

Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Biomarkern beim Glaukom

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der
Naturwissenschaften"**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

Jochen Rieck
geb. in Mainz

Mainz 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Das Glaukom: Ein Überblick	7
1.1.1	Pathogenese und Verlauf der Glaukomerkrankung	9
1.2	Der Untergang retinaler Ganglienzellen als zentrales Element der Pathogenese	11
1.2.1	Das Dogma vom zentralen Nervensystem als immunologisch privilegiertem Ort	12
1.2.2	Die Mikroglia koordiniert das Immunsystem des ZNS	13
1.2.3	Die Induktion der angeborenen Immunität als pathogener Faktor im ZNS	14
1.2.4	Die Rolle der angeborenen Immunität bei der Manifestation zentralnervöser Autoimmunerkrankungen.....	17
1.2.5	Was trägt die Blut-Hirn-Schranke zur Etablierung neurodegenerativer Prozesse bei?	20
1.2.6	Woher stammen die neuronalen Antigene in der Peripherie?.....	21
1.2.7	Der immunologische Homunculus als Abbild des physiologischen Status quo	21
1.2.8	Die zwei Gesichter des Komplementsystems.....	22
1.3	Autoimmune Mechanismen bei der Manifestation des Glaukoms.....	25
1.3.1	Wie kann es zur Entstehung autoreaktiver Prozesse kommen?.....	27
1.3.2	Das zentrale Nervensystem reagiert bei Schädigungen mit der Induktion von Reparaturprozessen	27
1.3.3	Die Gliose besiegelt das Schicksal retinaler Ganglienzellen beim Glaukom	30
1.4	Oxidativer Stress: Proteinoxidation und Aggregatbildung ebnet den Weg zur Apoptose ...	32
1.4.1	Oxidative Schädigungen der DNA postmitotischer Zellen.....	32
1.5	Die Abhängigkeit retinaler Ganglienzellen von der Neutrophinversorgung.....	33
1.5.1	Das Risiko ischämischer Zustände im ZNS.....	34
1.5.2	Die Zytotoxizität des Glutamates führt zum Untergang retinaler Ganglienzellen.....	34
1.6	Resümee des derzeitigen Kenntnisstands.....	35
2	Zielsetzung der Arbeit.....	37
3	Material und Methoden.....	40
3.1	Probenmaterial	40
3.2	Methoden.....	42
3.2.1	Verwendete Methoden zur Präfraktionierung der zur analysierenden Proben	42

3.2.2	Fraktionierungsversuche mit Milipore Zentrifugalfiltern	43
3.2.3	<i>Bead</i> -Aufreinigung/Fraktionierung	44
3.2.4	Vorfraktionierung über Multiaffinitätssäule (MARS).....	44
3.2.5	Geelution	44
3.2.6	Elektroelution mit Whatman „Elutrap“	45
3.2.7	„Whole Gel Eluter“ (BioRad, Hercules, USA)	45
3.2.8	LC-MS	46
3.2.9	Nano-LC	47
3.2.10	Bio-Rad-HPLC.....	47
3.2.11	Identifizierung des Biomarker-Kandidaten Platelet basic protein (PBP) als Beispiel für die erfolgreiche zweidimensionale HPLC-Fraktionierung eines Serum-Proteins .	48
3.2.12	<i>Bead</i> - Versuche mit Protein G Magnetic <i>Beads</i> (Dynal) zur Anreicherung weiterer thrombozytärer Effektorsubstanzen.....	51
3.2.13	Prinzip des MALDI-TOF	52
3.3	Workflow für die Biomarker-Identifizierung	55
3.3.1	Serum-Biomarker-Identifizierung	57
3.3.2	Tränen-Biomarker-Identifizierung	60
3.4	Auswertung der methodischen Ansätze.....	62
4	Ergebnisse.....	63
4.1	Kammerwasserfraktionierungen über Ym30 und Ym3-Filter	63
4.1.1	Kammerwasserfraktionierungen über C18 <i>Beads</i>	64
4.2	Fraktionierungsversuche mit der Multiaffinitäts (MARS)-Säule	65
4.3	Beispiel einer Elektroelution mit dem „Whole Gel Eluter“	66
4.4	Identifikation des Platelet basic protein precursor (PBP/CXCL7)	70
4.5	PDGF-Anreicherung aus dem Serum mit Protein-G <i>Beads</i>	72
4.5.1	Identifikation von CXCL4.....	73
4.5.2	Identifikation von Complementfaktor C1q.....	74
4.5.3	Identifikation von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase (TPTE2/TPIP)	75
4.5.4	Identifikation von Serum-Albumin	76
4.5.5	Identifikation von Transferrin.....	77
4.5.6	Identifikation von TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK).....	78

4.5.7	Identifikation von Transthyretin (Prealbumin, TTHY).....	79
4.6	Proteinidentifikationen aus dem Serum über die 2-D-HPLC	81
4.6.1	Identifikation von ADP-ribosylation factor-like protein 15 (ARL15).....	81
4.6.2	Identifikation von Apolipoprotein M (ApoM).....	82
4.6.3	Identifikation von Fizzy-related protein homolog (FZR).....	83
4.6.4	Identifikation von H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3 (NOLA3)	84
4.6.5	Identifikation von Intraflagellar transport 74 homolog (IFT74).....	85
4.6.6	Identifikation von Neuromedin-B receptor (NMBR)	86
4.6.7	Identifikation von Rabenosyn-5 (RBNS5).....	88
4.6.8	Identifikation von Small ubiquitin-related modifier 3 (SUMO3).....	89
4.6.9	Identifikation von Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1 /TRF2- interacting telomeric protein Rap1 (TE2IP)	90
4.6.10	Identifikation von Toll-like receptor 7 (TLR7).....	92
4.6.11	Identifikation von Twinfilin-2 (TWF2).....	94
4.7	Proteinidentifikationen aus der Tränenflüssigkeit über die C18-HPLC und anschließendem präparativem Gellauf	95
4.7.1	Identifikation von Antigen Ki-67 (Ki67).....	96
4.7.2	Identifikation von Armadillo repeat-containing X-linked protein 1 (ARMX1).....	96
4.7.3	Identifikation von Beta-2-Microglobulin [Beta-2-microglobulin variant pl 5.3] (B2MG). 97	
4.7.4	Identifikation von Lipocalin-1.....	98
4.7.5	Identifikation von Lipophilin-C (SG2A1) und Lipophilin-A (SG1D1)	98
4.7.6	Identifikation von Microtubule-actin cross-linking factor 1 (MACF1)	99
4.7.7	Identifikation von Peroxisomal antioxidant enzyme 5 (PRDX5).....	100
4.7.8	Identifikation von <i>Prolactin-inducible protein</i> precursor (Secretory actin-binding protein) (PIP).....	101
4.7.9	Identifikation von Proline-rich protein 4 precursor (PRP4) (PROL4).....	102
4.7.10	Identifikation von Protein S100-A8 (S10A8)	103
4.7.11	Identifikation von Spectrin alpha chain, brain (α -Fodrin) (SPTA2).....	104
4.7.12	Identifikation von TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK).....	104
4.7.13	Identifikation von Ubiquitin (UBIQ).....	104
5	Diskussion	107
5.1	Methodenentwicklung.....	107

5.2	Auswahl des Probenmaterials.....	108
5.3	Identifikationen aus der Tränenflüssigkeit.....	109
5.4	Identifikationen aus dem Serum.....	110
5.5	Zytokine als Mediatoren von inflammatorischen Prozessen beim Glaukom?	111
5.6	Das Komplementsystem und die angeborene Immunität	113
5.7	Die Beteiligung der TLR an autoinflammatorischen Prozessen	115
5.8	Die Expression von Beta-2-Microglobulin macht Neuronen im ZNS verwundbar	117
5.9	Transferrin: Eisenlieferant für das visuelle System und Ziel oxidativer Schädigung	118
5.10	Transthyretin versorgt das ZNS mit Thyroxin.....	118
5.11	Apolipoprotein M als Glaukom-Biomarker?.....	119
5.12	SUMO reagiert binnen Minuten auf zellulären Stress.....	119
5.13	Identifizierte Proteine, die an zellulären Stressreaktionen beteiligt sind.....	121
5.14	Identifizierte Proteine, die am Zellstoffwechsel beteiligt sind.....	122
5.15	Schlußfolgerung.....	122
6	Zusammenfassung	126
7	Zitierte Literatur.....	128
8	Anhang.....	143
8.1	Veröffentlichung.....	143
8.2	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Geräte	149
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	152
8.4	Tabellenverzeichnis.....	155
9	Erklärung	156

1 Einleitung

1.1 Das Glaukom: Ein Überblick

Das Glaukom wird heute als eine neurodegenerative Erkrankung definiert, die durch einen langsam fortschreitenden, irreversiblen Untergang retinaler Ganglienzellen durch Apoptose gekennzeichnet ist und mit einem progredienten Gesichtsfeldverlust einhergeht (Kerr, Wyllie et al. 1972; Fechtner and Weinreb 1994; Quigley, Nickells et al. 1995; Neufeld, Sawada et al. 1999; Quigley 1999; Maruyama, Ohguro et al. 2000; Maruyama, Ikeda et al. 2002; Weinreb and Khaw 2004; Henderson, Medeiros et al. 2005; Ferrer 2006; Grus, Joachim et al. 2006).

Dieser Visusverlust beginnt typischerweise mit einem bogenförmigen Bjerrum-Skotom im zentralen Gesichtsfeld und endet unbehandelt mit der völligen Erblindung des entsprechenden Auges (Bjerrum 1889; Harrington 1964; Glovinsky, Quigley et al. 1991; Garcia-Valenzuela, Shareef et al. 1995; Quigley, Nickells et al. 1995; Nickells 1996). Das Glaukom, umgangssprachlich auch „grüner Star“ genannt, ist dabei neben dem Katarakt, dem „grauen Star“, eine der häufigsten Ursachen für Erblindung weltweit (Foster, Gilbert et al. 2008). Nach Angaben von Coleman litten im Jahr 2000 geschätzte 66,8 Millionen Menschen weltweit an einem Glaukom, von denen voraussichtlich etwa 6,7 Millionen beidseitig erblinden, wenn nicht rechtzeitig mit einer Behandlung begonnen wird (Coleman 1999). Für das Jahr 2010 wird mit weltweit 8,4 Millionen, für 2020 mit 11,2 Millionen beidseitigen Erblindungen gerechnet (Quigley and Broman 2006). Die Prävalenz der Glaukom-Erkrankung steigt dabei mit zunehmenden Alter und ist zudem stark von der ethnischen Zugehörigkeit abhängig (Quigley 1996).

Mit der Alterung der Bevölkerung in den Industrienationen und den sich daraus ergebenden ansteigenden Erblindungszahlen erwächst also nicht nur ein immenser volkswirtschaftlicher Schaden, sondern auch für die Betroffenen eine enorme Beeinträchtigung ihrer Lebensqualität und Selbständigkeit.

Beim Glaukom sind die rechtzeitige Diagnosestellung und Therapie essentiell wichtig, da die im Verlauf der Erkrankung untergehenden postmitotischen Ganglienzellen verloren sind und nicht ersetzt werden können. Der frühzeitigen Erkennung eines sich entwickelnden Glaukomschadens steht allerdings eine tückische Eigenart dieser Erkrankung im Wege: Betroffene empfinden häufig über Jahrzehnte keine oder nur unerschwellige visuelle Beeinträchtigungen. Verursacht wird dies durch einen Kompensationsmechanismus des visuellen Cortex, dem es durch Umorganisationen lange gelingt, die sich immer weiter ausbreitenden Gesichtsfeldausfälle durch das Einfügen plausibler Bilder zu kompensieren. Man spricht hierbei auch vom *filling-in* (Zur and Ullman 2003; Komatsu 2006). Nur wenige Betroffene, die an einem Bjerrum-Skotom leiden, nehmen ein schwarzes Loch in der Mitte ihres Gesichtsfeldes wahr.

Die meisten beschreiben ihr Sehen eher so, dass Objekte verschwinden oder plötzlich, wie aus dem Nichts, auftauchen, wobei einige Bereiche, die sich direkt vor ihnen befinden, unscharf wahrgenommen werden. Akute Beschwerden beobachtet man lediglich beim Winkelblockglaukom, alle übrigen Glaukomformen verlaufen chronisch und für den Patienten weitestgehend symptomfrei.

Vereinfachte diagnostische Verfahren, idealerweise ein Glaukom-Schnelltest, der auch durch einen Optiker durchgeführt werden könnte, wären ein wirksames Instrument, die Ausbreitung von Erblindungen durch die rechtzeitige Diagnose und Therapie des Glaukoms einzudämmen. Allerdings ist die Pathogenese des Glaukoms erst in Teilen erforscht und verstanden, woraus folgt, daß für ein sinnvolles Massenscreening beim Glaukom bis heute eine verlässliche und zugleich bezahlbare und schnell durchführbare Diagnostik fehlt (Gloor 2004). Unbestritten ist ein dauerhaft erhöhter individueller okulärer Innendruck (IOD) von über 21 mmHg ein wichtiger pathogener Risikofaktor, jedoch kein Bestandteil der Glaukomdefinition mehr (Abbildung 1). Man spricht dabei vom individuellen okulären Innendruck, weil im Fall des Augeninnendrucks eine personenspezifische Schwankungsbreite existiert, die zudem einem circadianen Rhythmus folgt (Loewen, Liu et al. 2010). Dabei oszilliert der IOD im Normalfall beim Erwachsenen zwischen 10 und maximal 21 mmHg. Neugeborene weisen einen IOD zwischen sechs und acht mmHg auf, welcher alle zwei Jahre um etwa 1 mmHg ansteigt (Johnson, Deppmeier et al. 2000; Weber, Chen et al. 2000; Kass, Heuer et al. 2002; Naskar, Wissing et al. 2002; EGS 2003; Guo, Moss et al. 2005; Kuehn, Kim et al. 2006; Steele, Inman et al. 2006).

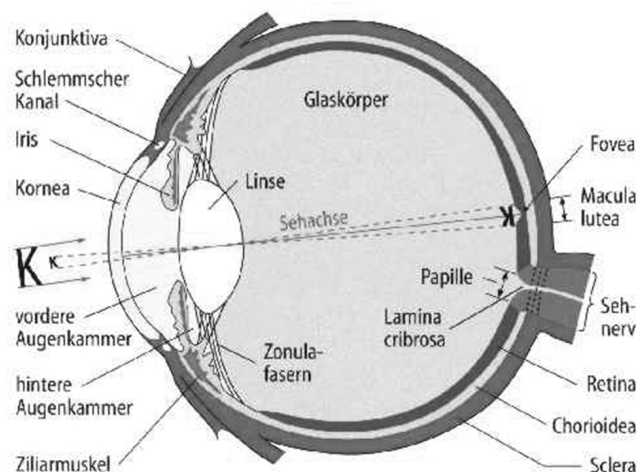


Abbildung 1: Querschnitt durch das menschliche Auge

Das menschliche Auge besteht aus der durchsichtigen Kornea, den mit Kammerwasser gefüllten hinteren und vorderen Augenkammern, der die Pupille umschließenden Iris, der Linse, und dem Glaskörper, der den größten Raum des Augapfels ausfüllt. Das Kammerwasser sorgt hierbei für den Augeninnendruck. Die innere hintere Fläche wird von der Retina ausgekleidet, der Raum zwischen Retina und der den Bulbus oculi bildenden Sklera wird durch das okuläre Gefäßsystem, der Chorioidea ausgefüllt. Der Punkt des schärfsten Sehens ist durch eine kleine Vertiefung in der Retina, der Fovea centralis, gekennzeichnet. Die Papille markiert den Eintrittsort des Sehnerven in die Retina (Schmidt 1995).

Es existieren Gesunde, die einen deutlich über die Norm erhöhten IOD aufweisen, ohne jemals ein Glaukom zu entwickeln. Hier spricht man von einer okulären Hypertension (*Ocular hypertension*, OHT). Gleichzeitig haben viele Patienten einen IOD ≤ 21 mmHg, entwickeln aber trotzdem einen typischen Glaukomschaden an Sehnerv und Gesichtsfeld.

In diesem Fall spricht man von einem Normaldruck-Glaukom (*Normal tension glaucoma*, NTG). Von Bedeutung für die Pathogenese des Glaukoms scheint daher die individuelle, relative Höhe des IOD zu sein.

Der IOD ist ein Produkt aus Kammerwasserproduktion durch die Epithelzellen des *Corpus ciliare* (Ziliarmuskel) in der Hinterkammer und dem Abfluss zwischen Linse und Iris durch die Pupille in die Vorderkammer (Pfeiffer 2001; Weinreb and Khaw 2004). Im Kammerwinkel, dem *Angulus iridocornealis*, wird das Kammerwasser durch das Trabekelwerk und den Schlemm'schen Kanal drainiert und gelangt durch den *Plexus venosus sclerae* (nicht abgebildet) wieder zurück in den Blutkreislauf (Abbildung 2) (Moll 2002).

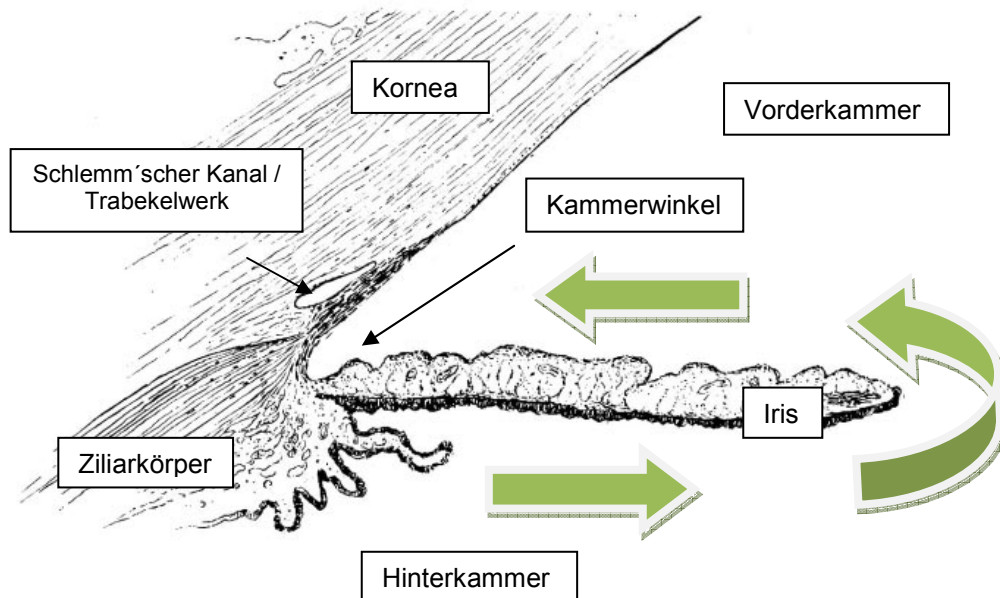


Abbildung 2: Kammerwasserfluss

Kammerwasserfluss vom Bildungsort, dem Ziliarkörper in der Hinterkammer, durch den Kammerwinkel zwischen Iris und Linse in die Vorderkammer. Drainage über Trabekelwerk und Schlemm'schen Kanal in den Plexus venosus sclerae (Weinreb and Khaw 2004).

1.1.1 Pathogenese und Verlauf der Glaukomerkrankung

Traditionell gilt ein dauerhaft erhöhter IOD als Auslöser für die Manifestation einer Glaukomerkrankung. Tatsächlich ist bei der häufigsten Glaukom-Form, dem primären Offenwinkel-Glaukom (POAG) bei der Mehrzahl der Betroffenen auch eine Erhöhung des IOD zu beobachten. Das POAG wird deshalb als ein Hochdruck-Glaukom (HTG) angesehen. Untersuchungen mit der Methode der *Laser Doppler flowmetry* von Pillunat ergaben, dass die Blutversorgung des Sehnervenkopfes ab einem IOD von etwa 50 mmHg aufwärts abnimmt. Dieser Effekt könnte einen möglichen Pathomechanismus beim HTG darstellen (Pillunat, Anderson et al. 1997).

Dagegen hatten über 30% dieser Patienten zu keinem Zeitpunkt einen pathologisch erhöhten IOD (NTG-Patienten) und es stellt sich die Frage was, wenn nicht ein erhöhter IOD, für den Untergang retinaler Ganglienzellen im Fall des NTG verantwortlich ist (Kass, Heuer et al. 2002; Grus, Joachim et al. 2004). Heute stuft man das Glaukom als eine chronisch-neurodegenerative Erkrankung ein, in deren Verlauf es zu morphologischen Veränderungen der Retina kommt (Abbildung 3).

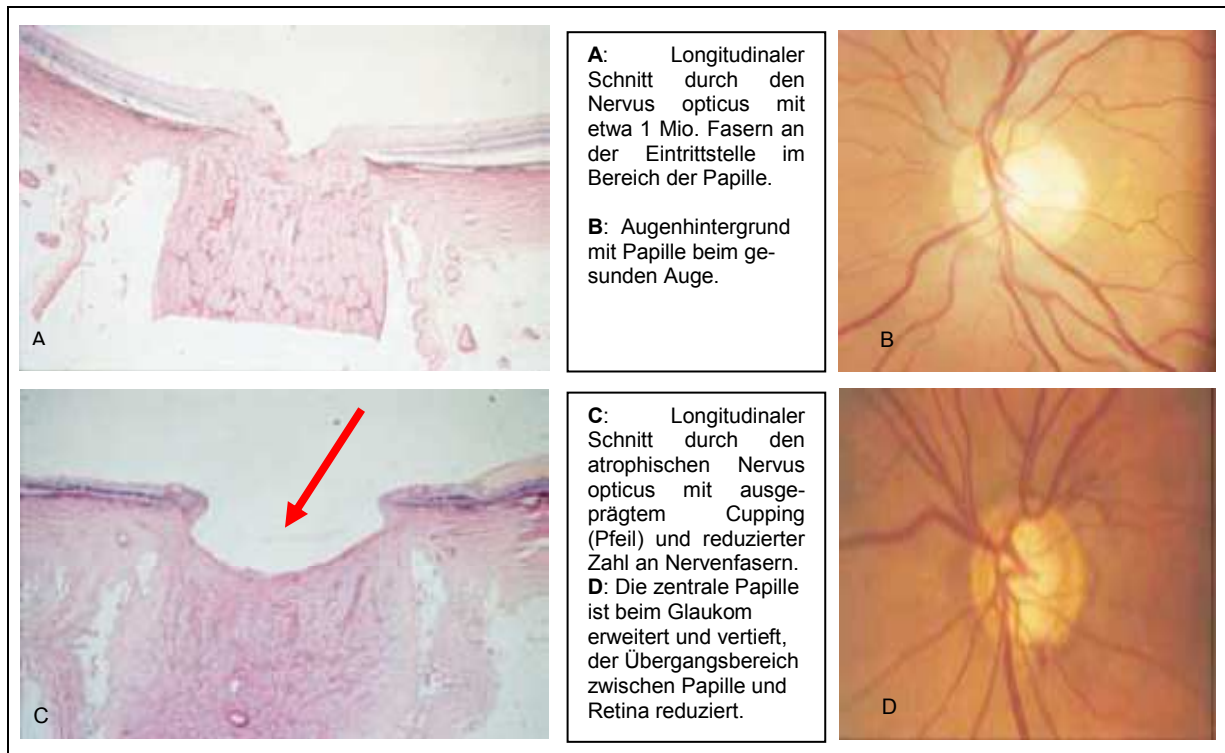


Abbildung 3: Sehnerv und Papille

Sehnerv und Papille im gesunden und glaukomatösen Auge mit Excavation der zentralen Papille (Pfeil) (Weinreb and Khaw 2004).

Hierzu zählt die Excavation der Papille (*Optical Nerve Head*, ONH), das sogenannten „Cupping“ (Hernandez 2000; Naskar, Wissing et al. 2002; Guo, Moss et al. 2005; Nickells 2007; Weber, Harman et al. 2008; Fu, Li et al. 2009; Hilliard 2009). Die neuronalen Schädigungen beim Glaukom beschränken sich hierbei nicht nur auf die retinalen Ganglienzellen, deren Axone, Somata und Dendriten. Es ist vielmehr die gesamte Sehbahn von der Retina über den *Nucleus geniculatum* bis zum visuellen Cortex vom Untergang bedroht (Weber, Chen et al. 2000; Yücel, Zhang et al. 2000; Crawford, Harwerth et al. 2001; Yücel, Zhang et al. 2001; Yücel, Zhang et al. 2003; Weinreb and Khaw 2004).

Unklar ist, ob die Umbauprozesse des ONH zum Untergang der retinalen Ganglienzellen (RGC) führen, oder ob umgekehrt der Verlust von RGC im für das Glaukom charakteristischen *Cupping* des Sehnervenkopfes endet (Neufeld, Sawada et al. 1999; Hernandez 2000; Maruyama, Ohguro et al. 2000; Fukuchi, Ueda et al. 2001; Naskar, Wissing et al. 2002; Kuehn, Fingert et al. 2005).

1.2 Der Untergang retinaler Ganglienzellen als zentrales Element der Pathogenese

Unstrittig ist das Schicksal glaukomatöser RGC, die sämtlich durch den programmierten Zelltod untergehen und nicht mehr ersetzt werden können (Kerr, Wyllie et al. 1972; Garcia-Valenzuela, Shareef et al. 1995; Quigley, Nickells et al. 1995; Nickells 1999; Guo, Moss et al. 2005; Kuehn, Fingert et al. 2005; Calandrella, Scarsella et al. 2007; Zhong, Leung et al. 2007; Levkovitch-Verbin, Dardik et al. 2009). Die eigentliche Ursache hierfür ist nach wie vor nicht geklärt. Der in diesem Zusammenhang zentrale Vorgang der Apoptose lässt sich in zwei Phasen gliedern: Der Initiations- und der Effektorphase. In der Initiationsphase wird unterschieden, wie diese eingeleitet wird: Über den extrinsischen oder den intrinsischen Weg. Der **extrinsische Weg** wird induziert durch Ligandenbindung an den sogenannten Todesrezeptor *CD95*, der der TNF-Rezeptorfamilie angehört (Synonyme: *Fas-Rezeptor*, *Apo-1*, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (TNFRsf6)*).

Der **intrinsische** Weg beginnt mit der intrazellulären Freisetzung von *Cytochrom c*. Diese Freisetzung wird initiiert durch Tumorsuppressor *p53*, der durch zelluläre Schädigungen aktiviert wird. *p53* kontrolliert die Expression der antagonistisch wirkenden Gene *bcl-x* und *bax* (Synonym: *bik*), deren Translationsprodukte die Freisetzung von *Cytochrom c* durch Mitochondrien kontrollieren (Abbildung 4).

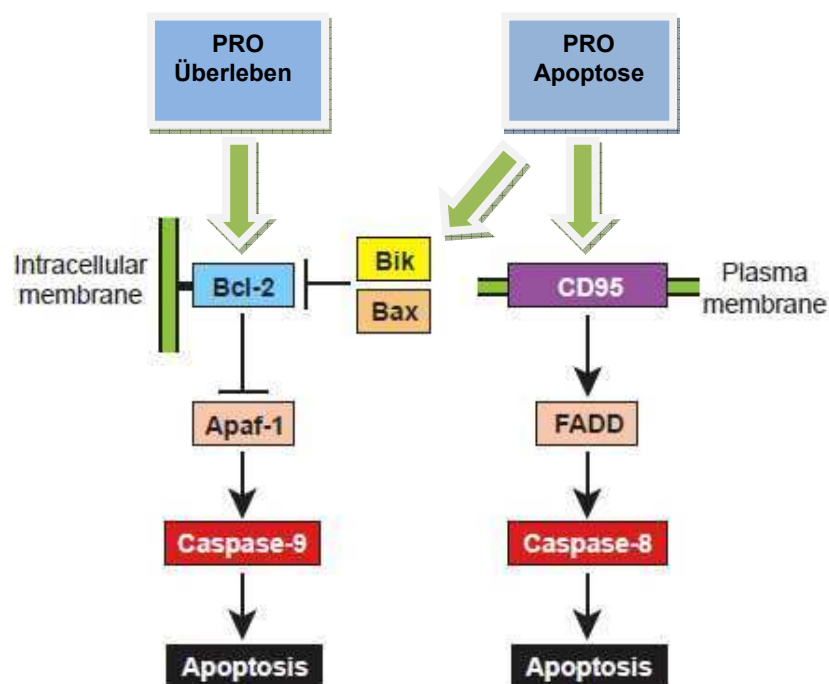


Abbildung 4: *bcl-2* und *bik* entscheiden über Leben und Tod

bcl-2 und *bik* (*bax*) sind Schlüsselproteine, deren Balance über die Einleitung (oder Verhinderung) der Apoptose entscheidet. *Bcl-2* wirkt dabei antiapoptotisch, *bik* (*bax*) und *CD95* proapoptotisch. *Apaf-1* leitet die Apoptose ein, die Caspasen koordinieren den Todesprozess der Zelle. Der „Todesrezeptor“ *CD95* (Synonyme: *Fas-Rezeptor*, *Apo-1*, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (TNFRsf6)*) umgeht diesen Zwischenschritt und initiiert bei Lymphozytenbindung über das Adapterprotein *FADD* direkt die Apoptose (Nickells 1996; Adams and Cory 1998).

Beide Wege führen schließlich zur Aktivierung von Caspasen, die den Abbau des Laminins der Zellkernmembran, des Actins des Zytoskeletts und über die *Caspase-aktivierte DNase* (CAD) die Fragmentierung der DNA einleiten (Nickells 1996; Adams and Cory 1998). Beim Glaukom scheint es auf die Art der schädigenden Noxe anzukommen, welcher Weg in die Apoptose beschränkt wird. Dokumentiert sind die Initiation des programmierten Zelltodes retinaler Ganglienzellen über *p53*, aber auch über die direkte Aktivierung des „Todesrezeptors“ *CD95* unter autoreaktiven Bedingungen (Nickells 1999; Li, Schlamp et al. 2000; Li, Schlamp et al. 2002; Wax, Tezel et al. 2008). Im Tiermodell kann die Expression vieler apoptotischer Faktoren so moduliert werden, dass das Überleben von Ganglienzellen gefördert wird. So führt die Überexpression des antiapoptotischen Faktors *bcl-2* in transgenen Mäusen, denen die Sehnerven durchtrennt wurden, zu einer verminderten Sterberate retinaler Ganglienzellen (Bonfanti, Strettoi et al. 1996).

Injektionen von Caspase-Inhibitoren in den Glaskörper von Ratten (mit ebenfalls durchtrennten Sehnerven) führten ebenso wie das *silencing* von proapoptotischen Faktoren, wie *Apaf-1*, mit „*short interfering RNAs*“ (RNAi) zu einer Verminderung der Sterberate von RGC (Chaudhary, Ahmed et al. 1999; Lingor, Koeberle et al. 2005).

1.2.1 Das Dogma vom zentralen Nervensystem als immunologisch privilegiertem Ort

Durch Transplantationsversuche erkannte man schon früh, dass bei heterologen Hauttransplantaten, die man in das Gehirn oder das Auge verpflanzte, keine oder nur stark verzögerte Abstoßungsreaktionen zu verzeichnen sind (Dooremal 1873; Medawar 1948; Woodruff and Woodruff 1950; Medawar 1961). Man ging deshalb beim zentralen Nervensystem (ZNS) von einem immunologisch privilegierten Organ aus (Streilein 1999; Carson, Doose et al. 2006).

Der Status der stark eingeschränkten Funktion der angeborenen und adaptiven Immunantwort führten zur Prägung des Begriffs des „*Immunologischen Privilegs*“ (Streilein 1995; Carson, Doose et al. 2006; Mrass and Weninger 2006; Niederkorn 2006; Sugita, Ng et al. 2006; Caspi 2008).

Bei genauerer Betrachtung sind jedoch nur jene Immunantworten beschnitten, deren mögliche „Kollateralschäden“ benachbarte Neuronen schädigen könnten, während ausgesuchte Abwehrmechanismen auch im ZNS funktionieren. Konkret deutet vieles darauf hin, dass die immunologische Überwachung des ZNS vom angeborenen Immunsystem übernommen wird, die adaptive Immunabwehr unter physiologischen Bedingungen jedoch keine Rolle spielen darf (Nguyen, Julien et al. 2002; Olson and Miller 2004; Carson, Doose et al. 2006; Niederkorn 2006; Yong and Marks 2010). Dieser immunologische Kompromiss schützt unbeteiligte Neuronen vor deren Zerstörung, die im postmitotischen Milieu des ZNS nicht in Kauf genommen werden kann.

1.2.2 Die Mikroglia koordiniert das Immunsystem des ZNS

Anders als von Rudolf Virchow vermutet, sind Gliazellen mehr als eine celluloseartige Kittsubstanz für Nervenzellen (Virchow 1854). Heute sind im ZNS drei Glia-Zelltypen bekannt: Die zur Mikroglia zählenden sternförmigen Astrozyten und spezialisierte retinale Müller-Zellen, denen man die Makroglia gegenüberstellt. In der Netzhaut sind Astrozyten in der Ganglienzellschicht lokalisiert, wogegen Müller-Zellen die gesamte Retina durchspannen.

Mikroglia, ovoid oder amöboid geformt, findet man in der Ganglienzell- und der inneren plexiformen Schicht. Die Makroglia übernimmt in der Retina, wie auch im gesamten ZNS, die Versorgung der Ganglienzellen mit Neutrophinen, sie reguliert die extrazelluläre Ionenkonzentration und unterstützt den neuronalen Stoffwechsel (Newman and Reichenbach 1996; Ramirez, TriviÑO et al. 1996; Tsacopoulos, Poitry-Yamate et al. 1997; Newman and Zahs 1998). Dagegen fungiert Mikroglia während der Embryonalentwicklung, bei degenerativen Prozessen in der Retina, sowie bei der experimentellen Durchtrennung des *Nervus opticus* im Tiermodell als ZNS-spezifischer Phagozyt, der apoptotische Neurone, Zelldebris und Pathogene beseitigt (Wang, Tay et al. 2000). Die Mikroglia erkennt diese über ihren *Toll like Receptor* (TLR) und reagiert mit der Freisetzung proinflammatorischer Cytokine, wie dem TNF- α und der *Nitric Oxide Synthase 2* (NOS-2).

Apoptotische Zellen werden unter Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren, wie TGF- β durch die Mikroglia phagozytiert (Napoli and Neumann 2009). Mikroglia stellt im ZNS die erste Linie der Immunabwehr dar und verfügt daher über ein feingegliedertes Arsenal an Abwehrmechanismen und über ein hohes Maß an Beweglichkeit, um im Fall einer Aktivierung durch infektiöse oder neurodegenerative Prozesse an entsprechender Stelle wirken zu können. Sie zerstören Mikroben durch das Freisetzen cytotoxischer Substanzen, beseitigen Zelldebris durch Phagozytose und agieren anschließend als Antigen-präsentierende Zellen (Hung, Chansard et al. 2010). Die durch eine amöboide Fortbewegung gut ausgeprägte Motilität ermöglicht der Glia-Zelle die Überwachung eines relativ großen Bereiches im ZNS-Parenchym (Davalos, Grutzendler et al. 2005; Nimmerjahn, Kirchhoff et al. 2005). Abweichend vom normalen Motilitätsverhalten unter physiologischen Bedingungen, bewegen sich im Fall einer Aktivierung die Zellen kollektiv auf den Ort der Schädigung zu. Angeschlagene Neuronen setzen üblicherweise Nukleotide, wie das ATP frei, was Mikrogliazellen als Chemoattraktant über die Aktivierung von Purinrezeptoren innerhalb von Stunden herbeilockt (Davalos, Grutzendler et al. 2005; Haynes, Hollopeter et al. 2006). Nach wenigen Tagen folgt darauf die Glia-Proliferation, die reaktive Gliose, die mit einer Hochregulation des für hämatopoetische Stammzellen charakteristischen Oberflächenmarkers CD34 verbunden ist (Ladeby, Wirenfeldt et al. 2005).

Die Beteiligung einer Gliose bei neurodegenerativen Prozessen konnte im Tiermodell bei Morbus Alzheimer demonstriert werden (Meyer-Luehmann, Spiers-Jones et al. 2008).

Einen Hinweis auf die positiv chemotaktische Motilität von Mikroglia liefern Experimente mit CXCR3⁻ Knockout-Mäusen, deren Mikroglia das unter degenerativen Bedingungen von Neuronen exprimierte Chemokin CXCL10 nicht binden können und damit eine Gliose unterbleibt. Dies führt dazu, dass geschädigte und tote Zellen nicht phagozytiert werden, während sie unter normalen Umständen nach einigen Tagen verschwunden wären (Rappert, Bechmann et al. 2004). In einem Tiermodell für Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Morbus Parkinson konnte ein weiteres Chemokin, CX3CL1, identifiziert werden, welches von geschädigten Neuronen als Chemoattraktant für Glia-Zellen freigesetzt wird. CX3CR1⁻ Mäuse, deren Mikroglia keinen funktionellen Chemokin-Rezeptor besitzt, weisen eine erhöhte neuronale Apoptoserate auf, was auf die neuroprotektive Rolle der Mikroglia verweist (Cardona, Piro et al. 2006; Biber, Neumann et al. 2007).

Neben der stützenden und schützenden Funktion der Glia kann eine durch degenerative Prozesse oder Verletzungen ausgelöste Glia-Aktivierung im glaukomatösen Auge Schaden anrichten (Wang, Tay et al. 2000; Tezel and Wax 2003; Steele, Inman et al. 2006). Zumindest im Auge korreliert dabei die Aktivierung mit einer Akkumulation von MAP-Kinase innerhalb der Glia-Zellen (Tezel, Chauhan et al. 2003). Solch eine Aktivierung, eine Astrogliose, erfolgt im ZNS generell als Reaktion auf jede Form von Verletzung oder Krankheit und wird als zellulärer Versuch gewertet, die beeinträchtigten zellulären Mechanismen aufrechtzuerhalten, sowie weitere Schädigungen zu verhindern.

1.2.3 Die Induktion der angeborenen Immunität als pathogener Faktor im ZNS

Heute weiß man, dass für viele neurodegenerative Prozesse innerhalb des ZNS chronische Immunantworten der angeborenen Immunabwehr verantwortlich sind (Nguyen, Julien et al. 2002). Die Retina verfügt dabei über ein eigenes Immunsystem, inklusive immunkompetenter Zellen: Mikroglia, eigene dendritischen Zellen und sogar perivaskuläre Makrophagen, alles Bestandteile der angeborenen Immunität (Xu, Dawson et al. 2007). Essentieller Bestandteil der angeborenen Immunität ist die rezeptorvermittelte Pathogenerkennung durch die *Toll-like-Rezeptorfamilie* (TLR) und den *Triggering receptor expressed on myeloid cells* (TREM) (Abbildung 5).

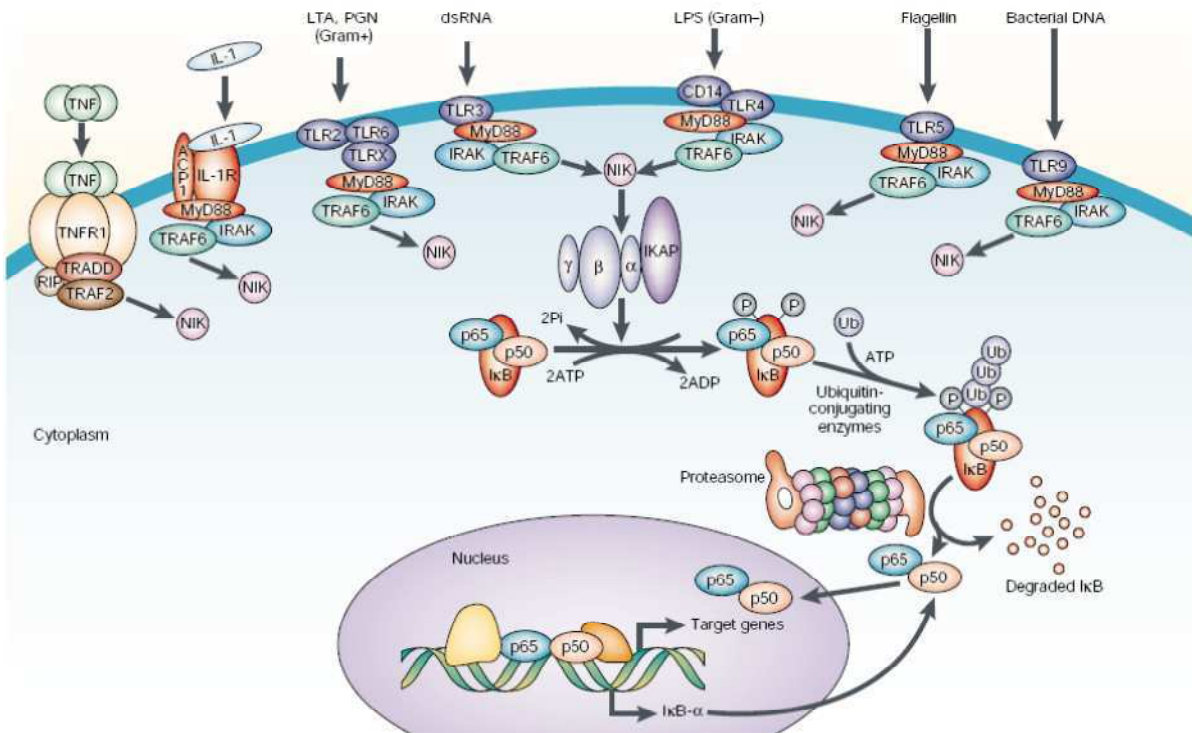


Abbildung 5: Die Funktionsweise der TLR-Familie

Die TLR-Familie und die proinflammatorische Signaltransduktions-Kaskade unter Beteiligung von NF-κB. TLR2 erkennt die PAMPs, die auf der Oberfläche von gram-positiven Bakterien zu finden sind. TLR4, in Kombination mit CD14, erkennt Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien. Flagellin, Bestandteil bakterieller Flagellen, wird durch TLR5 erkannt. TLR9 spricht auf bakterielle DNA an und TLR3 aktiviert die angeborene Immunantwort in der Gegenwart doppelsträngiger RNA, die von Viren stammt. Die Signaltransduktionskaskade, die bei einer TLR-Aktivierung beschriftet wird, gleicht der des IL-1-Rezeptors, inklusive des Adapterproteins MyD88. Die Aktivierung der IL-1 "receptor-associated kinase" des "tumor necrosis factor receptor-associated factor 6" (TRAF6), "inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-κB) kinase complex" mündet schließlich in der NF-κB-Aktivierung. Die beiden DNA-bindenden NF-κB-Untereinheiten p50 und p65 triggern bei Aktivierung die Transkription von Cytokinen, Chemokinen, Proteinen des Komplementsystems, Enzymen, Adhäsionsmolekülen und Immunrezeptoren. ACP1: accessory protein 1, IKAP: IκB kinase complex (IKK-αβγ)-associated protein, IκB inhibitor of NFκB, IRAK: IL-1R-associated kinase, LTA: lipoteichoic acid, NIK: NFκB-inducing kinase, PGN: peptidoglycan, RIP: receptor-interacting protein, TNF: tumournecrosis factor, TNFR: TNF receptor, TRADD: TNFR1-associated protein with death domain, TRAF: TNFR-associated factor, Ub: Ubiquitin (Nguyen, Julien et al. 2002).

Diese beiden Rezeptorklassen sind im ZNS auf der Mikroglia und in der Peripherie auf neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden (Bouchon, Dietrich et al. 2000; Akira, Yamamoto et al. 2003; Colonna 2003; Olson and Miller 2004; Ford and McVicar 2009; Lehnardt 2009). Bisher scheint bewiesen zu sein, dass TREM die Aktivität der TLR modulieren, wobei TREM-1 aktivierend und TREM-2 inhibitorisch wirkt (Sharif and Knapp 2008).

Im Fall einer Pathogenerkennung durch TLR sorgen diese durch die koordinierte Aktivierung von Transkriptionsfaktor NF- κ B, zusammen mit der gesteigerten Expression der Cytokine IL-1 β , IL-6, Chemokin IL-8 und der kostimulatorischen Proteine CD80 und CD86 (Synonym: B7.1) für eine zielgerichtete Steuerung der angeborenen Immunität (Fearon and Locksley 1996; Janeway and Medzhitov 2002).

Allgemein sind TLR dimer organisierte, mehrheitlich nach außen gerichtete und die Plasmamembran einfach durchspannende Rezeptoren, die auf eine Aktivierung durch *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie das für die Oberfläche gram-negativer Bakterien typische Lipopolysaccharid oder bakterielle DNA, mit einer Konformationsänderung reagieren (Janeway and Medzhitov 2002; Choe, Kelker et al. 2005). Von den insgesamt zwölf bisher identifizierten Isotypen übernehmen TLR3, 7, 8 und 9 die Überwachung der inneren zellulären Kompartimente (Heil, Hemmi et al. 2004; Olson and Miller 2004; Beutler 2009; Butchi, Du et al. 2009).

Da einige Proteine, wie Histone und Hitzeschockproteine (HSP), phylogenetisch stark konserviert sind, können körpereigene Proteine denen von Protozoen und anderen Pathogenen so sehr ähneln, dass es vereinzelt zu Kreuzreaktivitäten kommt (Garsia, Hellqvist et al. 1989; Schlesinger 1994; Thatcher and Gorovsky 1994; Wax, Tezel et al. 1998). So erkennt TLR4 HSP27 und HSP60. TLR2 bindet Glutathion-S-Transferase als PAMP (Ohashi, Burkart et al. 2000; Tükel 2005; Roelofs, Boelens et al. 2006). HSP72 reagiert mit TLR2 und TLR4 (Johnson and Fleshner 2006). Über die Stimulation der angeborenen Immunität werden so durch eine Kreuzreaktion, die in diesen Fällen nicht durch molekulares Mimikri verursacht wird, autoreaktive Mechanismen in Gang gesetzt (Kol, Lichtman et al. 2000; Liu, Yumoto et al. 2008; Rajaiyah and Moudgil 2009). Beim molekularen Mimikri eignet sich ein Pathogen mit ursprünglich anderem „Aussehen“ die Oberflächenbeschaffenheit von Wirtszellen an, um der Überwachung der Immunabwehr zu entgehen (Damian 1964; Damian 1965). Ob die hier zu beobachtende Kreuzreaktivität durch phylogenetische Konservierung oder molekulares Mimikri hervorgerufen wird, ist offensichtlich abhängig vom betreffenden Antigen. Dabei sind die Konsequenzen die gleichen. Wie bei der durch konservierte Aminosäuresequenzen verursachten Kreuzreaktivität gesehen, kann es auch durch Mimikri zur Etablierung autoreaktiver Prozesse kommen. Das zeitgleiche Auftreten von Enterobakterien - oder Vireninfektionen und der Manifestation autoimmuner Vorgänge spricht für sich (Cohen 2001; Oldstone 2005). Für das Glaukom wird eine Infektion mit *Helicobacter pylori* als krankheitsauslösende Noxe diskutiert (Galloway, Warner et al. 2003; Kountouras, Mylopoulos et al. 2003; Kountouras, Zavos et al. 2004).

Dass solche Kreuzreaktivitäten auch beim Glaukom eine Rolle spielen könnten, beweisen die signifikant erhöhten Antikörperreaktivitäten gegen HSP27 und Glutathion-S-Transferase im Serum von Glaukompatienten (Wax, Tezel et al. 1998; Yang, Tezel et al. 2001). Im Tiermodell führt die experimentelle Erhöhung des IOD durch Salzinjektionen in die episkleralen Venen zu einer gesteigerten Expression von TLR2, 3 und 4, von HSP27, 60 und 72, sowie der für die TLR-Signalkaskaden charakteristischen Adapterproteine und Kinasen. Diese Befunde konnten im Retinaproteom glaukomatöser Spenderaugen bestätigt werden. Dies untermauert die Hypothese, dass TLR über die Aktivierung des angeborenen Immunsystems zur Glaukomentstehung beitragen. Die ebenfalls vermehrt exprimierten HSPs scheinen die Aktivierung des Immunsystems noch zusätzlich zu stimulieren (Luo, Yang et al. 2009). Dies mag an der Kreuzreaktivität zwischen HSP und TLR liegen, kann aber auch mit der Fähigkeit von *Heat Shock Proteinen*, Antigene zu präsentieren, erklärt werden (Wallin, Lundqvist et al. 2002; Tsan and Gao 2009).

