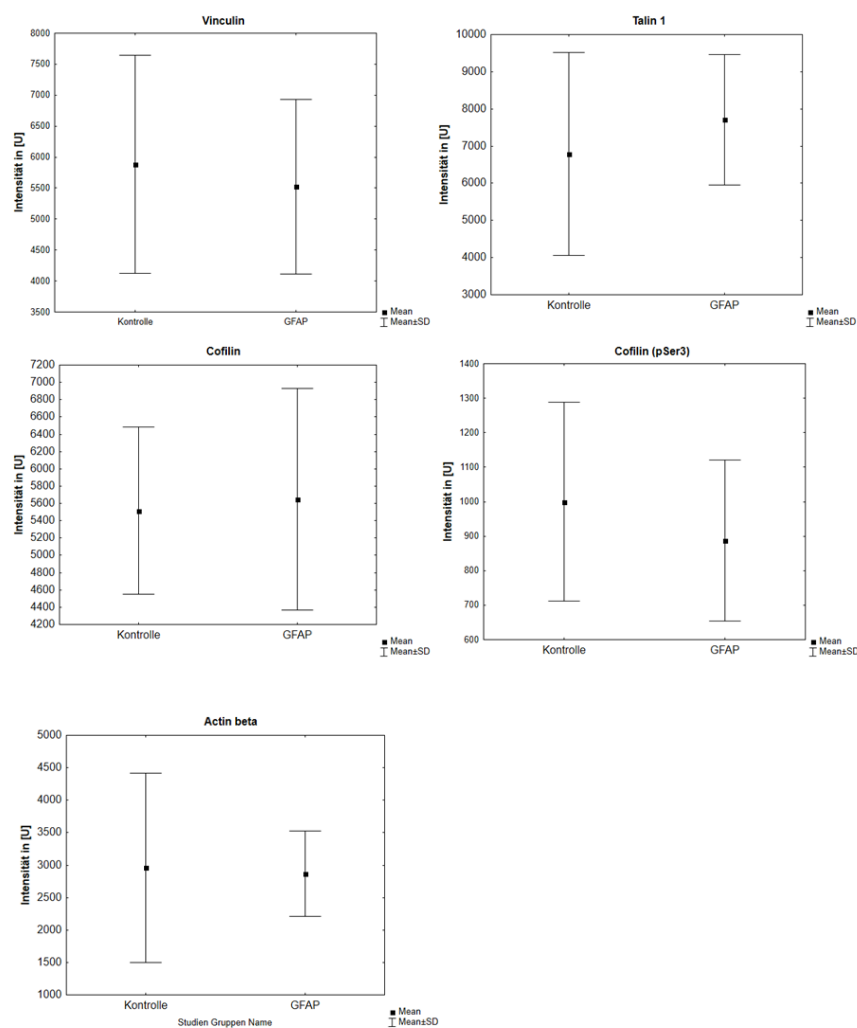
<b>Q61029-1</b>	Thymopoietin	Nukleus	5.527
<b>P02340</b>	tumor protein p53	Nukleus	2.428
<b>Q6NV83-2</b>	U2 snRNP-associated SURP domain containing	Nukleus	-2.755
<b>Q9CZ13</b>	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	Zytoplasma	-3.634
<b>Q64727</b>	Vinculin	Plasmamembran	2.187
<b>Q60932-1</b>	voltage-dependent anion channel 1	Zytoplasma	2.434
<b>P20152</b>	Vimentin	Zytoplasma	844.379
<b>Q80ZI9</b>	WD repeat domain 1	Extrazellularräum	2.550
<b>Q6P5F9</b>	exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	Nukleus	-6.232
<b>P68254-1</b>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	Zytoplasma	2.270



**Abbildung 32: Validierung des Effektes von  $\gamma$ -synuclein Ak auf mitochondriale apoptotische Signalwege mittels Microarray**