1.2.4 Die Rolle der angeborenen Immunität bei der Manifestation zentralnervöser Autoimmunerkrankungen

Die Aktivierung der Mikroglia ist bei Patienten mit Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Multipler Sklerose (MS) und Amyotropher Lateralsklerose (ALS) dokumentiert (Pasinetti 1998; Gonzalez-Scarano and Baltuch 1999; Julien 2001). Im Serum und in der Zerebrospinal-Flüssigkeit dieser Patienten finden sich erhöhte Titer von IL-6, IL-1 und TNF- α , Chemokine der angeborenen Immunität und potente Initiatoren der extrinsischen Apoptose von Neuronen (Pasinetti 1998; Gonzalez-Scarano and Baltuch 1999; Julien 2001). Speziell für IL-1 und TNF- α konnte die Aktivierung von Caspasen nachgewiesen werden, wobei TNF- α die Apoptoserate von Neuronen durch die Inhibition von *Insuline like Growth Factor 1* (IGF-1) noch zusätzlich steigert (Venters, Tang et al. 1999; Friedlander 2000). Neben der Sekretion von Chemokinen, produzieren aktivierte Mikroglia-Zellen Toxine wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandine, die ihrerseits neurodegenerative Prozesse initiieren (Gonzalez-Scarano and Baltuch 1999; Julien 2001). Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen steuert die aktivierte Mikroglia die Transition der angeborenen Immunität zur adaptiven Immunantwort im ZNS (Hickey and Kimura 1988; Gonzalez-Scarano and Baltuch 1999; Weiner 2008). Bisläng existieren also eine Reihe Befunde über erhöhte Cytokin-Titer und aktivierte Glia innerhalb des ZNS, wobei nicht klar ist, was davon als kausativ und was als Epiphänomen für die Manifestation einer Autoimmunerkrankung einzuordnen ist. Klar belegt ist hingegen, dass zelluläre Stressoren wie oxidativer Stress, mitochondrielle Dysfunktionen oder Exzitotoxizität durch Glutamat als jeweils singuläre Stressoren nicht ausreichen, um den Untergang von Neuronen auszulösen. Tiermodelle für ALS, M. Alzheimer, M. Parkinson und M. Huntington belegen dies (Mattson, Pedersen et al. 1999; Julien 2001; Lin and Beal 2006).

Genauso kann die Anwesenheit von gegen neuronale Antigene gerichtete Antikörper die zelluläre Funktion des Epitops beeinträchtigen, allein sind diese jedoch auch nicht in der Lage eine neurodegenerative Autoimmunerkrankung auszulösen. Tezel gelang es in einer retinalen Zellkultur durch die Applikation von gegen α -A- und α -B-Kristallin, sowie gegen HSP27 gerichtete Antikörper, die Apoptose von Neuronen und Zellen des retinalen Gefäßsystems zu induzieren, was allerdings nicht mit der Induktion einer komplexen Autoimmunerkrankung *in vivo* gleichgesetzt werden kann (Tezel, Seigel et al. 1998). Im Fall der Paraneoplastischen Neurologischen Erkrankung (PND), die als Begleitsymptom einer Tumorerkrankung auftreten kann, entsprechen Epitope, die durch Tumorzellen im Körper generiert werden, jenen von Neuronen im ZNS. Dies führt zur Etablierung eines neurodegenerativen Prozesses im ZNS, wobei die therapeutische Senkung des Autoantikörpertiters durch Plasmapherese keine persistierende Linderung des klinischen Verlaufs erbringt (Musunuru and Darnell 2001). Umgekehrt gelingt es nicht, in Tiermodellen durch Injektionen von Antikörpern Erkrankter, eine PND auszulösen. Autoantikörper allein können also keine autoimmune neurodegenerative Erkrankung hervorrufen (Solimena and De Camilli 2000; Musunuru and Darnell 2001). Im Fall der Glaukom-Erkrankung sind bereits gegen okuläre Strukturen gerichtete Autoantikörper des Isotyps IgG identifiziert worden (Wax, Tezel et al. 1998; Maruyama, Ohguro et al. 2000; Wax, Yang et al. 2001; Yang, Tezel et al. 2001; Grus, Joachim et al. 2004; Joachim, Pfeiffer et al. 2005; Grus, Joachim et al. 2006). IgG-Antikörper besitzen prinzipiell die Möglichkeit, durch die Interaktion ihrer Fc-Region mit der Komplementkomponente C1q, das Komplementsystem über den klassischen Weg zu aktivieren (Ouaissi, Auriault et al. 1981). Dass dies auch im ZNS möglich ist, konnte im Fall der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) gezeigt werden (Urich, Gutcher et al. 2006). Mit der Komplementaktivierung wird eine Entzündungsreaktion mit Beteiligung der adaptiven Immunität provoziert (Kishore, Gaboriaud et al. 2004). Der Fund von aktivierten T-Zellen und Makrophagen im Hirnparenchym neurodegenerativ Erkrankter, belegt die Beteiligung der zellulären Immunantwort, die gegen körpereigenes neuronales Gewebe innerhalb des zentralen Nervensystems gerichtet ist (Streilein 1995; Fearon and Locksley 1996; Li, Uccelli et al. 1997; Albert, Darnell et al. 1998; Whitney, Andrews et al. 1999; Albert, Austin et al. 2000; Neumann, Medana et al. 2002; Caspi 2008; Nielsen, Ladeby et al. 2009).

Auslöser von inflammatorischen Vorgängen im ZNS können also gegen neuronale Antigene gerichtete T-Zellen und Autoantikörper aus der Peripherie sein, die Zugang zum zentralen Nervensystem finden und dort erneut von lokalen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), der Mikroglia, reaktiviert werden oder im Fall der Antikörper, direkt an ihre neuronalen Epitope binden. Die Reaktivierung der T-Zellen triggert erneut die Freisetzung inflammatorischer Cytokine und damit die Aufrechterhaltung der Immunreaktion (Abbildung 6).

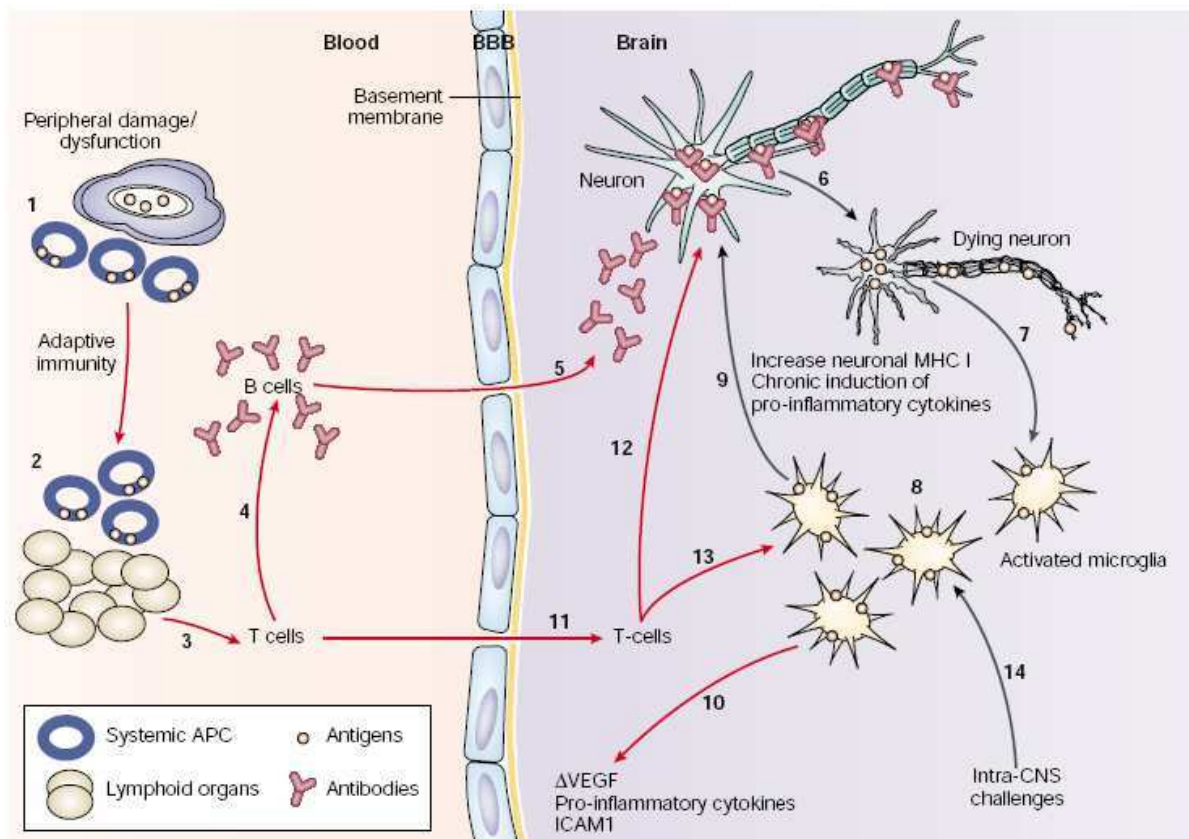


Abbildung 6: Hypothetischer Mechanismus der Neurodegeneration im ZNS unter Beteiligung der angeborenen und adaptiven Immunität

(1) und (2) Schädigungen peripherer Organe führen zur Aktivierung immunologischer Prozesse unter Beteiligung Antigen-präsentierender Zellen (APC). Die APC flottieren zu lokalen Lymphknoten, wo die Aktivierung der adaptiven Immunabwehr erfolgt. (3) und (4) Die folgende klonale Expansion der B-Zellen führt zur Produktion Antigen-spezifischer Antikörper. (5) Diese Antikörper passieren die durchlässige Blut-Hirn-Schranke. (6) Im ZNS binden die Antikörper an neuronale Antigene, stören deren Funktion und verursachen zellulären Stress und schließlich die Apoptose des entsprechenden Neurons. (7) Die Apoptose von Neuronen führt zur Aktivierung der Mikroglia. (8) Aktivierte Mikroglia phagozytiert die apoptotischen Zellen und präsentiert deren Antigene auf ihrer Oberfläche. (9) Mikroglia sezerniert pro-inflammatorische Cytokine. (10) und (11) Erhöhte Titer des „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und des „Intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM 1) führen zu vermehrter Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke, welche zu weiterem Einstrom von T-Lymphozyten führt. (12) und (13) T-Zellen binden neuronale Antigene und aktivieren Mikroglia, was ebenfalls zum Untergang von Neuronen führt. (14) Alternativ können zelluläre Schädigungen oder Pathogene eine chronische Immunantwort der nicht-adaptiven Immunabwehr hervorrufen (Nguyen, Julien et al. 2002).

Phagozyten flottieren zum Ort der Inflammation, endozytieren Zelldebris, präsentieren Fragmente davon in Peptidgröße über den MHC-II-Komplex auf ihrer Oberfläche und aktivieren so erneut die adaptive Immunabwehr. Die adaptive Immunität vermittelt über Antigen-spezifische CD4⁺ T-Helfer-Zellen die Aktivierung und Differenzierung naiver B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen in der Peripherie. Diese Antikörper passieren die Blut-Hirn-Schranke, was ihnen insbesondere unter pathologischen Umständen, aber auch schon bei erhöhtem IOD gelingt (Abbott 2002; Grieshaber and Flammer 2007).

Diese Immunglobuline binden, wie im Fall der α -HSP27-Antikörper, nicht nur an Epitope auf Oberflächen, sondern gelangen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose auch in das Zytoplasma von Neuronen und können diese dadurch in die Apoptose treiben (Yanase, Smith et al. 1997; Tezel and Wax 2000). Das dadurch entstandene Zelldebris wird von den Phagozyten des ZNS, der Mikroglia aufgenommen und als Antigen auch peripheren T-Zellen präsentiert, die ihrerseits eine adaptive Immunantwort gegen neuronale Ziele im ZNS starten.

Ein durch wiederkehrende Cytokinfreisetzung und Antigenpräsentation sich selbst erhaltender Kreislauf ist in Gang gekommen: Die Folge sind Apoptose von Neuronen, zunehmende Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und Hochregulierung des neuronalen MHC-I-Komplexes, was in einer chronischen Aktivierung der angeborenen Immunität und der Etablierung einer adaptiven Autoimmunantwort im ZNS resultiert. Die Induktion des *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM1) und des *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) durch proinflammatorische Cytokine der angeborenen und adaptiven Immunität führt zu einer weiteren Beeinträchtigung der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke, da diese die Passage aktivierter T-Lymphozyten ermöglichen (Nguyen, Julien et al. 2002; Goverman 2009).

Auch in Abwesenheit inflammatorischer Ereignisse im ZNS ist der Übertritt von T-Zellen im subarachnoidalen Raum (SAS) zwischen Blut und Cerebrospinalflüssigkeit jederzeit möglich (Ransohoff, Kivisakk et al. 2003). Dass die Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen im ZNS eine große Rolle spielt, konnte bei M. Alzheimer, der Multiplen Sklerose und der HIV-assoziierten Encephalitis gezeigt werden (Gonzalez-Scarano and Baltuch 1999; Huber, Egleton et al. 2001).

Das Modell des ZNS als immunologisch privilegierter Ort ohne Überwachung durch das adaptive Immunsystem besitzt also, wenn überhaupt, nur noch stark eingeschränkte Gültigkeit und ist davon abhängig, welchen Ort man im zentralen Nervensystem betrachtet (Carson, Doose et al. 2006).

1.2.5 Was trägt die Blut-Hirn-Schranke zur Etablierung neurodegenerativer Prozesse bei?

In vivo- und *in vitro*-Studien belegen einen Zusammenhang zwischen der Infiltration des ZNS durch autoreaktive Leukozyten aus der Peripherie und der Manifestation neurodegenerativer Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose (Minagar, Jy et al. 2006). Dabei scheint eine Protease, die Matrixmetalloprotease 9 (MMP-9), die Passage von Lymphozyten durch das mikrovaskuläre Endothel zu begünstigen, was die erhöhten MMP-9-Titer im Serum von schwer erkrankten MS-Patienten erklären würde (Boz, Ozmenoglu et al. 2006).

MMPs nutzen nicht nur das Endothel als Substrat, vielmehr sind diese Proteasen auch an den Umbauprozessen der extrazellulären Matrix (ECM) in der Retina und im Sehnervenkopf

(ONH) beteiligt, die über die Excavation der Papille mit dem Untergang retinaler Ganglienzellen enden (Hernandez 2000; Guo, Moss et al. 2005; Rodriguez, Morrison et al. 2009).

Vom immunologischen Standpunkt aus wird die Blut-Hirn-Schranke lediglich als Barriere für Lymphozyten angesehen, wobei oft vergessen wird, dass die weitaus wichtigere Aufgabe darin besteht, den ungebremsten Einstrom von Metaboliten und Toxinen aus dem Blut zu verhindern (Ohtsuki 2004; Han and Suk 2005). Die dem Blutstrom zugewandte (luminale) Seite des Endothels besitzt hierfür spezielle Transporter, die den kontrollierten Zustrom von Glucose, Aminosäuren, Vitaminen und Nukleosiden in das ZNS steuern. Umgekehrt weist die abluminale Seite Transporter für potentiell toxische Substanzen, wie exzitatorische Neurotransmitter oder Stoffwechselendprodukte für die Entfernung aus dem ZNS auf. Schon ein kleiner Defekt in der Blut-Hirn-Schranke würde demnach nicht nur den Einstrom von Leukozyten ermöglichen, sondern auch das austarierte „Mikroklima“ des ZNS stören. Die Folgen wären neuronaler Stress und Initiierung einer Immunantwort des ZNS:

Der Aktivierung der Glia, die in einer Gliose münden kann (Nguyen, Julien et al. 2002; Zlokovic 2005).

1.2.6 Woher stammen die neuronalen Antigene in der Peripherie?

Zur Existenz von ZNS-spezifischen neuronalen Antigenen in der Peripherie, und der damit bedingten Existenz von Autoantikörpern, gibt es, neben den bereits erwähnten Kreuzreaktionen, weitere Theorien. So können durch freie Sauerstoffradikale, *Reactive Oxygen Species* (ROS), oxidativ modifizierte oder durch Metalloproteinasen (MMPs) fragmentierte Proteine als Autoantigene dienen (Ram, Sherer et al. 2006; Kurien and Scofield 2008; Cauwe 2009; Rodriguez, Morrison et al. 2009). Beispiele hierfür sind HSP27, HSP70 und HSP90, die als Substrat für die Metalloproteinase MMP-9 dienen. Gegen diese HSPs gerichtete Autoantikörper zeigen beim Glaukom und anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose oder dem Guillain–Barré-Syndrom, im Vergleich zu Gesunden gesteigerte Reaktivitäten (Tezel, Seigel et al. 1998; Yonekura, Yokota et al. 2004; Chiba, Yokota et al. 2006; Cauwe 2009). Andere Autoren führen als Stimulans für die Initiation autoimmuner, gegen das ZNS gerichteter, Mechanismen, wie der bereits besprochenen PND, Tumorerkrankungen an (Albert, Darnell et al. 1998; Musunuru and Darnell 2001).

1.2.7 Der immunologische Homunculus als Abbild des physiologischen Status quo

Der Theorie des *Immunologischen Homunculus* folgend, formen Autoantikörper und autoreaktive T-Lymphozyten ein immunologisches Abbild des physiologischen Status quo, sodass auch jeder Gesunde über ein komplexes Arsenal an autoreaktiven

Immunoeffektorzellen verfügt (Cohen and Young 1991; Nobrega, Haury et al. 1993; Poletaev 2002; Cohen 2007). Abweichungen hiervon spiegeln einen pathologischen Zustand wieder, in dessen Verlauf autoreaktive Immunzellen protektiv und regulierend eingreifen können. Dieses Repertoire an autoreaktiven Komponenten der humoralen und zellulären Abwehr ist bei gesunden Individuen über einen langen Zeitraum stabil und dient unter physiologischen Umständen vermutlich der biochemischen Feintuning, welches die Funktion und Aktivität der Zielmoleküle den jeweiligen Erfordernissen anpasst und so der Aufrechterhaltung der Homöostase dient (Poletaev 2002).

Bei erhöhten Reaktivitäten durch Auto-Antikörper geht man von negativen Folgen durch autoaggressive Prozesse aus, wie man es beispielsweise bei der *Myasthenia gravis* beobachten kann. Hier verhindern α -Acetylcholinrezeptor-Antikörper durch deren Bindung die Weiterleitung der Aktionspotentiale auf die motorische Endplatte (Zimmermann 1987; Vincent, Palace et al. 2001; Hughes 2004; McConville 2004). Wie soll man aber reduzierte Autoantikörperreaktivitäten interpretieren, wie sie speziell bei NTG, in geringerem Maße aber auch bei POAG-Patienten beobachtet werden können (Grus, Joachim et al. 2004)? Womöglich bedeutet hier der Verlust an Autoreaktivität gleichzeitig eine verminderte autoimmune Protektion und damit ein erhöhtes Risiko ein Glaukom zu entwickeln (Grus FH 2008).

1.2.8 Die zwei Gesichter des Komplementsystems

Neben den zellulären Komponenten stellt das Komplementsystem den wichtigsten Bestandteil der angeborenen Immunabwehr dar, die über den sogenannten „Klassischen Weg“, den Lectin-Weg und den alternativen Weg aktiviert werden kann. C1q ist die erste Komponente des klassischen Wegs, der Antikörper-vermittelt oder durch direkte Bindung an der Oberfläche eines Pathogens die Komplementaktivierung einleitet. Im Fall der Bindung von C1q an eine apoptotische Zelle, Pathogen oder Zelldebris (Opsonierung), erfolgt die Aktivierung einer Proteasenkaskade die zur Synthese der Komplementkomponente C3 führt (Gasque 2004). Die Opsonierung mit den C3-Fragmenten C3b und iCb leitet die Eliminierung von Debris über die direkte Aktivierung von C3-Rezeptoren auf Makrophagen und Mikroglia durch Phagozytose ein. Aktiviertes C3 besitzt über die Opsonierungsfunktion hinaus auch die Fähigkeit, die terminalen Komponenten des Komplementsystems zu aktivieren. Dies ermöglicht über die Formierung des *Membrane attack complex* (MAC) die direkte Eliminierung der Zielzelle durch einen lytischen Prozess.

Neben der Abwehr von Pathogenen besitzt die fortlaufende Beseitigung körpereigenen Debris und apoptotischer Zellen einen hohen Stellenwert, denn zum einen können diese im Fall der Aggregation zu einer Gefahr für den Stoffwechsel werden, zum anderen bieten sie dem Immunsystem ein autologes Epitop (Taylor, Carugati et al. 2000). Ist die durch C1q

gesteuerte Neutralisierung körpereigener Antigene gestört, oder fällt C1q ganz aus, kann dies zu einer Fehlleitung des Immunsystems und damit zur Etablierung autoimmuner Prozesse führen, die beispielsweise in einer Manifestation des Systemischen Lupus erythematosus oder einer Glomerulonephritis münden können (Botto, Dell'Agnola et al. 1998). Generell scheint eine Deviation der Komplementaktivierung mit ursächlich zu sein für eine Reihe neurodegenerativer Erkrankungen, wie Schädigung des ZNS durch ischämische Zustände, Multiple Sklerose, M. Alzheimer sowie M. Parkinson (Schafer, Schwaeble et al. 2000; Cowell, Plane et al. 2003; Rancan, Morganti-Kossmann et al. 2003; Yamada, Miwa et al. 2004). Im OHT-Tiermodell (DBA/2-Maus) und Spenderaugen von OHT-Patienten konnten signifikant erhöhte Transkriptionsraten von C1q und C3 nachgewiesen werden, wobei 28 Tage nach OHT-Induktion im Tiermodell eine Häufung von C1q und C3-Transkripten im Bereich der retinalen Ganglienzellen (Pfeil) und des Sehnervenkopfes (ONH) zu verzeichnen war (Abbildung 7) (Kuehn, Kim et al. 2006).

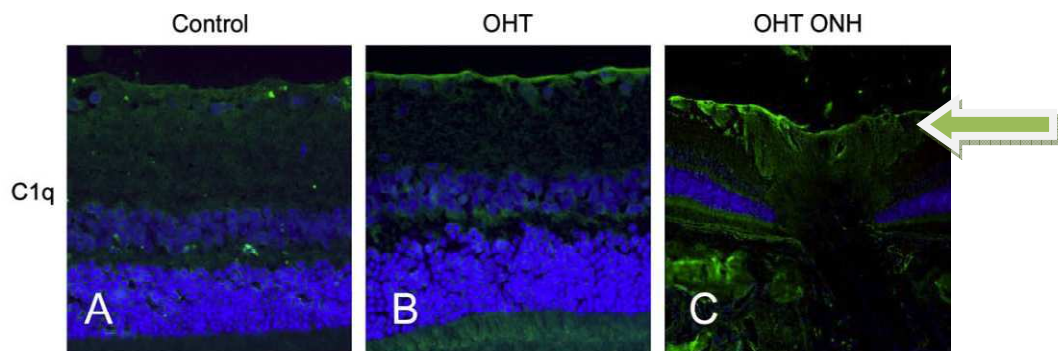


Abbildung 7: Verteilung von C1q-Transkripten in der Retina

Im Vergleich zur Kontrolle (A) zeigen sich bei OHT-Patienten (B) im Bereich der Ganglienzellschicht und des Sehnervenkopfes (ONH, C) starke Hybridisierungssignale für C1q (Pfeil) (Kuehn, Kim et al. 2006).

Diese C1q-Expression korreliert mit der Aktivierung von Gliazellen durch das Komplementsystem, die darauf ihrerseits mit der Sekretion von NO, TNF- α , Hyperoxid (O_2^-), und weiterer Effektorsubstanzen reagieren und so an der Umorganisation des Sehnervenkopfes und dem Untergang retinaler Ganglienzellen beteiligt sind (Hernandez 2000; Tezel and Wax 2000; Neufeld and Liu 2003; Kulkarni, Kellaway et al. 2004; Tezel and Wax 2004). Eine signifikant gesteigerte Apoptoserate unter den retinalen Ganglienzellen bestätigt diesen Befund (Tezel and Wax 2000; Calandrella, Scarsella et al. 2007; Yang, Zhu et al. 2007).

Dies legt den Schluss nahe, dass Neuronen und Synapsen, die nach deren Untergang von Phagozyten beseitigt werden, zuvor mit C1q als für die Beseitigung *getaggt* wurden, was auf einem der klassischen Komplementkaskade basierenden Mechanismus entspricht. Üblicherweise sorgt dieser Mechanismus während der embryonalen Entwicklung und Reifung des ZNS für die Beseitigung überflüssiger Verknüpfungen und Neuronen, sowie für

die Koordination der synaptischen Plastizität im adulten ZNS (Stevens, Allen et al. 2007; Boulanger 2009).

Wo C1q während der embryonalen und einer kurzen postnatalen Reifungsphase des ZNS noch eine Rolle als Eliminator überflüssiger synaptischer Verknüpfungen innehat, ist dessen Expression im adulten zentralen Nervensystem unter physiologischen Bedingungen herunter geregelt. Allerdings kann die Expression von C1q durch Neuronen und Mikroglia unter ischämischen, traumatischen und anderen pathogenen Einflüssen sehr schnell wieder hochgefahren werden. Außer beim Glaukom ist die massive Hochregulierung der C1q-Expression auch bei Morbus Alzheimer und ALS nachgewiesen (Miyahara, Kikuchi et al. 2003; Ahmed, Brown et al. 2004; Dangond, Hwang et al. 2004; Fonseca, Kawas et al. 2004; Stasi, Nagel et al. 2006; Stasi, Nagel et al. 2006; Steele, Inman et al. 2006; Johnson, Jia et al. 2007). Auslöser hierfür könnten reaktive Astrozyten sein, die einen während der neuronalen Reifung des ZNS erforderlichen Mechanismus der C1q-Aktivierung im adulten ZNS zum Pathomechanismus für retinale Ganglienzellen werden lässt (Stevens, Allen et al. 2007). Interessanterweise konzentrieren sich dabei Komplement-Transkripte in der Retina hauptsächlich in jenen Schichten in denen Ganglienzellen und Nervenfasern überwiegen (Abbildung 8).

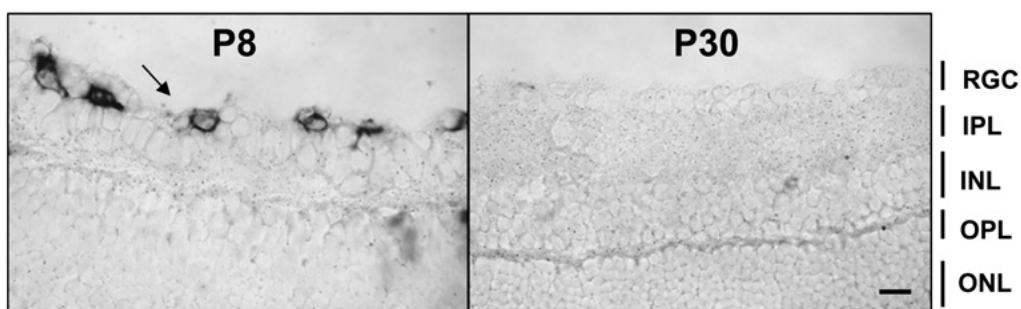


Abbildung 8: Gefrierdünnschnitte postnataler Mausretinae

Zeitpunkte der Probennahme: **P8** = Tag 8 postnatal, **P30** = Tag 30 postnatal. Zu erkennen sind Hybridisierungssignale von C1q bei sich entwickelnden (P8), nicht aber bei gereiften (P30) retinalen Ganglienzellen unter normalen Bedingungen. C1q-Expression ist vorwiegend im Bereich der RGC zu detektieren, wogegen im P30-Schnitt keinerlei Hybridisierungssignal zu erkennen ist. RGC, retinal ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. Maßstab: 20 μm (Stevens, Allen et al. 2007).

Im Bereich der *Lamina cribrosa* sind dagegen keine signifikant erhöhten RNA-Titer nachweisbar, was eine Beteiligung des Komplementsystems an dort stattfindenden pathologischen Prozessen unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Die Formation des MAC in der Ganglienzellschicht, als Folge eines erhöhten IOD, lässt auf die Beteiligung des Komplementsystems an der Entstehung sekundärer degenerativer Prozesse beim Glaukom schließen. Unter sekundären degenerativen Prozessen im ZNS versteht man das Phänomen des Untergangs von Neuronen und Glia in der Nachbarschaft

ischämischer oder traumatischer Läsionen ohne direkte Schädigung (Linnik, Zobrist et al. 1993; Charriaut-Marlangue, Aggoun-Zouaoui et al. 1996; Singhrao, Neal et al. 2000). Astrozyten und Mikroglia schützen sich selbst gegen die cytotoxischen Auswirkungen des MAC durch die Synthese inhibitorischer Substanzen (Singhrao, Neal et al. 1999). Ein sekundärer degenerativer Prozess wird auch beim *Nerve-Crush-Modell* postuliert, jedoch sind die molekularen Mechanismen bis heute ungeklärt.

Beim *Nerve-Crush-Modell* werden die beim Glaukom zu beobachteten neurodegenerativen Prozesse im Tiermodell durch eine Läsion des *N. opticus* simuliert (Yoles and Schwartz 1998; Levkovitch-Verbin, Quigley et al. 2003).

1.3 Autoimmune Mechanismen bei der Manifestation des Glaukoms

Einen ersten Hinweis auf die Beteiligung des Immunsystems bei der Glaukomentstehung lieferte Wax 1998 mit dem Nachweis von Antikörpern im Serum von NTG-Patienten, die gegen körpereigene Antigene, wie das *Heat-Shock-Protein* 60 (HSP-60), gerichtet waren (Wax, Tezel et al. 1998). HSP60 und 90 werden im ZNS konstitutiv exprimiert, wogegen HSP27 und HSP70 hochgradig durch pathologische Zustände induzierbar sind. HSP27-Expression findet in der intakten, ungeschädigten Retina kaum statt (Krueger-Naug, Emsley et al. 2002). Bei zellulärem Stress agieren HSP27 und HSP70 antiapoptotisch, wogegen HSP60 die Induktion der Apoptose fördert (Garrido, Bruey et al. 1999; Garrido, Gurbuxani et al. 2001). Bemerkenswert ist, dass HSP27 und HSP70 auch in der retinalen Glia, den Müller-Zellen, und in Neuronen durch Stressoren wie beispielsweise Ischämie und Hyperthermie stark induzierbar sind (Manzerra, Rush et al. 1993; Currie, Ellison et al. 2000). HSPs überwachen als Chaperone die korrekte Faltung der cytosolischen Proteine und stabilisieren die Actinfilamente des Cytoskeletts (Jakob, Gaestel et al. 1993; Lavoie, Hickey et al. 1993; Lavoie, Lambert et al. 1995; Guay, Lambert et al. 1997). In humanen glaukomatösen Spenderaugen konnte HSP27 in den RGC-Axonon und im Sehnervenkopf detektiert werden (Tezel, Hernandez et al. 2000). In der Retina entfaltet HSP27 seine neuroprotektive Wirkung im Tiermodell nach Axotomie und Ischämie möglicherweise durch die Hemmung von Caspase-3 (Whitlock, Agarwal et al. 2005; Whitlock, Lindsey et al. 2005; Kretz, Schmeer et al. 2006). HSP70 zeigt nach ischämischen Zuständen ebenfalls neuroprotektive Wirkung (Wagstaff, Collaco-Morales et al. 1999; Franklin, Krueger-Naug et al. 2005).

Seit bekannt ist, dass Antikörper durch Endozytose auch in das Cytoplasma intakter Zellen gelangen können, muss insbesondere der Effekt autoreaktiver Immunglobuline auf die zellulären Abläufe berücksichtigt werden (Yanase, Smith et al. 1997; Sisto 2009). Im Fall des HSP27 könnte dies bedeuten, dass α -HSP27-Antikörper durch Bindung dieses neuroprotektive Protein vor vorzeitigem Abbau durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) schützen, zu deren Substraten auch HSPs gehören (Ram, Sherer et al. 2006; Cauwe 2009).

Eine im Vergleich zu gesundem Gewebe signifikant erhöhte Konzentration von MMPs in glaukomatösen Retinae würde für diese protektive Rolle der α -HSP27-Antikörper sprechen (Yuan and Neufeld 2001). Gleichzeitig hemmt diese Antikörperbindung aber die neuroprotektive Aktivität von HSP27 und führt damit unmittelbar zu einer erhöhten Apoptoserate retinaler Ganglienzellen beim Glaukom (Tezel and Wax 2000). Ratten, die mit HSP-27 immunisiert wurden, wiesen im Vergleich zu Kontrolltieren eine höhere Apoptoserate unter den retinalen Ganglienzellen auf, wobei der Verlust nahe der *Area centralis* am höchsten war. Auch bei NTG-Patienten geht man in diesem Bereich der Retina von der größten Schädigung aus (Tezel, Seigel et al. 1998; Wax, Yang et al. 2002).

Die Tatsache, dass Antikörper gegen Bestandteile der Retina oder des Sehnervenkopfes eine Rolle in der Pathogenese der glaukomatösen Optikusneuropathie spielen, stimmt mit Befunden bei anderen Neuropathien überein.

Bei der Multiplen Sklerose (MS), der Myasthenia gravis und dem Guillain-Barré-Syndrom konnten gegen neuronale Strukturen gerichtete Autoantikörper nachgewiesen werden und an der Manifestation des Lupus erythematoses sollen α -C1q-Antikörper beteiligt sein (Kornberg and Pestronk 1993; Genein 1999; Hughes 2004; Lennon, Wingerchuk et al. 2004; Schaller, Bigler et al. 2009). Beim Devic's Syndrom, der Neuromyelitis optica verwischen sogar die Grenzen zwischen einer klassischen Multiplen Sklerose und einer Neuropathie des Sehnerven, da neben diesem auch Spinalnerven angegriffen werden. Diese Erkrankung wird in der Regel als MS fehldiagnostiziert (Lennon, Wingerchuk et al. 2004).

Leider sind beim Auftreten einer Autoimmunerkrankung nicht grundsätzlich erhöhte Titer autoreaktiver Antikörper wie beim systemischen Lupus erythematoses zu beobachten. So sind Patienten dokumentiert, die an Myasthenia gravis leiden, jedoch keine Antikörper gegen körpereigene Acetylcholinrezeptoren entwickeln (Vincent, Palace et al. 2001). Allerdings findet man bei vielen solcher "seronegativen" Patienten Autoantikörper gegen ein weiteres neuromuskuläres Protein des synaptischen Spaltes, der „Muskelspezifischen Kinase“ MuSK (John McConville 2004). Auch beim Glaukom sind solche Divergenzen im Antikörperrepertoire dokumentiert. Maruyama detektierte bei etwa 20% aller in einer Studie untersuchten Glaukomkranken Antikörper gegen neurospezifische γ -Enolase, ein für die Glykolyse wichtiges Enzym.

Im gesunden Kontrollkollektiv wiesen nur 10% der Untersuchten diese Antikörper auf, wogegen bei den Glaukom-Patienten mit dem erhöhten γ -Enolase-Antikörper-Titer keine der sonst häufig bei Glaukomkranken detektierten erhöhten Autoantikörpertiter gegen Rhodopsin, α -Kristallin oder HSP-60 nachgewiesen werden konnten (Meyerhof and Lohmann 1934; Romano, Barrett et al. 1995; Tezel, Seigel et al. 1998; Maruyama, Ohguro et al. 2000; Tezel, Hernandez et al. 2000).

Die Analyse komplexer Antikörper-Repertoires bei Autoimmunerkrankungen wird dadurch erschwert, dass man auch im Blut von Gesunden natürlich vorkommende Autoantikörper gegen körpereigene Strukturen nachweisen kann (Avrameas and Ternynck 1995). Allen bisherigen Untersuchungen ist gemeinsam, dass Antikörperprofile systemisch im Blut der Glaukom-Patienten untersucht wurden. Eine Untersuchung des Proteinprofils im Auge selbst, dort wo sich die Erkrankung manifestiert, ist daher naheliegend. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Kammerwasser selbst immunkompetente Eigenschaften besitzt (Mochizuki, Sugita et al. 2000).

1.3.1 Wie kann es zur Entstehung autoreaktiver Prozesse kommen?

Die Triggerung autoaggressiver Mechanismen kann durch Kreuzreaktivität, molekulare Mimikri von Mikroorganismen, oxidativen Stress und Modifikationen körpereigener Strukturen durch Proteasen hervorgerufen werden (Wucherpfennig, Weiner et al. 1991; Ram, Sherer et al. 2006; Kurien and Scofield 2008; Cauwe 2009; Rodriguez, Morrison et al. 2009). Yang et al. fanden im Serum von Glaukom-Patienten (NTG und POAG) eine erhöhte Konzentration an Interleukin 2 (Yang, Patil et al. 2001). IL-2 wird von T- Zellen produziert und steigert die Produktion von weiteren Zytokinen und Antikörpern. Des Weiteren konnte mittels Proliferationstest nachgewiesen werden, dass die T-Lymphozyten von POAG und NTG-Patienten eine verminderte Reaktion auf unspezifische Antigene zeigten.

1.3.2 Das zentrale Nervensystem reagiert bei Schädigungen mit der Induktion von Reparaturprozessen

Zu den neuroprotektiven Prozessen, die durch inflammatorische Prozesse wie einer Astrogliose initiiert werden, gehören die Produktion von Neutrophinen, Freisetzung von Antioxidantien, Bindung überschüssigen Glutamates, Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke, Förderung von Neovaskularisation und Remyelinisation, Förderung axonaler Regeneration und synaptische Remodellierung (Represa, Niquet et al. 1995; Wilson 1997; Privat 2003; Liberto, Albrecht et al. 2004). Die durch eine Gliose induzierbare Narbenbildung hingegen kann all diese neuroprotektiven Maßnahmen torpedieren und somit die neuronale Regeneration verhindern (Bovolenta, Wandosell et al. 1992; Pekny, Johansson et al. 1999; Pekny 2004; Profyris, Cheema et al. 2004).

Hierbei scheinen die gliotischen Prozesse in Gehirn und Retina ähnlich zu verlaufen, wobei die im Gehirn dominierenden Astrozyten in der Neuroretina durch Müller-Zellen repräsentiert werden (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Die Gliose und die damit verbundene Ausschüttung von Zytokinen wird nicht nur bei sekundären neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, beobachtet. Charakteristisch sind diese Mechanismen auch für primäre neurodegenerative Erkrankungen wie M. Alzheimer, M. Parkinson, Chorea Huntington und ALS. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α

werden bei einer Aktivierung durch Mikroglia ausgeschüttet und zeigen im Tiermodell zunächst ein großes Zerstörungspotential in Form einer erhöhten Apoptoserate, der allerdings eine temporäre Freisetzung neurotrophischer Faktoren folgt. *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und *Insulin-like growth factor 1* (IGF1), sind Neurotrophine, die bei Reparaturprozessen im ZNS zu Einsatz kommen (Nguyen, Julien et al. 2002). TNF- α , ein Zytokin, welches klassischerweise seine Rolle in der angeborenen Immunität bei der Induktion inflammatorischer Prozesse erfüllt, scheint dabei pleiotrope Eigenschaften zu besitzen. Im postmitotischen ZNS ist durch Glia sezerniertes TNF- α an der Steuerung der synaptischen Plastizität beteiligt (Stellwagen and Malenka 2006).

Allerdings ist ein möglicher Zusammenhang zwischen Komponenten der angeborenen Immunität und der Manifestation neurodegenerativer Erkrankungen noch nicht aufgeklärt. Der auf Gliazellen neu identifizierte TREM-2-Rezeptor könnte hierbei eine direkte Verbindung zwischen angeborener Immunität und Neurodegeneration darstellen. TREM-2 scheint an der phagozytotischen Steuerung der Glia und damit an der Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS beteiligt zu sein (Biber, Neumann et al. 2007; Neumann and Takahashi 2007; Takahashi, Prinz et al. 2007; Napoli and Neumann 2009; Walter and Neumann 2009). Patienten, die über einen nicht-funktionellen TREM-2-Rezeptor verfügen, entwickeln durch die fehlende Beseitigung apoptotischer Zellen und Zell-Debris neurodegenerative Erkrankungen (Colonna 2003). Die Phagozytose durch die Mikroglia wird dabei über Signale gesteuert, die sie aus ihrer Umgebung empfängt. Zu den hierfür erforderlichen Rezeptoren gehören neben TREM-2 auch Scavenger-Rezeptoren, TLRs zur Erkennung von Pathogenen und Rezeptoren, die das für die Oberfläche apoptotischer Zellen charakteristische Phosphatidylserin (PtdSer) binden können (Abbildung 9).

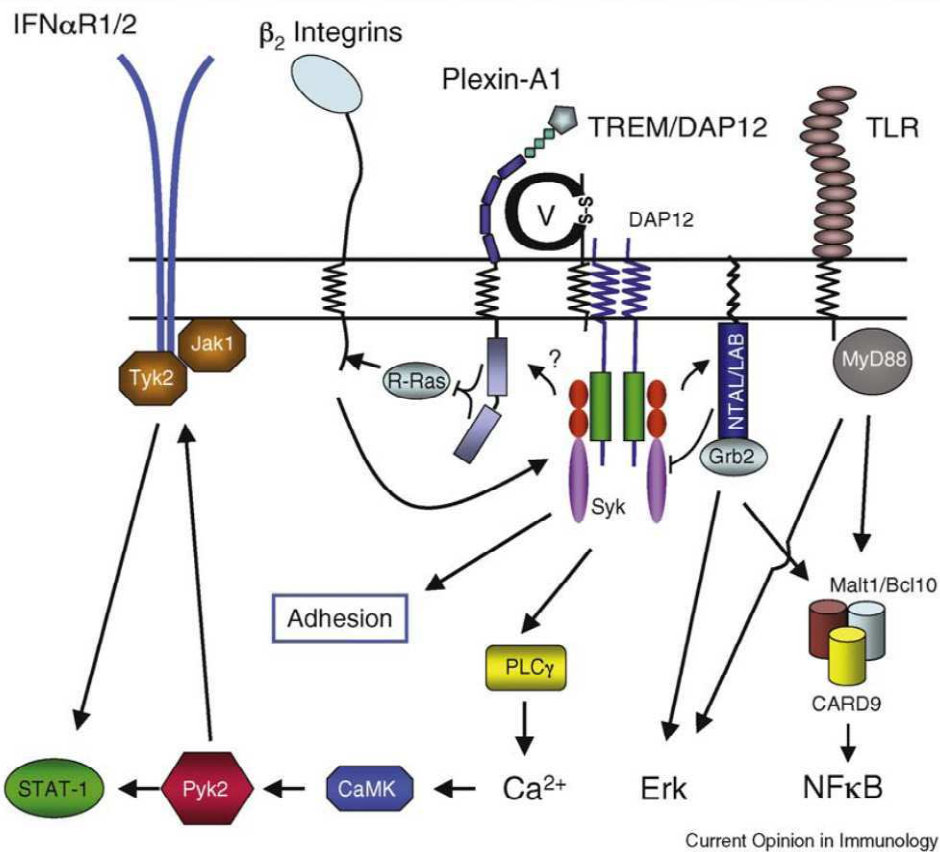


Abbildung 9: Potentielle Signalkaskade des TREM- Rezeptors

Extrazelluläre Aktivierung von TREM, der mit dem Adapterprotein DAP-12 konjugiert ist führt, zur Phosphorylierung der cytoplasmatischen DAP12-Domäne, ITAM (grüne Rechtecke) und der Aktivierung der Kinase Syk. Sowohl TREM-1 als auch TREM-2 führen zur Syk-vermittelten Phosphorylierung des Adaptermoleküls NTAL/LAB, welches eine hemmende Funktion auf die vom TREM kommenden Aktivierungsreize ausübt. Obwohl die Art der Interaktion zwischen TREM und TLR bislang ungeklärt sind, können beide über den Malt1/Bcl10/CARD9-Komplex NF-κB aktivieren. Die Aktivierung des Integrin-Rezeptors kann ebenfalls zu einer Phosphorylierung von DAP12 führen, wobei nicht geklärt ist, ob es sich dabei um TREM-assoziiertes DAP12 handelt (Ford and McVicar 2009).

Ob die Glia-Zelle nach erfolgter Phagozytose pro- oder antiinflammatorische Mediatoren freisetzt, legt dabei die Art des aktivierten Rezeptors und damit die Eigenschaften des Epitopes fest. Apoptotische Neuronen erleichtern den Glia-Zellen ihre Arbeit als Phagozyten durch die Freisetzung von Chemoattraktanten, wie ATP und Uridin-Triphosphat (UTP). Mikroglia reagiert darauf mit der Expression des metabotropen P2Y6 –Rezeptors (Abbildung 10) (Koizumi, Shigemoto-Mogami et al. 2007).

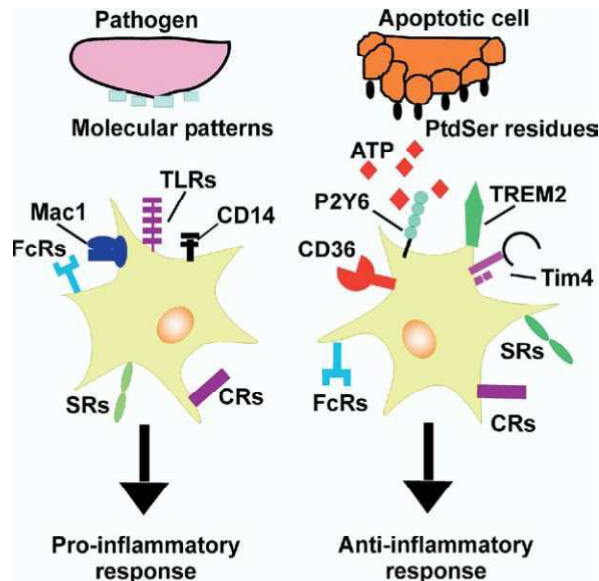


Abbildung 10: Das Rezeptorrepertoire der Mikroglia

Mikroglia exprimiert an ihrer Oberfläche Rezeptoren, die entweder zu pro- oder anti-inflammatorischen Prozessen führen. Dabei erkennt Mikroglia charakteristische Epitope der meisten mikrobiellen Pathogene via TLR, Complement-Rezeptoren (CRs), Fc-Rezeptoren (FcRs) oder Scavenger-Rezeptoren (Srs) und reagiert mit der Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine. PtdSer, welches auf den Membranen apoptotischer Zellen exprimiert wird, kann durch den Tim4-Rezeptor erkannt werden. Unterstützt wird die Glia-Zelle durch die weiteren phagozytotischen Rezeptoren P2Y6 und TREM2. Die Phagozytose apoptotischer Zellen führt zur Freisetzung anti-inflammatorischer Cytokine (Napoli and Neumann 2009).

1.3.3 Die Gliose besiegelt das Schicksal retinaler Ganglienzellen beim Glaukom

Wie bereits geschildert kann eine Aktivierung der Glia sowohl protektive als auch destruktive Folgen haben. So trifft letzteres in der Retina insbesondere auf das Schicksal retinaler Ganglienzellen zu (Wang, Tay et al. 2000; Tezel and Wax 2003; Steele, Inman et al. 2006). Zu den neuroprotektiven Faktoren, mit denen retinale Müller-Zellen zum Überleben retinaler Ganglien-Zellen beitragen, gehören die Expression des antiapoptotischen Proteins *bcl-2* und die Sezernierung neurotropher Faktoren (Di Polo, Aigner et al. 1998; Woldemussie, Wijono et al. 2004).

Experimentell kann man eine Aktivierung der Glia durch eine Erhöhung des IOD induzieren, wobei Müller-Zellen mit mindestens drei gliotischen Antworten reagieren: Zelluläre Hypertrophie, Proliferation und gesteigerte Expression der intermediären Filamente Nestin, Vimentin und dem *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Die Hochregulierung von GFAP kann hierbei in seiner Eigenschaft als *Retinal stress indicator* als Biomarker für retinale Schädigung und Müller-Zell-Aktivierung dienen (Bignami and Dahl 1979; Johnson, Deppmeier et al. 2000; Wang, Tay et al. 2000; Bringmann and Reichenbach 2001; Naskar, Wissing et al. 2002; Lewis and Fisher 2003; Bringmann, Pannicke et al. 2006).

In einem Glaukom-Tier-Modell, der DBA/2J-Maus, führt ein anwachsender IOD zur Gliose inklusive mikroglärer Proliferation in der Retina und sich anschließendem progressivem Untergang retinaler Ganglienzellen (Inman and Horner 2007). Diese Phänomene korrelieren zeitlich und topografisch mit der Herunterregulierung neuronaler Marker, was eine Beteiligung der Glia an neurodegenerativen Prozessen beim Glaukom nahelegt. (Abbildung 11) (Johnson and Morrison 2009).