**Abbildung 33: Validierung des Effektes von 14-3-3 Ak auf mitochondriale apoptotische Signalwege mittels Microarray**



**Abbildung 34: Validierung des Effektes von GFAP Ak auf Proteine des Aktin Zytoskeletts mittels Microarray.**

**Tabelle 15: Signifikant veränderte Proteine in 14-3-3 Ak behandelten Retinaexplantaten**

Swiss prot ID	Gen Name	Lokalisation	Veränderte Expression
<b>Q562R1</b>	actin, beta-like 2	Nukleus	2,022
<b>Q3ZC07</b>	actin, alpha, cardiac muscle 1	Zytoplasma	2,142
<b>Q719I0</b>	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)	Other	-8,804
<b>P02768</b>	Albumin	Extrazellularraum	-3,2
<b>P05062</b>	aldolase B, fructose-bisphosphate	Zytoplasma	2,103
<b>P09972</b>	aldolase C, fructose-bisphosphate	Zytoplasma	2,001
<b>P08758</b>	annexin A5	Plasmamembran	-2,774
<b>Q8WZ64</b>	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2	Zytoplasma	-3,676
<b>P36575</b>	arrestin 3, retinal (X-arrestin)	Zytoplasma	-2,046
<b>P49407</b>	arrestin, beta 1	Zytoplasma	-2,046
<b>P32121</b>	arrestin, beta 2	Zytoplasma	-2,176

<b>P36543</b>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1	Zytoplasma	2,938
<b>Q9P281</b>	BAH domain and coiled-coil containing 1	Other	-3,544
<b>Q8N0U7</b>	chromosome 1 open reading frame 87	Extrazellularraum	-2,528
<b>Q68DN1</b>	chromosome 2 open reading frame 16	Other	-2,731
<b>P22676</b>	calbindin 2	Zytoplasma	2,011
<b>Q6IMN6</b>	caprin family member 2	Zytoplasma	-2,799
<b>Q8IYE0</b>	coiled-coil domain containing 146	Other	-2,15
<b>Q0P6D6</b>	coiled-coil domain containing 15	Zytoplasma	-2,27
<b>P49454</b>	centromere protein F, 350/400kDa	Nukleus	-2,65
<b>P12277</b>	creatine kinase, brain	Zytoplasma	2,364
<b>P07339</b>	cathepsin D	Zytoplasma	-2,092
<b>Q93034</b>	cullin 5	Nukleus	11,888
<b>Q6NSI4</b>	chromosome X open reading frame 57	Other	2,07
<b>Q9H7D0</b>	dedicator of cytokinesis 5	Zytoplasma	-2,893
<b>Q14126</b>	desmoglein 2	Plasmamembran	2,45
<b>P24534</b>	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	Zytoplasma	-3,957
<b>Q5THR3</b>	EF-hand calcium binding domain 6	Other	2,516
<b>P09104</b>	enolase 2 (gamma, neuronal)	Zytoplasma	-2,479
<b>P13929</b>	enolase 3 (beta, muscle)	Zytoplasma	-2,082
<b>Q92817</b>	Envoplakin	Plasmamembran	-2,061
<b>O94988</b>	family with sequence similarity 13, member A	Other	2,029
<b>Q7L8L6</b>	FAST kinase domains 5	Zytoplasma	-3,042
<b>Q9NYQ8</b>	FAT atypical cadherin 2	Plasmamembran	-2,179
<b>P07954</b>	fumarate hydratase	Zytoplasma	-3,236
<b>P14136</b>	glial fibrillary acidic protein	Zytoplasma	2,297
<b>Q9NZ52</b>	golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 3	Zytoplasma	2,126
<b>P15104</b>	glutamate-ammonia ligase	Zytoplasma	3,574
<b>B2RSH2</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	Plasmamembran	-2,497
<b>P11488</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 1	Plasmamembran	2,821
<b>P68871</b>	hemoglobin, beta	Zytoplasma	15,226
<b>P30519</b>	heme oxygenase (decycling) 2	Zytoplasma	2,22
<b>P34931</b>	heat shock 70kDa protein 1-like	Zytoplasma	-2,936
<b>P54652</b>	heat shock 70kDa protein 2	Zytoplasma	-2,307
<b>P17066</b>	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	Nukleus	-2,457
<b>P10809</b>	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	Zytoplasma	-3,556
<b>P61603</b>	heat shock 10kDa protein 1	Zytoplasma	3,112
<b>P09382</b>	lectin, galactoside-binding, soluble, 1	Extrazellularraum	2,065
<b>Q8WWI1</b>	LIM domain 7	Zytoplasma	-12,313
<b>P42704</b>	leucine-rich pentatricopeptide repeat containing	Zytoplasma	-2,343
<b>P46821</b>	microtubule-associated protein 1B	Zytoplasma	-2,067
<b>Q16798</b>	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	Zytoplasma	-5,986
<b>O95568</b>	methyltransferase like 18	Other	-3,53