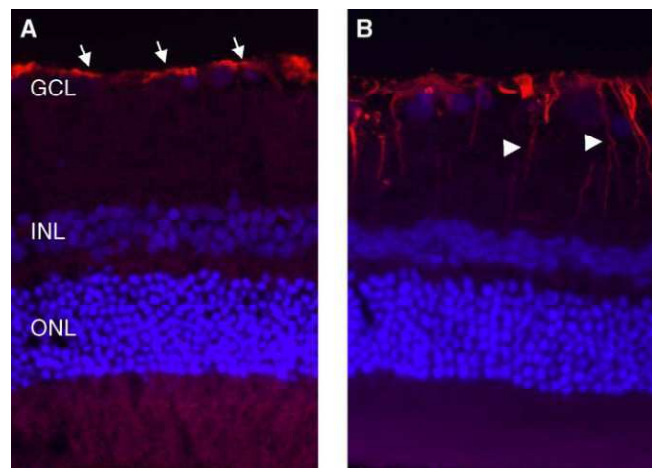


Abbildung 11: Distribution von GFAP in der Retina

Immunohistochemische Detektion von GFAP in normaler (A) und glaukomatöser (B) Ratten-Retina. In der gesunden Retina kann GFAP lediglich in den Astrozyten (Pfeile) nachgewiesen werden. Eine Erhöhung des IOD induziert die GFAP-Synthese durch Müller-Zellen (Dreiecke). GCL: Ganglion cell layer, INL: Inner nuclear layer, ONL: Outer nuclear layer (Kuehn, Fingert et al. 2005).

Mit der Aktivierung der Glia geht die Freisetzung von Effektorsubstanzen wie dem NO einher, was neben einer vasodilatativen Wirkung in hohen Konzentrationen eine cytotoxische Wirkung besitzt und aufgrund dieser Eigenschaft von Gliazellen zur Abwehr freigesetzt wird (Murad 1986; Banati, Gehrman et al. 1993). Da hierbei auch benachbarte Ganglienzellen in Mitleidenschaft gezogen werden, spielen erhöhte NO-Konzentrationen erwiesenermaßen eine Rolle bei der Pathogenese des Glaukoms (Neufeld, Sawada et al. 1999; Shareef, Sawada et al. 1999; Liu 2000; Liu and Neufeld 2001; Neufeld and Liu 2003; Zhong, Leung et al. 2007). *Nitric oxide synthase-2* (NOS-2), welches die Synthese von NO katalysiert, wird durch Verletzungen und über zirkulierende Cytokine, wie sie durch aktivierte Glia freigesetzt werden, induziert (Nathan and Xie 1994; Wallace and Bisland 1994).

1.4 Oxidativer Stress: Proteinoxidation und Aggregatbildung ebnet den Weg zur Apoptose

Mehr als alle anderen Organe und Gewebe unterliegt das postmitotische ZNS und damit das visuelle System den pathophysiologischen Prozessen der Alterung. Nach heutigem Kenntnisstand ist hauptsächlich oxidativer Stress, verursacht durch ROS ursächlich für altersbedingte degenerative Prozesse. ROS entstehen im Zellstoffwechsel als Nebenprodukt der Atmungskette und fallen somit an Orten mit besonders hoher Metabolismusrate, wie dem zentralen Nervensystem, in besonders großen Mengen an. In der Retina führt oxidativer Stress zu Proteinoxidationen, die bei Akkumulation und Aggregatbildung vom Proteasom nicht mehr abgebaut werden können (Glickman and Ciechanover 2002; Sakamoto 2002; Golab, Bauer et al. 2004; Dorval and Fraser 2007; Buchakjian 2010). Wie β -Amyloid-Plaques bei Morbus Alzheimer und Lewy-Körper bei Morbus Parkinson ihre verheerenden Wirkungen entfalten, so führen Proteinaggregate auch bei retinalen Ganglienzellen zum Untergang (Selkoe 2002; Kruger, Fischer et al. 2003; Xu, Chen et al. 2009). Neuere Erkenntnisse belegen zudem, dass zwischen Zell-Metabolismus und zelleigener Zellzyklus / Apoptose-Maschinerie eine enge Rückkopplung besteht und eine Störung des Zellstoffwechsels, durch ROS oder andere Stressoren, weitaus unmittelbarer in die Apoptose führen kann als bislang angenommen (Braun, Büttner et al. 2009; Buchakjian 2010)

1.4.1 Oxidative Schädigungen der DNA postmitotischer Zellen

Oxidative Schädigungen der DNA, die zu Strangbrüchen führen, werden in der Regel durch DNA-Reparaturmechanismen behoben, können aber auch, wie in einem Glaukom-Tiermodell gezeigt, zur Apoptose von Ganglienzellen führen (Collins, Ai-guo et al. 1995; Garcia-Valenzuela, Shareef et al. 1995). Die Telomeren, die ihre eigene Schutzeinrichtung, den Shelterinkomplex besitzen, spielen in postmitotischen Zellen wie den Neuronen eine Schlüsselrolle bei degenerativen Prozessen (Ye, Donigian et al. 2004; Ye, Donigian et al. 2004; de Lange 2005; Fu and Collins 2007; Zhang, Dilley et al. 2007; Sarthy, Bae et al. 2009). Mitochondrielle DNA (mtDNA), die durch ihre direkte Nachbarschaft zur inneren Mitochondrienmembran, den oxidativen Nebenprodukten der Atmungskette unmittelbar ausgeliefert ist, besitzt nach neueren Erkenntnissen einen Reparaturmechanismus, der weniger effektiv als der der Kern-DNA zu arbeiten scheint. Die Folge sind Häufung genetischer Mutationen und mitochondrielle Dysfunktionen (Gredilla, Bohr et al. 2010). Ob diese, wie oft behauptet, zwangsläufig zu einer Zunahme der ROS-Produktion führen, ist bislang nicht bewiesen (Duchen 2004; Trifunovic and Larsson 2008). Erwiesen ist dagegen, daß zumindest bei einem Teilkollektiv der Glaukompatienten, eine mitochondrielle Dysfunktion für den Untergang retinaler Ganglienzellen verantwortlich gemacht werden kann (Carelli, Ross-Cisneros et al. 2004; McKenzie, Liolitsa et al. 2004; Abu-Amero, Morales et al. 2006).

1.5 Die Abhängigkeit retinaler Ganglienzellen von der Neutrophinversorgung

Ein erhöhter Augeninnendruck gehört zu den Hauptrisikofaktoren beim Glaukom, was vor allem mit einer Unterversorgung durch für die zelluläre Ernährung zuständigen Neutrophine zusammenhängen dürfte. Dies legen Untersuchungen im Tiermodell nahe, bei denen durch den Zusammenbruch des axonalen Transports die Versorgung mit Neutrophinen ausbleibt (Minckler, Bunt et al. 1977; Quigley, McKinnon et al. 2000). Retinale Ganglienzellen sprechen auf eine Vielzahl verschiedener Neutrophine, hauptsächlich aber auf *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *Ciliary nerve trophic factor* (CNTF), *Glial-cell derived neurotrophic factor* (GDNF) und *Nerve growth factor* an (Mansour-Robaey 1994; Sawai, Clarke et al. 1996; Klöcker 1997; Jian-Zhong Ji 2004; Zweifel, Kuruvilla et al. 2005). Im Tiermodell wie auch in der Zellkultur konnten die neuroprotektiven Effekte dieser trophischen Faktoren dokumentiert werden (Meyer-Franke, Kaplan et al. 1995; Weibel, Kreutzberg et al. 1995). Wie andere Neutrophine auch, werden NGF und BDNF durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zielzelle aufgenommen. Bindungspartner sind hier die hochaffinen Rezeptoren *trkA* für *NGF* und *trkB* für *BDNF*, sowie ein weiterer niederaffiner Rezeptor, *p75NTR*, an den alle übrigen Neutrophine binden.

Der Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes folgt der retrograde Transport zum Soma des Neurons, der durch die G-Proteine Rabenosyn 1 und 5 (*Rab1 und Rab5*) koordiniert wird (Nielsen, Severin et al. 1999; Nielsen, Christoforidis et al. 2000; Schnatwinkel, Christoforidis et al. 2004; Eathiraj, Pan et al. 2005; Shin, Hayashi et al. 2005; Valdez, Philippidou et al. 2007).

Immunhistochemische Untersuchungen belegen, dass Beeinträchtigungen des Neutrophintransports vom visuellen Thalamus zum Soma der retinalen Ganglienzellen mit deren Untergang durch Apoptose enden (Quigley, Nickells et al. 1995; Pease, McKinnon et al. 2000; Quigley, McKinnon et al. 2000). Vergleichbare Folgen haben Schädigungen des *Nervus opticus* im Tiermodell durch den *Optic-Nerve-Crush* (Allcutt, Berry et al. 1984; Nickells 1996).

Wie aber sieht der Pathomechanismus aus, der durch einen erhöhten IOD zum Untergang retinaler Ganglienzellen führt? Hierbei scheint die *Lamina cribrosa sclerae*, durch die der *Nervus opticus*, sowie die *Arteria* und *Vena centralis retinae* in den *Bulbus oculi* eintreten, eine Schlüsselrolle zu spielen, da sie der mechanisch am schwächsten ausgebildete Bestandteil der Sclera ist. Durch einen erhöhten IOD kommt es, an der Eintrittsstelle des *N. opticus* in die Retina, der *Papilla nervi optici* (Papille), zu einer Excavation, was zu einer mechanischen Belastung der *Lamina cribrosa sclerae* und dem Umbau ihrer extrazellulären Matrix führt (Fukuchi, Ueda et al. 2001). Durch Färbeversuche an RGC-Axonon frisch explantierter Augen konnten Morgan et al. den Weg der einzelnen Axone durch die *Lamina cribrosa* dokumentieren.

Dabei fiel auf, dass die meisten Axone in Bündeln einen direkten Weg durch die *Lamina* in Richtung Sehnervenkopf nehmen, andere, etwa 8-12 %, sich jedoch zwischen den kollagenösen Platten der *Lamina cribrosa sclerae* hindurch zwängen. Bei einer Kompression der Lamina sind es diese Axone, die mechanisch besonders belastet werden (Morgan, Jeffery et al. 1998). Versuche mit Primaten zeigen, dass der retrograde und anterograde neuronale Transport in glaukomatösen Augen genau an dieser Stelle gestört oder sogar unterbrochen wird (Minckler, Bunt et al. 1977; Radius and Anderson 1981; Dandona, Hendrickson et al. 1991; Pease, McKinnon et al. 2000; Quigley, McKinnon et al. 2000; Pena, Agapova et al. 2001; Bellezza, Rintalan et al. 2003). Injektionsversuche in den Glaskörper des Auges von Ratten zeigten einen neuroprotektiven Effekt von BDNF auf retinale Ganglienzellen, nachdem der Sehnerv durchtrennt wurde (Di Polo, Aigner et al. 1998). In Folgestudien wurden statt BDNF-Injektionen Expressionsvektoren eingesetzt, wobei die Ergebnisse vergleichbar sind (Martin, Quigley et al. 2003).

1.5.1 Das Risiko ischämischer Zustände im ZNS

Risikofaktoren, wie erhöhter IOP, Unterversorgung der Neuronen mit Neurotrophinen, Glutamat-assoziierte Neurotoxizität, Ischämie und Vasospasmen werden für den Untergang retinaler Ganglienzellen verantwortlich gemacht, wobei auch einige nichtokuläre Erkrankungen, wie Migräne oder das Raynaud Phänomen mit Vasospasmen in Zusammenhang gebracht werden (Gasser 1989; Broadway and Drance 1998). Individuen mit Vasospasmen entwickeln überdurchschnittlich häufig ein Normaldruck-Glaukom, was durch die resultierende verminderte Durchblutung des Sehnerven, also ischämische Zuständen, zu erklären sein könnte. Beobachtungen von Mulligan belegen die Freisetzung vasoaktiver Peptide durch aktivierte Astrozyten. Die Folgen sind Konstriktion regionaler Kapillaren und ischämische Zustände. Dieser Effekt tritt insbesondere bei zellulärem Stress und erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf (Mulligan and MacVicar 2004). Ischämische Zustände, wodurch auch immer hervorgerufen, sind einer der Hauptfaktoren für die Überexpression exzitatorischer Aminosäuren, wie beispielsweise dem Glutamat (Nickells 1996).

1.5.2 Die Zytotoxizität des Glutamates führt zum Untergang retinaler Ganglienzellen

Dass Glutamat in erhöhten Konzentrationen neurotoxisch auf die Zellen der Retina wirkt, haben Lucas & Newhouse durch Glutamatinjektionen in die Augen von Mäusen schon vor Jahrzehnten gezeigt (Lucas and Newhouse 1957). Unter physiologischen Bedingungen wird nach einer Erregung freigesetztes Glutamat durch Astrozyten schnell wieder abgebaut (Drejer, Larsson et al. 1982). Bei Verletzungen und ischämischen Zuständen des ZNS scheint dieser Mechanismus unterbrochen zu sein. Erhöhte extrazelluläre Glutamat-

Konzentrationen enden mit dem Untergang von Nervenzellen im Rückenmark und im Gehirn (Choi and Rothman 1990).

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS. Es bindet an metabotropen, sowie an ionotropen Rezeptoren, wobei die postsynaptischen ionotropen N-methyl-D-aspartate (NMDA)-Rezeptoren für die exzitotoxischen, d.h. neurotoxischen Effekte verantwortlich gemacht werden (Choi 1988). Die aus erhöhter extrazellulärer Glutamatkonzentration resultierende Aktivierung der NMDA-Rezeptoren führt zu einem unphysiologisch erhöhten Ca^{2+} -Influx, der letztlich mit dem Untergang des Neurons durch Apoptose endet. Das Neuron wird quasi zu Tode erregt. Dass Glutamat die Entstehung eines Glaukoms fördern kann, wird durch Beobachtungen von Vorwerk bestätigt (Vorwerk, Lipton et al. 1996; Vorwerk, Naskar et al. 2000). Weiterführende Untersuchungen konnten allerdings die pathogene Rolle des Glutamats beim Glaukom nicht bestätigen. Honkanen fand im Kammerwasser von Glaukom-Patienten keine erhöhten Glutamat-Konzentrationen (Honkanen, Baruah et al. 2003). Ullian et al. dokumentierte an retinalen Ganglienzellen (RGC) der Ratte deren Unempfindlichkeit gegenüber erhöhten extrazellulären Glutamat-Konzentrationen. Eine Erklärung dafür könnte die Lokalisation der NMDA-Rezeptoren in den RGC sein, da diese außerhalb des synaptischen Spalts liegen und dadurch vor überhöhten Glutamatkonzentrationen verschont werden (Ullian, Barkis et al. 2004).

1.6 Resümee des derzeitigen Kenntnisstands

Eine alleinige Ursache, wie ein erhöhter IOD, als Auslöser für eine Glaukomerkrankung scheint es nicht zu geben. Vielmehr muß man von mehreren, miteinander wechselwirkenden Pathomechanismen ausgehen, an deren Anfang zellulärer Stress steht, der entweder durch einen erhöhten IOD, durch ischämische und damit hypoxische Zustände oder eine gestörte Neutrophinversorgung hervorgerufen wird. Da es sich bei retinalen Ganglienzellen um Neuronen mit enorm hoher Metabolismusrate handelt, führt jede Deviation des Stoffwechsels schnell zu oxidativem Stress, Exzitotoxizität und einer Aktivierung der angeborenen Immunität, der Glia. Die Glia reagiert ihrerseits mit der Ausschüttung von Cytokinen, $\text{TNF-}\alpha$ und NO. Oxidativer Stress führt zur Schädigung zellulärer Bestandteile und zur Generierung von Autoantigenen. Gliaaktivierung und oxidativer Stress provozieren die Apoptose retinaler Ganglienzellen, die Freisetzung retinaler Antigene und der Aktivierung der adaptiven Immunantwort.

Die Folge sind die Etablierung umfangreicher degenerativer Prozesse im Sehnervenkopf, unter den retinalen Ganglienzellen und den Axonen des Sehnerven (Abbildung 12).

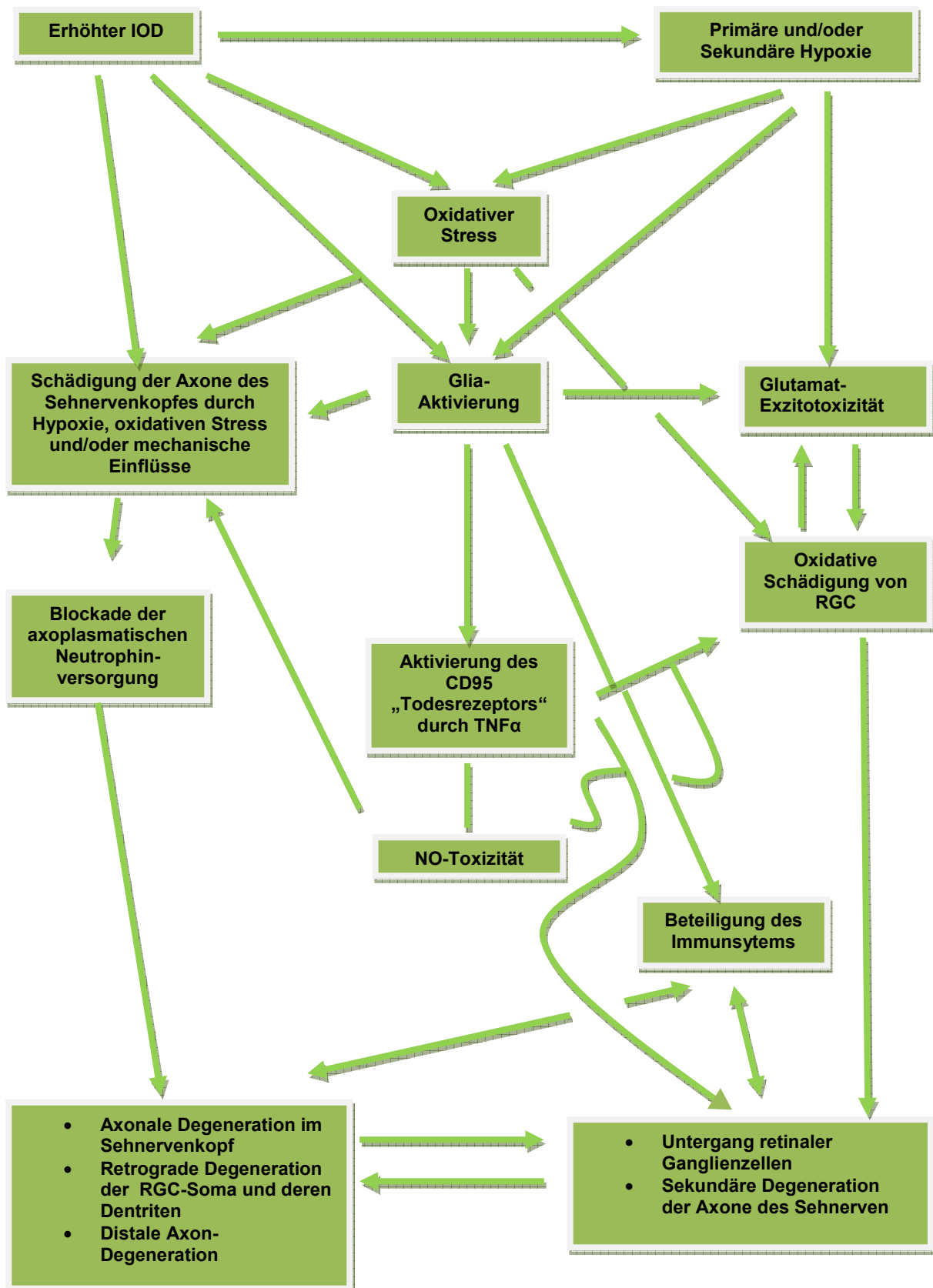


Abbildung 12: Zusammenfassung aller bekannten Faktoren und Mechanismen, die beim Glaukom über das Schicksal der RGC bestimmen

2 Zielsetzung der Arbeit

Proteine und Peptide spielen eine Schlüsselrolle für die Homöostase im menschlichen Körper und stellen in ihrer Gesamtheit das Proteom des betreffenden Organismus dar. Das Proteom entspricht dabei dem Gegenstück des Genoms, ist aber im Gegensatz dazu nicht statisch, sondern hochdynamisch. Es reagiert auf äußere und innere Stimuli, ist abhängig von der Tageszeit und den an dessen Entstehung beteiligten Zelltypen. An einem bestimmten Zeitpunkt repräsentiert das Proteom lediglich einen Teil aller möglichen Genprodukte und kann deshalb nicht durch die schlichte Übersetzung der genomischen Basensequenzen definiert werden. Überdies kann jedes einzelne Protein in Abhängigkeit von Zelltyp, posttranslationalen Modifikationen und Abbauprozessen in zahlreichen Varianten auftreten, die dessen Struktur, Lokalisation und Funktion beeinflussen (Anderson and Anderson 2002). In der labormedizinischen Diagnostik spielt daher das Proteom eine immer größere Rolle. Spezifische Veränderungen des Proteoms, die statistisch signifikant mit einer Erkrankung korrelieren, werden als Biomarker für Diagnose und Verlaufskontrollen eingesetzt und kommen heute in erster Linie bei der Tumordiagnostik in Form sogenannter Tumormarker zum Einsatz (Petricoin, Ardekani et al. 2002; Kolch, Mischak et al. 2005; LaBaer 2005; Srivastava and Srivastava 2005; Vitzthum, Behrens et al. 2005). Die größte Herausforderung bei der Identifizierung neuer Biomarker ist vor allem analytischer Natur. Albumin zum Beispiel liegt im Blut in millimolaren Konzentrationen vor, wogegen viele physiologisch interessante Cytokine oder durch pathologische Prozesse modifizierte Proteine nur in Konzentrationen im Nano -bis Pikomol-Bereich nachweisbar sind. Dazu stellen lediglich zehn Proteine, die *high-abundant-Proteins*, insgesamt 95% der Masse aller Plasmaproteine dar (Castagna, Cecconi et al. 2005).

Ausgangspunkt für die Suche, Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Biomarkern ist das massenspektroskopische Proteinprofiling von Serum -und Tränenproben unter Einsatz der *Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight* SELDI-TOF® (Bio-Rad, Hercules, USA). Dieses Profiling wird im Forschungslabor der Augenklinik Mainz routinemäßig und unter Einsatz großer Patientenkollektive, durchgeführt. Dabei ermöglicht die hohe Zahl der zur Verfügung stehenden Patientenproben die Generierung signifikanter Biomarkerkandidaten. Diese sind Proteinsignale, die im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, im Glaukomkollektiv bezüglich der realtiven Intensität, erhöht oder erniedrigt erscheinen, somit von der Norm abweichen und in Beziehung mit den pathologischen Prozessen beim Glaukom stehen könnten. Um diese namenlosen Signale als potentielle Biomarker einsetzen zu können müssen diese benannt werden! Hier setzt diese Arbeit an: Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen diese Biomarker-Kandidaten im Proteom wiederzufinden, zu isolieren und eindeutig zu identifizieren.

Damit soll diese Arbeit dazu beitragen, die pathogenen Mechanismen der Glaukomerkrankung zu entschlüsseln, um dadurch neuartige diagnostische Verfahren und Behandlungsmethoden zu ermöglichen.

Berücksichtigt werden muss in diesem Zusammenhang die Wahl und Verfügbarkeit des Probenmaterials. Plasma, bzw. Serum steht dabei in der Labordiagnostik an erster Stelle, stellt jedoch auf analytischem Gebiet die größte Herausforderung dar. Die enorme Konzentrationsdynamik im Plasmaproteom lässt die Suche nach Glaukom-Biomarkern schnell zur Sisypusarbeit werden.

Vor dem Hintergrund der anatomischen Gegebenheiten im Auge, sollte die Wahl des Probenmaterials auf das Kammerwasser fallen, da es im Inneren des Auges zirkuliert und hierdurch am wahrscheinlichsten glaukomatöse Prozesse auf Proteomebene widerspiegelt. Die schlechte Verfügbarkeit spricht dagegen. In Deutschland fällt Kammerwasser nur als „Abfallprodukt“ bei ophthalmologischen Eingriffen an und darf nicht etwa durch eine Punktion des Auges gewonnen werden. Der geringe Gehalt an Proteinen erfordert zudem eine relativ große Probenmenge, was das Kammerwasser als Probenmaterial letztendlich disqualifiziert.

Als guter Kompromiss hat sich die Tränenflüssigkeit erwiesen, da sie direkt am Auge entnommen wird und mit Zelltypen in direkten Kontakt treten kann, die beim Glaukom betroffen sind. Zudem ist die Gewinnung des Probenmaterials einfach: Entweder entnimmt man mit einer Mikrokapillare im Bereich der Austrittsöffnungen der Tränendrüsen im inneren Augenwinkel des ungereizten Auges die Tränenflüssigkeit direkt, oder setzt Schirmer-Streifen ein wie sie zur Diagnostik des „Trockenen Auges“ eingesetzt werden. Für diese Arbeit wurde vorwiegend eigene, mit der Kapillare gewonnene Tränenflüssigkeit verwendet. Berücksichtigt man alle Spleißvarianten, enthält das Plasmaproteom geschätzte 500.000 Proteinvarianten, ohne die 10 Millionen Sequenzvarianten der Immunglobuline (Anderson and Anderson 2002). Das Plasmaproteom lässt sich in folgende funktionelle Gruppen unterteilen: *Sezernierte Proteine*, *Immunglobuline*, *Long distance Receptor Ligands* (Enthalten die klassischen Peptid- und Proteinhormone), *Local Reporter Ligands* (Cytokine und andere lokal wirkende Mediatoren), *Temporary Passengers* (Nicht-Hormon-Proteine, die das Plasma auf dem Weg zu ihrem Wirkungsort passieren), *Tissue Leakage Products* (Proteine, die ihre Funktion normalerweise innerhalb von Zellen ausüben, jedoch durch Schädigungen oder Zelltod ins Plasma gelangen; Beispiele: diagnostische Marker des Herzinfarktes wie Troponin I und Creatinkinase (CK)), *Abnormale Sekretionen* (Stammen aus Tumoren und anderen geschädigten Geweben, werden physiologisch nicht benötigt. Beispiele sind diagnostische Tumormarker) und Fremdproteine von infektiösen Organismen oder Parasiten. Angesichts des mit dem demographischen Wandel zu erwartenden Anstiegs der Glaukom-Inzidenz, der teuren und aufwändigen Diagnostik, ist die Nutzbarmachung proteomischer Diagnoseverfahren für die Ophthalmologie von größter Bedeutung.

Erste Erfolge auf diesem Gebiet konnten bereits beim trockenen Auge und bei der Analyse von Antikörperprofilen gegen okuläre Epitope, speziell dem α -Fodrin bei Glaukomkranken erzielt werden (Grus, Podust et al. 2005; Grus, Joachim et al. 2006; Quigley and Broman 2006).

Abweichend von der klassischen Lehre der *bottom-up-Proteomics*, bei der ein Proteingemisch zunächst einem tryptischen Verdau unterzogen wird, soll in dieser Arbeit der *top-down-Ansatz* zur Identifizierung von Glaukom-Biomarkern in Serum und Tränenflüssigkeit verfolgt werden (Eckerskorn and Lottspeich 1989; Kelleher, Lin et al. 1999). Es sind möglichst intakte Proteine, die es hier zu fraktionieren und identifizieren galt. Lag ein SELDI-Peak, der im Rahmen des klinischen Profilings als Biomarker-Kandidat ermittelt wurde nach etlichen Fraktionierungsschritten schließlich isoliert vor, wurde diese Fraktion einem tryptischen Verdau zugeführt. Die Zusammensetzung der dadurch entstandenen Peptidmischung, entsprechend einem einzigartigen Fingerabdruck, wurde im MALDI-Tof-Tof ermittelt und einer Sequenzdatenbank übermittelt. Dieser Datenabgleich, für den in dieser Arbeit die Mascot-Datenbank (<http://www.matrixscience.com/>) eingesetzt wurde, führte im Erfolgsfall zu einer signifikanten Identifikation und somit zur Zuordnung von SELDI-Peak und Proteinname. Die Wahl des *top-down-Ansatzes* soll letztendlich dazu beitragen, durch vereinfachte und automatisierbare Abläufe, die Biomarkersuche zu beschleunigen und auch für ein Routinelabor zu ermöglichen. Nachteilig für diesen Ansatz ist das Fehlen der hierfür nötigen analytischen Hardware, da die Proteinanalytik quasi vollständig auf den Einsatz von Peptiden ausgerichtet ist. Der experimentelle Ansatz in dieser Arbeit wurde angelegt, flüssigkeitschromatographische und elektrophoretische Techniken im präparativen Maßstab in einer Weise zu kombinieren, die einerseits eine möglichst breitgefächerte Auftrennung von Proteinen erzielt, andererseits aber auch eine Probenkonzentration gewährleistet, die für eine signifikante Identifikation auch von in niedrigen Konzentrationen vorhandenen, potentiellen Glaukom-Biomarkern im Maldi-Tof-Tof ausreicht.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Wie bereits oben erwähnt, dienten als Ausgangsmaterial für diese Arbeit die an der Augenklinik der Universität Mainz durchgeführten Profiling-Studien, in die Tränen, bzw. Serumproben von Glaukoma-Patienten (POAG und NTG) und entsprechende Proben einer gesunden Kontrollgruppe eingeschlossen wurden. Die Größe der jeweiligen Patientenkollektive wurde dabei so gewählt, um eine aussagekräftige statistische Aussage zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Studien wurden die Proben über *Beads* grob vorgereinigt und vorfraktioniert, um schließlich einer SELDI-Analyse unterzogen zu werden.

Anhand von Vergleichen mit den gesunden Kontrollgruppen wurde eine Liste mit potentiellen Biomarkern für Glaukomerkrankungen erstellt. Diese stellten Proteine dar, für die bisher nur die anhand von SELDI-Analysen ermittelten Massen vorlagen und deren Identität größtenteils nicht feststand (Abschnitt 3.2). Bisher wurden lediglich das Fodrin, sowie Transthyretin als Biomarker identifiziert (Grus, Joachim et al. 2006; Grus, Joachim et al. 2008). Es war daher die Aufgabe dieser Arbeit, diesen Proteinmassen mit Hilfe biochemischer und massenspektroskopischer Methoden eine Identität zu verleihen.

Da die Proteinprofile in der Tränenflüssigkeit und im Serum von Gesunden und Erkrankten sich nur minimal unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass die gesuchten Biomarker-Proteine auch bei gesunden Probanden zu finden sind. Für diese Arbeit wurde deshalb zur Methodenentwicklung und Biomarkersuche größtenteils Probenmaterial des Autors verwendet.

Da es sich beim Glaukom um eine auf das Auge begrenzte Erkrankung handelt, ist die Analyse des gesamten Protein-Profiles im Auge naheliegend. Hierzu bieten sich Kammerwasser und Tränenflüssigkeit an, die naturgemäß in direkter Nachbarschaft potentiell pathogener Prozesse im Auge zirkulieren. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sich diese Prozesse in den Flüssigkeiten als Deviationen des *gesunden* Proteinspektrums widerspiegeln. Leider beträgt die Proteinkonzentration im Kammerwasser, welches in Deutschland nur im Rahmen einer Operation am Auge gewonnen werden darf und deswegen als Probenmaterial für einen Routinetest ausfällt, nur etwa 0,2 mg/ml (Kuchle, Ho et al. 1994). Im Tränenfilm des ungereizten Auges sind etwa 8 mg/ml zu finden (Fullard and Snyder 1990). Die Tränenproben werden deshalb vom ungereizten Auge gewonnen, weil neben der eigentlichen Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*), noch weitere Drüsen existieren. Durch eine Reizung des Auges beginnen diese zusätzlich mit der Sekretion, was zu einer kurzfristigen Zunahme des Probenvolumens bei gleichzeitiger Abnahme der Proteinkonzentration und Steigerung der Lipid-Konzentration durch die Meibom-Drüse resultieren kann (Moll 2002). Beide Effekte sind, hinsichtlich der sich anschließenden analytischen Schritte, unerwünscht. Für diese Arbeit wurde mit der Mikrokapillare abgenommene

Tränenflüssigkeit aus dem ungereizten Auge verwendet, welche entweder frisch eingesetzt oder bei -80 °C gelagert wurde. Alternativ hätte man die Tränenproben auch durch Schirmer-Streifen, die üblicherweise zur Diagnose des trockenen Auges dienen, gewinnen können. Die zahlreichen, für die Biomarkeridentifizierung notwendigen analytischen Schritte und der durch den Einsatz einer herkömmlichen HPLC-Pumpe bedingten Proben-Verdünnung, setzen jedoch eine Ausgangs-Probenmenge voraus, die durch Schirmer-Eluat kaum zu erreichen ist.

Parallel zu Tränenproben wurde auch Blutserum als Probenmaterial eingesetzt. Dieses stellt den flüssigen Überstand einer agglutinierten Blutprobe dar, enthält also im Gegensatz zum Plasma keine Gerinnungsfaktoren mehr.

Auf den ersten Blick hat Serum nicht viel mit den Augen zu tun, macht aber bei neurodegenerativen Prozessen und zunehmend permeabler Blut-Hirn-Schranke als Probenmaterial durchaus Sinn, zumal im Rahmen der massenspektroskopischen Routinemessungen auch Biomarker-Kandidaten im Serum ermittelt werden.

Für das Profiling der Proteinproben eingesetzt wird hierfür die Methode der *Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight* SELDI-TOF® (Bio-Rad, Hercules, USA,).

Die zu analysierenden Proben werden dabei direkt auf den Chip (Array) aufgetragen und mit einem Energy Absorbing Molecule (EAM), einer Matrix, versetzt. Nach dem Auskristallisieren ist das Analysat bereit zur Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-TOF® (time of flight). Die Matrix absorbiert dabei die Energie des Lasers und fördert somit die Ionisation der zu messenden Probe, die in einem statischen elektrischen Feld beschleunigt und dabei, abhängig von ihrer Masse, in einer bestimmten Zeit (=Time Of Flight) eine definierte Driftstrecke zurücklegt, bevor diese auf dem Detektor landet. Gemessen wird dabei allerdings nicht direkt die Masse in Dalton, sondern das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/q (Thomson). Das Thomson ist dabei definiert als: $T_h = u/e$, wobei u für die atomare Masseneinheit (auch als **Dalton** bezeichnet) und e für die elementare Ladungseinheit steht. Da e eine Konstante ist, ist T_h also nur von u , der atomaren Masse abhängig (Karas, Bachmann et al. 1987; Ingendoh, Karas et al. 1994; Lennon 1997; Merchant and Weinberger 2000).

Nach einer automatischen *Peak-Detection* werden die gemessenen Protein-Peaks für die statistische Auswertung zu *Clustern* zusammengefasst. Diese ordnet man genau charakterisierten Patientenkollektiven zu: Etwa POAG, OHT und NTG plus gesunde Kontrollgruppe. Gefolgt von einer multivariaten Diskriminanzanalyse stehen schließlich die für eine Glaukomform signifikanten Biomarker-Kandidaten fest (Fisher 1936; Grus, Joachim et al. 2003; Grus, Podust et al. 2005).

3.2 Methoden

Das Serum-Proteom stellt aufgrund seiner enormen Konzentrationsdynamik und der strukturellen Komplexität der darin enthaltenen Proteine und Peptide eine große Herausforderung an die Analytik dar. Die Konzentrationen erstrecken sich von den hoch-abundanten Proteinen wie dem Albumin oder den Immunglobulinen, zu den niedrig-abundanten mit Konzentrationen im Pikomol-Bereich oder darunter. Eine solch große Konzentrationsdynamik ist mit einzelnen proteomischen Analysemethoden nicht zu bewältigen. Daher werden hier mehrere Techniken kombiniert, um zunächst die hochabundanten Proteine von den niederabundanten Proteinen zu trennen.

Hierfür kommen Molekularsiebe mit definiertem *Cutoff*, Immunoaffinitätsäulen und *Beads* mit funktionellen Oberflächen zum Einsatz. Darüber hinaus werden Methoden getestet, die es erlauben, auch größere Proteine mit einem Molekulargewicht von über 20 kDa aus einer Gelmatrix zu eluieren. Schließlich wird die Tauglichkeit der Flüssigkeitschromatographie zur Fraktionierung nativer Proteine erprobt. Die präparative Auftrennung derart komplexer Proteingemische wie dem Serum stellt analytisches Neuland dar. Zentrale Elemente hierbei sind die Methode des Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-TOF® (time of flight) (SELDI) für den Einsatz beim Profiling und Proteinanalyse in Kombination mit der Methode des Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Tof-Tof (Maldi-Tof-Tof) zur Identifizierung und Zuordnung der fraktionierten Proteine.

3.2.1 Verwendete Methoden zur Präfraktionierung der zur analysierenden Proben

Für die Präfraktionierung werden in dieser Arbeit folgende Methoden eingesetzt:

- Milipore Zentrifugalfilter
- Magnetische *Beads*
- Multiaffinitätsäule (MARS)
- Kationenaustauscher-Chromatographie (hier: *Strong Cation Exchanger, SCX*): Auftrennung der Proteine anhand ihrer Nettoladung. Bei der Kationenaustauscher-Chromatographie sind es die Proteine mit der größten positiven Ladungsdichte, die bei zunehmender Ionenstärke der mobilen Phase die Säule als letzte verlassen.
- Gelfiltrations-Chromatographie: Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht. Große Proteine verlassen dabei die Säule zuerst, da sie weniger intensiv mit der stationären Phase interagieren können.

Für die in der 2. Dimension erfolgende chromatografische Auftrennung wird stets eine *Reversed Phase*-Säule verwendet.

Bei der Methode der *Reversed Phase* erfolgt die Bindung der Analyte an einer unpolaren stationären Phase. Die Elution erfolgt mit polarem Laufmittel mit abnehmender Polarität (Acetonitril), welches zur Auftrennung der Proteine nach Hydrophobizität führt.

3.2.2 Fraktionierungsversuche mit Milipore Zentrifugalfiltern

Erste Fraktionierungsversuche erfolgten mit Milipore Zentrifugalfiltern. Hier sollte zunächst ein YM30 (Cutoff 30 kDa)-Filter die höhermolekularen, hochabundanten Immunglobuline und das Albumin abtrennen. Ein zweiter Zentrifugationsschritt erfolgte mit YM3 (Cutoff 3 kDa) zur Entsalzung der Probe und somit zur Vorbereitung für die Elektrophorese.

Versuchsprotokoll:

1. Mit BSA (1% BSA in PBS) geblockten YM30 Filter in Tube stecken.
2. Probe auf Filter pipettieren (ohne Filtermatrix zu berühren!).
3. Zentrifugieren: 10000g/30min/4 °C.
4. Filter mit 200 µl A. bidest waschen, zentrifugieren: 10000g/30min/4 °C.
5. Filter in neues Tube stecken.
6. Protein eluieren mit 200 µl Elutionslösung (50% ACN, 0,1%TFA).
7. 10 Min. schütteln (4 °C), anschließend zentrifugieren: 10000g/30min./4 °C.
8. Eluat in „Speed-Vac“ aufkonzentrieren (25 Min./60 °C).
9. 200 µl A. bidest zugeben und Pellet gut lösen.
10. Gelöstes Protein auf geblockten YM3-Filter (1% BSA in PBS) überführen.
11. Zentrifugieren: 10000g/30min./4 °C.
12. Filter mit 200 µl A. bidest waschen, zentrifugieren: 10000g/30min./4 °C.
13. Filter in neues Tube überführen, 200 µl A. bidest zugeben, Auf- und Abpipettieren ohne den Filter zu berühren.
14. 10 Min. schütteln (4° C), Filter umdrehen und nochmals zentrifugieren: 1000g/15min./4 °C.
15. Filter wieder in Ausgangsposition drehen und 200 µl Elutionslösung (50% ACN, 0,1%TFA) zugeben; 10 min. schütteln (4 °C).
16. Filter erneut drehen und anschließend zentrifugieren: 1000g/3min./4 °C.
17. Ein Aliquot des Eluats auf das SELDI-Chip pipettieren.

Nach diesem Protokoll wurden erste Fraktionierungsversuche mit 700 µl Kammerwasser, verteilt auf zwei Tubes durchgeführt. Die Qualität der Fraktionierung wurde über ein Gellauf mit einem 12% SDS-Gel dokumentiert.

Die jeweils anfallenden 200 µl Wasch- und Elutionslösung wurden zuvor in der „Speed-Vac“ auf etwa 10 µl aufkonzentriert. Die Versuche wurden mehrmals auch mit Tränenflüssigkeit und Serum wiederholt und führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.2.3 *Bead-Aufreinigung/Fraktionierung*

Magnetische *Beads* von Dynal wurden für die Probenaufreinigung und für Fraktionierungsversuche bei Kammerwasser, Tränenflüssigkeit und Serum eingesetzt. Hierfür wurden *Dynabeads* RPC3, RPC8 und RPC18 auch zur Fraktionierung der Proben verwendet, indem man die an den *Beads* anhaftenden Proteine mit Acetonitrillösungen aufsteigender Konzentrationen eluierte. Diese Fraktionierungsversuche wurden mit 300 µl Kammerwasser durchgeführt, wobei die Probe wurde mit 80 µl Probenpuffer gemischt und mit 50 µl RPC18-*Beads* inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die gebundenen Proteine mit Elutionspuffern mit Acetonitrilkonzentrationen von 10-100% mit einem Volumen von je 20 µl in 10 Schritten eluiert.

Die Eluate wurden in der „Speed-Vac“ aufkonzentriert und auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen. Auch die *Bead*-Versuche wurden mehrmals auch mit Tränenflüssigkeit, Serum sowie RPC3 und RPC8-*Beads* wiederholt und führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.2.4 *Vorfraktionierung über Multiaffinitätssäule (MARS)*

Eine weitere Möglichkeit einer Vorfraktionierung zur Abtrennung der *high-abundant proteins* von den *low-abundant proteins* ist das von der Fa. Agilent angebotene *Multiple Affinity Removal System*, welches neben Albumin und Transferrin auch Immunglobuline entfernen soll. In Vorversuchen wurde diese ausgiebig getestet. Als nachteilig erwies sich dabei die geringe Bindekapazität, die aufwändige Nachbearbeitung der mit einem Hochsalzpuffer zu eluierenden Proteine und der Verlust von Zielproteinen. Gerade bei der Albumin-Depletion ist der Verlust von „*low-abundance*“-Proteinen, speziell Cytokinen dokumentiert (Granger 2005). Vor allem der hohe Salzgehalt der gewonnenen „*low-abundance*“-Fraktionen macht sie für den direkten Einsatz im Rahmen einer SDS-Gelelektrophorese oder einer massenspektrometrischen Untersuchung unbrauchbar.

3.2.5 *Gelelution*

Die mit den in den vorherigen Abschnitten erläuterten Methoden vorfraktionierten Proben wurden über ein 12%-SDS-Fertiggel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und eluiert. Hierbei kam folgende Elutionslösung zum Einsatz:

Ameisensäure	50%,	Isopropanol	15%,
HPLC-Wasser	10%,	Acetonitril	25%.

Eluiert wurde über Nacht. Die anschließende Kontrolle des Elutionserfolges im SELDI-TOF® zeigte jedoch, dass sich mit dieser Lösung nur stark gefärbte Banden und Proteine < 20 kDa aus der Gelmatrix herauslösten.

3.2.6 Elektroelution mit Whatman „Elutrap“

Eine effektivere Elutionsleistung sollte die Methode der Elektroelution erbringen. Hierfür wurde die „Elutrap“ der Firma Whatman eingesetzt, die jedoch den großen methodischen Nachteil besitzt, pro Kammer jeweils nur ein Gelstück eluieren zu können. Diese Kammer wird durch einen „Plexiglas-Knochen“ dargestellt, wobei das eluierte Protein in einer durch zwei Dialysemembranen begrenzten Falle gesammelt wird. Das Volumen der Falle beträgt über 200 µl, was wiederum eine starke Verdünnung des Eluates bedingt und einen nachfolgenden Konzentrationsschritt notwendig macht.

Eluiert wurde für eine Stunde bei 100 V in einer Elektrophoresekammer mit einem MES-Laufpuffer folgender Zusammensetzung:

MES pH 7,2 50 mM,	SDS 0.1%,
EDTA 1 mM, pH 7,3,	Tris Base 50 mM.

Die Versuche ergaben auch, daß der Elutionspuffer mindestens 1% SDS enthalten muss, um alle Eigenladungen der zu eluierenden Proteine zu überdecken und zu gewährleisten, dass die Proteine nicht zu Anode und Kathode wandern. Da in solchen Konzentrationen SDS die massenspektrometrische Auswertung der Eluate unmöglich macht, wurde zu dessen Eliminierung mit jedem Eluat eine Ionenpaarextraktion nach Henderson durchgeführt (Henderson, Oroszlan et al. 1979).

Extraktionslösung:	Aceton	85%,	Triethylamin	5%,
	Eisessig	5%,	A. bidest	5%.

Jedes Eluat wird dabei mit 1ml Extraktionslösung gefällt, eine Stunde bei -20 °C inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 14.000 g pelletiert.

Nachdem die Pellets einmal mit A. bidest gewaschen und anschließend in der „Speed-Vac“ bei 30°C getrocknet wurden, konnte das gereinigte Protein in 20 µl HPLC-Wasser mit 0,1% TFA gelöst werden. Der Versuch, die Proteinlösungen mit *Reversed Phase Beads* aufzureinigen, schlug fehl, da die im SDS eingeschlossenen Proteine nicht an die *Beads* binden können.

3.2.7 „Whole Gel Eluter“ (BioRad, Hercules, USA)

Der „Whole Gel Eluter“ (BioRad, Hercules, USA) ermöglicht im Gegensatz zur „Elutrap“ die Proteinelution ganzer Gele, wobei allerdings jeweils nur eine Spur beladen werden darf. Dieser Eluter gleicht einer Blotting-Kammer, wie sie für Western-Blots verwendet werden. Der Unterschied besteht darin, daß die Proteine einer Spur nicht auf eine Membran, sondern in 30 Sammelkammern mit je 3 ml Volumen „geblottet“ werden. Für den Elutionsvorgang wurde MES-Laufpuffer (Abschnitt oben) eingesetzt. Eluiert wird 30 Minuten bei einer Spannung von 200 V. Dem Elutionsschritt folgt das *Harvesting*, bei dem die Eluate durch ein Vakuum in die in der „Harvesting-Box“ befindlichen Gefäße gesaugt werden und

anschließend in einem Volumen von 90 ml gelöst vorliegen. In der Praxis erweist sich aber dieses Probenvolumen als viel zu groß, was wiederum zeitraubende Konzentrationsschritte in der „Speed-Vac“ erfordert.

Sämtliche Eluate mussten durch eine Aceton-Fällung von Polyacrylamid-Rückständen befreit werden:

- Eluat mit ca. 1,5 ml Aceton gefällt (-80 °C)
- 2 h bei -80 °C
- Zentrifugieren bei 21885 x g (30 Minuten)
- Überstand abnehmen und restliches Aceton in „Speed-Vac“ verdampfen
- Protein-Pellet aufnehmen in 20 µl 0,1% TFA in HPLC-Wasser

Zur Aufreinigung wurde wie oben die Ionenpaarextraktion nach Henderson eingesetzt (Merrill and Fleisher 1932; Fogarty and Griffin 1973; Henderson, Oroszlan et al. 1979). Durch die alternativ eingesetzte, klassische Acetonfällung konnten nur maximal 60 % des eingesetzten Proteins zurückgewonnen werden. Protokoll für die Ionenpaarextraktion:

- Gefällte Proben mit 1 ml Extraktionslösung vermischen:

Aceton	Triethylamin	Eisessig	A. bidest
85	5	5	5
- 1 Stunde bei -20 °C inkubieren, 10 Minuten bei 14000 x g zentrifugieren
- Pellet in 20 µl HPLC-Wasser (0,1 % TFA) resuspendieren

3.2.8 LC-MS

Alle bisher durchgeführten Ansätze, ein Gemisch wie das Blutserum reproduzierbar in Fraktionen überschaubarer Komplexität zu unterteilen, sind an dessen Heterogenität und der extremen Konzentrationsdynamik gescheitert.

Der Wasseranteil im menschlichen Blutserum beträgt ca. 91%. Darin gelöst sind Kationen und Anionen, zu denen die Fraktion der Proteine gezählt wird. Das Albumin, als wichtiges Transport- und Reserveprotein, trägt zu etwa 80% zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks bei und macht über 60% des Gesamtproteingehaltes aus (Thews 1991). Die größte Herausforderung ist es also, während der Präfraktionierung vor allem das Albumin zu eliminieren. Die Kombination von chromatographischen Methoden zur Präfraktionierung und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse, hat sich seit einigen Jahren zu einem Standardverfahren in der Proteomforschung entwickelt und konkurriert inzwischen mit klassischen Methoden, wie der 2-D-Elektrophorese. Auch im Bereich der ophthalmologischen Forschung konnten mit diesem Ansatz, etwa durch die Identifikation erhöhter Defensin-Expression nach chirurgischen Eingriffen im Auge, erste Erfolge verzeichnet werden (Zhou, Huang et al. 2004).

3.2.9 Nano-LC

Um die Probenmengen, die in einem Routinelabor anfallen, zu bewältigen, sollten die Schritte der Proteinaufreinigung und der Fraktionierung möglichst automatisiert werden. Hierfür wurden Versuche mit einer Nano-LC-Anlage der Firma Dionex durchgeführt, wobei Kapillarsäulen der Typen POROS 10S (SCX), PepMap C4 und PepMap C8 eingesetzt wurden. Als Probenmaterial dienten Tränenflüssigkeit und Serum. Für die Fraktionierung wurde der von LC Packings gelieferte *Probot* eingesetzt, der während des LC-Laufs *online* in Mikrotiterplatten fraktionierte. Zur Evaluierung der Fraktionierungsleistung wurden alle Fraktionen auf SELDI-Chips aufgetragen und massenspektroskopisch analysiert. Als hochproblematisch stellte sich jedoch die Anwesenheit der erwähnten *high-abundant-proteins* für die eingesetzten Kapillarsäulen heraus, die ausnahmslos verstopften und entsorgt werden mussten. Während der Probestellung konnten deshalb keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden. Nachdem die Versuche mit der Dionex Nano-LC-Anlage unbefriedigend verliefen, wurde zunächst versucht mit einer robusten Vorfraktionierung die Problematik der *high-abundant-proteins* zu entschärfen, indem man diese von den Kandidatenproteinen trennte. Hierfür wurde eine Säule des Typs Agilent 300 SCX eingesetzt. Da es sich um eine Ionenaustauscher-Säule handelt, musste das zu trennende Schirmereluat vor dem Lauf über einen Microcon-Filter entsalzt werden (Granger 2005).

3.2.10 Bio-Rad-HPLC

Vielversprechender verlief der Einsatz einer herkömmlichen HPLC-Pumpe mit Flussraten von mindestens 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dies erforderte zwar einen im Vergleich zur Kapillar-LC, erhöhten Probeneinsatz. Dieser resultierte jedoch in verwertbaren Probenkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen, die nach Aufkonzentration auf ein präparatives Gel aufgetragen wurden.

Für die Präfraktionierung wurde zunächst eine Kationenaustauscher-Säule des Typs Agilent 300 SCX (2,1 x 150 mm) eingesetzt, was den Einsatz zuvor entsalzter Analysate notwendig machte (Granger 2005). Dieser Ansatz führte erstmals zu einer signifikanten Identifikation eines Biomarker-Kandidaten, des *Platelet basic protein* und der erfolgreichen Zuordnung eines SELDI-Peaks (s.u.).

3.2.11 Identifizierung des Biomarker-Kandidaten Platelet basic protein (PBP) als Beispiel für die erfolgreiche zweidimensionale HPLC-Fraktionierung eines Serum-Proteins

Da es mit dieser Methode erstmals gelang, ein niedrig-abundantes Protein mit zugehörigem SELDI-Peak signifikant zu identifizieren, soll dieses Verfahren hier genauer erläutert werden.

1. Dimension: Kationen-Austauscher-HPLC: Agilent Zorbax SCX 5 µm (2,1 x 150 mm)

Laufmittel A: 10 mM KH₂PO₄, pH 3.5, 1% MeOH

Laufmittel B: 10 mM KH₂PO₄, pH 3.5, 20% MeOH, 500 mM KCl

Säulentemperatur: 40°C

Probe: 50 µl Serum (nativ) und über 0.2 µm Spritzenfilter filtriert

Injektionsvolumen: 100 µl (Probe + 50% A)

Probenmenge: ca. 3 mg Protein

Programm:

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow (ml)	Injektion
0	100	0	0.1	
5.00	100	0	0.1	i
10.00	100	0	0.1	
10.01	80	20	0.1	
20.00	80	20	0.1	
20.01	70	30	0.1	
30.00	70	30	0.1	
30.01	60	40	0.1	
40.00	60	40	0.1	
40.01	50	50	0.1	
50.00	50	50	0.1	
70.00	0	100	0.1	
85.00	0	100	0.1	
90.00	100	0	0.1	
110.00	100	0	0.1	

Fraktionen wurden minütlich mit „Sunchrom-Spotter“ in 96 MTP gesammelt (100 µl/Fraktion) und anschließend auf etwa 50 µl in der „Speed-Vac“ bei 60 °C aufkonzentriert.

SELDI-Messung des PBP

Je 2 µl Analysat/Spot, gefolgt von 2 x je 1 µl Matrix (20 mg SPA, 750 µl ACN, 750 µl A.bidest, 15 µl TFA).

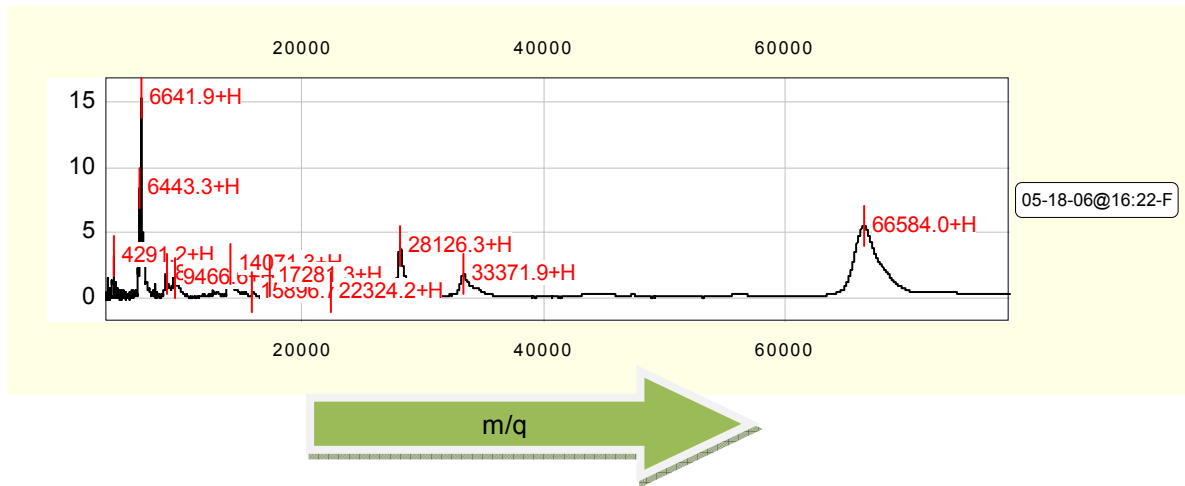


Abbildung 13: SELDI-Spektrum von Fraktion 30 (komplettes Spektrum)

Zu sehen sind hier auf der X-Achse nicht direkt die Masse in Dalton, sondern das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/q (Thomson). Das Thomson ist dabei definiert als: $Th = u/e$, wobei u für die atomare Masseneinheit (auch als Dalton bezeichnet) und e für die elementare Ladungseinheit steht. Da e eine Konstante ist, ist Th also nur von u , der atomaren Masse abhängig (Karas, Bachmann et al. 1987; Ingendoh, Karas et al. 1994; Lennon 1997; Merchant and Weinberger 2000). Auf der Y-Achse ist die relative Intensität aufgetragen mit der die ionisierten Proteine auf den Detektor auftreffen.

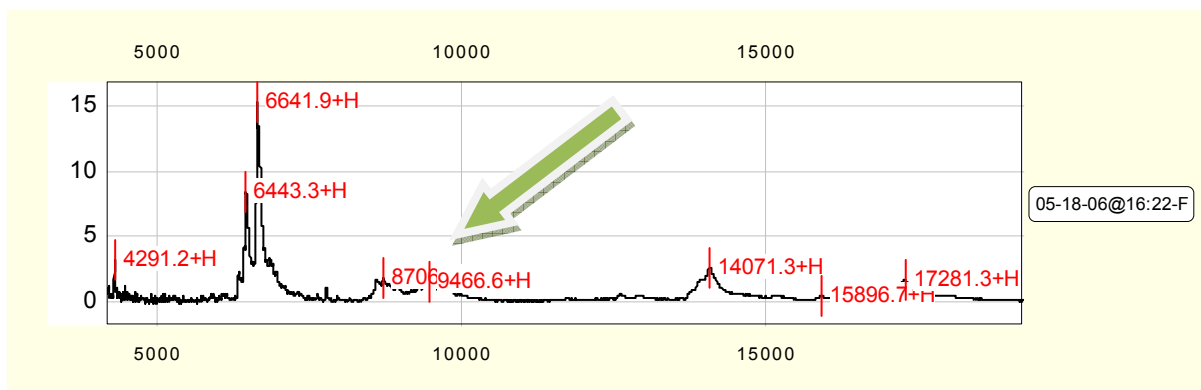


Abbildung 14: SELDI-Spektrum von Fraktion 30 (unterer Massenbereich)

Der Pfeil zeigt den Massenbereich für das zu identifizierende PBP an.

Fraktion 30 (Abbildungen 13 und 14) wurde für eine nachfolgende C18 RP-Auftrennung ausgewählt, da Peaks im Bereich um 9 kDa zu sehen sind (Abbildung 28, Pfeilmarkierung) und dieser Massenbereich aufgrund der existierenden Befunde vorangegangener Profilingstudien als Biomarkerkandidat überprüft werden sollte.

2. Dimension: C18 RP-HPLC: Waters BioSuite pC18, 500, 7 μm (2.0 x 150 mm)

Laufmittel A: 98% HPLC-Wasser, 2% ACN, 0.1% TFA

Laufmittel B: 100% ACN, 0.1% TFA

Probe: Fraktion 30, auf 50 μl eingengt

Injektionsvolumen: 100 μl (Probe + 50% A)

Programm:

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow (ml)	Injektion
0	100	0	0.120	
5.0	100	0	0.120	i
15.0	60	40	0.120	
55.0	0	100	0.120	
60.0	0	100	0.120	
65.0	100	0	0.120	

48 Fraktionen wurden minütlich mit dem „Sunchrom-Spotter“ in 96-well-Platten gesammelt (120 µl/Fraktion) und anschließend auf etwa 50 µl in der „Speed-Vac“ bei 60 °C aufkonzentriert.

Je 2 µl Analysat/Spot, gefolgt von 2 x je 1 µl Matrix (20 mg CHCA, 750 µl ACN, 750 µl A.bidest, 15 µl TFA) wurde anschließend auf den SELDI-array aufgetragen.

In Fraktion 31 der C18-Fraktionierung wurde der Biomarker-Kandidat als klares Signal bei ca. 9311 Da gefunden (Abbildung 15, Pfeil).

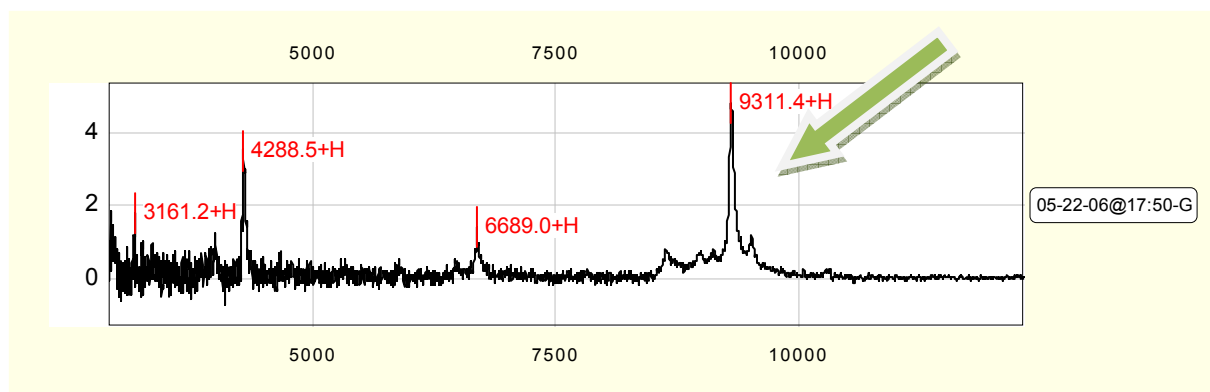


Abbildung 15: SELDI-Spektrum von Fraktion 31 der C18-Auftrennung

Fraktion 31 wurde im „Speed-Vac“ bis zum Trockenfallen eingengt und das resultierende Pellet unter Zugabe eines Ammoniumbikarbonat-Puffers und Trypsin unter Anwendung des Gelverdau-Protokolls ohne ACN-Schritt (siehe Abschnitt 3.3.1) verdaut .

Je 1 µl Verdau wurde unter Verwendung einer CHCA-Matrix (20 mg CHCA, 5 ml ACN, 5 ml HPLC-Wasser, 10 µl TFA) auf einem Anchor-Target präpariert (*double-layer*) und anschließend im MALDI-TOF-TOF gemessen.

3.2.12 *Bead-* Versuche mit Protein G Magnetic *Beads* (Dynal) zur Anreicherung weiterer thrombozytärer Effektorsubstanzen

Nach der erfolgreichen Identifizierung des PBP war es von Interesse, weitere thrombozytäre Effektorsubstanzen zu identifizieren. Hierzu wurde ein polyklonaler α -PDGF-Antikörper, gewonnen aus der Ziege, eingesetzt.

Für die Anreicherung der zu identifizierenden Effektorsubstanzen werden diese Antikörper an mit Protein G *gecoateten* magnetischen *Beads* mit ihrer Fc-Region gekoppelt, um so,quasi als Angel, weitere PDGF-Derivate für die Identifikation zu gewinnen.

Protokoll der *Bead*-Versuche:

1. *Beads* resuspendieren (nicht vortexen!)
2. 10 μ l *Beads* in 200 μ l PCR-Tubes überführen, in Magnet stecken und Überstand abnehmen
3. Tube aus Magnet nehmen, *Beads* mit 100 μ l Na-Acetat (pH5) waschen, Tube in Magnet stellen und Überstand abnehmen, einmal wiederholen
4. 50 μ l IgG-Lösung zugeben [100 μ g/ml]
5. 60 Min. im Klimaschrank bei 10 °C auf Horizontalshaker inkubieren (ca. 300 U/Min.)
6. Tube in Magnet stellen, Überstand abnehmen, Antikörper wiederverwendbar!
7. Tube aus Magneten nehmen
8. 100 μ l Na-Acetat pH 5 (0,1% OGP) zugeben, in Magneten stellen und Überstand abnehmen (zweimal waschen)
9. Im Magneten Überstand abnehmen
10. 200 μ l 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2) zugeben, zwei Min. inkubieren, im Magneten Überstand abnehmen (einmal wiederholen); zweimal mit je 200 μ l PBS waschen
11. 200 μ l 20 mM DMP zugeben
12. 30 Min. bei 20 °C sanft auf Intellimixer inkubieren
13. Im Magneten Überstand abnehmen
14. Tube aus Magneten nehmen, 200 μ l 50 mM Tris

Nachdem die Versuche mit der Dionex Nano-LC-Anlage unbefriedigend verliefen, wurde zunächst versucht mit einer robusten Vorfraktionierung die Problematik der *high-abundant-proteins* zu entschärfen, indem man diese von den Kandidatenproteinen trennt. Hierfür wurde eine Säule des Typs Agilent 300 SCX (2,1x150 mm) eingesetzt. Da es sich um eine Ionenaustauscher-Säule handelt, musste das zu trennende Schirmereluat vor dem Lauf über einen Microcon-Filter entsalzt werden (Granger 2005).

Versuchsprotokoll:

1. Circa 90 μ l 10-fach konzentriertes Schirmer-Eluat auf je einen YM3-Filter pipettieren.
2. Zentrifugieren bei 14000 g (4 °C) für 120 Min.
3. 200 μ l A. bidest zupipettieren, Zentrifugieren bei 14000 g (4 °C) für 60 Min.

4. Neues Tube, 200 µl A. bidest zupipettieren und Protein von Membran resuspendieren.
5. 10 Min. bei 4 °C schütteln, Filter umdrehen und zentrifugieren bei 1000 g (4 °C) für 15 Min.
6. Filter drehen, 100 µl Elutionslösung (50% ACN, 0,1% TFA) zupipettieren und 10 Min. bei 4 °C schütteln.
7. Filter drehen und zentrifugieren bei 1000 g (4 °C) für 3 Min.

Insgesamt werden etwa 1000 µl Eluat in der „Speed-Vac“ bei 30 °C auf 200 µl (5x) aufkonzentriert wovon 5 µl für den SCX-Lauf eingesetzt werden.

Laufmittel:

A	10 mM KH ₂ PO ₄ , pH 4,5
B	10 mM KH ₂ PO ₄ , 1 M KCL, 20% Acetonitril (v/v), pH 4,5

Programm: Stufengradient von 0-100% B, Dauer 130 Min., 10 Min. je Stufe.

Fluss: 120 µl/min.

Trotz vielfältiger Variation von Laufmittelzusammensetzung und LC-Programm, konnte die erhoffte Abtrennung der hochabundanten Proteine nicht erzielt werden.

3.2.13 Prinzip des MALDI-TOF

Die Technik der MALDI-TOF-Massenspektroskopie erlaubt den Nachweis von Biomolekülen bis zu einem Molekulargewicht von ca. 300.000 Da (Abbildung 16).

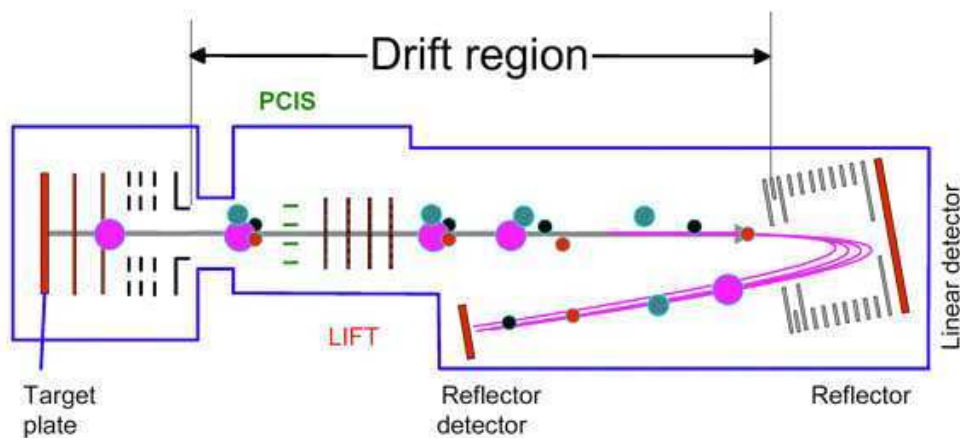


Abbildung 16: Prinzip des MALDI-Tof®

Die Grundlage der Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) bildet die ionenstimulierte Desorption des Analysats in Kombination mit einer niedermolekularen Säure als Matrix. Im MS-Modus erhalten alle Ionen dieselbe kinetische Energie, so dass die Driftzeit (time of flight, TOF) einzig von der Masse des Analysats bestimmt wird. Im abgebildeten MSMS-Modus wird eine „LIFT-Einheit“ in die Driftstrecke eingefügt. Diese Einheit ermöglicht die Isolierung einzelner „parent-Ions“ und deren Fragmente, die dann noch einmal beschleunigt und deren Driftzeit ermittelt werden kann. Quelle: CIGA, Centre Interdisciplinaire de Génomprotéomique Appliquée

Die erzielte Sequenzabdeckung ist dargestellt durch grau unterlegte Bereiche, wobei die zusätzlichen, rot unterlegten Abschnitte durch LIFT-Spektren bestätigt wurden. Hierbei stehen obenstehende Felder für N-terminale b-Ionen, untenstehende Felder für C-terminale y-Ionen (Abbildung 18, grüne Markierung).

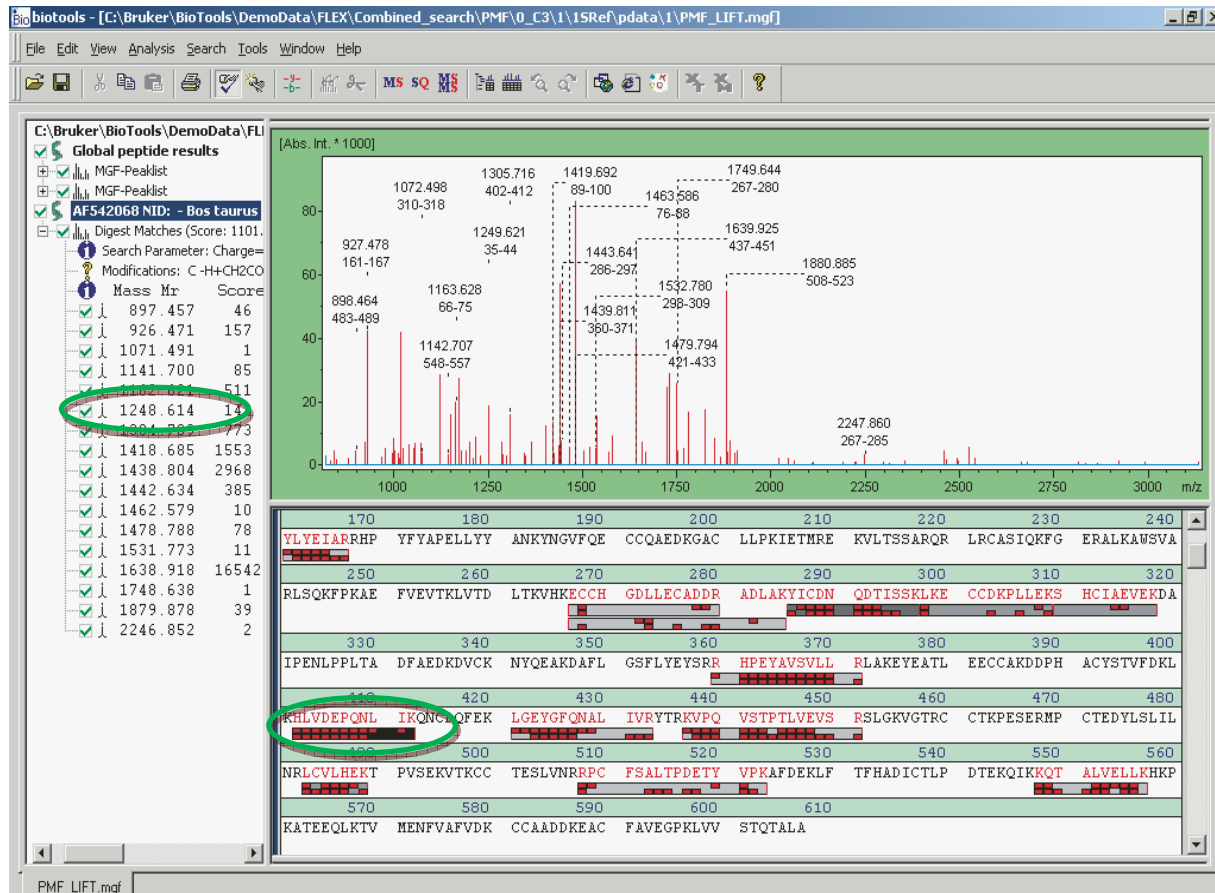


Abbildung 18: Spektrum-Ansicht der Biotoools-Software mit detektierten Fragmentgrößen und erzielter Sequenzabdeckung (grüne Markierungen). Quelle: BrukerDaltonic

Grundlage für die erfolgreiche Zuordnung der ermittelten Peptid-Fragmente zu einem in der MASCOT-Datenbank hinterlegten Protein bildet der **MOlecularWeightSearch (=MOWSE)-Score** (Pappin, Hojrup et al. 1993). Der Score ist abhängig von der Frequenz, mit der Peptidfragmente definierter Länge, sogenannte *Bins*, in der in der Datenbank hinterlegten Aminosäuresequenz eines Proteins, wiederkehren. Das Produkt dieser Frequenzen wird als *Distribution Frequency Score* bezeichnet. Der MOWSE-Score berechnet sich dabei wie folgt:

$$\text{MOWSE-Score} = 50000 / (P_N * H)$$

wobei **50000** sich auf die Größe eines Durchschnittsproteins beziehen (dient der Normalisierung), **P_N** für das Produkt der erzielten *Distribution Frequency Scores* steht und **H** dem Molekulargewicht des „Hit-Proteins“, also dem Zielprotein entspricht (van Domselaar).

Da der MOWSE-Score ein Maß für die auf den Abgleich von Peptidfragmenten basierenden Proteinidentifizierungen darstellt, wird dieser durch den MASCOT-Score erweitert. Dieser berechnet sich wie folgt: **$S = -10 \cdot \log(P)$** .

Wobei S für (MASCOT)-Score und P für die Wahrscheinlichkeit steht, dass der erzielte MOWSE-Treffer ein Zufallstreffer ist. Hierbei ist die P abhängig von der Anzahl aller in einer Datenbank hinterlegten Proteine. Für MASCOT gilt demzufolge eine Identifikation als hinreichend signifikant, wenn $p < 0,05$.

In der Praxis bedeutet das, dass eine Identifikation als signifikant angesehen werden kann, wenn bei einer kombinierten Identifikation (aus *Peptide Mass Fingerprint* + LIFT-Spektren) ein Score von mindestens 56 vorliegen muss. Wären bei dieser ID 4Peptide erfolgreich zugeordnet und eines dieser Peptide für die Generierung eines LIFT-Spektrums genutzt worden, würde dies folgendermaßen dargestellt werden: **56/4/1**.

Stimmen die zweite und die dritte Ziffer überein, wurde aus *jedem* detektierten Peptid zusätzlich noch ein LIFT-Spektrum generiert, wobei hier der Score bei wenigstens 27 liegen muss, um als hinreichend nicht-zufällig gelten zu können. Dies wäre folgendermaßen dargestellt: **27/1/1**.

3.3 Workflow für die Biomarker-Identifizierung

Nach etlichen, in den vorherigen Abschnitten beschriebenen, Vorversuchen hat sich zur Identifizierung von Biomarkern in Proben unterschiedlicher Zusammensetzung und Konzentrationen folgender Workflow als zuverlässige Methode erwiesen (Abbildung 19). Diese umfasst die folgenden Schritte:

- Im Fall von hochkonzentrierten Proben, wie dem Serum, ist eine Präfraktionierung über eine Size-Exclusion-Säule nötig. Diese dient der Abtrennung hochabundanter Proteine, wie Albumin und Immunglobulinen. Eine sich anschließende SELDI-TOF® - Analyse sämtlicher Fraktionen, dient der Kontrolle der jeweils enthaltenen Proteine. Fraktionen, in den Biomarker-Kandidaten zu finden sind, enthalten meist noch zahlreiche weitere Proteine.
- Eine eindeutige Zuordnung von SELDI-Peak und Biomarker-Kandidat ist in diesem Stadium noch unmöglich, da die SELDI-Analyse lediglich Informationen über den in einer Fraktion enthaltenen Massenbereich liefert. Das macht die weitere Auftrennung jeder dieser Fraktionen über eine *Reversed-Phase*-Säule nötig, die außerdem als erste Dimension für niedrig konzentrierte Substrate, wie Kammerwasser, Schirmereluat, Tränenflüssigkeit oder Zelllysate dient.
- Es schließt sich eine erneute SELDI-TOF® -Analyse sämtlicher Fraktionen an, diese dient der Kontrolle der jeweils enthaltenen Proteine, nach der C18-Auftrennung.
- Die Signale potentieller Biomarker enthaltenden Fraktionen werden im „Speed-Vac“ aufkonzentriert und in einem anschließenden Gellauf in einem präparativen 12% Bis-Tris-Fertigel aufgetrennt.

In jeder Spur wird der Massenbereich zwischen 3 und 30kDa ausgeschnitten und in 30 Gelstreifen von etwa 1mm Stärke zerlegt. Jeder einzelne Gelstreifen wird jeweils in drei Portionen geteilt, die für den tryptischen Verdau zur Identifikation im MALDI-TOF-TOF und der Elution für die Proteinmessung im SELDI-TOF® bestimmt sind (Detaillierte Beschreibung folgt im Abschnitt 3.3.1).

- Führt die Massebestimmung im SELDI-TOF® schließlich zu einer *eindeutigen* Biomarkerzuordnung und der tryptische Verdau *derselben* Fraktion über die MALDI-TOF-TOF-Messung zu einer *signifikanten* Identifikation des Proteins anhand der sich anschließenden Mascot-Suche, kann dem potentiellen Biomarker-Kandidaten, der ja bisher nur anhand seiner Masse identifiziert war, jetzt ein entsprechendes Protein zugeordnet werden.

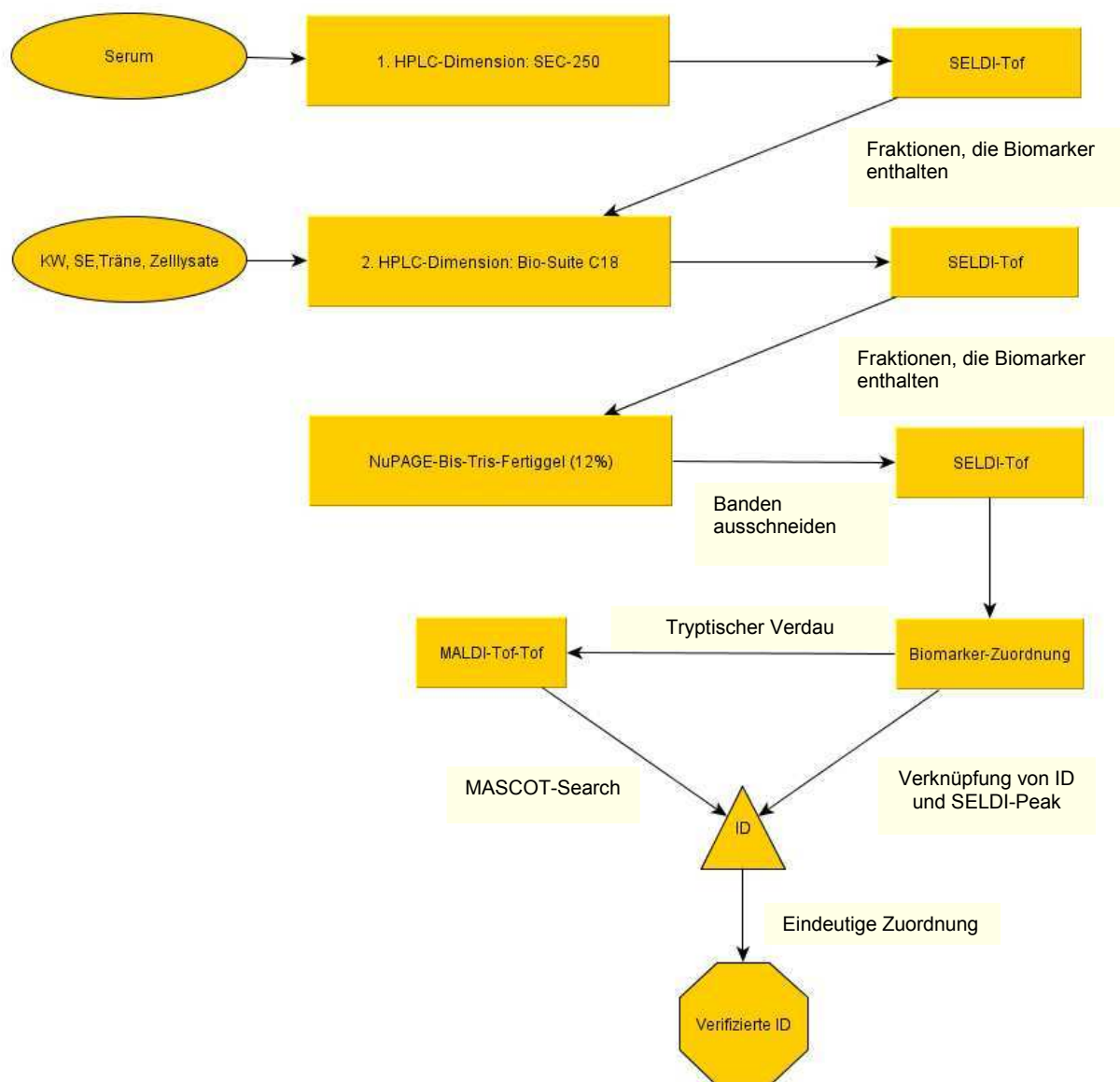


Abbildung 19: Workflow für die Biomarkeridentifizierung

Als Probenmaterial für die Biomarkersuche eingesetztes Serum, muß zunächst über eine „Size-Exclusion“-Säule (SEC-250, 1. HPLC-Dimension) vorfraktioniert werden. Kammerwasser (KW), Schirmer-Eluat (SE), Tränenflüssigkeit und Zelllysate können direkt der 2. HPLC-Dimension („Reversed-Phase“ C18) zugeführt werden.

3.3.1 Serum-Biomarker-Identifizierung

Serum-Proben werden zunächst über eine „Size-Exclusion“-Säule aufgetrennt, um sogenannte hochabundante Proteine, wie Albumin, von den niedermolekularen Zielproteinen zu trennen. Diese eluieren zuerst von der Säule und werden verworfen. Die zweite HPLC-Dimension besteht aus einer BioSuite „Reversed Phase“-Säule, die die Proteine entsprechend ihrer Hydrophobizität auftrennt. Nach der 2-dimensionalen Fraktionierung der Serum-Proben erfolgt schließlich eine SDS-PAGE (Fertigsystem).

1. HPLC-Dimension: Size-Exclusion mit Bio-Sil 250-5 (300 x 7,8 mm; MW:10-300 kDa)

Vorbereitung:

- 8 ml Serum 30 min zentrifugieren (20.000 g, 4°C)
- Überstand abnehmen und über 0,2 µm Spritzenfilter filtrieren
- Serum im „Speed-Vac“ (60°C) auf 400 µl einengen
- Je 100 µl Serum mit 100 µl Laufmittel (50 mM KH₂PO₄, pH 7) mischen
- 30 min zentrifugieren (20.000 g, 4°C)
- Überstand abnehmen
- Probe ist bereit zur Injektion in die HPLC

HPLC: Eingesetzte Proteinmenge ca. 50 mg

- Beladen der Säule mit 4 Injektionen à 200 µl
- Flussrate 400 µl/min, isokratischer Lauf, 40 min
- Sammelfrequenz 30 sec (200 µl/Fraktion), 80 Fraktionen

SELDI-TOF®

- Einengen der Fraktionen im „Speed-Vac“ (60 °C) auf ca. 100 µl
- 2 µl Probe/Spot auf NP20 (Normalphase)
- 3-fach-Messung mit unterschiedlichen Laser-Energien und Focuseinstellungen

Auswertung:

- Ausschluss aller Fraktionen mit Albumin und Ig-Peaks
- Auswahl aller Fraktionen mit potentiellen Biomarker-Peaks

2. HPLC-Dimension (Waters BioSuite C18, 500 Å, 7 µm, 2,0 x 150mm)

Laufmittel:

A	A. bidest	
	Acetonitril	2%
	Trifluoressigsäure (TFA)	0.01%
B	Acetonitril	100%
	Trifluoressigsäure (TFA)	0.01%

- Mischen jeder Fraktion à 100 µl mit 100 µl Laufmittel A
- 30 min zentrifugieren (20.000 g, 4°C)
- Überstand abnehmen
- Probe ist bereit zur Injektion in die HPLC
- Flussrate 80 µl/min, Gradient: 2-100% ACN in 100 min
- Sammelfrequenz 60 sec ,96 Fraktionen

Sammelbeginn: t = 8 min.

Sammelende: t = 94 min.

t (min)	A	B	Flussrate (µl)	Injektion
0	100	0	80	
5	100	0	80	X
10	100	0	80	
20	60	40	80	
90	0	100	80	
100	0	110	80	
110	100	0	120	
120	0	100	120	
130	100	0	120	
140	0	100	120	
150	100	0	120	
160	100	0	120	

Vorbereitung für die anschließende SELDI-TOF® -Analyse:

- Einengen der Fraktionen im „Speed-Vac“ (60 °C) auf ca. 20 µl
- 2 µl Probe/Spot auf NP20 (Normalphase)
- Sandwichpräparation (gesättigte Sinapinsäurematrix)
- 3-fach-Messung mit unterschiedlichen Laser-Energien und Focuseinstellungen

Auswertung der SELDI-TOF® -Analyse:

- Ausschluss aller Fraktionen mit Albumin und Ig-Peaks
- Auswahl aller Fraktionen mit potentiellen Biomarker-Peaks

Fraktionen mit potentiellen Biomarker-Peaks:

- Einengen der entsprechenden Fraktionen im „Speed-Vac“ auf ca. 10 µl

Gellauf auf NuPAGE-Bis-Tris-Fertiggel (12%):

Probe	10µl
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	5 µl
NuPAGEReducing Agent (10x)	2 µl
Aqua Bidest	3 µl
Aufgetragenes Volumen	20 µl

Gellauf ca. 80 min bei 100 V, Coomassie-Färbung über Nacht (ÜN) nach Protokoll, jedoch keine Fixierung! Entfärbung ca. 3 h mit A. bidest und Cellulose.

Anschließende Verarbeitung des präparativen Gels:

- Ausschneiden der Gelstreifen zwischen 0 und 30 kDa
- Gelstücke auf einer sauberen Glasplatte möglichst dünn ausschneiden (max. 1mm Stärke) und von beiden Enden etwa 1 mm für die Elution in 200 µl PCR-Tubes einsetzen, Mittelstück verbleibt für tryptischen Verdau
- Gelstücke mit je 10 µl Elutionslösung überschichten und 2 Stunden im Klimaschrank (10 °C) auf Horizontalshaker (750 rpm) eluieren

Elutionslösung:	Ameisensäure	50 %,	HPLC-Wasser	9,99 %,
	SDS	0,01 %,	Acetonitril	25 %,
	Isopropanol	15 %.		

SELDI-TOF® -Analyse der eluierten Gelstreifen:

- Einengen der Fraktionen im „Speed-Vac“ (60 °C) auf ca. 20 µl
- 2 µl Probe/Spot auf NP20 (Normalphase)
- Sandwichpräparation (gesättigte Sinapinsäurematrix)
- 3-fach-Messung mit unterschiedlichen Laser-Energien und Focuseinstellungen

Tryptischer Verdau:

1. Gelstück in 500 µl Eppendorf-Tube mit je 50 µl ACN überschichten
2. Gelstücke 15 min dehydrieren, anschließend anzentrifugieren und Überstand abnehmen
3. Gelstücke 15 min bei 45 °C im „Speed-Vac“ trocknen
4. Zugabe von je 50 µl Trypsinlösung [10 ng / µl] in 50 mM NH₄HCO₃
5. Inkubation ÜN bei 37°C
6. Verdau durch zehnminütiges Einfrieren bei -80 °C stoppen
7. Lösung auf ca. halbes Volumen im „Speed-Vac“ bei 45 °C einengen

MALDI MSMS

Präparation auf Bruker Anchor-Target (Kat.-Nr. #209513) in „double-layer“-Technik mit Zimtsäure-Matrix (20 mg/10 ml). Messung: Peptide Mass Fingerprint (PMF) + LIFT-Spektrum

3.3.2 Tränen-Biomarker-Identifizierung

Fraktionierung der Tränenflüssigkeit durch Reversed Phase HPLC (Waters BioSuite C18, 2,0 x 150 mm)

Vorbereitung:

- Einsatz von etwa 50 µl Tränenflüssigkeit
- Mischen von 50 µl Träne mit 100 µl A
- 30 min zentrifugieren (20000 g, 4 °C)
- Überstand abnehmen und injizieren

Laufmittel:

A	A. bidest	
	Acetonitril	2 %
	Trifluoressigsäure (TFA)	0.01 %
B	Acetonitril	100 %
	Trifluoressigsäure (TFA)	0.01 %

- Flussrate 80 µl/min, Gradient: 2-100% ACN in 100 min
- Sammelfrequenz 60 sec, 96 Fraktionen
Sammelbeginn: t = 8 min.
Sammelende: t = 94 min.

t (min)	A	B	Flussrate (µl)	Injektion
0	100	0	80	
5	100	0	80	x
10	100	0	80	
20	60	40	80	
90	0	100	80	
100	0	110	80	
110	100	0	120	
120	0	100	120	
130	100	0	120	
140	0	100	120	
150	100	0	120	
160	100	0	120	

SELDI-TOF®

- Einengen der Fraktionen im „Speed-Vac“ (60 °C) auf ca. 20 µl
- 2 µl Probe/Spot auf NP20 (Normalphase)
- Sandwichpräparation (gesättigte Sinapinsäurematrix)
- 3-fach-Messung mit unterschiedlichen Laser-Energien und Focuseinstellungen

Auswertung:

- Ausschluss aller Fraktionen mit Albumin und Ig-Peaks
- Auswahl aller Fraktionen mit potentiellen Biomarker-Peaks

Fraktionen mit potentiellen Biomarker-Peaks:

- Einengen der entsprechenden Fraktionen im „Speed-Vac“ auf ca. 10 µl

Gellauf auf NuPAGE-Bis-Tris-Fertiggel (12 %):

Probe	10µl
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	5 µl
NuPAGEReducing Agent (10x)	2 µl
Aqua Bidest	3 µl
Aufgetragen Volumen	20 µl

Gellauf ca. 80 min bei 100 V, Coomassie-Färbung ÜN nach Protokoll, jedoch keine Fixierung! Entfärbung ca. 3 h mit A. bidest und Cellulose.

Blindes Ausschneiden der „Gelbanden“ zwischen 0 und 30 kDa

- Gelstücke auf einer sauberen Glasplatte möglichst dünn ausschneiden (max. 1 mm Stärke) und von beiden Enden etwa 1mm für die Elution in 200 µl PCR-Tubes einsetzen, Mittelstück verbleibt für tryptischen Verdau
- Gelstücke mit je 10 µl Elutionslösung überschichten und 2 Stunden im Klimaschrank (10 °C) auf Horizontalshaker (750 rpm) eluieren

Elutionslösung:	Ameisensäure	50 %,	HPLC-Wasser	9,99 %,
	SDS	0,01 %,	Acetonitril	25 %,
	Isopropanol	15 %.		

Die Zugabe von SDS steigert die Elutionseffizienz enorm und ermöglicht erstmals die Rückgewinnung von Proteinen >20 kDa aus präparativen Gelen. Die niedrige Detergenz-Konzentration von gerade 0,01 % hat dabei keine störenden Einfluß auf massenspektrometrische Analysemethoden.

SELDI-TOF®

- Einengen der Fraktionen im „Speed-Vac“ (60 °C) auf ca. 20 µl
- 2 µl Probe/Spot auf NP20 (Normalphase)
- Sandwichpräparation (gesättigte Sinapinsäurematrix)
- 3-fach-Messung mit unterschiedlichen Laser-Energien und Focuseinstellungen

Tryptischer Verdau (EMBL-Protokoll):

1. Gelstück in 500 µl Eppendorf-Tube mit je 50 µl ACN überschichten
2. Gelstücke 15 min dehydrieren, anschließend anzentrifugieren und Überstand abnehmen
3. Gelstücke 15 min bei 45°C im „Speed-Vac“ trocknen
4. Zugabe von je 50 µl Trypsinlösung [10 ng/µl] in 50 mM NH₄HCO₃
5. Inkubation ÜN bei 37°C
6. Verdau durch Einfrieren bei (10 min, -80 °C) stoppen
7. Lösung auf ca. halbes Volumen im „Speed-Vac“ bei 45°C einengen

MALDI MSMS:

Präparation auf Bruker Anchor-Target (#209513) in „*double-layer*“-Technik mit Zimtsäure-Matrix (20 mg/10ml).

Messung: Peptide Mass Fingerprint (PMF) + LIFT-Spektrum mit Bruker Ultraflex I

3.4 Auswertung der methodischen Ansätze

Zur signifikanten Identifizierung von Biomarkern und deren eindeutiger Zuordnung zu entsprechenden Proteinpeaks waren weit mehr als 2000 SELDI und MALDI-Messungen und mehr als 200 LC-Läufe notwendig. Insbesondere die im Methodenteil geschilderten Vorversuche mit Mikrokon-Filtern, Elektroelution und *Bead*-aufreinigung erwiesen sich als mit großen methodischen Defiziten behaftet: Die Fraktionierungsleistung durch Mikrokon-Filter und *Bead*-Aufreinigung war nicht ausreichend und die Bindekapazität bei den *Beads* zu gering, als dass diese Versuche eine erfolgreiche und eindeutige Zuordnung einer signifikanten ID mit einem SELDI-Peak ermöglicht hätten. Die Elektroelutionen haben den methodischen Nachteil, daß in viel zu großen Volumina eluiert werden muss und nach dadurch notwendigen Konzentrations- und Aufreinigungsschritten von den gesuchten niedrigabundanten Proteinen nichts mehr nachweisbar ist.

Alle verwertbaren Ergebnisse, inklusive signifikanter ID und korrespondierendem SELDI-Spektrum entstanden deshalb unter Anwendung des unter Abbildung 19 dargestellten Workflow.

Diese signifikanten Identifikationen sind im Ergebnisteil mit jeweiligem Score, Proteinfunktion nach Uniprot- Datenbankrecherche über <http://www.uniprot.org/> und Literaturstellen, die deren mögliche Beteiligung an der Pathogenese des Glaukoms nahelegen, zusammengefasst.

4 Ergebnisse

4.1 Kammerwasserfraktionierungen über Ym30 und Ym3-Filter

Die für dutzende Fraktionierungsdurchgänge hier exemplarisch dargestellten Resultate der Versuche mit Molekularsieben verschiedener *Cut-offs*, ob mit BSA zuvor geblockt oder ungeblockt, und der *Bead*-Fraktionierung mit unterschiedlichsten funktionellen Oberflächen, zeigen die methodischen Beschränkungen dieser Ansätze auf. Bei der Fraktionierung mit Filtern kam es häufig vor, dass die Zielproteine während der Waschschriffe verloren gingen. Versuchte man dieses Problem mit höherem Probeneinsatz zu umgehen, resultierte das häufig mit dem raschen Verstopfen der Filtereinsätze. Dies machte stundenlange Zentrifugationsschritte notwendig. Im Folgenden ist exemplarisch ein Ergebnis einer Vorfraktionierung mit Microcon-Filtern dargestellt:

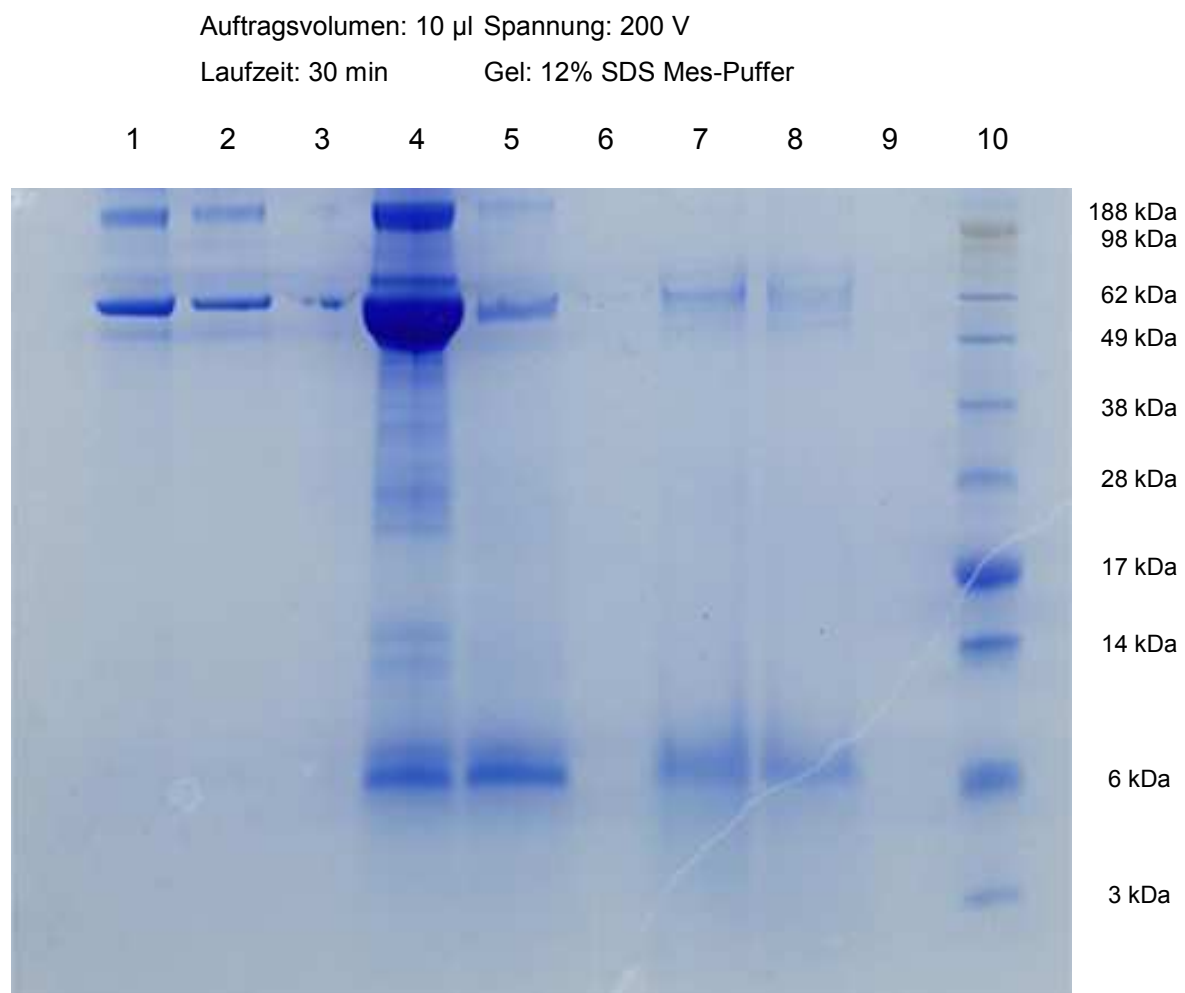


Abbildung 20: Gellauf einer Kammerwasserfraktionierung nach Fraktionierung über Microcon-Filter

Spur 1: Tube 2, Eluat

Spur 3: Leer

Spur 5: Tube 1, Waschschrift 2

Spur 7: Tube 2, Waschschrift 1

Spur 9: Leer

Spur 2: Tube 1, Eluat

Spur 4: Tube 2, Waschschrift 2

Spur 6: Leer

Spur 8: Tube 1, Waschschrift 1

Spur 10: SeeBlue-Standard

4.1.1 Kammerwasserfraktionierungen über C18 Beads

Bei den *Bead*-versuchen zeigten sich die limitierten Bindungskapazitäten und das begrenzte Fraktionierungspotential als nachteilig. Zur groben Vorfraktionierung, wie sie bei Profilingstudien eingesetzt werden, mögen sich *Beads* gut eignen.