<b>P42345</b>	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	Nukleus	-2,702
<b>Q9Y2K3</b>	myosin, heavy chain 15	Extrazellularraum	-4,187
<b>O75489</b>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	Zytoplasma	-2,163
<b>P46934</b>	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4, E3 ubiquitin protein ligase	Zytoplasma	-2,191
<b>P19838</b>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	Nukleus	-4,207
<b>P29728</b>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	Zytoplasma	-2,76
<b>Q9ULC6</b>	peptidyl arginine deiminase, type I	Zytoplasma	2,132
<b>Q9H792</b>	pseudopodium-enriched atypical kinase 1	Plasmamembran	-2,232
<b>P15259</b>	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)	Zytoplasma	2,179
<b>Q8WXW3</b>	progesterone immunomodulatory binding factor 1	Nukleus	-2,153
<b>Q9BYX7</b>	POTE ankyrin domain family, member K, pseudogene	Other	2,342
<b>O14818</b>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	Zytoplasma	-4,838
<b>P62492</b>	RAB11A, member RAS oncogene family	Zytoplasma	-2,715
<b>P62835</b>	RAP1A, member of RAS oncogene family	Zytoplasma	-4,248
<b>P35243</b>	Recoverin	Zytoplasma	-2,261
<b>Q92963</b>	Ras-like without CAAX 1	Plasmamembran	-11,034
<b>Q9P2E9</b>	ribosome binding protein 1	Zytoplasma	-2,117
<b>Q9NQC3</b>	reticulon 4	Zytoplasma	-5,885
<b>Q86VV8</b>	Rotatin	Other	3,881
<b>P10523</b>	S-antigen; retina and pineal gland (arrestin)	Zytoplasma	-3,311
<b>P21912</b>	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)	Zytoplasma	3,513
<b>Q9H936</b>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier: glutamate), member 22	Zytoplasma	2,109
<b>P61009</b>	signal peptidase complex subunit 3 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	Zytoplasma	-2,665
<b>P02787</b>	Transferrin	Extrazellularraum	-3,78
<b>P06753</b>	tropomyosin 3	Zytoplasma	-2,053
<b>O15050</b>	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	Nukleus	-2,787
<b>Q13061</b>	Triadin	Zytoplasma	-2,12
<b>Q6ZT12</b>	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 3 (putative)	Other	-2,422
<b>O75691</b>	UTP20, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	Nukleus	2,185
<b>O60281</b>	zinc finger protein 292	Nukleus	2,764

Tabelle 16: Signifikant veränderte Proteine in GFAP Ak behandelten Retinaexplantaten

Swiss-Prot ID	Gen Name	Lokalisation	Veränderte Expression
<b>Q99798</b>	aconitase 2, mitochondrial	Zytoplasma	-2,871
<b>Q3ZC07</b>	actin, alpha, cardiac muscle 1	Zytoplasma	2,086
<b>Q71910</b>	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)	Other	-45,025
<b>P14550</b>	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)	Zytoplasma	-4,224
<b>P02768</b>	Albumin	Extrazellularraum	-10,852
<b>P04075</b>	aldolase A, fructose-bisphosphate	Zytoplasma	-2,034
<b>P09525</b>	annexin A4	Plasmamembran	-2,443
<b>P08758</b>	annexin A5	Plasmamembran	-2,808
<b>P08133</b>	annexin A6	Plasmamembran	-7,548
<b>O95996</b>	adenomatosis polyposis coli 2	Zytoplasma	3,038
<b>P61205</b>	ADP-ribosylation factor 3	Zytoplasma	-2,304
<b>Q8N264</b>	Rho GTPase activating protein 24	Zytoplasma	-5,489
<b>P49407</b>	arrestin, beta 1	Zytoplasma	-3,168
<b>P32121</b>	arrestin, beta 2	Zytoplasma	-4,499
<b>Q13733</b>	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 4 polypeptide	Plasmamembran	-2,617
<b>P20648</b>	ATPase, H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> exchanging, alpha polypeptide	Plasmamembran	-4,632
<b>P15313</b>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1	Zytoplasma	6,549
<b>Q68DN1</b>	chromosome 2 open reading frame 16	Other	-2,338
<b>P27797</b>	calreticulin	Zytoplasma	-4,098
<b>P27824</b>	calnexin	Zytoplasma	-3,162
<b>Q6IMN6</b>	caprin family member 2	Zytoplasma	-30,077
<b>Q8NG31</b>	cancer susceptibility candidate 5	Nukleus	-5,791
<b>Q0P6D6</b>	coiled-coil domain containing 15	Zytoplasma	-3,204
<b>Q3V6T2</b>	coiled-coil domain containing 88A	Zytoplasma	-2,235
<b>P50991</b>	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	Zytoplasma	-3,891
<b>P12277</b>	creatine kinase, brain	Zytoplasma	3,234
<b>Q00610</b>	clathrin, heavy chain (Hc)	Plasmamembran	-2,871
<b>P53675</b>	clathrin, heavy chain-like 1	Plasmamembran	-5,144
<b>O75390</b>	citrate synthase	Zytoplasma	-3,106
<b>P56545</b>	C-terminal binding protein 2	Nukleus	-7,081
<b>P09622</b>	dihydrolipoamide dehydrogenase	Zytoplasma	-3,276
<b>Q9H7D0</b>	dedicator of cytokinesis 5	Zytoplasma	-13,551
<b>Q6ZVH7</b>	espin-like	Other	-3,592
<b>Q5CZC0</b>	fibrous sheath interacting protein 2	Zytoplasma	-3,349
<b>P14136</b>	glial fibrillary acidic protein	Zytoplasma	-3,253
<b>P15104</b>	glutamate-ammonia ligase	Zytoplasma	2,358
<b>P38405</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide, olfactory type	Zytoplasma	2,729



<b>A8MTJ3</b>	guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 3	Plasmamembran	7,137
<b>P62874</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	Plasmamembran	-60,603
<b>P06744</b>	glucose-6-phosphate isomerase	Extrazellularraum	-3,025
<b>Q16478</b>	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5	Plasmamembran	-2,17
<b>P68871</b>	hemoglobin, beta	Zytoplasma	23,912
<b>O95714</b>	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	Zytoplasma	-2,218
<b>P14625</b>	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	Zytoplasma	-3,008
<b>P54652</b>	heat shock 70kDa protein 2	Zytoplasma	-8,262
<b>P11021</b>	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	Zytoplasma	-3,533
<b>P10809</b>	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	Zytoplasma	-2,572
<b>P00338</b>	lactate dehydrogenase A	Zytoplasma	-7,011
<b>P07195</b>	lactate dehydrogenase B	Zytoplasma	-4,73
<b>P42704</b>	leucine-rich pentatricopeptide repeat containing	Zytoplasma	-2,157
<b>Q96JM4</b>	leucine-rich repeats and IQ motif containing 1	Other	-2,183
<b>Q9UPN3</b>	microtubule-actin crosslinking factor 1	Zytoplasma	-6,023
<b>Q16798</b>	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	Zytoplasma	-19,263
<b>O95568</b>	methyltransferase like 18	Other	-6,588
<b>P42345</b>	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	Nukleus	-2,385
<b>Q9Y2K3</b>	myosin, heavy chain 15	Extrazellularraum	-9,706
<b>Q9UKN7</b>	myosin XVA	Zytoplasma	-6,991
<b>Q9NQX4</b>	myosin VC	Other	-5,043
<b>P19338</b>	nucleolin	Nukleus	-3,551
<b>P29728</b>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	Zytoplasma	-2,428
<b>Q99497</b>	parkinson protein 7	Nukleus	-10,786
<b>P30086</b>	phosphatidylethanolamine binding protein 1	Zytoplasma	-24,664
<b>Q13608</b>	peroxisomal biogenesis factor 6	Zytoplasma	-5,314
<b>P00558</b>	phosphoglycerate kinase 1	Zytoplasma	-2,058
<b>P36871</b>	phosphoglucomutase 1	Zytoplasma	-2,371
<b>O00264</b>	progesterone receptor membrane component 1	Plasmamembran	-5,912
<b>O35129</b>	prohibitin 2	Zytoplasma	-5,526
<b>P47712</b>	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	Zytoplasma	3,265
<b>Q13393</b>	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	Zytoplasma	-10,227
<b>P32119</b>	peroxiredoxin 2	Zytoplasma	-7,519
<b>Q3ZCK9</b>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4	Zytoplasma	-2,42
<b>Q9Z2U1</b>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5	Zytoplasma	-2,075
<b>P49190</b>	parathyroid hormone 2 receptor	Plasmamembran	2,21