Für die Biomarkersuche, die einen Gellauf einschließt, stoßen *Beads* auch aus Kostengründen schnell an ihre Grenzen.

Gellauf-Bedingungen wie oben.

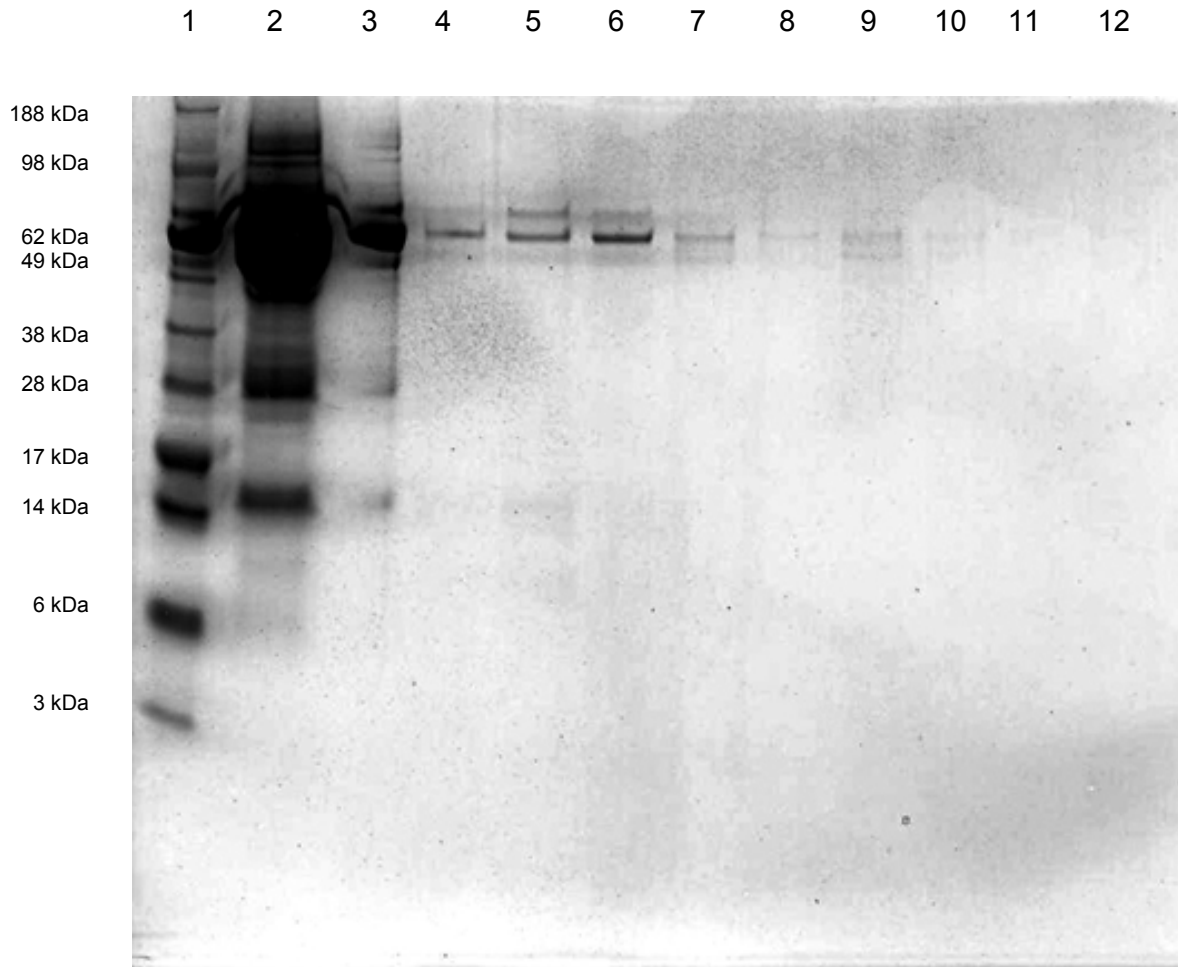


Abbildung 21: Gellauf einer Kammerwasserfraktionierung über C18-Beads

Da die in einer Gelbande enthaltene Proteinmenge, sowohl für einen tryptischen Verdau zur massenpektrometrischen Identifizierung (ID), als auch für die Gel-Elution zur Verifizierung des potentiellen Biomarker-Kandidaten ausreichen musste, war die Biomarkersuche über diesen Weg ein zeitraubendes Glücksspiel.

Die Nutzung dieser Methodik brachte im Rahmen dieser Arbeit zwar einige vielversprechende Identifikationen, jedoch scheiterte eine erfolgreiche Zuordnung von ID und SELDI-Peak stets an der Gel-Elution.

4.2 Fraktionierungsversuche mit der Multiaffinitäts (MARS)-Säule

Für die Fraktionierungsversuche mit der Multiaffinitätssäule wurde Serum eingesetzt.

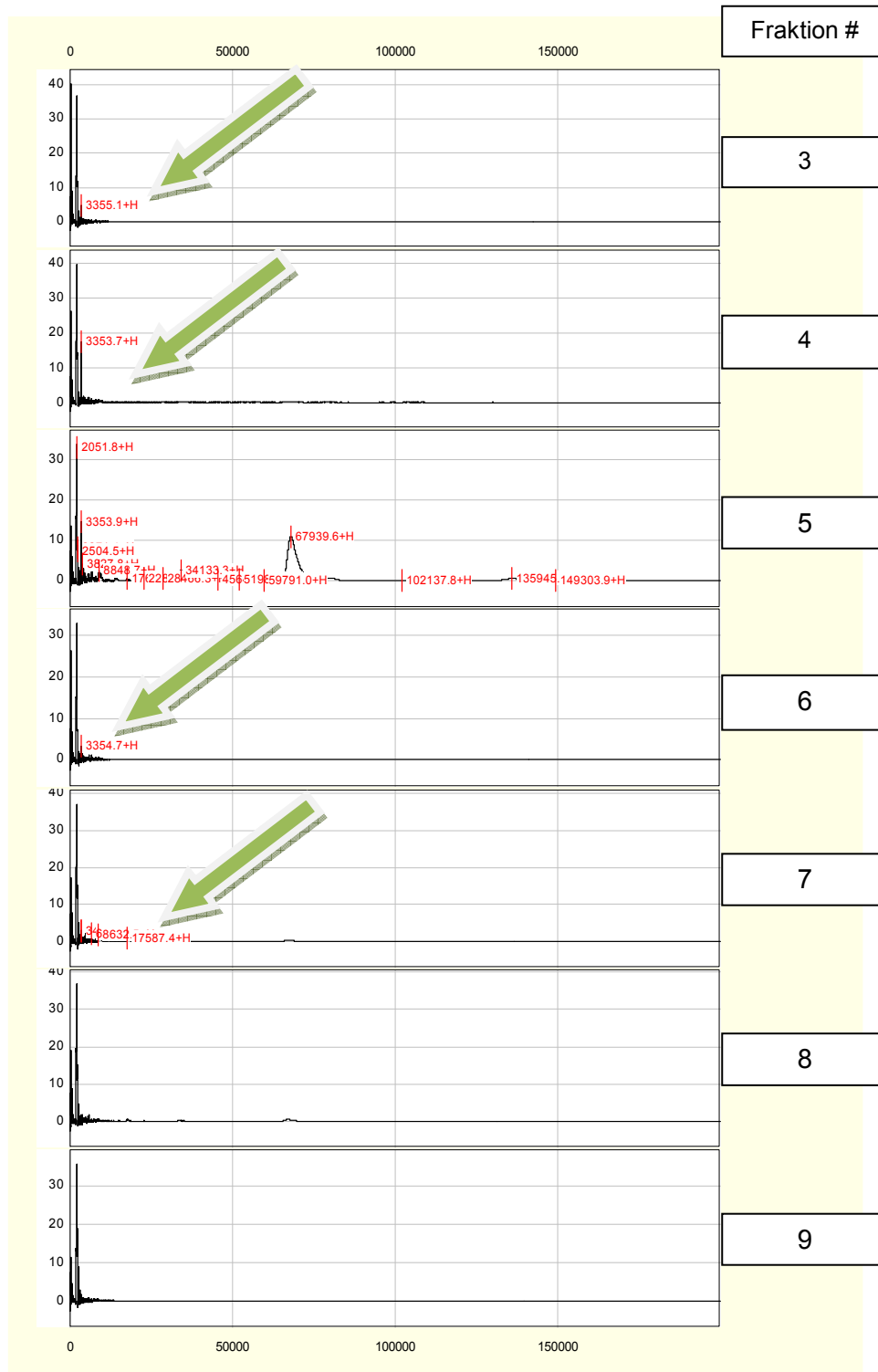


Abbildung 22: SELDI-Spektren der von der MARS-Säule eluierten Fraktionen

Es zeigte sich, dass die Bindekapazität dieser Säule sehr begrenzt ist, was an der Gegenwart von Serum im Durchfluss zu erkennen ist. Nachteilig ist außerdem der Gehalt hoch-abundanter Proteine in den Elutionsfraktionen, die gemeinsam mit den niedrig-abundanten Proteinen von der Säule eluieren (Abbildung 22, Fraktion 5).

Zwar führt die Vorfraktionierung der Serum-Proben mit der MARS-Säule im Vergleich von Albumin, Transferrin und der Ig-Fraktion zu den niedrig-abundanten Proteine zu einer partiellen Abtrennung der hoch-abundanten Proteine. Eine vollständige Trennung dieser beiden Fraktionen war jedoch nur möglich, wenn man gleichzeitig auf einen Großteil der niedrig-abundanten Proteine verzichtete (Abbildung 22, Fraktionen 3, 4, 6 und 7 (Pfeilmarkierungen im unteren Massenbereich)).

4.3 Beispiel einer Elektroelution mit dem „Whole Gel Eluter“

Um die Effektivität des „Whole Gel Eluter“ zu testen, wurden zwei Gele mit einer definierten Proteinkomposition benötigt, wofür aufeinander folgende Fraktionen einer C18-Tränen-Auftrennung gepoolt wurden.

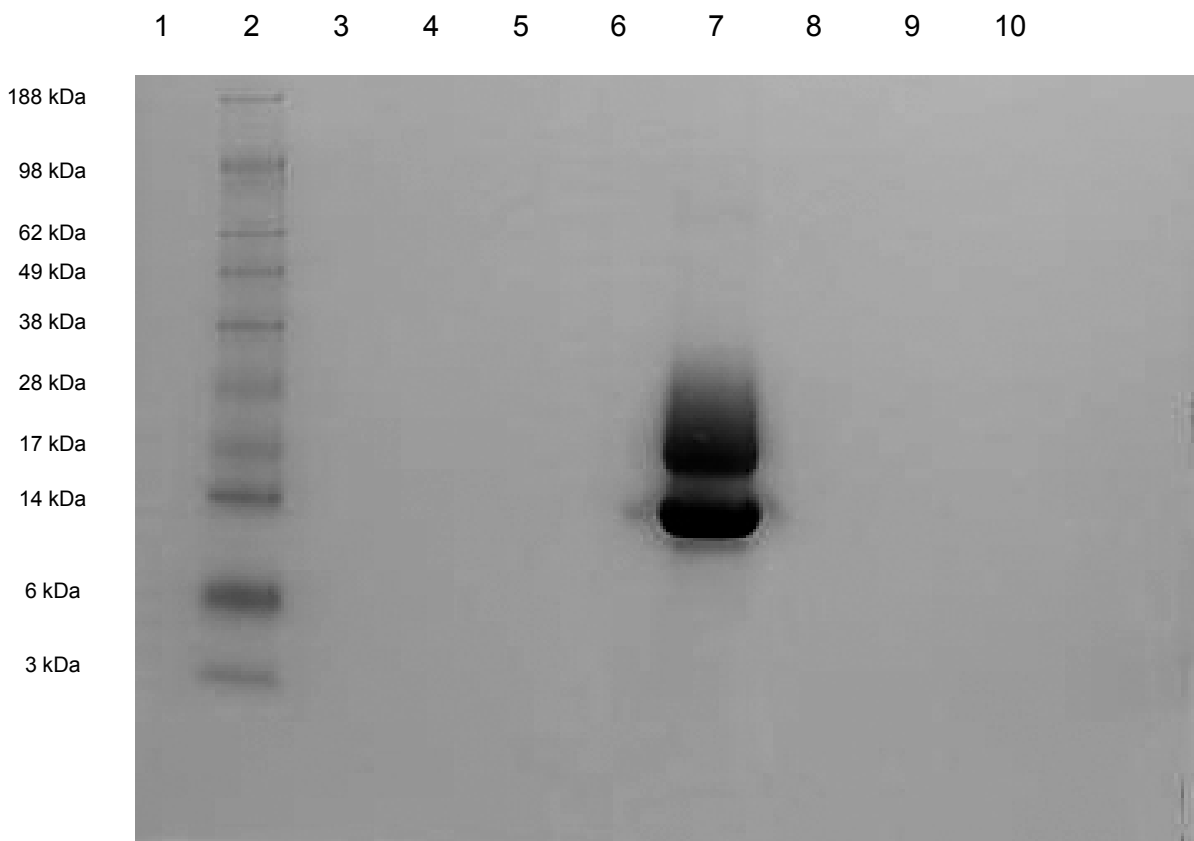


Abbildung 23: SDS-Gel mit gepoolten Tränen-HPLC-Fraktionen. Zu sehen sind zwei Banden, die Lysozym bei 14 kDa und Lipocalin bei 17 kDa repräsentieren.

Marker: SeeBlue

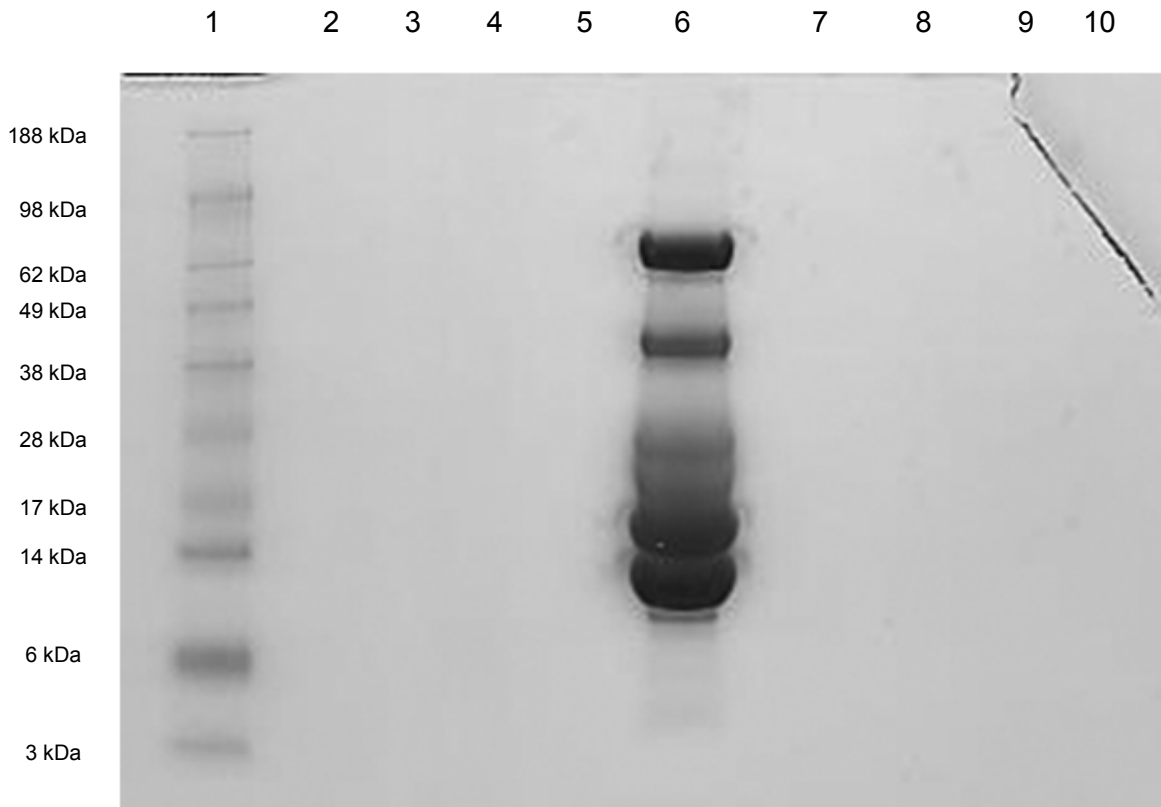


Abbildung 24: SDS-Gel mit gepoolten Tränen-HPLC-Fractionen

Marker: SeeBlue

Beide Gele wurden zur Elution jeweils in den „Whole-Gel-Eluter“ eingelegt, um die Proteine in eine der darunter liegenden Rinnen (hier Spuren) zu blotten. Die Spuren wurden den jeweiligen zu erwartenden Massenbereichen des Gels zugeordnet.

Gel 1: Spur 1-13

- 4: 62 kDa
- 5: 38 kDa
- 6: 28 kDa
- 7: 17 kDa
- 8: 14 kDa
- 9: 6 kDa
- 11: 3 kDa

Gel 2: Spur 14-26

- 16: 98 kDa
- 17: 62 kDa
- 18: 38 kDa
- 19: 28 kDa
- 20: 17 kDa
- 21: 14 kDa
- 23: 6 kDa
- 24: 3 kDa

Die Elution erfolgte bei 250 mA (const.) für 30 Minuten. Die jeweils 2 ml Eluat pro Spur wurden bei 60 °C auf etwa 500 µl eingeeengt und je 2 µl zur massenspektroskopischen Analyse auf einen CM10-Chip aufgetragen.

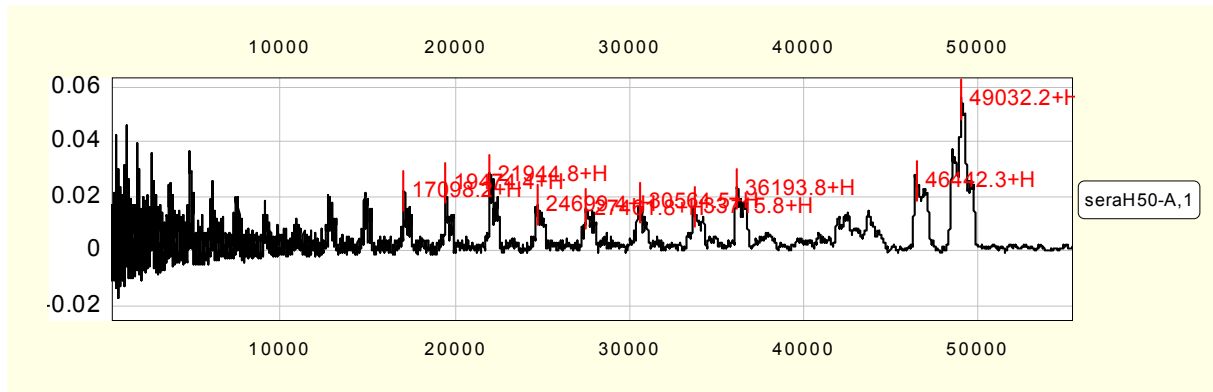


Abbildung 25: Exemplarisches Ergebnis der Eluate mit Polymerkontamination.

Starke Polymersignale stören die Proteinmessung.

Zu sehen sind im SELDI-Spektrum des Elektroeluates Polymersignale, die mutmaßlich durch eluiertes Polyacrylamid hervorgerufen werden. Um die Elution von diesen Kontaminationen zu befreien, erfolgte eine Acetonfällung (Merrill and Fleisher 1932).

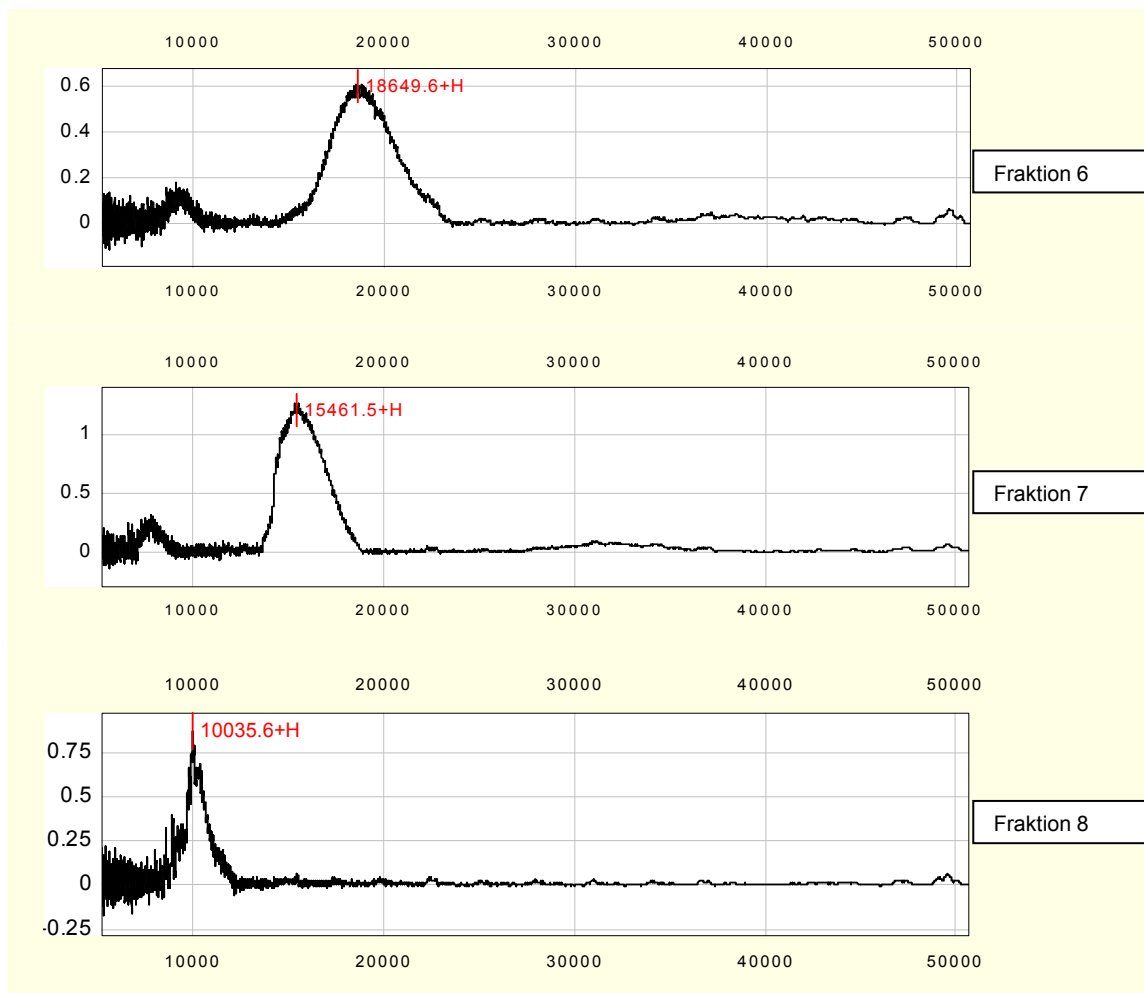


Abbildung 26: SELDI-Spektren der Eluat-Fractionen 6,7 und 8.

Zu erwarten wären deutliche Signale von Lipocalin und Lysozym. Zu sehen sind jedoch nur Polymersignale und messtechnisch bedingte Artefakte, sogenannte „Fokusbeulen“.

Wie das SELDI-Spektrum zeigt, war die Aceton-Fällung zur Abtrennung der Acrylamid-Kontamination nicht erfolgreich. Zu sehen sind lediglich „Peaks“ im Grundrauschen und eine „Fokus-Beule“ bei 15 kDa, ein Artefakt. Diese Ergebnisse wurden in mehrfachen Vorversuchen erhalten. Mit Elutionsfraktion 7 wurde anschließend eine Ionenpaarextraktion nach Henderson durchgeführt. Danach wurde im SELDI- Spektrum ein Massepeak bei 17615Da erhalten, der dem von Lipocalin entspricht.

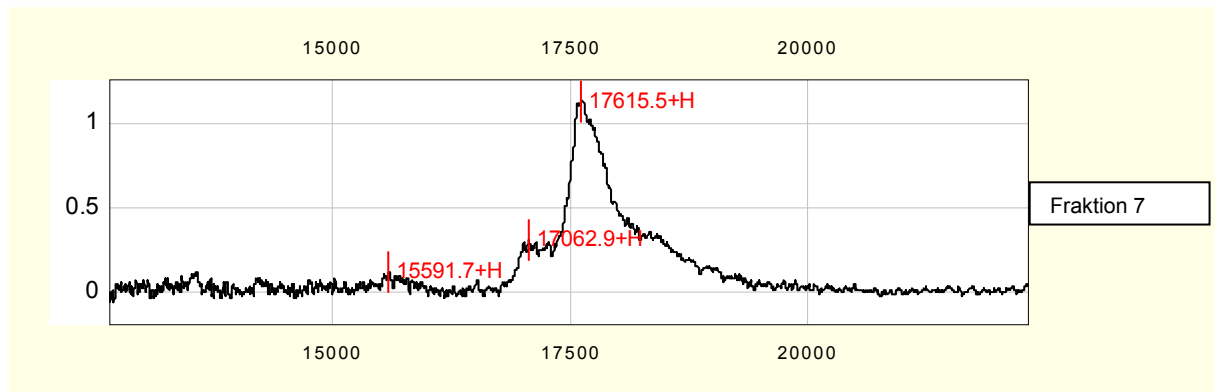


Abbildung 27: SELDI-Spektrum des Eluates 7 nach der Ionenpaarextraktion

Zu sehen ist ein Lipocalin-Peak bei 17615 Da

Der tryptische Verdau eines Aliquots führte nach MALDI-TOF-Analyse zu folgenden Identifikationen:

<i>Score</i>	<i>Identifikation</i>	<i>Molekular-Gewicht</i>	<i>Proteinname</i>
158/ 7/ 2	LCN1_HUMAN	19409 Da	Lipocalin
98/ 18/ 1	K1C10_HUMAN	59711 Da	Keratin, type I cytoskeletal 10
84/ 5/ 2	LYSC_HUMAN	16982 Da	Lysozym
61/ 5/ 2	PIP_HUMAN	16847 Da	Prolactin-inducible protein
58/13/ 0	DESM_HUMAN	53560 Da	Desmin

Tabelle 1: Identifikationen aus der Tränenflüssigkeit

Den höchsten Score erreichte in Fraktion 7 die Identifikation für Lipocalin mit 158 Punkten, 7 Peptiden und 2 MSMS-Spektren. Daneben fanden sich Keratin, Lysozym, das Actin-bindende Protein Prolactin-inducible protein und das intermediäre Filamentprotein Desmin.

Wie die positive Identifizierung dieser Proteine zeigt, lassen sich mit der Methode der „whole gel elution“ aus dem Proteingel im Prinzip Proteine gewinnen.

Dies gelingt jedoch nur bei intensiv gefärbten Gelbanden und nach aufwendiger Nachbehandlung (Ionenpaarextraktion). Für die ID von Biomarkerkandidaten, die ja in weit geringeren Konzentrationen vorliegen, ist diese Methode daher nicht geeignet.

4.4 Identifikation des Platelet basic protein precursor (PBP/CXCL7)

Die zweidimensionale HPLC-Fraktionierung nativer Serum-Proteine (1. Dimension: Agilent Zorbax SCX, 2. Dimension: Waters BioSuite RPC18) führte zur Identifizierung von PBP/CXCL7. Nach dem SCX-Lauf konnte nach der SELDI-Auswertung in Fraktion 30 eine Peak-Gruppe bei 9 kDa identifiziert werden, die als potentielle Biomarker-Kandidaten gelten (Abb. 28).

SELDI-Messung: Je 2 µl Analysat/Spot, gefolgt von 2 x je 1 µl Matrix (20 mg SPA, 750 µl ACN, 750 µl A. bidest, 15 µl TFA).

Fraktion 30

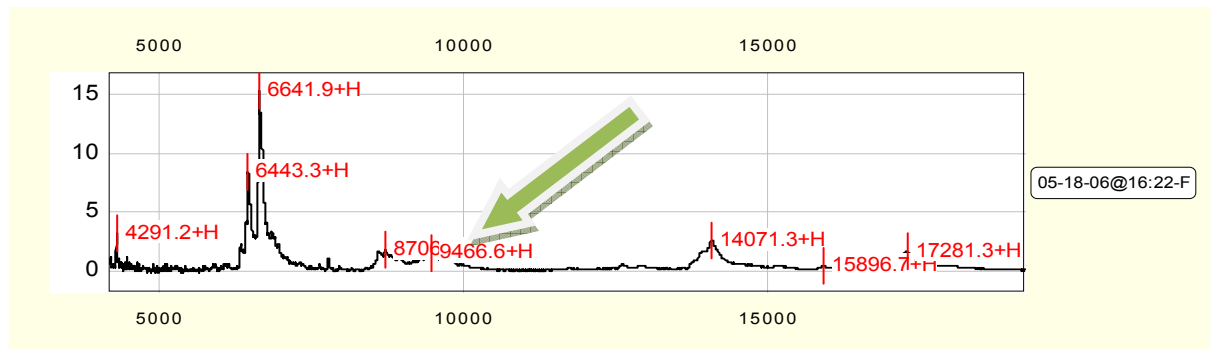


Abbildung 28: SELDI-Spektrum der SCX-Fraktion 30 mit Peak-Gruppe bei 9 kDa (Pfeil)

Fraktion 30 wurde für eine nachfolgende C18 RP-Auftrennung (2. HPLC-Dimension) ausgewählt.

2. Dimension (C18 RP-HPLC): 48 Fraktionen wurden minütlich mit „Sunchrom-Spotter“ in 96 MTP gesammelt (120 µl/Fraktion) und anschließend auf etwa 50 µl in der „Speed-Vac“ bei 60 °C aufkonzentriert. Auftragung: Je 2 µl Analysat/Spot, gefolgt von 2 x je 1 µl Matrix (20 mg CHCA, 750 µl ACN, 750 µl A. bidest, 15 µl TFA). In Fraktion 31 wurde das gesuchte Fragment als prominentes Signal bei ca. 9311 Da gefunden.

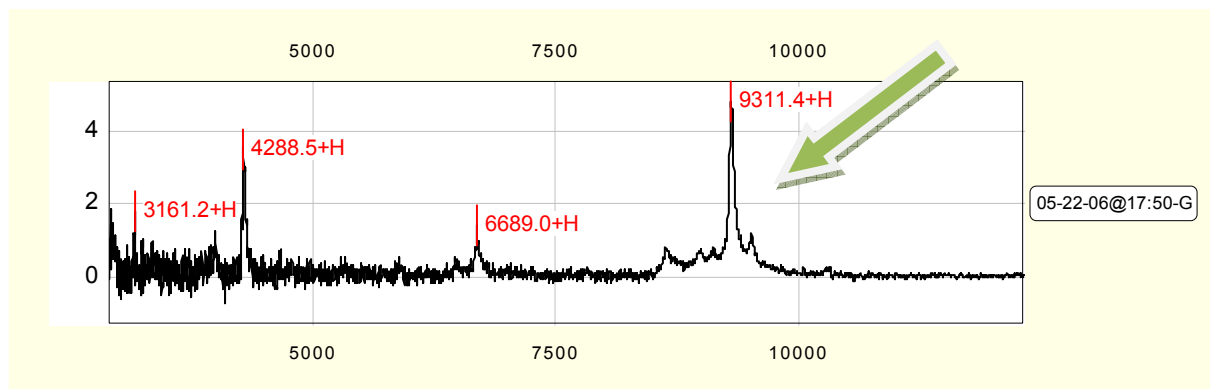


Abbildung 29: SELDI-TOF® Spektrum von Fraktion 31 mit CXCL7-Peak bei 9311 Da

Fraktion 31 wurde nach dem Standard (EMBL)-Protokoll (*in gel digestion*) verdaut. Je 1 µl Verdau wurde unter Verwendung einer CHCA-Matrix (20 mg CHCA, 5 ml ACN, 5 ml HPLC-Wasser, 10 µl TFA) auf einem Anchor-Target präpariert (double-layer) und anschließend im MALDI-TOF-TOF gemessen. Der Verdau wurde doppelt gemessen, wobei PBP (CXCL7)

jeweils signifikant identifiziert wurde (siehe Tabelle 2). CXCL7 stimuliert die DNA-Replikation, Mitose, Glycolyse, intrazelluläre cAMP-Akkumulation, Prostaglandin-E2-Sekretion und Synthese von Hyaluronsäure. Es stimuliert die Sekretion von Plasminogenaktivatoren und ist ein Bindungspartner von CXCR1 und CXCR2. CXCL7 und dessen Fragmente sind potente Chemoattraktoren und Aktivatoren für neutrophile Granulozyten (Schenk, Petersen et al. 2002; Gleissner, von Hundelshausen et al. 2008).

Das *Platelet Basic Protein* ist somit ein thrombozytäres Cytokin aus der Familie der CXC-Chemokine, dem ein SELDI-Peak bei 9311 Da zugeordnet werden kann (Iida, Haisa et al. 1996; Schaffner, King et al. 2004). Da der 9311 Da-Peak in einem Bereich liegt, der als Glaukom-Biomarker infrage kommen könnte, lohnt es sich, eine mögliche Rolle der Thrombozyten beim Glaukom zu untersuchen.

Score	Identifikation	Molekular-Gewicht	Proteinname
28/ 1/ 1	SCYB7_HUMAN	14171 Da	Platelet basic protein precursor (PBP) (CXCL7)
65/ 3/ 2	SCYB7_HUMAN	14171 Da	Platelet basic protein precursor (PBP) (CXCL7)

Tabelle 2: Mascot-Resultate der Fraktion 31 (1. Messung; Spot E3).

Dargestellt ist in der oberen Reihe die Identifizierung von CXCL7 anhand eines LIFT-Spektrums mit einem erzielten MASCOT-Score von 28. In der unteren Reihe resultierte eine Kombination aus drei PMF-Spektren (Peptide Mass Fingerprint) und zwei LIFT-Spektren in einem MASCOT-Score von 65.

Score	Identifikation	Molekular-Gewicht	Proteinname
26/ 1/ 1	SCYB7_HUMAN	14171 Da	(P02775) Platelet basic protein precursor (PBP) (CXCL7) SCYB7_HUMAN
58/ 4/ 1	SCYB7_HUMAN	14171 Da	(P02775) Platelet basic protein precursor (PBP) (CXCL7) SCYB7_HUMAN

Tabelle 3: Mascot-Resultate der Fraktion 31 (2. Messung; Spot E4).

Dargestellt ist in der oberen Reihe die Identifizierung von CXCL7 anhand eines LIFT-Spektrums mit einem erzielten MASCOT-Score von 26. In der unteren Reihe resultierte eine Kombination aus vier PMF-Spektren (Peptide Mass Fingerprint) und einem LIFT-Spektrum in einem MASCOT-Score von 58 (Abschnitt auch Abschnitt 3.2.13: Prinzip des MALDI-TOF).

PBP konnte in der MALDI-Messung auf zwei benachbarten Spots durch PMF und der Generierung von LIFT-Spektren mehrfach signifikant identifiziert werden.

4.5 PDGF-Anreicherung aus dem Serum mit Protein-G Beads

2 x 20 µl Protein G-Beads wurden nach Protokoll mit α-PDGF-Antikörpern gekoppelt und mit DMP gecrosslinkt, wobei benutzte PDGF-Beads wiederverwendet werden können. Die Beads wurden jeweils über Tag oder ÜN mit Serum inkubiert und PDGF-Fragmente mit jeweils 20 µl Citrat-Puffer (pH3) eluiert. Es wurden jeweils 6 Kopplungs/Elutionszyklen durchgeführt. Die daraus resultierenden 360 µl Eluat wurden auf ca. 20 µl eingengt, im SELDI auf CM 10 Chips (Elution-Protokoll) gemessen und auf ein 12%-SDS-Gel geladen (Abbildung 30). Die Banden mit den in Frage kommenden Massenbereichen wurden ausgeschnitten und wie oben beschrieben für die SELDI-Analyse vorbereitet.

Auftragsvolumen: 20 µl, Gel: 12 % SDS Mes-Puffer, Spannung: 200 V, Laufzeit: 30 min.

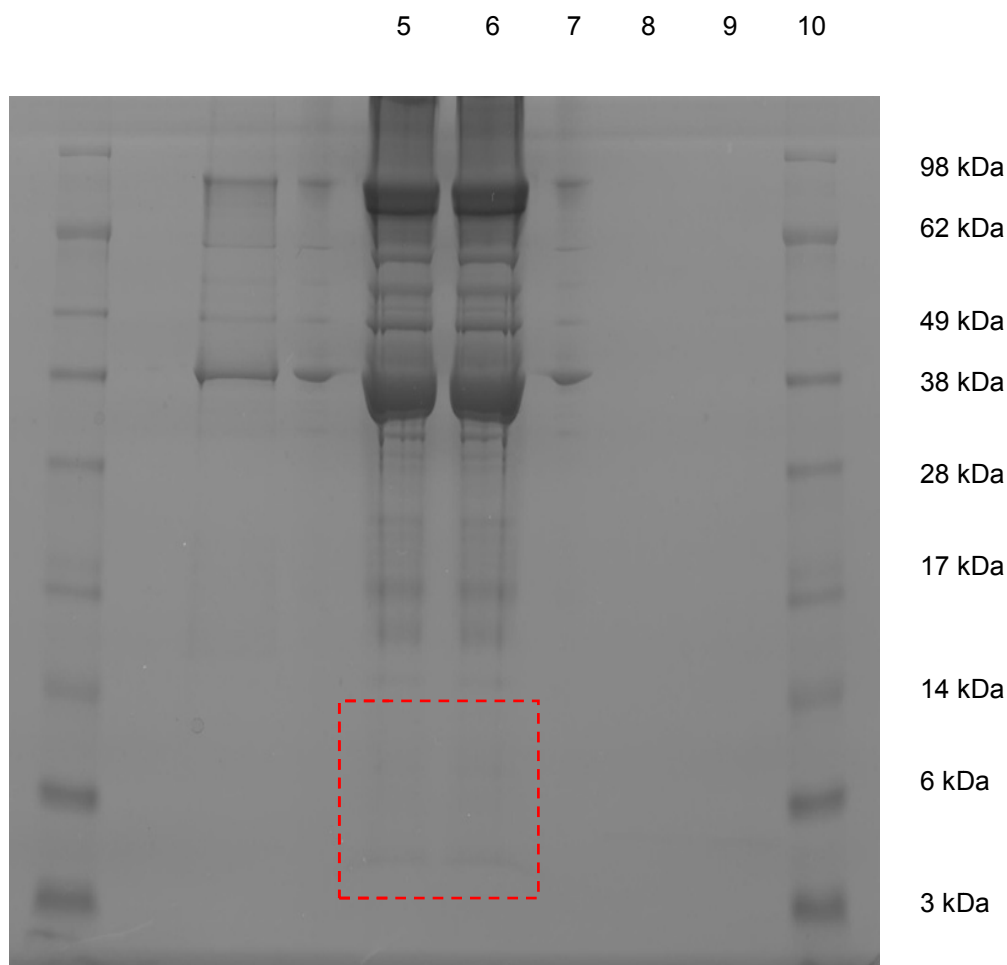


Abbildung 30: Gel mit stark aufkonzentrierten PDGF-Eluaten

Das Gel ist leicht überladen, um auch die schwach konzentrierten Fragmente eluieren und identifizieren zu können. Der für das PDGF zu erwartende MW-Bereich ist markiert.

Spur 1: SeeBlue-Standard
 Spur 3: leer
 Spur 5: PDGF-Eluat
 Spur 7: leer
 Spur 9: leer

Spur 2: leer
 Spur 4: Leer
 Spur 6: PDGF-Eluat
 Spur 8: leer
 Spur 10: SeeBlue-Standard

4.5.1 Identifikation von CXCL4

Die *Bead*-basierte Suche nach weiteren Vertretern der PDGF-Familie führte zur Identifizierung von CXCL4 (PF4). Die Masse von CXCL4 beträgt 11123 Dalton. Es wurde mit einem Mascot-Score von 64, zwei übereinstimmenden Peptidsequenzen und einem Lift-Spektrum identifiziert.

Protein:	Platelet factor 4 precursor (PF-4) (CXCL4) (Oncostatin A) (Iroplact) - Homo sapiens (Human) PLF4_HUMAN					Peak threshold:	0.0
Intensity coverage:	12.6 % (152854 cnts)	Sequence coverage MS:	16.8 %	Sequence coverage MS/MS:	8.9 %	pI:	10.2
	10	20	30	40	50	60	70
	MSSAAGFCAS	RPGLLFLGLL	LLPLVVFAS	AEAEEDGDLQ	CLVVKTSQW	RPRHITSLEV	IKAGFNCPTA
							QLIATLKNGR
							KICLDLQAPL
	100	110					
	YKIIKKLLE	S					

Abbildung 31: Mascot-Identifizierung für CXCL4.

Das durch MALDI-Analyse identifizierte Peptidfragment ist **grau** unterlegt (gelbe Markierung). Die obenstehenden roten Felder stehen dabei für **N-terminale b-Ionen**, untenstehende Felder für **C-terminale y-Ionen**. Unter **Intensity Coverage** (grüne Markierung) versteht man das Verhältnis der aufsummierten Intensitäten der Peaks, die zu der ID führen, zu den aufsummierten Intensitäten aller gemessener Peaks. Die **Sequence Coverage MS** (blaue Markierung) ist ein Maß für die durch MS-Spektren erreichte Sequenzabdeckung, wobei die **Sequence Coverage MSMS** (orange Markierung) die entsprechende Abdeckung durch die generierten Lift-Spektren wiedergibt. Der isoelektrische Punkt des identifizierten Proteins ist durch **pI** (lila Markierung) angegeben, das Molekulargewicht in **kDa** (graue Markierung).

Sämtliche nachfolgenden signifikanten Proteinidentifikationen werden, soweit verfügbar, in der geschilderten Weise dokumentiert.

CXCL4 konnte einem SELDI-Peak 7794Da zugeordnet werden und kommt somit für einen Glaukom-Biomarker-Kandidaten, der bei 7775Da liegt infrage (Abbildung 32). Der zur Familie der CXC-Chemokine gehörende CXCL4 wird während der Thrombozytenaggregation freigesetzt und neutralisiert dabei den antikoagulierenden Effekt von Heparin. Es wirkt positiv chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Monozyten (Schenk, Petersen et al. 2002; Gleissner, von Hundelshausen et al. 2008; Mueller, Meiser et al. 2008).

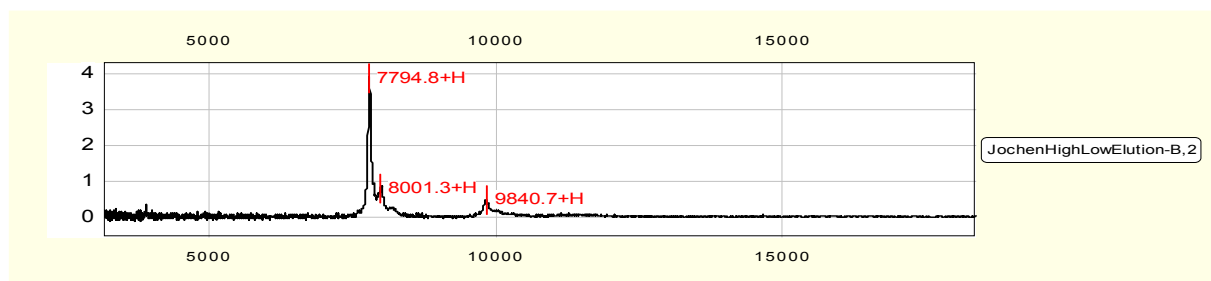


Abbildung 32: SELDI-Spektrum mit CXCL4-Peak bei 7795 Da

4.5.2 Identifikation von Complementfaktor C1q

Neben PDGF-Derivaten konnte der Complementfaktor C1q mit einer Masse von 26670Da mit einem Score von 98, sechs zugeordneten Peptidsequenzen und drei Lift-Spektren identifiziert werden (Abbildung 33). C1q ist die erste Komponente des klassischen Wegs, der Antikörper-vermittelt oder durch direkte Bindung an der Oberfläche eines Pathogens die Komplementaktivierung einleitet (Sato, Van Dixhoorn et al. 1997; Kishore, Gaboriaud et al. 2004).

Protein: Complement C1q subcomponent subunit B precursor - Homo sapiens (Human) C1QB_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 15.8 % (27191 cnts)		Sequence coverage MS: 11.6 %		Sequence coverage MS/MS: 11.6 %		pl: 9.6	MW (kDa): 26.7			
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MKIPWGSIPV	LMLLLLGLI	DISQAQLSCT	GPPAIPGIPG	IPGTPGPDGQ	PGTPGIKGEK	GLPGLAGDHG	EFGEKGDPI	PGNPGKVGPK		
100	110	120	130	140	150	160	170	180		
GPMGPKGGPG	APGAPGPKGE	SGDYKATQKI	AFSATRTINV	PLRRDQTIRF	DHVITNMNNN	YEPKSGKFTC	KVPGLYYFTY	HASSRGNLCV		
190	200	210	220	230	240	250	260			
NLMRGRERAQ	KVVTFCDYAY	NTFQVTTGGM	VLKLEQGENV	FLQATDKNSL	LGMEGANSIF	SGFLLPDME	A			

Abbildung 33: Mascot-Identifizierung für C1q

Im SELDI Spektrum fand sich C1q mit einem Peak bei 19828 Da wieder (Abbildung 34)

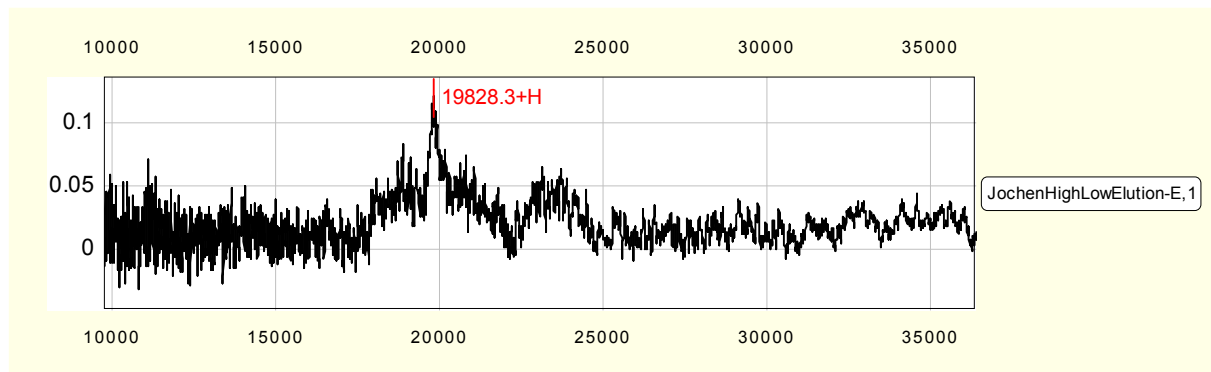


Abbildung 34: SELDI-Spektrum mit C1q-Peak bei 19828 Da

4.5.3 Identifikation von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase (TPTE2/TPIP)

TPTE2 ist ein Tumorsuppressorhomolog mit einer Masse von 61457 Da (Abbildung 35) und stellt ein PTEN-Homolog mit vergleichbarer katalytischer Aktivität dar (Maehama and Dixon 1998; Simpson and Parsons 2001; Walker, Downes et al. 2001; Leslie and Downes 2002; Rhee, Kang et al. 2005).

Protein:		Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase TPTE2 [EC 3.1.3.67] (TPTE and PTEN homologous inositol lipid phosphatase)										Peak threshold:	0.0		
Intensity coverage:		16.1 % (9177 cnts)		Sequence coverage MS:		11.1 %		Sequence coverage MS/MS:		11.1 %		pl:	9.6	MW (kDa):	61.5
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100						
MNESPQTNEF	KGTTEEAPAK	ESPHTSEFKG	AALVSPISKS	MLERLSKFEV	EDAENVASVD	SKIKKIVHSI	VSSFAFGIFG	VFLVLLDVTL	LLADLIFTDS						
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200						
KLYIPLYEYRS	ISLAIGLFFL	MDVLLRVFVE	GRQQYFSDLF	NILDTAIIVI	PLLVDVIYIF	FDIKLLRNIP	RWTHLVRLLR	LIILIRIFHL	LHQKRQLEKL						
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300						
MRRLVSENKR	RYTRDGFDDL	LTYVTERIIA	MSFPSSGRQS	FYRNPIEEV	RFLDKKHRNH	YRVYNLCSE	AYDPKHFHNR	VSRIMIDDHN	VPTLHEMVVF						
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400						
TKEVNEWMAQ	DLENIVAIHC	KGGKGRGTGM	VCALLIASEI	FLTAEESLYY	FGRRTNKTH	SKKFGVETP	SQNRVVGYPFA	QVKHLYNUNL	PPRRILFIKR						
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500						
FIIYSIRGDV	CDLKQVQVME	KRVVFSSTSL	GNCNILHDI	TDEVLINVD	GPPLYDDVKV	QFFSSNLPKY	YDNCPPFFWF	NTSFIQNRL	CLPRNELDNP						
510	520	530													
HKQKAWKIYP	PEFAVEILFG	KK													

Abbildung 35: Mascot-Identifizierung für TPTE2.

Die gelb unterlegten Sequenzmotive (Markierung) stellen (N-linked)-Glycosylation-Sites dar die eine wichtige Funktion bei der Proteinfaltung erfüllen.

Im SELDI-Spektrum des Gel-Eluates wird TPTE2 durch einen Peak bei 23578 Da repräsentiert (Abbildung 36).

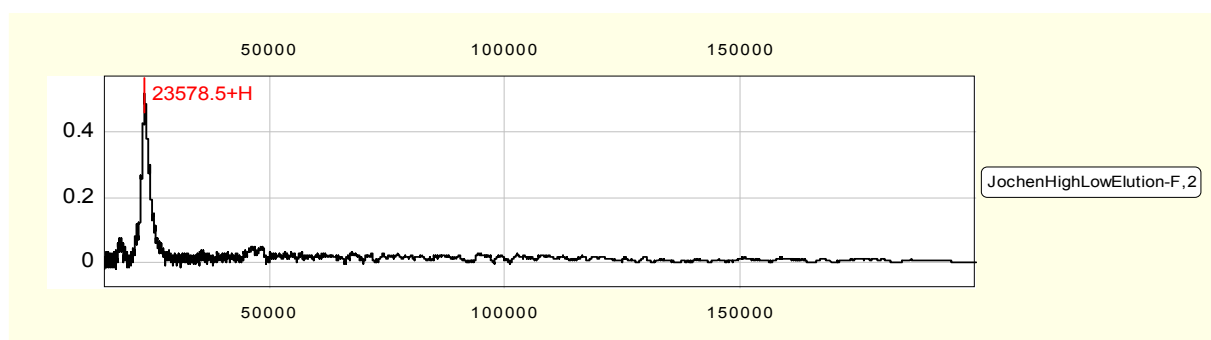


Abbildung 36: SELDI-Spektrum mit TPTE2-Peak bei 23578 Da

4.5.4 Identifikation von Serum-Albumin

Das Transportprotein Albumin ist neben dem Transport wasserunlöslicher Substanzen vor allem für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks verantwortlich (Abbildung 37) (Anderson and Anderson 2002).

Protein: Serum albumin precursor - Homo sapiens (Human) ALBU_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 34.3 % (125136 cnts)										Sequence coverage MS: 9.2 %
										Sequence coverage MS/MS: 9.2 %
										pl: 5.9
										MW (kDa): 71.3
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MKQVTFISLL	FLFSSAYSRG	VFRRDAHKSE	VAHRFKDLGE	ENFKALVLI A	FAQYLQQCPF	EDHVKLVNEV	TEFAKTCVAD	ESAENCDKSL		
100	110	120	130	140	150	160	170	180		
HTLFGDKLCT	VATLRETYGE	MADCCAQKQP	ERNECFLOHK	DDNPNLRLV	RPEVDVMCTA	FHDNEETFLK	KLYEIAARRH	PYFYAPELLF		
190	200	210	220	230	240	250	260	270		
FAKRYKAFT	ECCQAADKAA	CLLPKLDLRL	DEGKASSAQ	RLKCASLQKF	GERAFKAWAV	ARLSQRFPKA	EFAEVSKLVT	DLTKVHTECC		
280	290	300	310	320	330	340	350	360		
HGDLLECADD	RADLAKYICE	NQDSISSKLL	ECCEKPLEK	SHCIAEVEND	EMPADLPSLA	ADRVESKDVC	KNYAEAKDVF	LGMFLYEYAR		
370	380	390	400	410	420	430	440	450		
RHPDYSVLL	LRLAKTYETT	LEKCCAAADP	HECYAKVFDE	FKPLVEEPQN	LIKQNCELFE	QLGEYKFNQA	LLVRYTKKVP	QVSTPTLVEV		
460	470	480	490	500	510	520	530	540		
SRNLGKVGSK	CCKHPEAKRM	PCAEDYLSVV	LNQLCVLHEK	TPVSDRVTKC	CTESLVNRRP	CFSALEVDET	YVPKEFNAET	FTFHADICTL		
550	560	570	580	590	600	610				
SEKERQIKKQ	TALVELVKHK	PKATKEQLKA	VMDDFAAFVE	KCKKADDKET	CFAEEGKLV	AASQAALGL				

Abbildung 37: Mascot-Identifizierung für Albumin

Im dazugehörigen SELDI-Spektrum findet sich Albumin mit einem Peak bei 67 KDa wieder (Abbildung 38).

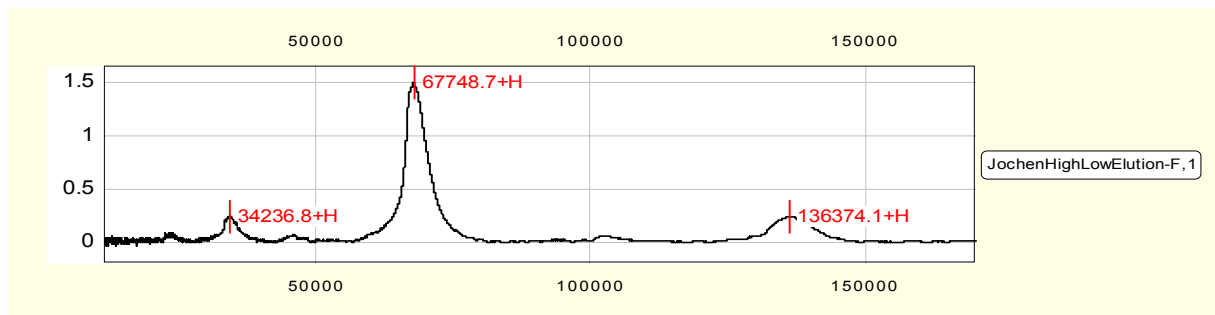


Abbildung 38: SELDI-Spektrum mit Albumin-Peak bei 67748 Da

4.5.5 Identifikation von Transferrin

Transferrin ist das für den Eisentransport verantwortliche Glycoprotein (Abbildung 39) (LeVine, Lynch et al. 1999).

Protein:		Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1-metal-binding globulin) - Homo sapiens (Human) TRFE_HUMAN								Peak threshold:	0.0			
Intensity coverage:		29.4 % (89789 cnts)		Sequence coverage MS:		9.5 %		Sequence coverage MS/MS:		9.5 %	pl:	7.0	MW (kDa):	79.3
10	20	30	40	50	60	70	80	90						
MRLAVGALLV	CAVLGLCLAV	PDKTVRWCVA	SEHEATRCQS	FRDHMKSVIP	SDGPSVACVK	KASYLDCIRA	IAANEADAVT	LDAGLVYDAY						
100	110	120	130	140	150	160	170	180						
LAPNNLKPVV	AEFYGSKEDP	QTFYYAVAVV	KKDSGFQMNQ	LRGKKSCHTG	LGRSAGWNIP	IGLLYCDLPE	PRKPLEKAVA	NFFSGSCAPC						
190	200	210	220	230	240	250	260	270						
ADGTDFFQLC	QLCPGCGCST	LNQYFGYSGA	FKCLKDGAGD	VAFVKHSTIF	ENLANKADRD	QYELLCLDNT	RKPVDEYKDC	HLAQVPSHTV						
280	290	300	310	320	330	340	350	360						
VARSMGKED	LIWELLNQAQ	EHFGKDKSKE	FQLFSSPHGK	DLLFKDSAHG	FLKVPPRMDA	KMYLGYEYVT	AIRNLREGTC	PEAPTDECKP						
370	380	390	400	410	420	430	440	450						
VKWCALSHHE	RLKCEWVSVN	SVGKIECVSA	ETTEDCIAKI	MNGEADAMSL	DGGFVYIAGK	CGLVPVLAEN	YKSDNCEDT	PEAGYFAVAV						
460	470	480	490	500	510	520	530	540						
VKKSASDLTW	DNLKGGKKSCH	TAVGRTAGWN	IPMGLLYNKI	NHCRFDEFFS	EGCAPGSKKD	SSLCKLCMGS	GLNLCEPNMK	EGYGYTGAF						
550	560	570	580	590	600	610	620	630						
RCLVEKGDVA	FVKHQTVPQN	TGGKNPDPWA	KNLNEKDYEL	LCLDGTRKPV	EYANCHLAR	APNHAVVTRK	DKEACVHKIL	RQQQLFGSN						
640	650	660	670	680	690	700								
VTDCSGNFCL	FRSETKDLLF	RDDTVCLAKL	HDRNTYEKYL	GEEYVKAVGN	LRKCTSSLL	EACTFRRP								

Abbildung 39: Mascot-Identifizierung für Transferrin

Das Geleluat der Transferrin-Bande korrespondiert im SELDI-Spektrum mit mehreren Peaks: Einem bei 80 kDa und einem zweiten bei 9824 Da (Abbildung 40).

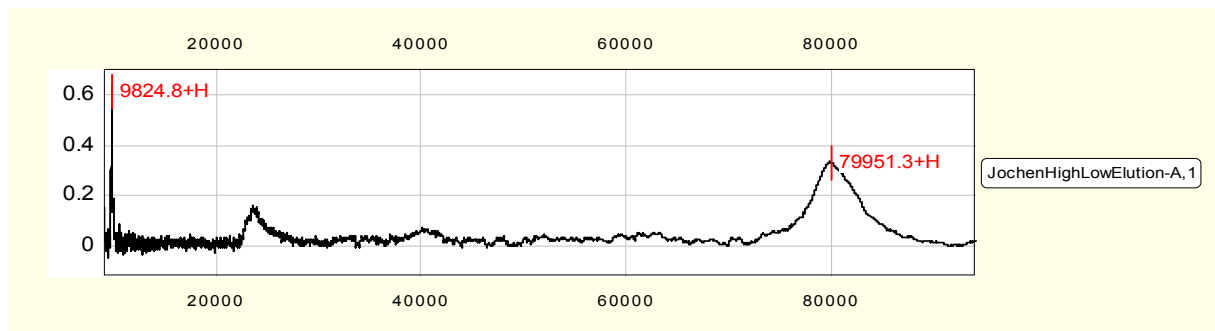


Abbildung 40: SELDI-Spektrum mit Transferrin-Peaks bei 80 kDa und 9800 Da

4.5.7 Identifikation von Transthyretin (Prealbumin, TTHY)

Transthyretin (TTHY) bindet Thyroidhormon und ist möglicherweise am Thyroxintransport vom Blutkreislauf ins zentrale Nervensystem (ZNS) beteiligt (Fleming, Saraiva et al. 2007; Hou, Aguilar et al. 2007)(Abbildung 44).

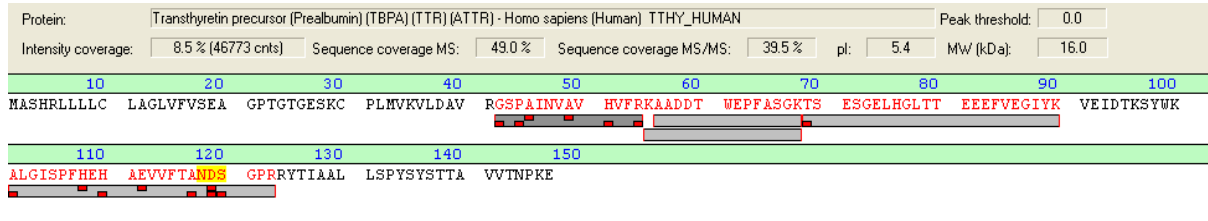


Abbildung 44: Mascot-Identifizierung für Transthyretin

Im SELDI-Spektrum wird Transthyretin durch einen Peak bei 13986 Da repräsentiert (Abbildung 45). Ein im Rahmen von Profilingstudien erhaltener Biomarkerkandidat bei 13999 Da lässt diese ID als besonders vielversprechend erscheinen.

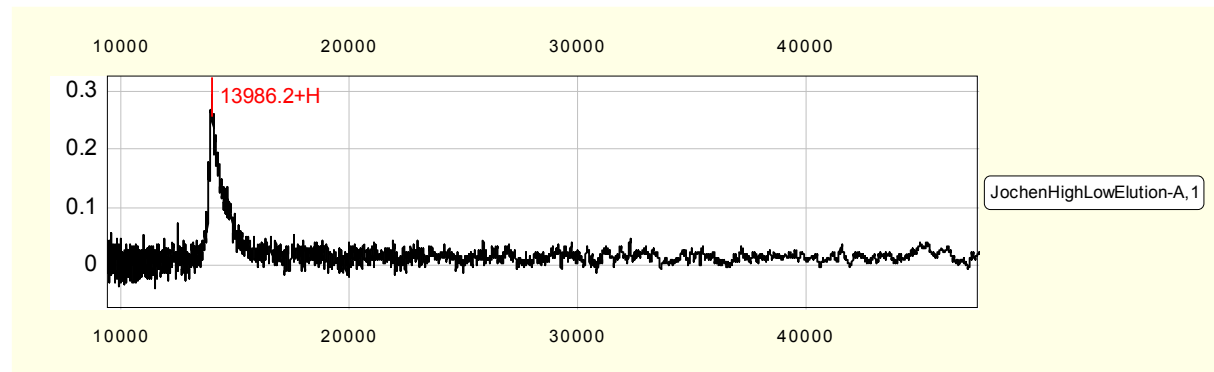


Abbildung 45: SELDI-Spektrum mit Transthyretin-Peak bei 13986 Da

In Tabelle 4 sind alle Identifikationen, die unter Einsatz der α -PDGF-Beads erzielt wurden zusammengefasst.

Identifizierung	Molekulargewicht (Da)	Peaks (Da)	Biomarker-Kandidat (Da)	Score
Complement C1q subcomponent subunit B precursor	26670	19828		98/ 6/ 3
Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase	61457	23578		29/ 3/ 3
Platelet factor 4 precursor (PF-4) (CXCL4)	11123	7794	7775	64/ 2/ 1
Platelet basic protein precursor (PBP) (CXCL7)	14171	9311	9299	65/ 3/ 2
Serum albumin precursor	71317	67748		428/ 15/ 7
Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin)	79280	9824,79951		270/ 17/ 8
TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	155361	4183,4230	4165,4219	56/ 17/ 1
Transthyretin precursor (Prealbumin) (TBPA) (TTR)	15991	13986	13999	87/ 5/ 3

Tabelle 4: Über α -PDGF-Beads erzielte Identifikationen aus dem Serum

Da es sich bei den eingesetzten α -PDGF-Antikörpern um die gesamte IgG-Fraktion der mit einer humanen PDGF-Fraktion immunisierten Ziege handelt, sieht das Ergebnis der Elutionsversuche entsprechend heterogen aus (Abbildung 46).

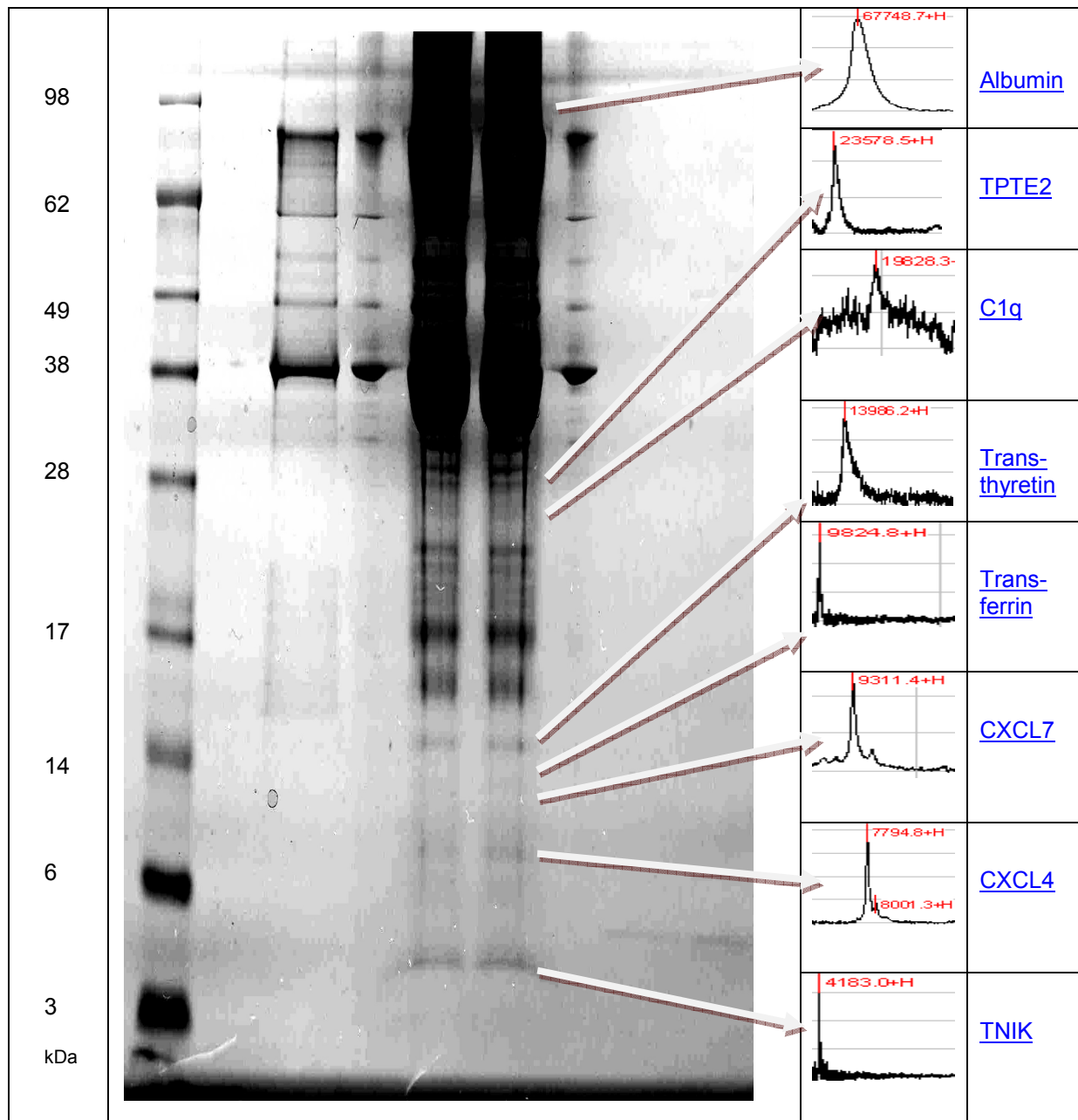


Abbildung 46: Schematische Übersicht der über ein präparatives Gel aufgetrennten PDGF-Eluate. Dargestellt sind die SELDI-Spektren der Protein-Elution aus den ausgeschnittenen Banden und die durch tryptischen Verdau der korrespondierenden Gelstücke erzielten Identifikationen.

4.6 Proteinidentifikationen aus dem Serum über die 2-D-HPLC

Die folgenden Identifikationen wurden aus dem Serum unter Verwendung einer zweidimensionalen HPLC-Fraktionierung gewonnen. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden hierzu die Serumproben zunächst über eine Size-Exclusion-Säule (Bio-Sil 250-5) nach Größe präfraktioniert, da die hochabundanten Proteine im Massenbereich über 30 kDa und die niedrigabundanten Biomarkerkandidaten im Massenbereich ≤ 20 kDa zu finden sind. Sämtliche Fraktionen wurden im SELDI-TOF® analysiert und bei Anwesenheit vielversprechender Peak-Gruppen ohne Albumin-Peak der zweiten HPLC-Dimension, der BioSuite RPC18 zugeführt.

Dieser Auftrennung folgte wieder die massenspektroskopische Analyse und Gellauf der Fraktionen mit Biomarkerkandidaten, gefolgt vom Ausschneiden von 30 Gelstücken/Spur, Teilung der Gelstücke in Elutions- und Verdauportionen und schließlich Identifikation und Zuordnung von ID und SELDI-Peak.

4.6.1 Identifikation von ADP-ribosylation factor-like protein 15 (ARL15)

ADP-ribosylation factor-like protein 15 gehört zur Familie der G-Proteine. ARL15, eine GTPase, die über Tubulin-spezifische Chaperone an dessen Faltung beteiligt ist, erfüllt eine Funktion als Tumorsuppressor und Auslöser der Mitochondrien-abhängigen intrinsischen Apoptose (Bhamidipati, Lewis et al. 2000; Bhamidipati, Lewis et al. 2000; Nakazawa, Kamijo et al. 2003; Uren, Kool et al. 2008)(Abbildung 47).

Protein: ADP-ribosylation factor-like protein 15 - Homo sapiens (Human) ARL15_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 4.7 % (31528 cnts)		Sequence coverage MS: 36.3 %		Sequence coverage MS/MS: 36.3 %		pl: 5.3	Mw (kDa): 23.3			
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MSDLRITAEAF	LYMDYLCFRÄ	LCKKGPPPAR	PEYDLVCIGL	TGSGKTSLLS	KLCSESPDNV	VSTTGFSIKA	VFFQNALNV	KELGGADNIR		
100	110	120	130	140	150	160	170	180		
KYWSRYQGS	QGVIFVLSA	SSEDDLEAAR	NELHSALQHP	QLCTLPFLIL	ANHQDKPAAR	SVQEIKKYFE	LEPLARGKRW	ILQFCSLDDM		
190	200	210								
DALKDSFSQL	INLLEEKDHE	AVRM								

Abbildung 47: Mascot-Resultat für ARL15

Im SELDI-Spektrum wird ARL15 durch eine Peak bei 7115 Da repräsentiert (Abbildung 48).

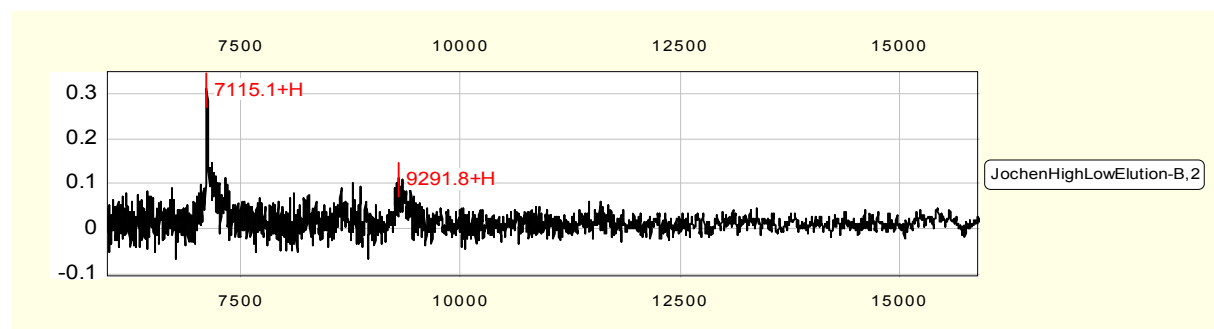


Abbildung 48: SELDI-Spektrum mit ARL15-Peak bei 7115 Da

4.6.2 Identifikation von Apolipoprotein M (ApoM)

Apolipoprotein M gehört zur Familie der Lipocaline und wird ausschließlich in der Leber und in den Nieren synthetisiert. Die Expression von ApoM ist durch *Platelet Activating Factor* (Paffenholz, Kuhn et al.), TNF- α und IL-1 induzierbar. Es ist Bestandteil der *High-density-Lipoprotein-* (HDL) Partikel im Plasma und offenbar an der Koordination des Kortison-Stoffwechsels beteiligt (Xu, Zhang et al. 2002; Wolfrum, Poy et al. 2005; Sevana, Ahnström et al. 2009) (Abbildung 49).

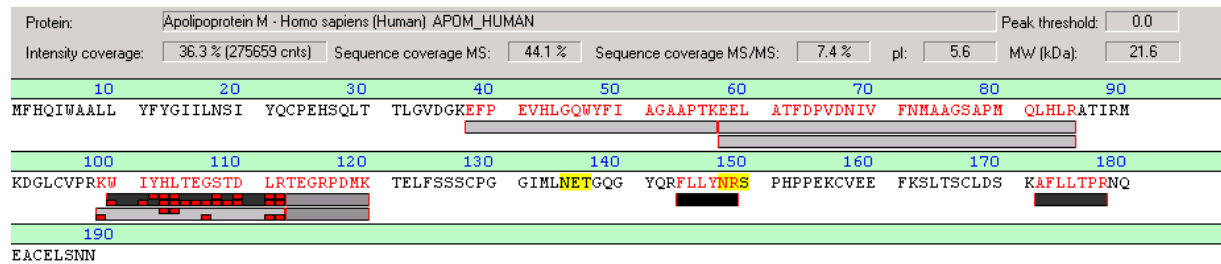


Abbildung 49: Mascot-Identifizierung von Apolipoprotein M

Im SELDI-Spektrum findet sich Apolipoprotein M mit einem Peak bei 15142 Da wieder (Abbildung 50).

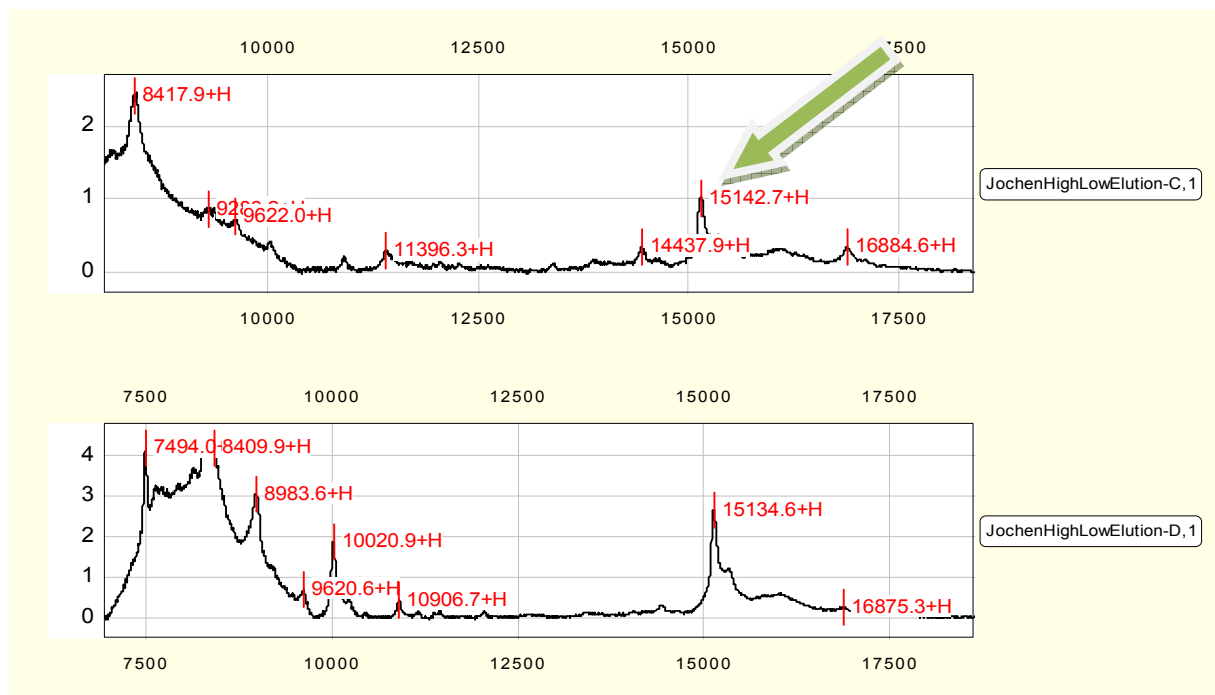


Abbildung 50: SELDI-Spektren mit ApoM-Peak bei 15142 Da

Zu sehen sind zwei Spektren, die zu jeweils hochsignifikanten ApoM-Identifikationen zugeordnet werden können.

Ein Biomarker-Kandidat bei 15151 Da liegt in direkter Nähe (Abbildung 50, Pfeil).

4.6.3 Identifikation von Fizzy-related protein homolog (FZR)

Fizzy-related protein (Synonym: CDC20-like protein 1, Cdh1/Hct1 homolog) ist an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt, indem es die Aktivität der Ubiquitin-Ligase-Aktivität des *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C)* reguliert. Der APC/C-Cdh1-Komplex ist während der Anaphase und der Telophase aktiv und beseitigt bis zur nächsten Synthesephase Substrate des vorangegangenen Zyklus. Störungen des APC führen zu Beeinträchtigungen der Zellzyklus-Progression, sowie zur Aggregation von an der Zellzyklus-Steuerung beteiligter Proteine und letztendlich zum Untergang der entsprechenden Zelle (Fang, Yu et al. 1998; Wang, Fisk et al. 2000; Pimentel and Venkatesh 2005; Maestre 2008; Buchakjian 2010). (Abbildung 51).

Protein: Fizzy-related protein homolog - Homo sapiens (Human) FZR_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 7.5 % (6350 cnts)										Sequence coverage MS: 12.7 %
Sequence coverage MS/MS: 12.7 %										pl: 10.1
										MW (kDa): 55.5
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MDQYERRLL	RQIVIQNENT	MPRVTEMRRT	LTPASSPVSS	PSKHGDRFIP	SRAGANNSVN	FHRINENEKS	PSQNRKAKDA	TSDNGKDGLA		
100	110	120	130	140	150	160	170	180		
YSALLKNELL	GAGIEKVQDP	QTEDRRLQPS	TPEKKGIFTY	SLSTKRSSPD	DGNDVSPYSL	SPVSNKSKQL	LRSPRKPTRK	ISKIPFKVLD		
190	200	210	220	230	240	250	260	270		
APELQDDFYI	NLVDWSSLNV	LSVGLGTCVY	LWSACTSQVT	RLCDLSVEGD	SVTSVGVWSE	GNLVAVGTHK	GFVQIWDAAA	GKKLSMLEGH		
280	290	300	310	320	330	340	350	360		
TARVGLAWN	AEQLSSGSRD	RMILQRDIRT	PPLQSERRLQ	GHRQEVCGLK	WSTDHQLLAS	GGNDNKLLVW	NHSLSPVQQ	YTEHLAAVKA		
370	380	390	400	410	420	430	440	450		
IAWSPHQHGL	LASGGGTADR	CIRFWNTLTG	QPLQCIDTGS	QVCNLAWSKH	ANELVSTHGY	SONQILVWKY	PSLTQVAKLT	GHSYRVLYLA		
460	470	480	490	500						
MSPDGEAIVT	GAGDETLRFW	NVFSKTRSTK	VKWESVSVLN	LFTRIR						

Abbildung 51: Mascot-Identifikation von Fizzy-related protein homolog

Das *Fizzy-related protein homolog* wird im SELDI-Spektrum durch einen Peak bei 3359 Da repräsentiert (Abbildung 52).

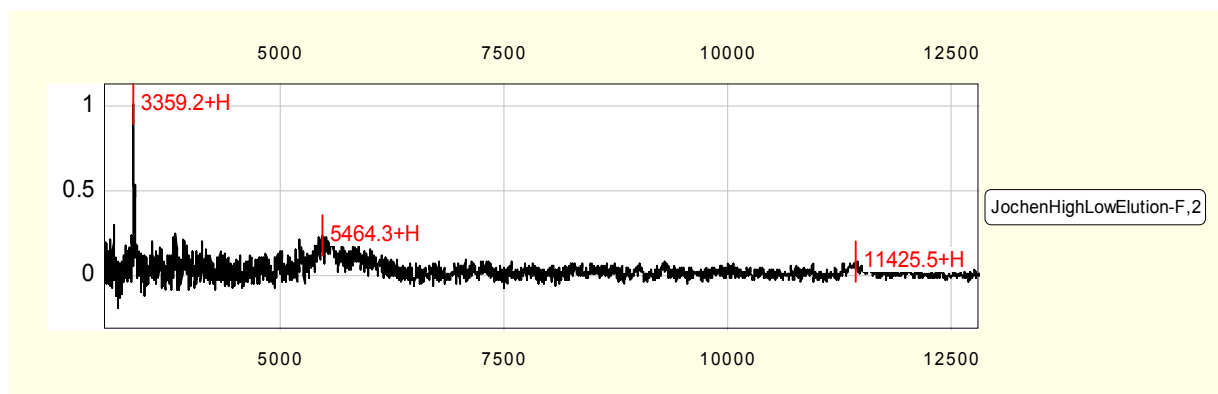


Abbildung 52: SELDI-Spektrum mit FZR-Peak bei 3359 Da

4.6.4 Identifikation von H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3 (NOLA3)

NOLA3 ist im Nukleus lokalisiert und an der Synthese von Ribosomen, sowie als Bestandteil des *H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein (H/ACA snoRNP) complex* an der Erhaltung der Telomeren beteiligt (Mitchell, Cheng et al. 1999; Wang and Meier 2004; Meier 2005; Fu and Collins 2007; Venteicher, Abreu et al. 2009).

Da sich in diesem Fall die Zuordnung der ID zum korrespondierenden SELDI-Peak als sehr schwierig erwies, sind im Folgenden alle signifikanten Identifikationen mit SELDI-Spektrum aufgeführt. Es wurden dabei stets die gleichen Peptidfragmente zugeordnet, wobei sich jedoch die *Intensity Coverage* in einem niedrigen Bereich zwischen 2,0 und 5,1% bewegt (Abbildung 53-58).

Protein:	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3 - Homo sapiens (Human) NOLA3_HUMAN				Peak threshold:	0.0														
Intensity coverage:	2.6 % (3366 cnts)	Sequence coverage MS:	60.9 %	Sequence coverage MS/MS:	60.9 %	pl: 10.5 MW (kDa): 7.8														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>10</th> <th>20</th> <th>30</th> <th>40</th> <th>50</th> <th>60</th> <th>70</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MFLQYYLNEQ</td> <td>GDRVYTLKRF</td> <td>DPMGQQTCSA</td> <td>HPARFSPDDK</td> <td>YSRHRITIKK</td> <td>RFKVLMTQQP</td> <td>RPVL</td> </tr> </tbody> </table>							10	20	30	40	50	60	70	MFLQYYLNEQ	GDRVYTLKRF	DPMGQQTCSA	HPARFSPDDK	YSRHRITIKK	RFKVLMTQQP	RPVL
10	20	30	40	50	60	70														
MFLQYYLNEQ	GDRVYTLKRF	DPMGQQTCSA	HPARFSPDDK	YSRHRITIKK	RFKVLMTQQP	RPVL														

Abbildung 53: Mascot-Resultat für NOLA3

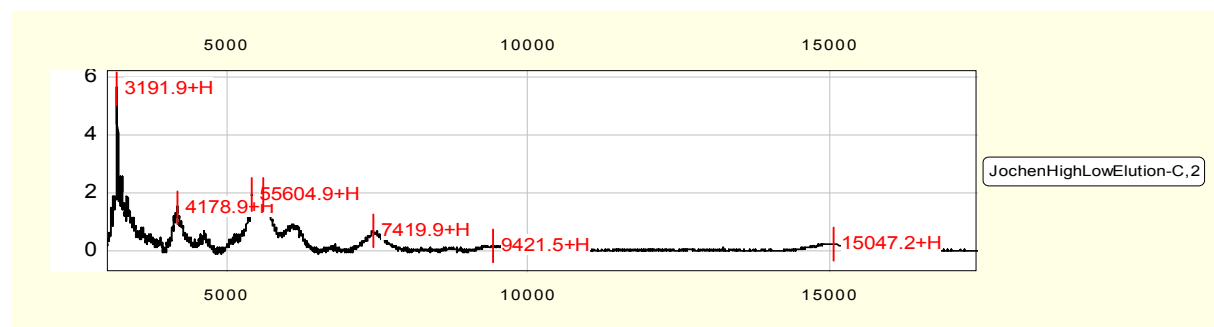


Abbildung 54: SELDI-Spektrum mit NOLA3-Peak bei 7419 Da

Protein:	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3 - Homo sapiens (Human) NOLA3_HUMAN				Peak threshold:	0.0														
Intensity coverage:	2.0 % (3285 cnts)	Sequence coverage MS:	60.9 %	Sequence coverage MS/MS:	60.9 %	pl: 10.5 MW (kDa): 7.8														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>10</th> <th>20</th> <th>30</th> <th>40</th> <th>50</th> <th>60</th> <th>70</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MFLQYYLNEQ</td> <td>GDRVYTLKRF</td> <td>DPMGQQTCSA</td> <td>HPARFSPDDK</td> <td>YSRHRITIKK</td> <td>RFKVLMTQQP</td> <td>RPVL</td> </tr> </tbody> </table>							10	20	30	40	50	60	70	MFLQYYLNEQ	GDRVYTLKRF	DPMGQQTCSA	HPARFSPDDK	YSRHRITIKK	RFKVLMTQQP	RPVL
10	20	30	40	50	60	70														
MFLQYYLNEQ	GDRVYTLKRF	DPMGQQTCSA	HPARFSPDDK	YSRHRITIKK	RFKVLMTQQP	RPVL														

Abbildung 55: Mascot-Resultat für NOLA3

Sequence coverage: 60,9%; Intensity coverage: 2,0%

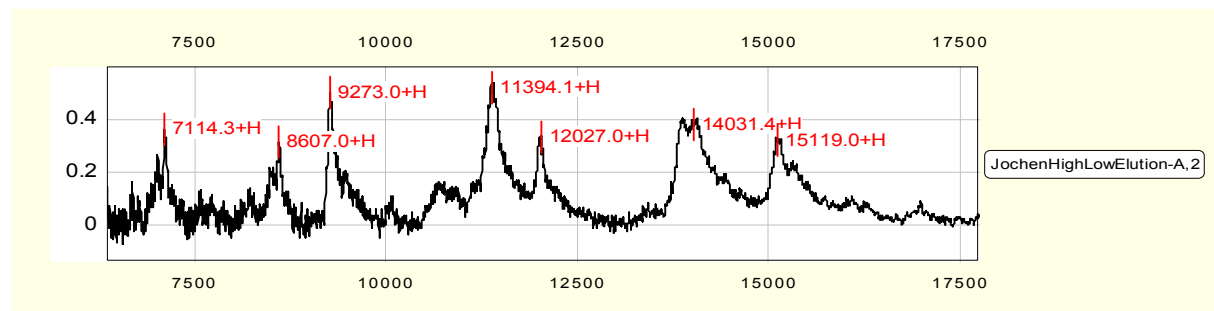


Abbildung 56: SELDI-Spektrum mit NOLA3-Peak bei 7114 Da

Protein:	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3 - Homo sapiens (Human) NOLA3_HUMAN	Peak threshold:	0.0
Intensity coverage:	5.1 % (5803 cnts)	Sequence coverage MS:	60.9 %
		Sequence coverage MS/MS:	60.9 %
		pl:	10.5
		MW (kDa):	7.8

10	20	30	40	50	60	70
MFLQYYLNEQ	GDRVYTLKKF	DPMGQQTCSA	HPARFSPDDK	YSRHRTIKK	RFKVLMTQQP	RPVL

Abbildung 57: Mascot-Resultat für NOLA3

Sequence coverage: 60,9%. Im Vergleich zu den zwei weiteren NOLA3- Identifikationen mit der größten Intensity coverage von 5,1%.

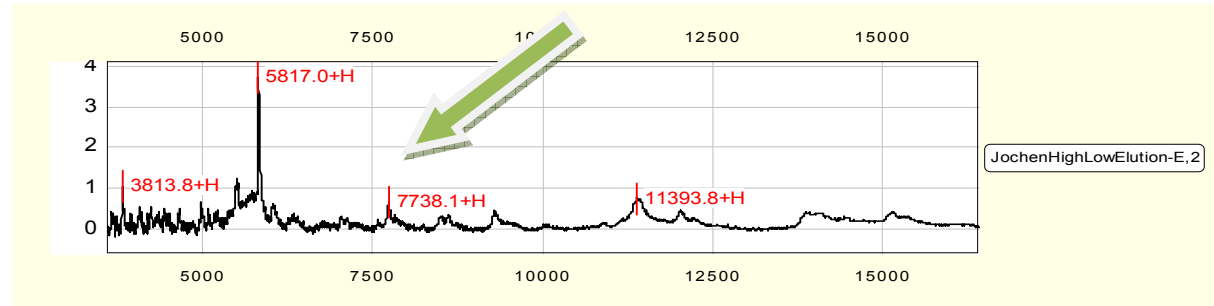


Abbildung 58: SELDI-Spektrum mit NOLA3-Peak bei 7738 Da (Pfeil)

Ein Biomarker-Kandidat bei 7775 Da liegt in direkter Nähe (Abbildung 58, Pfeil).

4.6.5 Identifikation von Intraflagellar transport 74 homolog (IFT74)

Das *Intraflagellar transport 74 homolog* ist ein Protein, das am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt ist und ein Molekulargewicht von 69,3 kDa aufweist. Im ZNS ist es als Komponente des intraflagellaren Transportsystems verantwortlich für den Transport neuronaler Komponenten vom Perikaryon in und entlang der Dendriten und Ausläufer der Nervenzellen (Goldstein and Philp, 1999; Momeni et al., 2006)(Abbildung 59).

Protein:	Intraflagellar transport 74 homolog - Homo sapiens (Human) IFT74_HUMAN	Peak threshold:	0.0
Intensity coverage:	9.3 % (46945 cnts)	Sequence coverage MS:	19.7 %
		Sequence coverage MS/MS:	7.8 %
		pl:	5.7
		MW (kDa):	69.3

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MASNKSSAA	RPVSRGGVGL	TGRPPSGIRP	LSGNIRVATA	MPPGTARPGS	RGCPIGTGGV	LSSQIKVAHR	PVTQQGLTGM	KTGKGPQRQ
100	110	120	130	140	150	160	170	180
ILDKSYLGL	LRSKISELTT	EVNKLQKGI	HYNQNSVYL	SYEKRAETLA	VEIKELQGGQ	ADYNMLVDKL	NTNTEMEEVH	NDYNMLKAQN
190	200	210	220	230	240	250	260	270
DRETQSLDVI	FTERQAKEKQ	IRSVVEEIEQ	EKQATDDIIK	NMSFENQVKY	LEMKTTNEKL	LQELDTLQQQ	LDSQNMKKES	LEAEIAHSQV
280	290	300	310	320	330	340	350	360
KQEAIVLLHEK	LYELESHRDQ	MIAEDKSIGS	PHEEREKLLK	QIKDDNQEIA	SMERQLTDTK	EKINQFIEEI	RQLDMDLEE	HQEMNQYKE
370	380	390	400	410	420	430	440	450
LKKREEHMDT	FIETFEETKN	QELKRKAQIE	ANIVALLEHC	SRNINRIEQI	SSITNQELKM	HQDDLNFKST	EVQKSQSTAQ	NLTSDIQRLO
460	470	480	490	500	510	520	530	540
LDLQKMELE	SKMTEEQHSL	KSIKIQMTTD	LEIYNDLPAL	KSSGEEKIKK	LHQERMILST	HRNAFKKIME	KONIEYEALK	TQLQENETHS
550	560	570	580	590	600	610		
QLTNLERKMQ	HLEQNNFAMK	EFIATKSQES	DYQPIKKNVT	KQIAEYNKTI	VDALHSTSGN			

Abbildung 59: Mascot-Resultat für IFT74

IFT74 wird im SELDI-Spektrum durch Peaks bei 7581 und 8483 (8425) Da repräsentiert (Abbildungen 60 und 61).

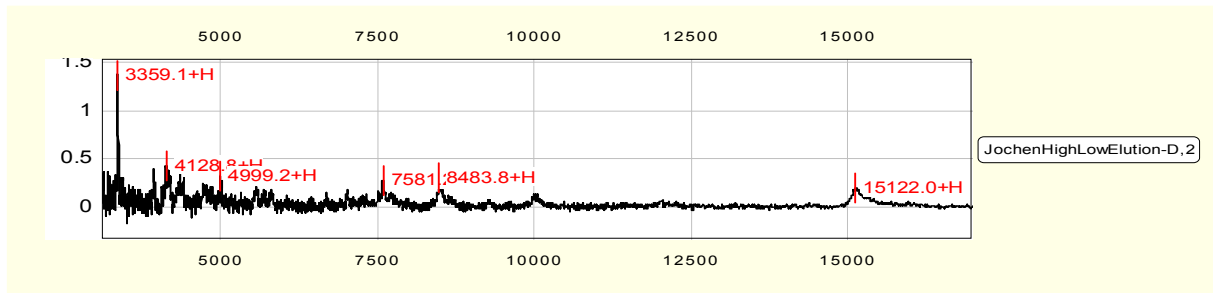


Abbildung 60: SELDI-Spektrum mit IFT74-Peaks bei 7581 und 8483 Da

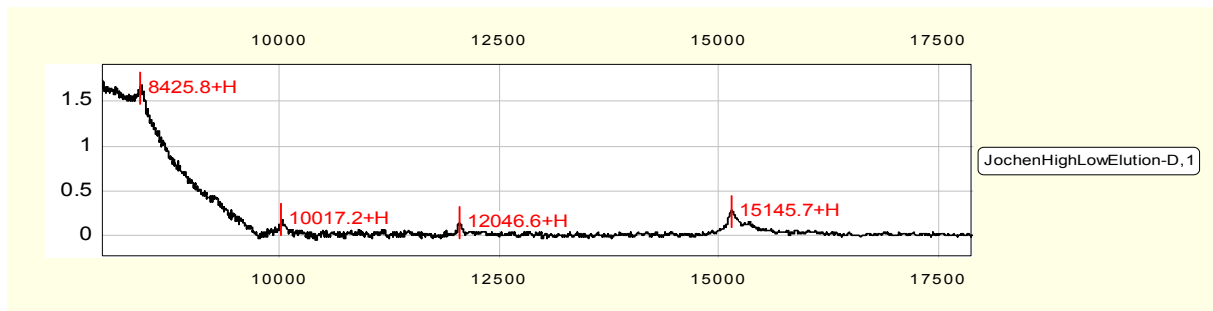


Abbildung 61: SELDI-Spektrum mit IFT74-Peak bei 8425 Da.

Die Differenz zum IFT74-Signal in Abb. 60 begründet sich durch Messtoleranzen und den recht niedrigen Signal-Rausch-Abstand.