<b>P11216</b>	phosphorylase, glycogen; brain	Zytoplasma	4,151
<b>P35243</b>	recoverin	Zytoplasma	-17,428
<b>P36578</b>	ribosomal protein L4	Zytoplasma	-3,307
<b>Q9P2E9</b>	ribosome binding protein 1	Zytoplasma	-2,245
<b>Q16799</b>	reticulon 1	Zytoplasma	-7,365
<b>Q6Q137</b>	septin 7	Zytoplasma	5,117
<b>P31947</b>	stratifin	Zytoplasma	-4,225
<b>Q9C093</b>	sperm flagellar 2	Other	-2,553
<b>Q9NQ38</b>	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	Extrazellularraum	-2,321
<b>Q01082</b>	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	Plasmamembran	-2,829
<b>Q9Y3M8</b>	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 13	Zytoplasma	-3,905
<b>O08599</b>	syntaxin binding protein 1	Zytoplasma	-2,569
<b>Q8NF91</b>	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	Nukleus	-2,803
<b>Q8WXH0</b>	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	Nukleus	-5,185
<b>P02787</b>	transferrin	Extrazellularraum	-7,136
<b>P29401</b>	transketolase	Zytoplasma	-8,439
<b>Q15025</b>	TNFAIP3 interacting protein 1	Nukleus	-2,467
<b>P60174</b>	triosephosphate isomerase 1	Zytoplasma	-12,049
<b>O15050</b>	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	Nukleus	-21,654
<b>Q9BUF5</b>	tubulin, beta 6 class V	Zytoplasma	2,68
<b>A6NKZ8</b>	tubulin, beta pseudogene 5	Other	9,851
<b>Q8IWW7</b>	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1	Zytoplasma	-6,272
<b>Q6ZT12</b>	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 3 (putative)	Other	-14,507
<b>P31930</b>	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	Zytoplasma	-3,045
<b>P22695</b>	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	Zytoplasma	3,953
<b>P21796</b>	voltage-dependent anion channel 1	Zytoplasma	-3,403
<b>P45880</b>	voltage-dependent anion channel 2	Zytoplasma	-3,782
<b>P31946</b>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta	Zytoplasma	-2,101
<b>P62259</b>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon	Zytoplasma	-4,229
<b>P61982</b>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma	Zytoplasma	-4,393
<b>Q04917</b>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta	Zytoplasma	-4,421
<b>Q3SZI4</b>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta	Zytoplasma	-4,225
<b>P63103</b>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	Zytoplasma	-4,057

Tabelle 17: Signifikant veränderte Proteine von  $\gamma$ -synuclein Ak behandelten Retinaexplantaten

Swiss-Prot ID	Gen Name	Lokalisation	Veränderte Expression
<b>Q9NRZ7</b>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	Zytoplasma	3,343
<b>Q719I0</b>	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)	Other	-3,15
<b>O43488</b>	aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)	Zytoplasma	3,102
<b>P02768</b>	albumin	Extrazellularraum	-2,955
<b>Q8N7J2</b>	APC membrane recruitment protein 2	Plasmamembran	2,484
<b>P09525</b>	annexin A4	Plasmamembran	-2,163
<b>Q8N264</b>	Rho GTPase activating protein 24	Zytoplasma	-5,715
<b>Q12797</b>	aspartate beta-hydroxylase	Zytoplasma	2,781
<b>P98196</b>	ATPase, class VI, type 11A	Plasmamembran	2,474
<b>P06576</b>	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	Zytoplasma	-2,065
<b>Q9Y5K8</b>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 34kDa, V1 subunit D	Zytoplasma	3,201
<b>P36543</b>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1	Zytoplasma	2,306
<b>Q96A05</b>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E2	Zytoplasma	3,034
<b>Q68DN1</b>	chromosome 2 open reading frame 16	Other	-2,165
<b>Q5SRN2</b>	chromosome 6 open reading frame 10	Nukleus	-2,677
<b>Q29RI6</b>	calcium binding protein 39	Zytoplasma	4,136
<b>Q9P0X4</b>	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1I subunit	Plasmamembran	-2,104
<b>Q13185</b>	chromobox homolog 3	Nukleus	13,221
<b>Q8IYE0</b>	coiled-coil domain containing 146	Other	-2,848
<b>P50991</b>	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	Zytoplasma	6,297
<b>P60766</b>	cell division cycle 42	Plasmamembran	9,55
<b>Q5VT25</b>	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)	Zytoplasma	-3,23
<b>P12277</b>	creatine kinase, brain	Zytoplasma	2,08
<b>P06732</b>	creatine kinase, muscle	Zytoplasma	6,746
<b>P09497</b>	clathrin, light chain B	Plasmamembran	-3,348
<b>O75390</b>	citrate synthase	Zytoplasma	-3,034
<b>Q02127</b>	dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	Zytoplasma	-6,483
<b>O60610</b>	diaphanous-related formin 1	Plasmamembran	4,244
<b>P36957</b>	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	Zytoplasma	-3,328
<b>Q8WXX0</b>	dynein, axonemal, heavy chain 7	Zytoplasma	-2,189
<b>Q3B7T1</b>	erythroid differentiation regulatory factor 1	Other	-2,84

<b>P24534</b>	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	Zytoplasma	-9,427
<b>Q15723</b>	E74-like factor 2 (ets domain transcription factor)	Nukleus	-2,366
<b>P06733</b>	enolase 1, (alpha)	Zytoplasma	-4,339
<b>P09104</b>	enolase 2 (gamma, neuronal)	Zytoplasma	-4,091
<b>P13929</b>	enolase 3 (beta, muscle)	Zytoplasma	-5,133
<b>Q9NYQ8</b>	FAT atypical cadherin 2	Plasmamembran	3,525
<b>Q68DA7</b>	formin 1	Nukleus	9,13
<b>Q8TAK5</b>	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2	Nukleus	-6,804
<b>P04406</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Zytoplasma	2,039
<b>P00367</b>	glutamate dehydrogenase 1	Zytoplasma	-2,872
<b>P15104</b>	glutamate-ammonia ligase	Zytoplasma	4,492
<b>Q14344</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13	Plasmamembran	5,581
<b>P08754</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	Zytoplasma	3,805
<b>P38405</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide, olfactory type	Zytoplasma	5,334
<b>P09471</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	Plasmamembran	-2,404
<b>P11488</b>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 1	Plasmamembran	3,845
<b>Q13098</b>	G protein pathway suppressor 1	Other	-4,225
<b>Q6ISB3</b>	grainyhead-like 2 (Drosophila)	Nukleus	17,188
<b>P51841</b>	guanylate cyclase 2F, retinal	Plasmamembran	-5,121
<b>Q32LA7</b>	H2A histone family, member V	Nukleus	5,094
<b>P68871</b>	hemoglobin, beta	Zytoplasma	12,109
<b>P51858</b>	hepatoma-derived growth factor	Extrazellularraum	-2,242
<b>Q9Y3E1</b>	hepatoma-derived growth factor, related protein 3	Nukleus	2,39
<b>Q96QV6</b>	histone cluster 1, H2aa	Nukleus	3,728
<b>Q99880</b>	histone cluster 1, H2bl	Nukleus	3,504
<b>Q8CGP0</b>	histone cluster 3, H2bb	Nukleus	2,969
<b>P40673</b>	high mobility group box 2	Nukleus	2,329
<b>P22626</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	Nukleus	2,117
<b>P61603</b>	heat shock 10kDa protein 1	Zytoplasma	2,912
<b>O75874</b>	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	Zytoplasma	2,378
<b>Q9HBG6</b>	intraflagellar transport 122 homolog (Chlamydomonas)	Nukleus	-2,17
<b>Q9CXY6</b>	interleukin enhancer binding factor 2	Nukleus	3,128