4.6.6 Identifikation von Neuromedin-B receptor (NMBR)

Der Neuromedin-B-Rezeptor (NMBR) gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Bombesin-Rezeptoren und ist mit 7 Transmembraneinheiten in der Zielzelle verankert, welche im ZNS und im Gastrointestinaltrakt zu finden sind (Krane, Naylor et al. 1988). Die Bindung von Neuromedin, welches gemeinsam mit Bombesin zur Familie der Neuropeptide gehört, steuert neuronale sekretorische Vorgänge und nimmt Einfluß auf die Kontraktilität glatter Muskulatur, Blutdruck, Körpertemperatur und Zellteilung (Ohki-Hamazaki 2000; Jensen, Battey et al. 2007). NMBR mit einem Molekulargewicht von 44 kDa konnte mit einem Mascot-Score von 32, drei Peptidzuordnungen und drei Lift-Spektren identifiziert werden. Da auch in diesem Fall die Zuordnung der ID zu den korrespondierenden SELDI-Peaks eine Herausforderung war, sind im Folgenden alle signifikanten Identifikationen mit SELDI-Spektrum aufgeführt. Es wurden zweimal die gleichen Peptidfragmente zugeordnet, wobei sich jedoch die *Intensity Coverage* zwischen 4,5 und 5,1 % bewegt. Die Protein-Messungen im SELDI-TOF® ergaben für NMBR jeweils Signale bei 5808 und 9276 Da (Abbildungen 62-65).

Protein: Neuromedin-B receptor - Homo sapiens (Human) NMBR_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 5.1 % (13940 cnts)		Sequence coverage MS: 16.4 %		Sequence coverage MS/MS: 16.4 %		pI: 9.8		MW (kDa): 44.0		
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MPSKSLNLS	VTTGANESGS	VPEGWERDFL	PASDGTTEL	VIRCVIPSLY	LLIITVGLLG	NIMLVKIFIT	NSAMRSPNI	FISNLAAGDL		
100	110	120	130	140	150	160	170	180		
LLLLTCVPVD	ASRYFFDEWM	FGKVGCKLIP	VIQLTSVGV	VFTLTALSAD	RYRAIVNPM	MQTSGALLRT	CVKAMGIWV	SVLLAVPEAV		
190	200	210	220	230	240	250	260	270		
FSEVARISL	DNSFTACIP	YPQDELHPK	IHSVLIFLVY	FLIPLAISI	YYYHIAKTLI	KSAHNLPGY	NEHTKKQMET	RKRLAKIVLV		
280	290	300	310	320	330	340	350	360		
FVGCFFPCWF	PNHILYMYRS	FNYNEIDPSL	GHMIVTLVAR	VLSFGNSCVN	PFALYLLSES	FRRHFNSQLC	CGRKSYQERG	TSYLLSSSAV		
370	380	390	400							
RMTSLKSNK	NMVTNSVLLN	GHSMKQEMM								

Abbildung 62: Mascot-Resultat für die NMBR-Identifikation

Die Intensity coverage beträgt für diese NMBR-Identifikation 5,1 %

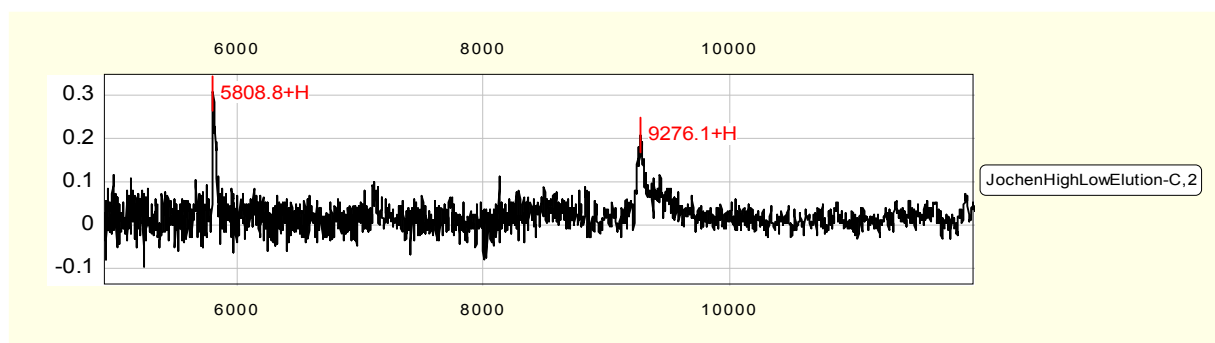


Abbildung 63: SELDI-Spektrum mit NMBR-Peaks bei 5808 und 9276 Da

Protein: Neuromedin-B receptor - Homo sapiens (Human) NMBR_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 4.5 % (16460 cnts)		Sequence coverage MS: 16.4 %		Sequence coverage MS/MS: 16.4 %		pI: 9.8		MW (kDa): 44.0		
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MPSKSLNLS	VTTGANESGS	VPEGWERDFL	PASDGTTEL	VIRCVIPSLY	LLIITVGLLG	NIMLVKIFIT	NSAMRSPNI	FISNLAAGDL		
100	110	120	130	140	150	160	170	180		
LLLLTCVPVD	ASRYFFDEWM	FGKVGCKLIP	VIQLTSVGV	VFTLTALSAD	RYRAIVNPM	MQTSGALLRT	CVKAMGIWV	SVLLAVPEAV		
190	200	210	220	230	240	250	260	270		
FSEVARISL	DNSFTACIP	YPQDELHPK	IHSVLIFLVY	FLIPLAISI	YYYHIAKTLI	KSAHNLPGY	NEHTKKQMET	RKRLAKIVLV		
280	290	300	310	320	330	340	350	360		
FVGCFFPCWF	PNHILYMYRS	FNYNEIDPSL	GHMIVTLVAR	VLSFGNSCVN	PFALYLLSES	FRRHFNSQLC	CGRKSYQERG	TSYLLSSSAV		
370	380	390	400							
RMTSLKSNK	NMVTNSVLLN	GHSMKQEMM								

Abbildung 64: Mascot-Resultat für die NMBR-Identifikation

Intensity coverage von 4,5 %

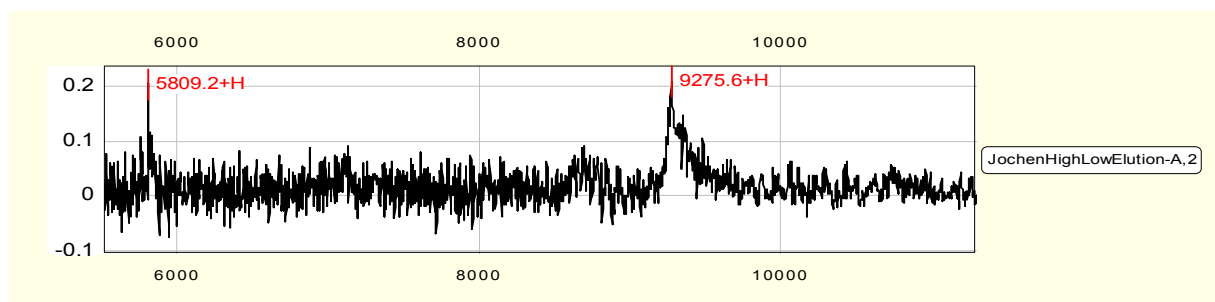


Abbildung 65: SELDI-Spektrum mit NMBR-Peaks bei 5809 und 9275 Da

4.6.7 Identifikation von Rabenosyn-5 (RBNS5)

Rabenosyn-5 ist als Effektorprotein beteiligt an der Membranfusion während der Endozytose, am Recycling und der Fusion von Endosomen und deren Motilität. RBNS5 ist Bestandteil der Prozessierung von Cathepsin D und Transferrin und bindet Vesikel mit Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PI-3) (Nielsen, Severin et al. 1999; Nielsen, Christoforidis et al. 2000; Schnatwinkel, Christoforidis et al. 2004; Eathiraj, Pan et al. 2005; Eathiraj, Pan et al. 2005; Shin, Hayashi et al. 2005). Im Folgenden sind die signifikanten Identifikationen mit SELDI-Spektrum aufgeführt, in denen übereinstimmend ein Peak bei 5810 Da zu verzeichnen ist (Abbildung 66 bis 69).

Protein: Rabenosyn-5 - Homo sapiens (Human) RBNS5_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 14.4% (139010 cnts)										Sequence coverage MS: 13.5%
										Sequence coverage MS/MS: 5.2%
										pI: 5.2
										MW (kDa): 89.6
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MASLDDPGEV	REGFLCPLCL	KDLQSFYQLH	SHYEEHSGE	DRDVKGQIKS	LVQKAKKAKD	RLKREGDDR	AESGTQGYES	FSYGGVDPYM		
100	110	120	130	140	150	160	170	180		
WEPQELGAVR	SHLSDFKKHR	AARIDHYVVE	VNKLIRLEK	LTAFDRNTTE	SAKIRAIIEKS	VVPWVNDQDV	PFCPCGKNF	SIRNRRHCHR		
190	200	210	220	230	240	250	260	270		
LCGSIMCKKC	MELISLPLAN	KLTSASKESL	STHTSPSQSP	NSVHGSRRGS	ISSMSSVSSV	LDEKDDDRIR	CCTHCKDTLL	KREQQIDEKE		
280	290	300	310	320	330	340	350	360		
HTPDIVKLYE	KLRLCMEKVD	QKAPEYIRMA	ASLNAGETTY	SLEHASDLRV	EVQKVVELID	ALSKKILTLG	LNQDPPPHPS	NLRLQRMIRY		
370	380	390	400	410	420	430	440	450		
SATLQVQEKL	LGLMSLPTKE	QFEELKKKRR	EEMERKRAVE	RQAALQSRR	LEERQSGLAS	RAANGEVASL	RRGPAPLRKA	EGWLPISGGQ		
460	470	480	490	500	510	520	530	540		
GQSESDPLL	QQIHNTSFI	RQAKAAGRMD	EVRTLQENLR	QLQDEYDQQ	TEKAIELSRR	QAEEDLQRE	QLQMLREREL	EREREQFRVA		
550	560	570	580	590	600	610	620	630		
SLHTRTRSLD	FREIGPFQLE	PSREPRTHLA	YALDLGSSPV	PSSTAPKTPS	LSSTQPTRVM	SGPPAVGQER	LPQSSMPQOH	EGPSLNPFDE		
640	650	660	670	680	690	700	710	720		
EDLSSPMEEA	TTGPPAAGVS	LDPSARILKE	YNPFEEDEE	EEAVAGNPF I	QPDSPAPNPF	SEDEHPQQR	LSSPLVPGNP	FEEPTCINPF		
730	740	750	760	770	780	790				
EMSDSGPEA	EEPIEELL	QQIDNIKAYI	FD&RQCGRLD	EVEVLTENLR	ELKHTLAKOK	GGTD				

Abbildung 66: Mascot-ID für RBNS5 (a)

Sequence coverage: 13,5%

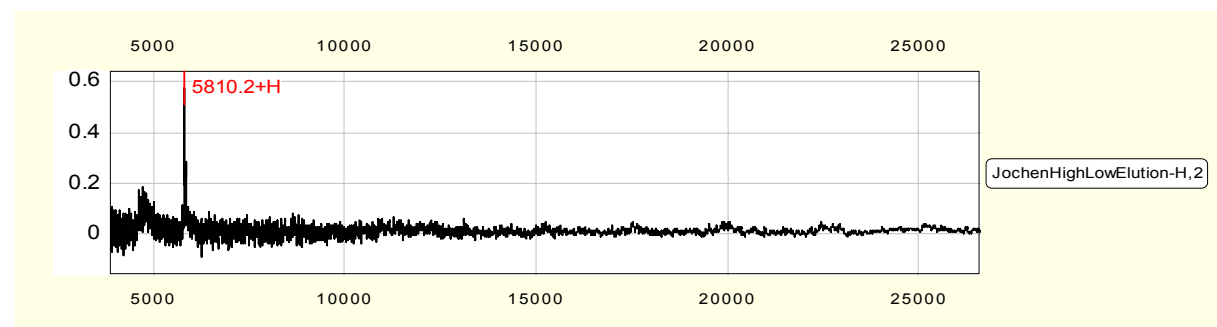


Abbildung 67: SELDI-Spektrum mit Rabenosyn-5-Peak bei 5810 Da

Protein: Rabenosyn-5 - Homo sapiens (Human) RBNS5_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 11.6 % (52314 cnts)										Sequence coverage MS: 10.6 %
										Sequence coverage MS/MS: 7.9 %
										pl: 5.2
										MW (kDa): 89.6
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MASLDDPGEV	REGFLCPLCL	KDLQSFYQLH	SHYEEHSGE	DRDVKGQIKS	LVQAKAKAKD	RLKREGDDR	AESGTQGYES	FSYGGVDPYM		
100	110	120	130	140	150	160	170	180		
WEPQELGAVR	SHLSDFKKHR	AARIDHYVVE	VNKLIIIRLEK	LTAFDRNTTE	SAKIRAIKES	VVPWVNDQDV	PFPCDCGNKF	SIRNRRHCHR		
190	200	210	220	230	240	250	260	270		
LCGSIMCKKC	MELISLPLAN	KLTSASKESL	STHTSPSQSP	NSVHGSRRGS	ISSMSSVSSV	LDERDDDRIR	CCTHCKDTLL	KREQQIDEKE		
280	290	300	310	320	330	340	350	360		
HTPDIKLYE	KLRLCMEKVD	QKAPEYIRMA	ASLNAGETTY	SLEHASDLRV	EVQKVYELID	ALSKKILTLG	LNQDPPPHPS	NLRLQRMIRY		
370	380	390	400	410	420	430	440	450		
SATLQVQEKL	LGLMSLPTKE	QFEELKKRKR	EEMERKRAVE	RQAALQSRR	LEERQGLAS	RAANGEVASL	RRGPAPLRKA	EGNLPLSGGQ		
460	470	480	490	500	510	520	530	540		
GQSESDPLL	QQIHNIISFI	RQAKAAGRMD	EVRTLQENLR	QLQDEYDQQQ	TEKAIELSR	QAEEDLQRE	QLQMLREREL	EREREQFRVA		
550	560	570	580	590	600	610	620	630		
SLHTRTRSLD	FREIGPFQLE	PSREPRTHLA	YALDLGSSPV	PSSTAPKTPS	LSSTQPTRVW	SGPPAVGQER	LPQSSMPQOH	EGPSLNPFFD		
640	650	660	670	680	690	700	710	720		
EDLSSPMEEA	TTGPPAAGVS	LDPSARILKE	YNPFEEDEE	EEAVAGNPF	QPDSPAPNPF	SEEDHPQQR	LSSPLVPGNP	FEEPTCINPF		
730	740	750	760	770	780	790				
EMDSGSGPEA	EEPIEEELL	QQIDNIKAYI	FDAKQCGRLD	EVEVLTENLR	ELKHTLAKQK	GGTD				

Abbildung 68: Mascot-ID für RBNS5 (b)

Sequence coverage: 10,6%

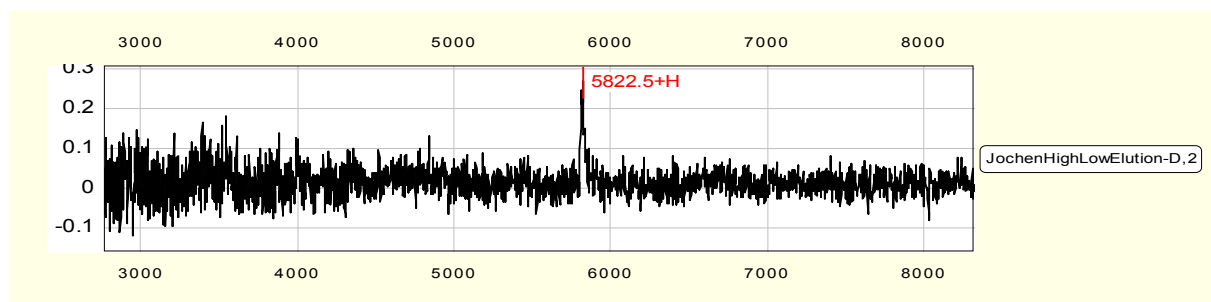


Abbildung 69: SELDI-Spektrum mit Rabenosyn-5-Peak bei 5822 Da

4.6.8 Identifikation von Small ubiquitin-related modifier 3 (SUMO3)

Die „Small Ubiquitin-like Modifier“ SUMO stellen eine Familie kleiner Proteine mit 101 Aminosäuren dar, die über die ϵ -Aminogruppe der Lysin-Seitenketten kovalent an ihr Substrat binden und damit Einfluß auf Funktion, Transkription, Replikation, DNA-Reparatur, intrazellulären Transport und Kommunikation nehmen (Haverkamp, Grünert et al. 2000; Hay 2005; Bossis and Melchior 2006; Scheschonka, Tang et al. 2007). Im Folgenden sind die signifikanten Identifikationen von SUMO3 (a und b) mit SELDI-Spektrum, inklusive charakteristischer Peaks bei 9290 Da, aufgeführt (Abbildungen 70-73).

Protein: Small ubiquitin-related modifier 3 precursor - Homo sapiens (Human) SUMO3_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 5.3 % (8051 cnts)										Sequence coverage MS: 24.3 %
										Sequence coverage MS/MS: 24.3 %
										pl: 5.2
										MW (kDa): 11.7
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MSEKPKREGV	KTENDHINLK	VAGQDGSVVQ	FKIKRHTPLS	KLMKAYCERQ	GLSMRQIRFR	FDGQPINETD	TPAQLEMEDE	DTIDVFQQQT		
100	110									
GGVPESLAG	HSF									

Abbildung 70: Mascot-ID für SUMO3 (a)

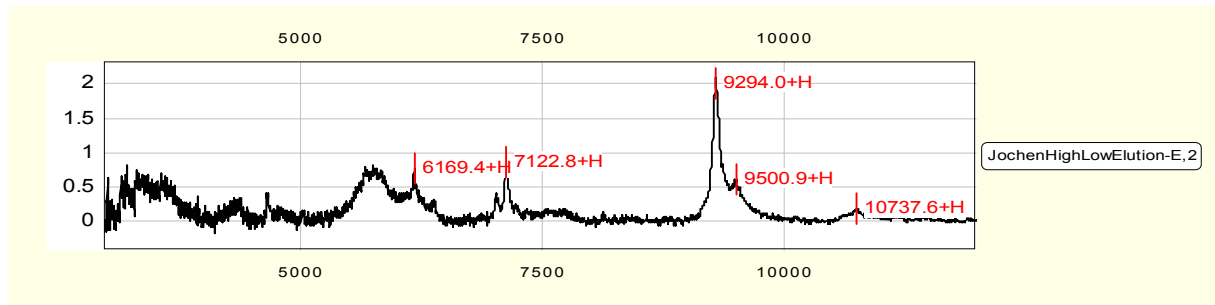


Abbildung 71: SELDI-Spektrum mit SUMO-3-Peak bei 9294 Da

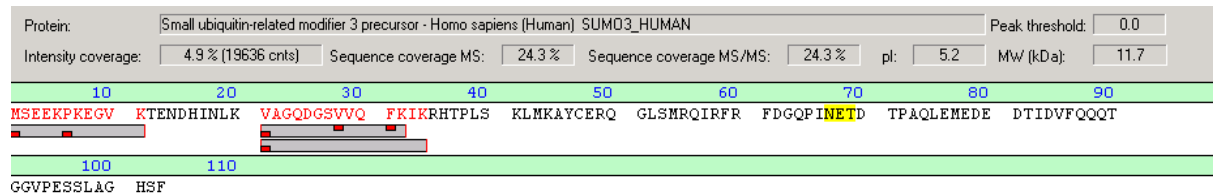


Abbildung 72: Mascot-ID für SUMO3 (b)

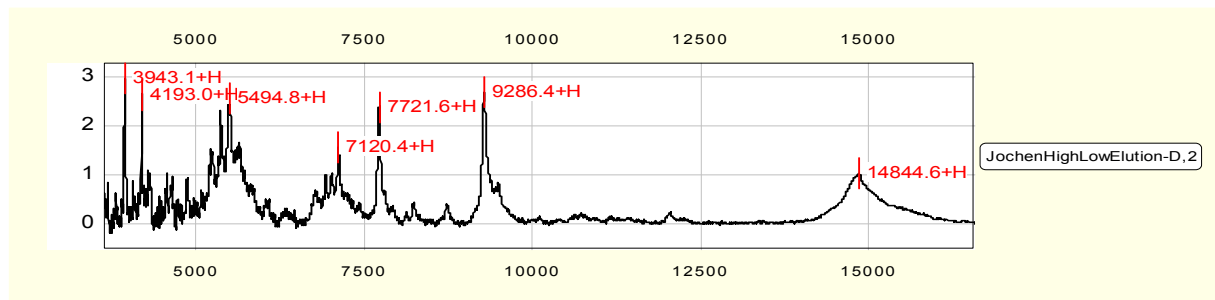


Abbildung 73: SELDI-Spektrum mit SUMO-3-Peak bei 9286 Da

4.6.9 Identifikation von Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1 /TRF2-interacting telomeric protein Rap1 (TE2IP)

TE2IP ist eine Komponente des Shelterin-Komplexes (Telosom), der für die Längenregulation und den Schutz der Telomeren verantwortlich ist (de Lange 2005; Zhang, Dilley et al. 2007; Sarthy, Bae et al. 2009). Nachfolgend sind die drei Identifizierungen von TE2IP mit den dazugehörigen SELDI-Spektren und dem korrespondierenden Peak bei 3358 Da zu sehen (Pfeilmarkierung). Da auch hier, wie im Fall der SUMO3-Identifizierungen, mehrere Peaks im SELDI-Spektrum zu sehen sind, gelangt man durch dreifache Identifizierung (Garcia-Castineiras, Andino Moreno et al.) zu einer eindeutigen Zuordnung.

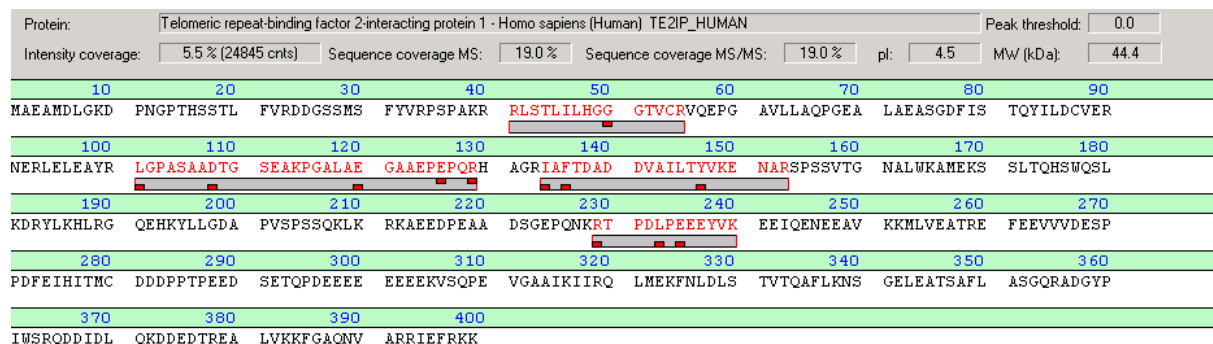


Abbildung 74: Mascot-ID für TE2IP (a)

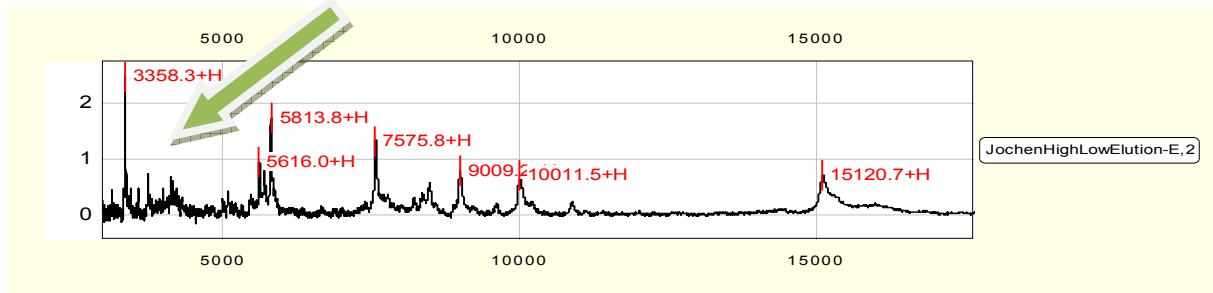


Abbildung 75: SELDI-Spektrum mit TE2IP-Peak bei 3358 Da

Protein:	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1 - Homo sapiens (Human) TE2IP_HUMAN					Peak threshold:	0.0		
Intensity coverage:	3.4 % (18860 cnts)	Sequence coverage MS:	15.3 %	Sequence coverage MS/MS:	15.3 %	pl:	4.5	MW (kDa):	44.4
10	20	30	40	50	60	70	80	90	
MAEAMD LGK D	PNGP THS STL	FVR DDG SS MS	FYVRP SPA KR	RLSTL LHGG	GTVC RVQ EPG	AVLLAQ PGEA	LAEAS GDF IS	TQYILD CVER	
100	110	120	130	140	150	160	170	180	
NERLELEAYR	LGPASA ADTG	SEAKPGALAE	GAAEPEPORH	AGRIAF TDAD	DVAILTYVKE	NARSPSSVTG	NALWKAMEKS	SLTQHSWQSL	
190	200	210	220	230	240	250	260	270	
KDRYLKHLRG	QEHKYL LGDA	PVSPSSQKLK	RKAEEDPEAA	DSGEPQNKRT	PDLPEEEYVK	EETQENEEAV	KKMLVEATRE	FEEVVVD ESP	
280	290	300	310	320	330	340	350	360	
PDFEIHITMC	DDDPPTPEED	SETQDDEEEE	EEEEKVSQPE	VGAAIKIIRQ	LMEKFNLDLS	TVTQAFLKNS	GELEATS AFL	ASGQRADGYP	
370	380	390	400						
IWSRQDDIDL	QKDD EDTREA	LVKKFGA QNV	ARRIEFRKK						

Abbildung 76: Mascot-ID für TE2IP (b)

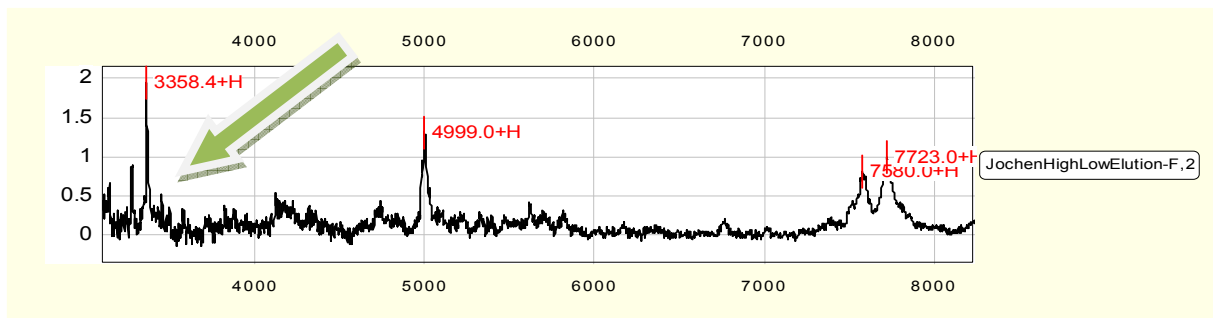


Abbildung 77: SELDI-Spektrum mit TE2IP-Peak bei 3358 Da

Protein:	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1 - Homo sapiens (Human) TE2IP_HUMAN					Peak threshold:	0.0		
Intensity coverage:	5.3 % (21631 cnts)	Sequence coverage MS:	19.0 %	Sequence coverage MS/MS:	19.0 %	pl:	4.5	MW (kDa):	44.4
10	20	30	40	50	60	70	80	90	
MAEAMD LGK D	PNGP THS STL	FVR DDG SS MS	FYVRP SPA KR	RLSTL LHGG	GTVC RVQ EPG	AVLLAQ PGEA	LAEAS GDF IS	TQYILD CVER	
100	110	120	130	140	150	160	170	180	
NERLELEAYR	LGPASA ADTG	SEAKPGALAE	GAAEPEPORH	AGRIAF TDAD	DVAILTYVKE	NARSPSSVTG	NALWKAMEKS	SLTQHSWQSL	
190	200	210	220	230	240	250	260	270	
KDRYLKHLRG	QEHKYL LGDA	PVSPSSQKLK	RKAEEDPEAA	DSGEPQNKRT	PDLPEEEYVK	EETQENEEAV	KKMLVEATRE	FEEVVVD ESP	
280	290	300	310	320	330	340	350	360	
PDFEIHITMC	DDDPPTPEED	SETQDDEEEE	EEEEKVSQPE	VGAAIKIIRQ	LMEKFNLDLS	TVTQAFLKNS	GELEATS AFL	ASGQRADGYP	
370	380	390	400						
IWSRQDDIDL	QKDD EDTREA	LVKKFGA QNV	ARRIEFRKK						

Abbildung 78: Mascot-ID für TE2IP (c)

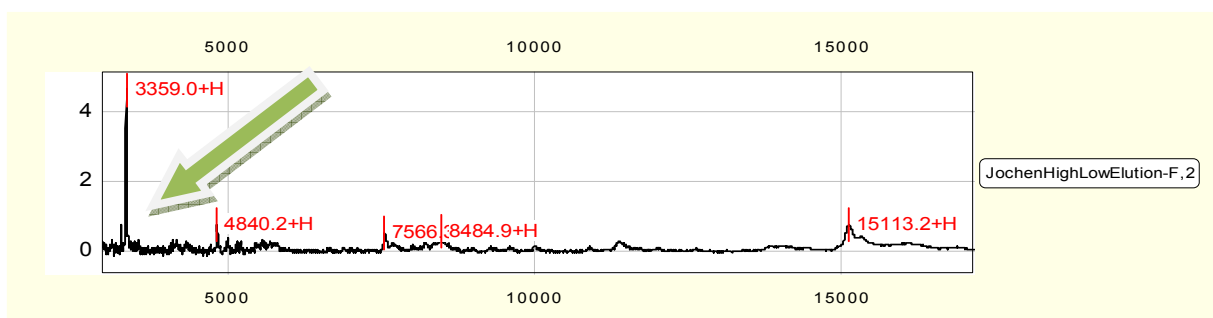


Abbildung 79: SELDI-Spektrum mit TE2IP-Peak bei 3359 Da

4.6.10 Identifikation von Toll-like receptor 7 (TLR7)

TLR7 ist als Teil der „Toll-like“-Rezeptorfamilie an der mikrobiellen Pathogenerkennung durch Makrophagen, dendritische Zellen (Chapple, Grayson et al.), Mastzellen, Eosinophile, Neutrophile und sogenannte „natural-killer-cells“, NK-Zellen mittels der sofortigen Aktivierung angeborener immunologischer Abwehrmechanismen beteiligt. Durch die gleichzeitige Aktivierung von NF- κ B und der gesteigerten Expression der Cytokine Il-1 β , Il-6 und von Chemokin Il-8 und der costimulatorischen Proteine CD80 und CD86 sorgen TLR außerdem für eine zielgerichtete Steuerung der adaptiven Immunität (Fearon and Locksley 1996; Janeway and Medzhitov 2002). Die drei gelungenen signifikanten Identifikationen weisen im dazugehörigen SELDI-Spektrum jeweils einen Peak bei 9280 Da auf (Abbildungen 80-85).

Protein: Toll-like receptor 7 precursor - Homo sapiens (Human) TLR7_HUMAN		Peak threshold: 0.0						
Intensity coverage: 12.6% (166616 crts)		Sequence coverage MS: 14.3%						
		Sequence coverage MS/MS: 1.0%						
		pI: 9.4						
		MW (kDa): 122.4						
10	20	30	40	50	60	70	80	90
MVFPMTLKR	QILILFNIL	ISKLLGARWF	PKTLPDVTL	DVPK ^N HVID	CTDKHLTEIP	GGIPT ^N TNLL	TLTINHIPDI	SPASFHRLDH
100	110	120	130	140	150	160	170	180
LVEIDFRCNC	VPIPLGSKNN	MCIKRLQIKP	RSFSG ^L TYLK	SLYLDGNQLL	EIQGLPPSL	QLLSLEANNI	FSIRKEN ^L TE	L ^A NIEILYLG
190	200	210	220	230	240	250	260	270
QNCYYRNPCY	VSYSIEKDAF	L ^N LTKLVLS	LKDM ^N V ^T AVP	TVLPSTLTEL	LYNMNIAKI	QEDDFNNLNQ	LQILDLSGNC	PRCYNAPFPC
280	290	300	310	320	330	340	350	360
APCK ^N NSPLQ	IPVNAFDALT	ELKVLRLHSN	SLQHVP ^R RWF	KNINKLQELD	LSQNFLAKEI	GDAKFLHFLP	SLIQLDLSFN	FELQVYR ^A SM
370	380	390	400	410	420	430	440	450
NLSQAFSSLK	SLKILRIRGY	VFKELKSF ^N L	SPLHNLQ ^N LE	VLDLGTNFIK	I ^A NLSMFKQF	KRLKVIDLSV	NKISPSGDSS	EVGFCSNART
460	470	480	490	500	510	520	530	540
SVESYEPQVL	EQLHYFR ^R YDK	YARSCRFRNK	EASFMSV ^N ES	CYKYGQTL ^D	SKNSIFFVKS	SDFQHLSFLK	CLNLSGNLIS	QTLN ^G S ^E FQF
550	560	570	580	590	600	610	620	630
LAELRYLDFS	NNRLDLLHST	AFEELHKLEV	LDISSNSHYF	QSEGITHMLN	F ^T KNLKV ^L QK	LMMNDNDISS	STSRTESES	LRTLEFR ^G NH
640	650	660	670	680	690	700	710	720
LDVLWREGDN	RYLQLFKNLL	KLEELDISKN	SLSFLPSGVF	DGMPN ^L KNL	SLAKNGLK ^S F	SMK ^L QCLKN	LETDL ^S HWQ	LTTVPERLS ^N
730	740	750	760	770	780	790	800	810
CS ^R SLKNLIL	KNNQIRSLTK	YFLQDAFQ ^L R	YLDLSSNKIQ	MIQKTSFPEN	VLN ^N LK ^M LLL	H ^H NRFLCTCD	AVFV ^V W ^V NH	TEVTIPYLAT
820	830	840	850	860	870	880	890	900
DVTCVGP ^G AH	KQSVISIDL	YTCEL ^D L ^T NL	ILFSL ^S ISVS	LFLM ^V MTAS	HL ^Y F ^W D ^V W ^Y I	YH ^F CKAKIRG	YQRL ^I SPDCC	YD ^A F ^I VYDTK
910	920	930	940	950	960	970	980	990
DPAVTEWVLA	ELVAKLED ^P R	EKFHNL ^C LEE	RDWLP ^G Q ^P VL	ENLS ^Q SI ^Q LS	KK ^T V ^F V ^M TDK	YAKTEN ^F KIA	FYL ^S HQRLMD	EK ^V D ^V IILIF
1000	1010	1020	1030	1040	1050			
LEKPFQ ^S KF	LQLR ^R LCGS	SVLEW ^P T ^N PQ	AHPY ^F W ^Q CLK	NALAT ^D NHVA	YSQV ^F KETV			

Abbildung 80: Mascot-Identifikation von TLR7 (a) Erzielt wurde eine Sequence coverage von 14,3% mit 14 übereinstimmenden Peptidsequenzen

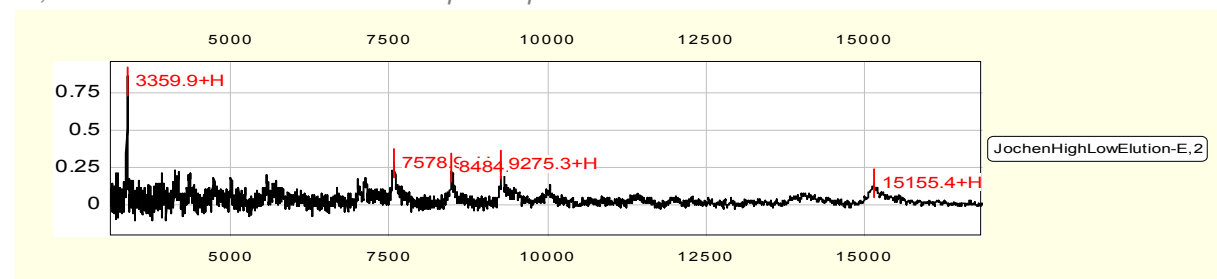


Abbildung 81: SELDI-Spektrum mit TLR7-Peak bei 9275 Da

Protein:		Toll-like receptor 7 precursor - Homo sapiens (Human) TLR7_HUMAN										Peak threshold:	0.0
Intensity coverage:	9.7 % (113803 cnts)	Sequence coverage MS:	16.0 %	Sequence coverage MS/MS:	5.2 %	pl:	9.4	MW (kDa):	122.4				
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100				
MVFPMTLKR	QILILFNIIL	ISKLLGARWF	PKTLPDVTL	DVPKNHVID	CTDKHLTEIP	GGIPTNTNL	TLTINHIPDI	SPASFHRLDH	LVEIDFRNC				
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200				
VPIPLGSKNN	MCIKRLQIKP	RSFSGLYTLK	SLYLDGNQLL	EIQQLPSSL	QLLSLEANNI	FSIRKENLTE	LANIELYLG	QNCYYRNP	VSYSIEKDF				
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300				
LNLTKLVLS	LKDNNTAVP	TVLPSTLTEL	LYNNMIAKI	QEDDFNMLNQ	LQILDLSGNC	PRCYNAPFPC	APCKNSPLQ	IPVNAFDALT	ELKVLRLHSN				
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400				
SLQHVPPRF	KNINKLQELD	LSQNFLAKEI	GDAKFLHFLP	SLIQDLDFSN	FELQVYRASH	NLSQAFSSLK	SLKILRIRGY	VFKELKSFNL	SPLHNLQNL				
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500				
VLDLGTNFIK	IANLSMFKQF	KRLKVIDLSV	NKISPSGDSS	EVGFCSNART	SVESYEPQVL	EQLHYFRYDK	YARSCRFKNK	EASFMSVNES	CYKYGQTLDL				
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600				
SKNSIFFVKS	SDFQHLSFLK	CLNLSGNLIS	QTLNGSEFQP	LAELRYLDFS	NNRDLHLST	APEELHKLEV	LDISSNSHYF	QSEGITHMLN	FTKNLKVLOK				
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700				
LMMNDNDISS	STSRMSESES	LRTLEFRGNH	LDVLWREGDN	RYLQLFKNLL	KLEELDISEKN	SLSFLPSGVF	DGMPNKNL	SLAKNGLKSF	SWKKLQCLKN				
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800				
LETLDLSHNQ	LTTVPERLSN	CSRSLKNLIL	KNNQIRSLTK	YFLQDAFQLR	YLDLSSNKIQ	MIQKTSFPEN	VLNNLKMILL	HNNRFLCTCD	AVMFWVWVNH				
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900				
TEVTIPYLAT	DVTCVPGAH	KGQSVISLDL	YTCELDLTLN	ILFSLSISVS	LFLMVMNTAS	HLVFWVWYI	YHFKAKIKG	YQRLISPDCC	YDAFIVYDTK				
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000				
DPAVTEWVLA	ELVAKLEDPR	EKHFNLCL	RDWLPQGPVL	ENLSQSIQLS	KKTVFVMTDK	YAKTENFKIA	FYLSSHQLMD	EKVDVILIF	LEKPFQKSKF				
1010	1020	1030	1040	1050									
LQLRKRLCGS	SVLEWPTNPQ	AHPYFWQCLK	NALATDNHVA	YSQVFKETV									

Abbildung 82: Mascot-Identifikation von TLR7 (b) Erzielt wurde eine Sequence coverage von 16,0% mit 13 übereinstimmenden Peptidsequenzen

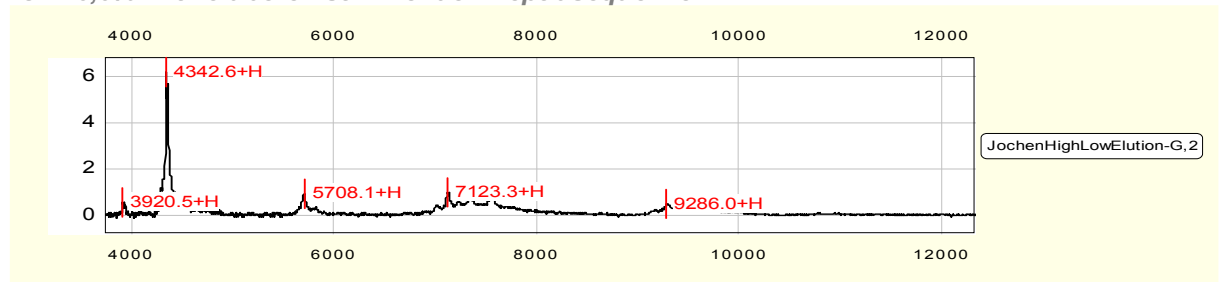


Abbildung 83: SELDI-Spektrum mit TLR7-Peak bei 9286 Da

Protein:		Toll-like receptor 7 precursor - Homo sapiens (Human) TLR7_HUMAN										Peak threshold:	0.0
Intensity coverage:	10.9 % (135176 cnts)	Sequence coverage MS:	15.6 %	Sequence coverage MS/MS:	1.0 %	pl:	9.4	MW (kDa):	122.4				
10	20	30	40	50	60	70	80	90					
MVFPMTLKR	QILILFNIIL	ISKLLGARWF	PKTLPDVTL	DVPKNHVID	CTDKHLTEIP	GGIPTNTNL	TLTINHIPDI	SPASFHRLDH					
100	110	120	130	140	150	160	170	180					
LVEIDFRNC	VPIPLGSKNN	MCIKRLQIKP	RSFSGLYTLK	SLYLDGNQLL	EIQQLPSSL	QLLSLEANNI	FSIRKENLTE	LANIELYLG					
190	200	210	220	230	240	250	260	270					
QNCYYRNP	VSYSIEKDF	LNLTKLVLS	LKDNNTAVP	TVLPSTLTEL	LYNNMIAKI	QEDDFNMLNQ	LQILDLSGNC	PRCYNAPFPC					
280	290	300	310	320	330	340	350	360					
APCKNSPLQ	IPVNAFDALT	ELKVLRLHSN	SLQHVPPRF	KNINKLQELD	LSQNFLAKEI	GDAKFLHFLP	SLIQDLDFSN	FELQVYRASH					
370	380	390	400	410	420	430	440	450					
NLSQAFSSLK	SLKILRIRGY	VFKELKSFNL	SPLHNLQNL	VLDLGTNFIK	IANLSMFKQF	KRLKVIDLSV	NKISPSGDSS	EVGFCSNART					
460	470	480	490	500	510	520	530	540					
SVESYEPQVL	EQLHYFRYDK	YARSCRFKNK	EASFMSVNES	CYKYGQTLDL	SKNSIFFVKS	SDFQHLSFLK	CLNLSGNLIS	QTLNGSEFQP					
550	560	570	580	590	600	610	620	630					
LAELRYLDFS	NNRDLHLST	APEELHKLEV	LDISSNSHYF	QSEGITHMLN	FTKNLKVLOK	LMMNDNDISS	STSRMSESES	LRTLEFRGNH					
640	650	660	670	680	690	700	710	720					
LDVLWREGDN	RYLQLFKNLL	KLEELDISEKN	SLSFLPSGVF	DGMPNKNL	SLAKNGLKSF	SWKKLQCLKN	LETLDLSHNQ	LTTVPERLSN					
730	740	750	760	770	780	790	800	810					
CSRSLKNLIL	KNNQIRSLTK	YFLQDAFQLR	YLDLSSNKIQ	MIQKTSFPEN	VLNNLKMILL	HNNRFLCTCD	AVMFWVWVNH	TEVTIPYLAT					
820	830	840	850	860	870	880	890	900					
DVTCVPGAH	KGQSVISLDL	YTCELDLTLN	ILFSLSISVS	LFLMVMNTAS	HLVFWVWYI	YHFKAKIKG	YQRLISPDCC	YDAFIVYDTK					
910	920	930	940	950	960	970	980	990					
DPAVTEWVLA	ELVAKLEDPR	EKHFNLCL	RDWLPQGPVL	ENLSQSIQLS	KKTVFVMTDK	YAKTENFKIA	FYLSSHQLMD	EKVDVILIF					
1000	1010	1020	1030	1040	1050								
LEKPFQKSKF	LQLRKRLCGS	SVLEWPTNPQ	AHPYFWQCLK	NALATDNHVA	YSQVFKETV								

Abbildung 84: Mascot-Identifikation von TLR7 (c) Erzielt wurde eine Sequence coverage von 16,5% mit 14 übereinstimmenden Peptidsequenzen

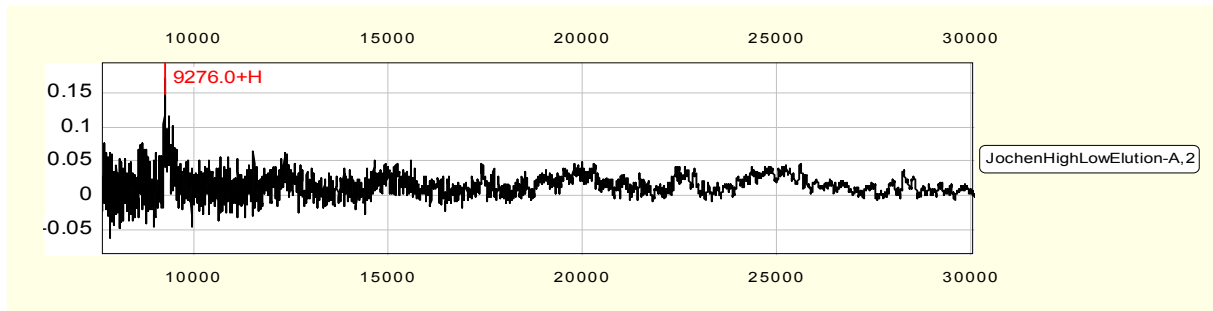


Abbildung 85: SELDI-Spektrum mit TLR7-Peak bei 9276 Da

4.6.11 Identifikation von Twinfilin-2 (TWF2)

Twinfilin-2 ist ein Aktin-bindendes Protein, dass über das Zytoskelett an der Zellmotilität und an morphologischen Prozessen beteiligt ist. TWF2 spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose und der Disposition endozytotischer Organellen (Vartiainen, Sarkkinen et al. 2003; Nevalainen, Skwarek-Maruszewska et al. 2009).

Im SELDI-Spektrum korrespondiert Twinfilin-2 mit einem prominenten Peak bei 4337Da (Abbildung 86 und 87).

Protein: Twinfilin-2 - Homo sapiens (Human) TWF2_HUMAN										Peak threshold: 0.0
Intensity coverage: 22.5 % (150743 cnts)										Sequence coverage MS: 18.3 %
										Sequence coverage MS/MS: 7.2 %
										pl: 6.4
										MW (kDa): 39.8
10	20	30	40	50	60	70	80	90		
MAHQGTGIHAT	EELKEFFAKA	RAGSVRLIKV	VIEDEQLVLG	ASQEPVGRWD	QDYDRAVLPL	LDAQQPCYLL	YRLDSQNAQG	FEWLFLAWSP		
100	110	120	130	140	150	160	170	180		
DNSPVRLKML	YAATRATVKK	EFGGGHKDE	LFGTVKDDL	FAGYQKHLSS	CAAPAPLTA	ERELQQIRIN	EVKTEISVES	KHQTLLGLAF		
190	200	210	220	230	240	250	260	270		
PLQPEAQRAL	QQLKQKHWNY	IQMKLDLRE	TIELVHTEPT	DVAQLPSRVP	RDAAARYHFFL	YKHTHEGDPL	ESVVFYISMP	GYKCSIKERM		
280	290	300	310	320	330	340	350			
LYSSCKSRLL	DSVEQDFHLE	IAKKIEIGDG	AELTAEFLYD	EVHPKQHAFK	QAFAPKPGPG	GKRGHKRLIR	GPGENGDDS			

Abbildung 86: Mascot-Identifikation von Twinfilin 2

Sequence coverage: 18,3 %

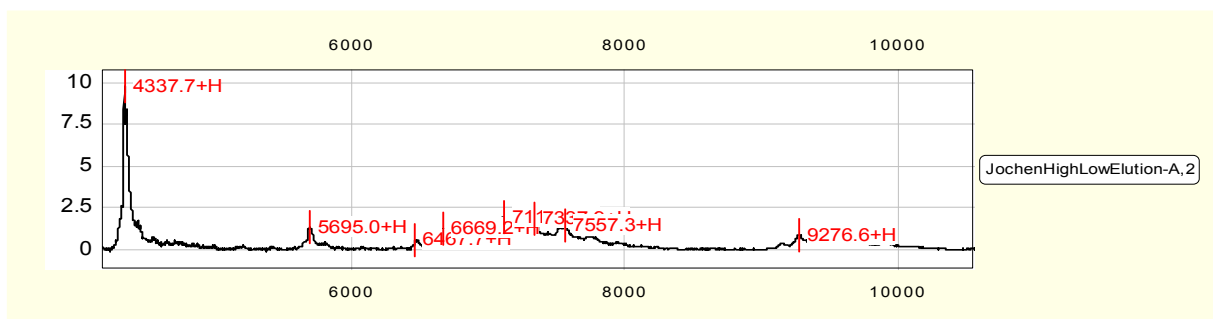


Abbildung 87: SELDI-Spektrum mit TWF2-Peak bei 4337 Da

In Tabelle 5 sind Identifikationen, die unter Einsatz der 2-D-HPLC aus dem Serum erzielt wurden zusammengefasst.