<b>P51787</b>	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	Plasmamembran	2,08
<b>Q92845</b>	kinesin-associated protein 3	Zytoplasma	18,725
<b>P78559</b>	microtubule-associated protein 1A	Zytoplasma	-4,177
<b>P46821</b>	microtubule-associated protein 1B	Zytoplasma	2,524
<b>Q16798</b>	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	Zytoplasma	-2,618
<b>P42345</b>	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	Nukleus	-7,681
<b>Q9Y2K3</b>	myosin, heavy chain 15	Extrazellularraum	-2,837
<b>Q9UM54</b>	myosin VI	Zytoplasma	2,077
<b>P19404</b>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa	Zytoplasma	-3,676
<b>P46934</b>	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4, E3 ubiquitin protein ligase	Zytoplasma	-4,32
<b>Q9NYR9</b>	NFKB inhibitor interacting Ras-like 2	Zytoplasma	2,847
<b>P29728</b>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	Zytoplasma	-9,909
<b>Q9BPV8</b>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13	Plasmamembran	2,006
<b>Q9ULE6</b>	phosphatase domain containing, paladin 1	Zytoplasma	-4,139
<b>P11177</b>	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	Zytoplasma	2,147
<b>P18669</b>	phosphoglycerate mutase 1 (brain)	Zytoplasma	2,584
<b>O35129</b>	prohibitin 2	Zytoplasma	3,759
<b>P47712</b>	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	Zytoplasma	-2,111
<b>Q15149</b>	plectin	Zytoplasma	-2,571
<b>P32119</b>	peroxiredoxin 2	Zytoplasma	-2,283
<b>P41219</b>	peripherin	Plasmamembran	-3,976
<b>P23942</b>	peripherin 2 (retinal degeneration, slow)	Plasmamembran	2,112
<b>P60900</b>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6	Zytoplasma	2,807
<b>O14818</b>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	Zytoplasma	-3,705
<b>P49720</b>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	Zytoplasma	8,233
<b>P49190</b>	parathyroid hormone 2 receptor	Plasmamembran	5,441
<b>P51150</b>	RAB7A, member RAS oncogene family	Zytoplasma	4,761
<b>Q14644</b>	RAS p21 protein activator 3	Plasmamembran	2,073
<b>P47804</b>	retinal G protein coupled receptor	Plasmamembran	2,561
<b>P49758</b>	regulator of G-protein signaling 6	Zytoplasma	-3,515
<b>O75916</b>	regulator of G-protein signaling 9	Zytoplasma	-4,276
<b>O15537</b>	retinoschisin 1	Extrazellularraum	7,341
<b>Q9NQC3</b>	reticulon 4	Zytoplasma	-2,801
<b>Q86VV8</b>	rotatin	Other	3,446
<b>P35498</b>	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit	Plasmamembran	3,263

<b>P21912</b>	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)	Zytoplasma	2,088
<b>O75533</b>	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	Nukleus	2,35
<b>Q13796</b>	shroom family member 2	Plasmamembran	2,185
<b>Q9UJS0</b>	solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier), member 13	Zytoplasma	-2,22
<b>Q00325</b>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3	Zytoplasma	-3,248
<b>P53794</b>	solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter), member 3	Plasmamembran	2,194
<b>Q6IN85</b>	SMEK homolog 1, suppressor of mek1 (Dictyostelium)	Plasmamembran	-2,297
<b>Q13813</b>	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1	Plasmamembran	-4,181
<b>Q01082</b>	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	Plasmamembran	-2,037
<b>Q9BXG8</b>	spermatogenic leucine zipper 1	Nukleus	2,335
<b>Q9Y6N5</b>	sulfide quinone reductase-like (yeast)	Zytoplasma	-2,494
<b>P84104</b>	serine/arginine-rich splicing factor 3	Nukleus	4,303
<b>Q16629</b>	serine/arginine-rich splicing factor 7	Nukleus	2,022
<b>Q8WXH0</b>	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	Nukleus	-5,02
<b>Q8N9I0</b>	synaptotagmin II	Zytoplasma	-2,917
<b>P02787</b>	transferrin	Extrazellularraum	-2,884
<b>Q96PF1</b>	transglutaminase 7	Other	-10,164
<b>Q02880</b>	topoisomerase (DNA) II beta 180kDa	Nukleus	-5,892
<b>P09493</b>	tropomyosin 1 (alpha)	Zytoplasma	-3,342
<b>P06753</b>	tropomyosin 3	Zytoplasma	-6,908
<b>P67936</b>	tropomyosin 4	Zytoplasma	-8,778
<b>O15050</b>	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	Nukleus	-8,976
<b>Q6NXR4</b>	TELO2 interacting protein 2	Other	4,602
<b>Q6ZT12</b>	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 3 (putative)	Other	-2,073
<b>P63027</b>	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	Plasmamembran	5,78
<b>O60281</b>	zinc finger protein 292	Nukleus	-8,583

## 10. Eidesstaatliche 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,