Identifizierung	Molekulargewicht (Da)	Peaks (Da)	Biomarker-Kand. (Da)	Score
ADP-ribosylation factor-like protein 15	23261	7117		38/ 3/ 3
Apolipoprotein M	21582	3356,7571,8482,15140	15151	185/ 10/ 3
Fizzy-related protein homolog	55544	3359		30/ 3/ 3
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	7758	7738	7775	34/ 2/ 2
Intraflagellar transport 74 homolog	69310	7580, 8483		62/ 11/ 2
Neuromedin-B receptor	43995	5808,9275		32/ 3/ 3
Rabenosyn-5	89613	5822		65/ 11/ 2
Small ubiquitin-related modifier 3 precursor	11687	7120,9290		28/ 3/ 3
Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	44404	3359, 7575		38/ 4/ 4
Toll-like receptor 7 precursor	122384	9286	9299	60/ 14/ 2
Twinfilin-2	4337	4337		78/ 9/ 2

Tabelle 5: Über 2-D-HPLC erzielte Identifikationen aus dem Serum. Vermerkt sind maximal erzielter Score , sowie mögliche Korrelationen mit Glaukom-Biomarker-Kandidaten anhand der übereinstimmenden Masse.

4.7 Proteinidentifikationen aus der Tränenflüssigkeit über die C18-HPLC und anschließendem präparativem Gellauf

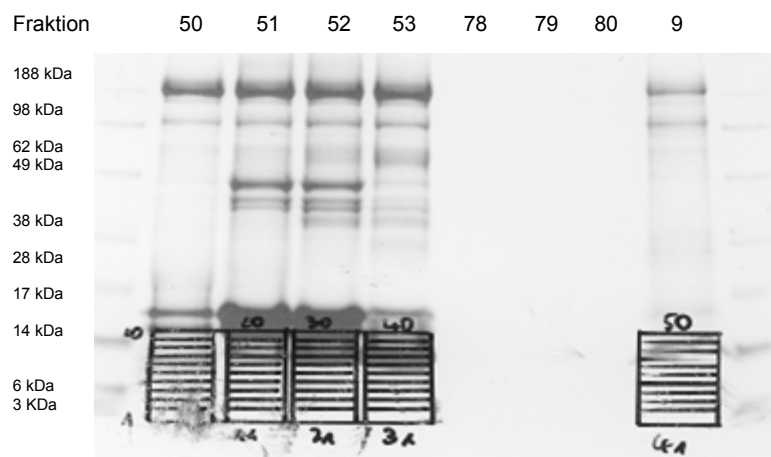


Abbildung 88: Beispiel eines präparativen Gels mit Fraktionen einer C18-Tränen-Auftrennung. In diesem Fall wurden in fünf Spuren im hier interessierenden Molekulargewichtsbereich bis etwa 20 kDa je 10 Gelstreifen ausgeschnitten und der Gelelektion sowie dem tryptischen Verdau zugeführt.

4.7.1 Identifikation von Antigen Ki-67 (Ki67)

Ki-67 ist während der G1-Phase vorwiegend in perinukleolaren Regionen, in späteren Phasen in der nukleolären Matrix, während der Mitose an allen Chromosomen detektierbar. In der G0-Phase ist Ki-67 in der Zelle nicht nachweisbar und wird deshalb traditionell als histologisches Marker-Protein für proliferierende Gewebe eingesetzt (Scholzen and Gerdes 2000). In Sehnervenköpfen glaukomatöser Augen ist die Expression von Ki-67 signifikant erhöht (Johnson, Jia et al. 2007). Die Ursache hierfür könnte darin begründet liegen, dass auch proliferierende Astrozyten Ki-67 exprimieren (Voskuhl, Peterson et al. 2009). Die Abbildungen 89 und 90 zeigen die SELDI-Spektren der beiden Identifikationen mit einem korrespondierenden Signal bei 5816 Da.

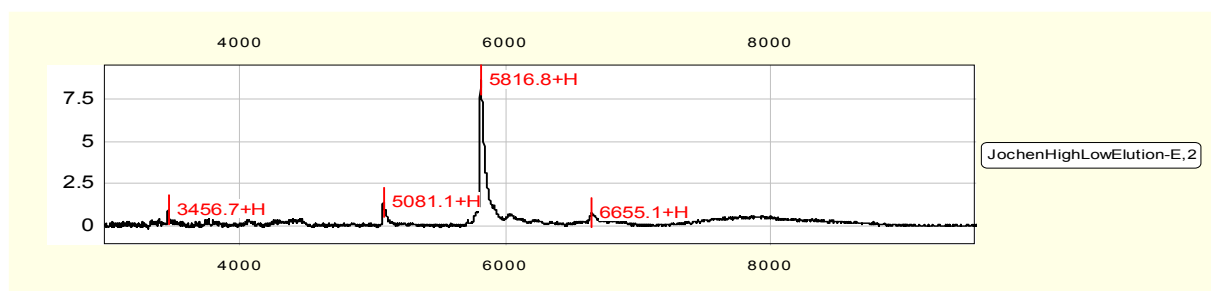


Abbildung 89: SELDI-Spektrum mit Ki-67-Peak bei 5816 Da

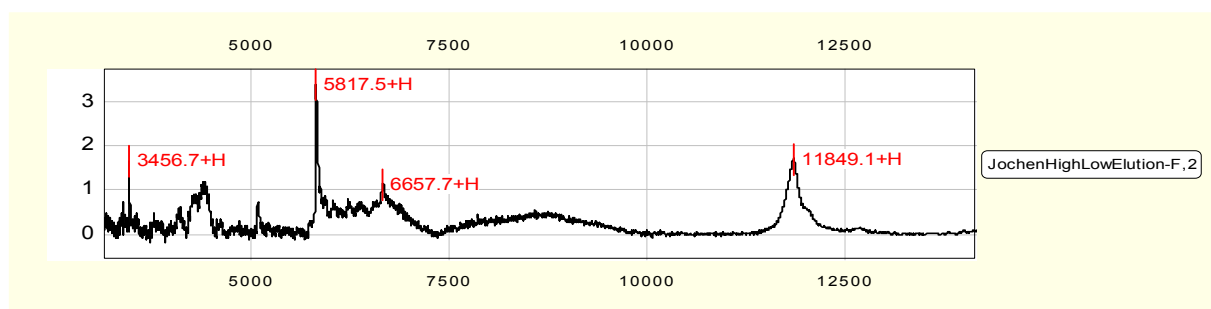


Abbildung 90: SELDI-Spektrum mit Ki-67-Peak bei 5817 Da

4.7.2 Identifikation von Armadillo repeat-containing X-linked protein 1 (ARMX1)

Das Armadillo repeat-containing X-linked protein 1 (ARMX1) gehört zur Familie der Catenine und wird in hohen Konzentrationen in Ovar, Herz Hoden, Prostata, ZNS, Milz und Dickdarm exprimiert und ist im Rahmen der Zelladhäsion an Tumorgenese, Embryogenese und am Zellstoffwechsel beteiligt (Kurochkin, Yonemitsu et al. 2001; Izawa, Nishizawa et al. 2002; Elul, Kimes et al. 2003). Als *G protein-coupled receptor associated sorting protein* (Gasparini, Anthony Crowther et al.), übt ARMX1 seine Funktionen über die Bindung an *G protein-coupled receptors* (GPCRs) aus (Abu-Helo and Simonin 2010). In zwei signifikanten Identifikationen konnte in den entsprechenden SELDI-Spektren jeweils ein Peak bei 3460 Da beobachtet werden (Abbildungen 91 und 92). In diesem Fall ist leider keine MASCOT-Darstellung der ID verfügbar.

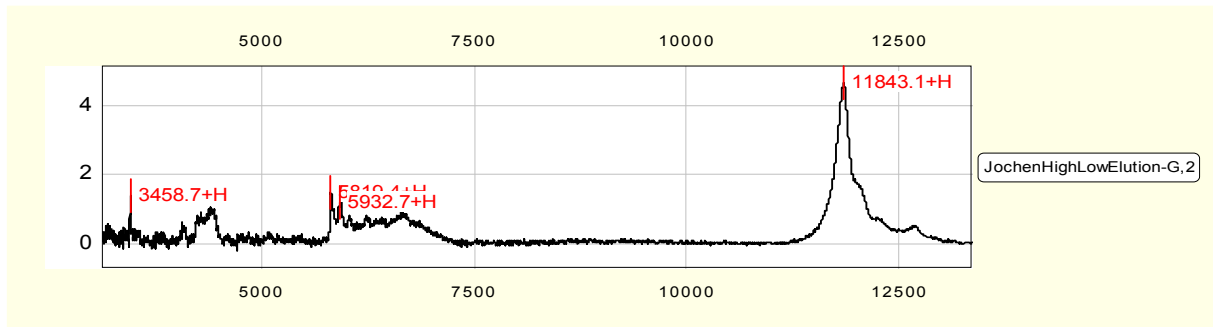


Abbildung 91: SELDI-Spektrum mit ARMX1-Peak bei 3458 Da

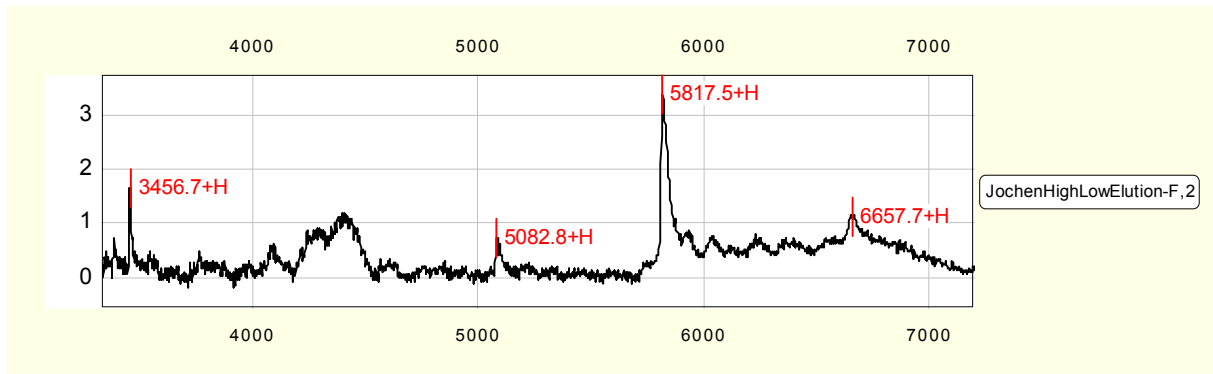


Abbildung 92: SELDI-Spektrum mit ARMX1-Peak bei 3456 Da

4.7.3 Identifikation von Beta-2-Microglobulin [Beta-2-microglobulin variant pl 5.3] (B2MG)

Das Beta-2-Microglobulin stellt die β -Kette des MHC-1-Moleküls dar, welches sich auf jeder Zelle mit Zellkern findet (siehe Abbildungen 93 und 94) (Bagnato, Durastanti et al. 2003; Linker, Rott et al. 2005).

Protein:	Beta-2-microglobulin precursor [Contains: Beta-2-microglobulin variant pl 5.3] - Homo sapiens (Human) B2MG_HUMAN	Peak threshold:	0.0
Intensity coverage:	23.7 % (99675 cnts)	Sequence coverage MS:	16.8 %
		Sequence coverage MS/MS:	16.8 %
		pl:	6.1
		MW (kDa):	13.8

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MSRSVALAVL ALLSLGLEA IQRTPKIQVY SRHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLL KNGERIEKVE HSDLFSKDW SFYLLYYTEF TPTERDEYAC
 110 120
 RVNHVTLSP KIVKMDRDM

Abbildung 93: Mascot-Identifikation von Beta-2-Microglobulin

Sequence coverage: 16,8%

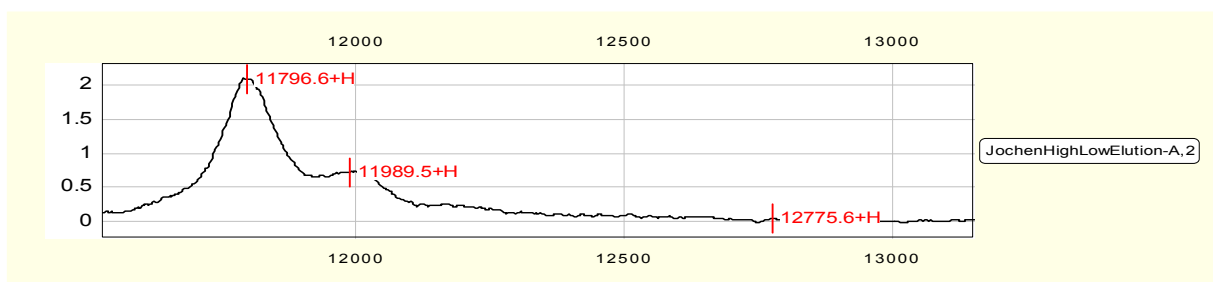


Abbildung 94: SELDI-Spektrum mit B2MG -Peak bei 11796 Da

4.7.4 Identifikation von Lipocalin-1

Tränen-Lipocalin ist ein extrazelluläres Transportprotein welches ein ganze Palette lipophiler Liganden binden kann. Darunter finden sich neben Lipiden Retinoide, Steroide und das antibiotisch wirkende Rifampicin (Breustedt, Korndörfer et al. 2005; Breustedt and Skerra 2009; Sevvana, Ahnström et al. 2009)(Abbildungen 95 und 96).

Protein:	Lipocalin-1 precursor (Von Ebner gland protein) (VEG protein) (Tear prealbumin) (TP) (Tear lipocalin) (Tlc) - Homo sapiens (Human)						Peak threshold:	0.0			
Intensity coverage:	33.4 % (47518 cnts)		Sequence coverage MS:	12.5 %		Sequence coverage MS/MS:	12.5 %	pl:	5.3	MW (kDa):	19.4
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
MKPLLLAVSL	GLIAALQAHH	LLASDEETQD	VSGTWYLKAM	TVDREFFEMN	LESVTPHTLT	TLEGGNLEAK	VTMLISGRGQ	EVKAVLEKTD	EPGKYTADGG		
110	120	130	140	150	160	170	180				
KHVAYIIRSH	VKDHYIFYCE	GELHGKPVRG	VKLVGRDPKN	NLEALEDFEK	AAGARGLSTE	SILIPRQSET	CSPGSD				

Abbildung 95: Mascot-Identifikation von Lipocalin 1

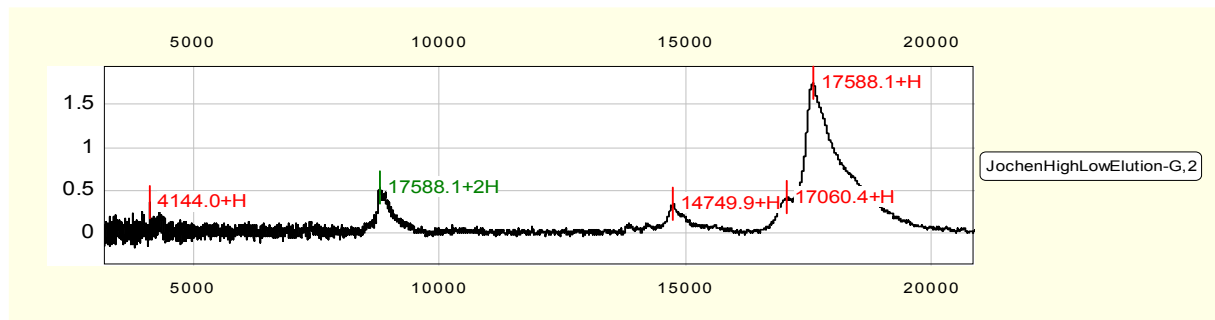


Abbildung 96: SELDI-Spektrum mit Lipocalin-Peak bei 17588 Da. Unterhalb von 10000 Da ist ein weiterer, mit 17588.1+2H bezeichneter Peak zu erkennen, der durch doppelt protonierte Lipocalin-Ionen hervorgerufen wird. Es handelt sich hierbei um ein Artefakt.

4.7.5 Identifikation von Lipophilin-C (SG2A1) und Lipophilin-A (SG1D1)

Das Proteolipid Lipophilin-C ist ein stark hydrophobes Protein, welches mit Lipophilin-A Dimere bildet und den Hauptbestandteil der Myelinscheiden im ZNS bildet (Deber and Reynolds 1991; Gow 1997; Lehrer, Xu et al. 1998). Diesem Lipoprotein wird, im SELDI-Spektrum dem im Vergleich zum Lipophilin-A (Abbildung 98) etwas höheren Molekulargewicht von 11,1 kDa zu 10,2 kDa, der SELDI-Peak bei 10220 Da zugeordnet (Abbildung 99).

Protein:	Mammaglobin-B precursor (Mammaglobin-2) (Lipophilin-C) (Lactoglobulin) (Secretoglobin family 2A, member 1) - Homo sapiens (Human)						Peak threshold:	0.0			
Intensity coverage:	26.6 % (43339 cnts)		Sequence coverage MS:	40.0 %		Sequence coverage MS/MS:	31.6 %	pl:	5.4	MW (kDa):	11.1
10	20	30	40	50	60	70	80	90			
MKLLMVLMLA	ALLLHCYADS	GCKLEDMVE	KTINSDISIP	EYKELLQEFI	DSDAAAEAMG	KFKQCFLNQS	HRTLKNFGLM	MHTVYDSIWC			
100											
NMKS											

Abbildung 97: Mascot-Identifikation von Lipophilin-C

Protein:	Secretoglobin family 1D member 1 precursor (Lipophilin-A) - Homo sapiens (Human) SG1D1_HUMAN						Peak threshold:	0.0			
Intensity coverage:	22.6 % (36856 cnts)		Sequence coverage MS:	22.2 %		Sequence coverage MS/MS:	12.2 %	pl:	10.5	MW (kDa):	10.2
10	20	30	40	50	60	70	80	90			
MRLSVCLLLL	TLALCCYRAN	AVVCQALGSE	ITGFLLAGKP	VFKFQLAKFK	APLEAVAAMK	EVKKCVDTHA	YEKRVLITKT	LGKIAEKCDR			
100											

Abbildung 98: Mascot-Identifikation von Lipophilin-A

Sequence coverage: 22,2%

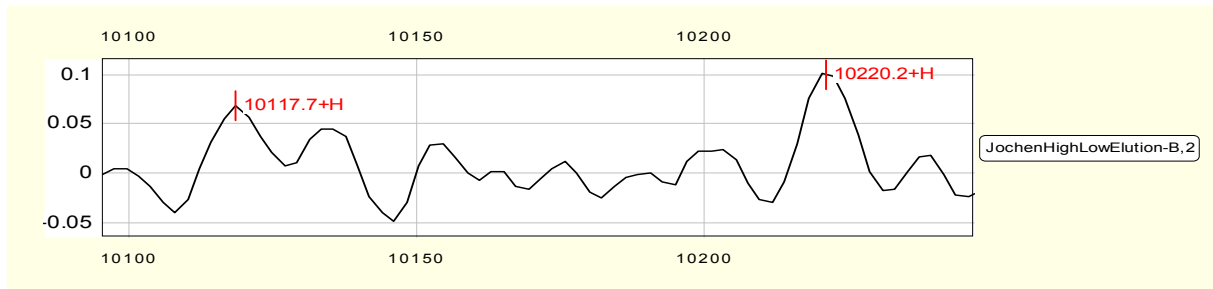


Abbildung 99: SELDI-Spektrum mit Lipophilin-C-Peak bei 10220 Da und Lipophilin-A-Peak bei 10117 Da.

Die Lipophilin-Peaks liegen im Bereich eines Biomarker-Kandidaten bei 10235 Da.

4.7.6 Identifikation von Microtubule-actin cross-linking factor 1 (MACF1)

Der *MACF1* gehört zur Plakin/Cytolinkerfamilie, dient der Verknüpfung von F-Aktin mit Mikrotubuli und ist somit am "Cross-Linking" mit anderen Cytoskelettkomponenten beteiligt (Leung, Sun et al. 1999; Goldstein and Yang 2000; Leung, Green et al. 2002). Im SELDI-Spektrum korreliert diese ID mit einem intensiven Signal bei 4999 Da und liegt damit im Bereich von zwei Biomarker-Kandidaten (4986 und 4999 Da) (siehe Abbildungen 100 und 101).

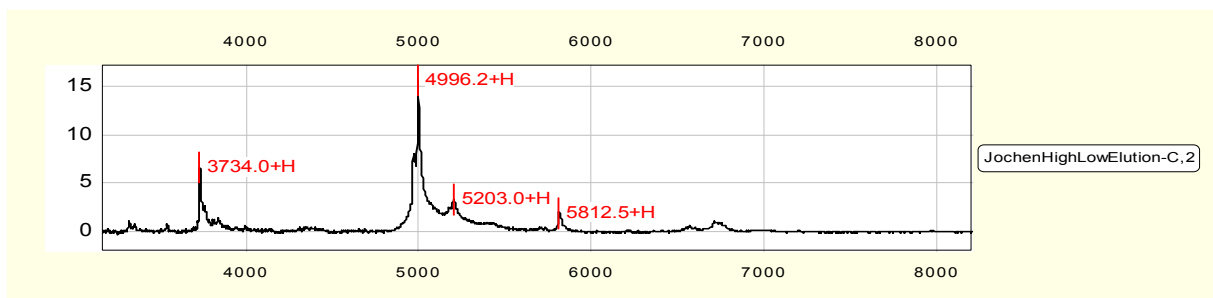


Abbildung 100: SELDI-Spektrum mit MACF1 -Peak bei 4996 Da

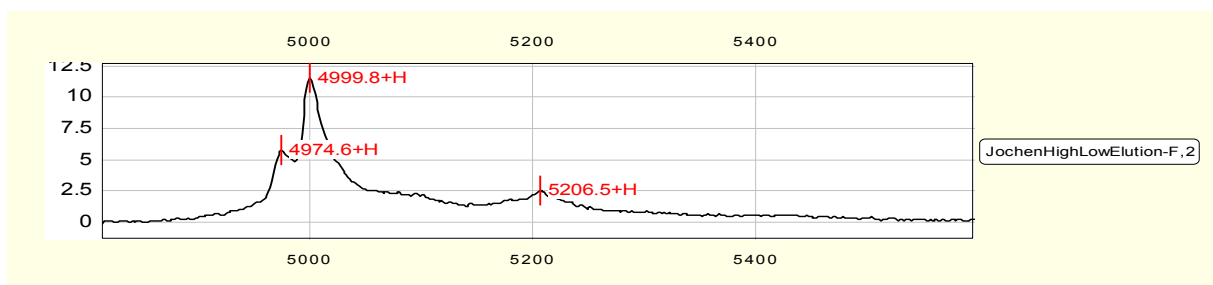


Abbildung 101: SELDI-Spektrum mit MACF1 -Peaks bei 4974 und 4999 Da

4.7.7 Identifikation von Peroxisomal antioxidant enzyme 5 (PRDX5)

Das *Peroxisomal antioxidant enzyme 5* gehört zur Familie der Peroxiredoxine, die als Antioxidans zur Neutralisation von ROS bei zellulärem Stress dienen (Peshenko, Singh et al. 2001; Wood, Poole et al. 2003). Peroxiredoxine, von denen beim Menschen bislang sechs Vertreter identifiziert wurden, scheinen beim Glaukom neuroprotektive Effekte zu entfalten und Neuronen vor der Apoptose zu bewahren (Lyu, Rhee et al. 1999; Zhou, Kok et al. 2000; Fatma, Kubo et al. 2008)(Abbildungen 102 bis 105).

Auch hier waren, wie im Fall der Serum-Identifikationen von SUMO3 und TE2IP mehrere Identifikationen zur Eindeutigen Zuordnung von ID und SELDI-Peak nötig.

Die jeweils zusätzlich erscheinenden Signale bei 3900 Da und 5805 Da stammen von Ubiquitin und PRP4, welche in denselben Fraktionen identifiziert wurden.

Protein:	Peroxisoredoxin-5, mitochondrial precursor [EC 1.11.1.15] (Prx-V) (Peroxisomal antioxidant enzyme) (PLP) (Thioredoxin reductase)	Peak threshold:	0.0
Intensity coverage:	1.2 % (2697 cnts)	Sequence coverage MS:	7.9 %
		Sequence coverage MS/MS:	7.9 %
		pl:	9.9
		MW (kDa):	22.3

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MGLAGVICALR	RSAGYILVGG	AGGQSAAAAA	RRCSEGEWAS	GGVRSFSRAA	AAMAPIKVG	AIPAVEVFEG	EPGNKVNLA	LFKGGKGVLF	GVPGAFTPGC
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SKTHLPGFVE	QAEALKAKGV	QVVAQLSVND	AFVTGEWGRA	HKAEGKVRLL	ADPTGAFGKE	TDLLLDDSLV	SIFGNRRLKR	FSMVVQDGIV	KALNVEPDGT
210	220								
GLTCSLAPNI	ISQL								

Abbildung 102: Mascot-Identifikation von PRDX5

Sequence coverage: 7,9%

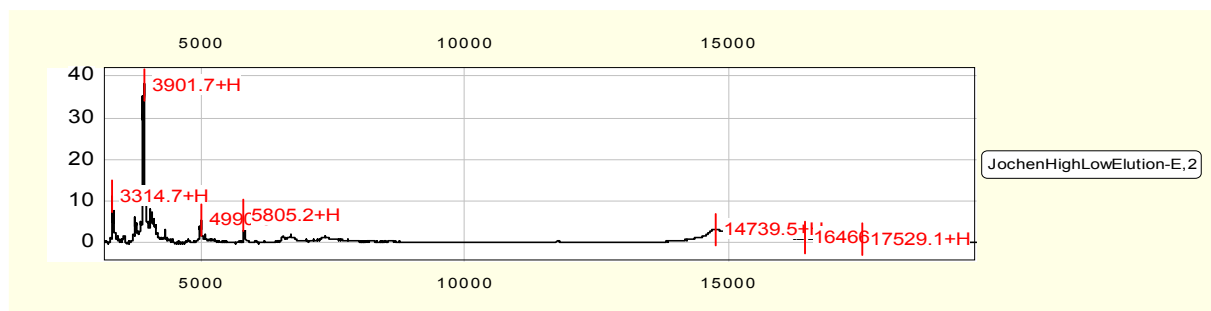


Abbildung 103: SELDI-Spektrum mit PRDX5-Peak bei 3314 Da.

Die übrigen Peaks korrelieren mit IDs für Ubiquitin (3900Da) und PRP4 (5805Da), die in der gleichen Fraktion erzielt wurden.

Protein:	Peroxisoredoxin-5, mitochondrial precursor [EC 1.11.1.15] (Prx-V) (Peroxisomal antioxidant enzyme) (PLP) (Thioredoxin reductase)	Peak threshold:	0.0
Intensity coverage:	4.1 % (6335 cnts)	Sequence coverage MS:	32.2 %
		Sequence coverage MS/MS:	7.9 %
		pl:	9.9
		MW (kDa):	22.3

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MGLAGVICALR	RSAGYILVGG	AGGQSAAAAA	RRCSEGEWAS	GGVRSFSRAA	AAMAPIKVG	AIPAVEVFEG	EPGNKVNLA	LFKGGKGVLF	GVPGAFTPGC
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SKTHLPGFVE	QAEALKAKGV	QVVAQLSVND	AFVTGEWGRA	HKAEGKVRLL	ADPTGAFGKE	TDLLLDDSLV	SIFGNRRLKR	FSMVVQDGIV	KALNVEPDGT
210	220								
GLTCSLAPNI	ISQL								

Abbildung 104: Mascot-Identifikation von PRDX5

Sequence coverage:32,2%

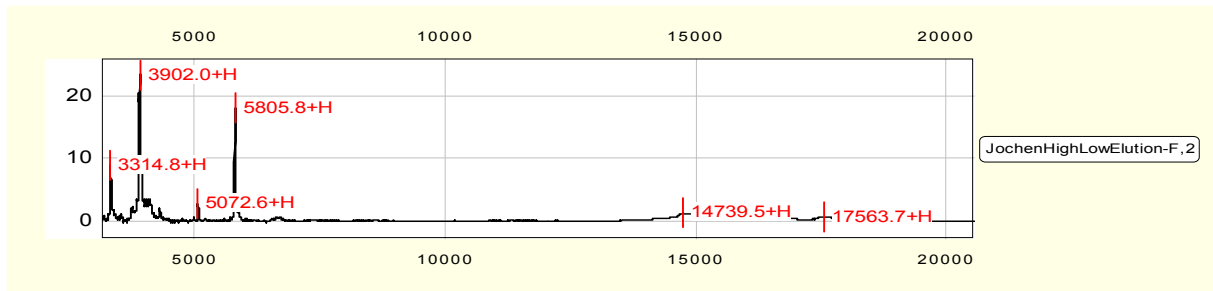


Abbildung 105: SELDI-Spektrum mit PRDX5-Peak bei 3314 Da. Die übrigen Peaks korrelieren mit weiteren IDs, die in der gleichen Fraktion erzielt wurden.

4.7.8 Identifikation von *Prolactin-inducible protein precursor* (Secretory actin-binding protein) (PIP)

PIP ist ein Protein, welches trotz seiner geringen Größe durch die Fähigkeit zur Bindung an TCR CD4⁺ T-Zellen und der Fc-Region von IgG-Antikörpern, Einfluss nimmt auf die Koordination des Immunsystems und antiapoptotisch wirkt (Hassan, Waheed et al. 2009). Bei Autoimmunerkrankungen wie dem Sjögren-Syndrom ist die Transkriptionsrate von PIP signifikant heruntergeregelt (Giusti 2007). Diagnostisch wird das *Prolactin-inducible protein* als Tumormarker beim Mammacarcinom eingesetzt (Debily, Marhomy et al. 2009). Die dazugehörige SELDI-Messung ergab ein Signal bei 3451 Da (Abbildungen 106 und 107).

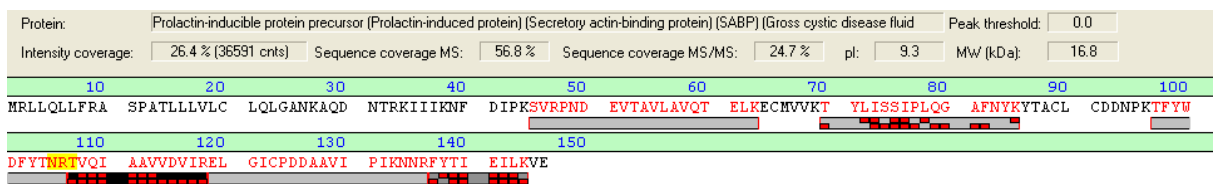


Abbildung 106: Mascot-Identifikation von PIP

Sequence coverage: 56,8%

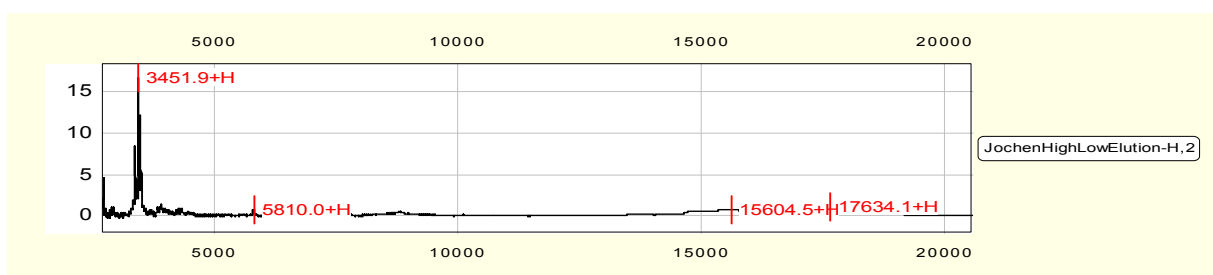


Abbildung 107: SELDI-Spektrum mit PIP-Peak bei 3451 Da

4.7.9 Identifikation von Proline-rich protein 4 precursor (PRP4) (PROL4)

PRP4, ein Protein mit mutmaßlich protektiver Funktion, wird von den Tränenrüsen gebildet und verfügt über ein Molekulargewicht von 15116 Da (Dickinson and Thiesse 1995; Ozyildirim, Wistow et al. 2005; Laurie, Olsakovsky et al. 2008; McKown, Wang et al. 2009; Nichols and Green-Church 2009).

Im SELDI-Spektrum resultieren aus der PRP4-Messung Peaks bei 14446, 5809, 5078 und 4093 Da (Doppelpeak mit 4093 und 4066 Da, Abb. 108 und 109). Somit könnte PRP4 für zwei Biomarker-Kandidaten bei 4056 und 5066 Da stehen.

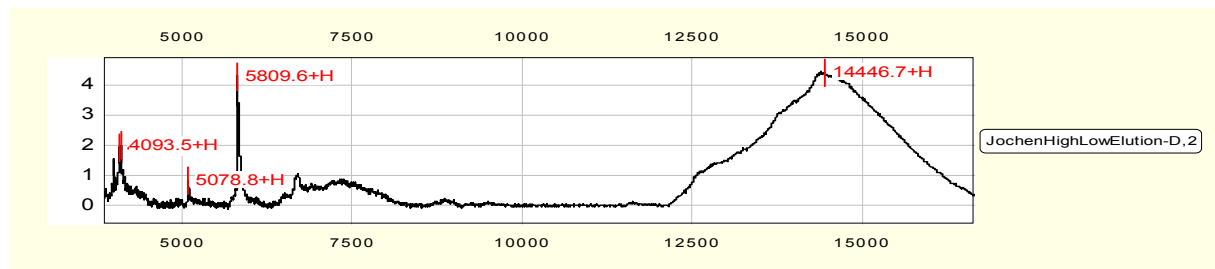


Abbildung 108: SELDI-Spektrum mit PRP4-Peaks bei 14446, 5809, 5078 und 4093 Da.

Der ungewöhnlich breite PRP4-Peak bei 14446 Da ist proteinspezifisch und bei jeder PRP4-Messung zu beobachten gewesen. Eine Ursache hierfür ist unbekannt, liegt jedoch vermutlich in den spezifischen Fragmentierungseigenschaften von PRP4 im SELDI-TOF® begründet.

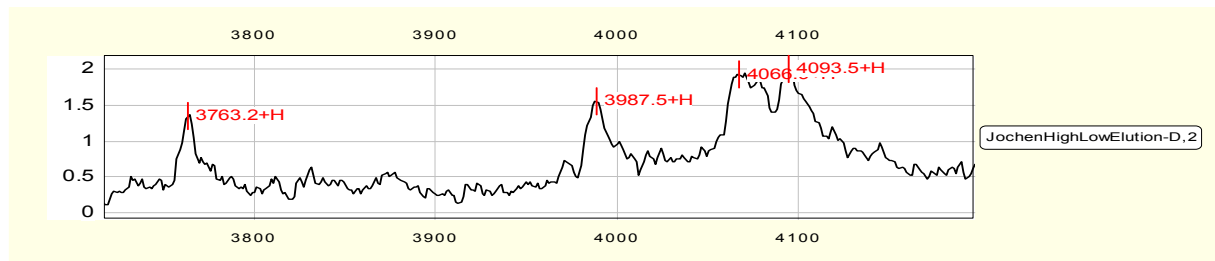


Abbildung 109: Doppelpeak bestehend aus Signalen bei 4093 und 4066 Da.

Das Herauszoomen des unteren Molekulargewichtsbereichs offenbart neben dem Signal bei 4093 Da noch einen weiteren Peak bei 4066 Da.

4.7.10 Identifikation von Protein S100-A8 (S10A8)

Das proinflammatorische Protein S100-A8 wird bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen durch Phagozyten der angeborenen Immunität exprimiert und tritt bei Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom oder Multipler Sklerose mit erhöhten Serum-Titern auf (Nacken 2003; Foell and Roth 2004). S100-A8 generiert im SELDI-TOF®-Spektrum neben einem Peak des intakten Proteins bei 10,9 kDa auch ein Signal bei 4993 Da (Abbildungen 110 und 111).

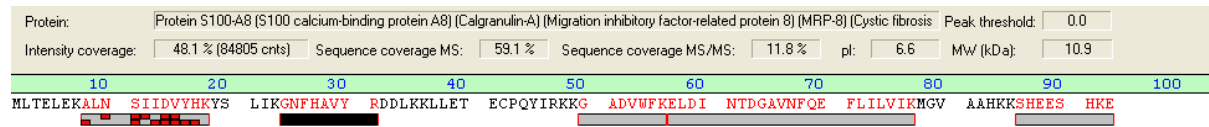


Abbildung 110: Mascot-Identifikation von S100-A8

Sequence coverage: 59,1 %

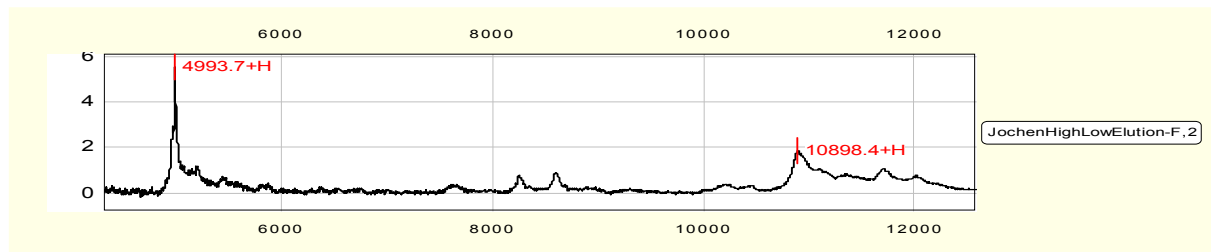


Abbildung 111: SELDI-Spektrum mit S100-A8-Peaks bei 10898 und 4993 Da

Das S100-A8-Signal bei 4993 Da liegt im Bereich eines Biomarker-Kandidaten bei 4999 Da. In diesem Fall ist sogar das komplette, unfragmentierte, Protein bei 10,9kDa sichtbar.

4.7.11 Identifikation von Spectrin alpha chain, brain (α -Fodrin) (SPTA2)

α -Fodrin ist ein neuronales Zytoskelett-Protein und ist über die Interaktion mit Calmodulin an der Calcium-abhängigen Motilität des Cytoskeletts beteiligt (Cheney, Hirokawa et al. 1983). Für Caspase-3 ist α -Fodrin eines der ersten Substrate, die bei der Induktion der Apoptose beim Glaukom proteolysiert werden (Janicke, Ng et al. 1998; Tahzib, Ransom et al. 2004). Im SELDI-Spektrum korreliert der Peak bei 4973 Da mit der Fodrin-Identifikation. Der zweite sichtbare Peak bei 4998 Da steht für das S100-Protein, welches sich beim tryptischen Verdau in der gleichen Fraktion befand (Abbildung 112).

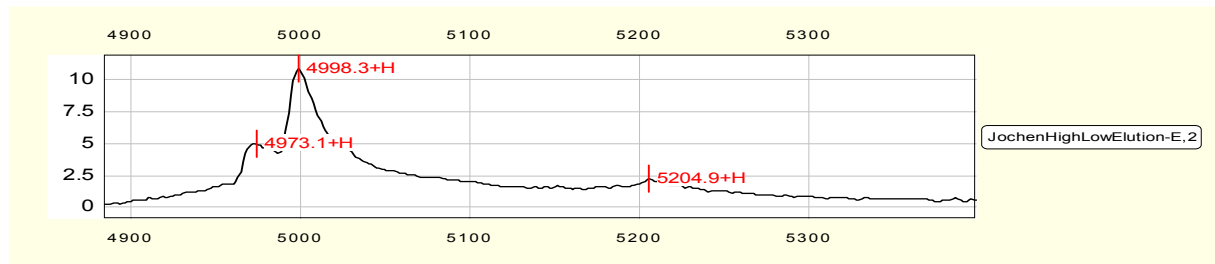


Abbildung 112: SELDI-Spektrum mit α -Fodrin -Peak bei 4973 Da

Das Signal bei 4998Da wird durch das Protein S100-A8 verursacht.

4.7.12 Identifikation von TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK)

Die *TNIK* gehört zur Familie der *Germinal center kinases* und ist unter anderem an der Aktivierung der *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) als Reaktion auf zellulären Stress beteiligt. JNK, eine *mitogen-activated protein kinase* (MAP)-Kinase, ist beteiligt an der Induktion inflammatorischer und neurodegenerativer Prozesse, sowie der Apoptose (Fu, Shen et al. 1999; Oltmanns, Issa et al. 2003; Taira, Umikawa et al. 2004). Im SELDI Spektrum korreliert ein Peak bei 3388Da mit *TNIK* (Abbildung 113).

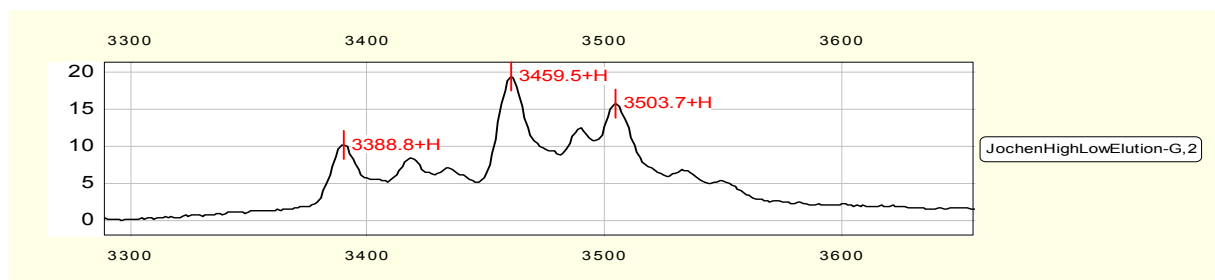


Abbildung 113: SELDI-Spektrum mit *TNIK* -Peak bei 3388Da.

Die Signale bei 3459 und 3503 Da werden durch das Protein KI-67 verursacht, welches sich neben *TNIK* in der verdauten Gelbende befand.

4.7.13 Identifikation von Ubiquitin (UBIQ)

Ubiquitin bindet kovalent als Monomer oder als Polymer an Lysin und führt bei der Bindung eines Lys-48-Polymers zur Degradation des Zielproteins im Proteasom.

Die Ubiquitin-gesteuerte Proteolyse ist an Zellzyklussteuerung, Transkription, Antigen-Präsentation, Rezeptor-Endozytose und der Signaltransduktion der Zelle als Reaktion auf zellulären Stress und an neurodegenerativen Prozessen beteiligt (Hershko and Ciechanover 1998; Glickman and Ciechanover 2002; Sakamoto 2002; Golab, Bauer et al. 2004; Jellinger 2009). Ubiquitin generiert im SELDI-TOF®-Spektrum neben einem Peak des intakten Proteins bei 8,6 kDa auch ein Signal bei 3920 und 3347 Da (Abbildungen 114 und 115).

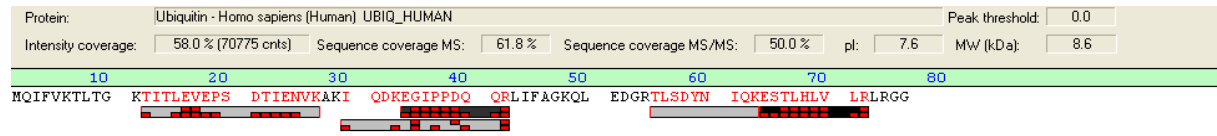


Abbildung 114: Mascot-Identifikation von Ubiquitin

Sequence coverage: 61,8 %

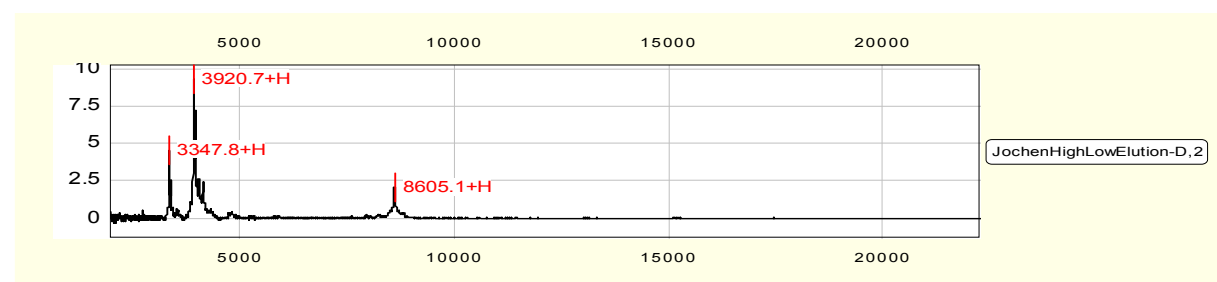


Abbildung 115: SELDI-Spektrum mit Ubiquitin-Peaks bei 8605, 3920 und 3347 Da.

Der SELDI-Peak bei 3920 Da liegt im Bereich eines Biomarker-Kandidaten (3966 Da).

In Tabelle 6 sind alle Identifikationen, die unter Einsatz der C18-HPLC und anschließend präparativem Gellauf aus der Tränenflüssigkeit erzielt wurden zusammengefasst.

Identifizierung	Molekulargewicht (Da)	Peaks (Da)	Biomarker-Kandidat (Da)	Score
Antigen KI-67	360698	3456,5816	3450	66/ 23/ 1
Armadillo repeat-containing X-linked protein 1	49720	3458		69/ 9/ 1
Beta-2-microglobulin precursor	13820	12721		127/ 2/ 2
Lipocalin	19409	3901,5800,11785,17544		225/ 5/ 2
Secretoglobin family 1D member 1 precursor (Lipophilin-A)	10234	10220	10223	71/3/1
Mammaglobin-B precursor (Mammaglobin-2) (Lipophilin-C)	11104	10103		234/ 5/ 3
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	623626	4974	4986,4999	55/ 33/ 4
Peroxiredoxin-5, mitochondrial precursor	22298	3314		155/ 5/ 1
Prolactin-inducible protein precursor	16847	3452	3450	259/ 6/ 3
Proline-rich protein 4 precursor	15116	4063,5076,5809	4056,5066	266/ 5/ 3
Protein S100-A8 (S100 calcium-binding protein A8)	10885	4999, 10898	4999	93/5/1
Spectrin alpha chain, brain	285163	4973	4986,4999	95/ 41/ 5
TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	155361	3388		61/ 15/ 0
Ubiquitin	8560	3347, 3920, 8605	3966	284/ 5/ 4

Tabelle 6: Über C18-HPLC erzielte Identifikationen aus der Tränenflüssigkeit.

Vermerkt sind maximal erzielter Score, sowie mögliche Korrelationen mit Glaukom-Biomarker-Kandidaten.

Folgende Tabelle fasst alle signifikant identifizierten Proteine zusammen:

Identifizierungen aus dem Serum über α -PDGF-Beads	Molekulargewicht (Da)	Peaks (Da)	Biomarker-Kandidat (Da)	Score
Complement C1q	26670	19828		98/ 6/ 3
TPTE2	61457	23578		29/ 3/ 3
Platelet factor 4 (PF-4) (CXCL4)	11123	7794	7775	64/ 2/ 1
Platelet basic protein (PBP) (CXCL7)	14171	9311	9299	65/ 3/ 2
Serum albumin	71317	67748		428/ 15/ 7
Serotransferrin (Transferrin) (Siderophilin)	79280	9824,79951		270/ 17/ 8
TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	155361	4183,4230	4165,4219	56/ 17/ 1
Transthyretin (Prealbumin) (TBPA) (TTR)	15991	13986	13999	87/ 5/ 3
Identifizierungen aus dem Serum				
ADP-ribosylation factor-like protein 15	23261	7117		38/ 3/ 3
Apolipoprotein M	21582	3356,7571,8482,15151	15151	185/ 10/ 3
Fizzy-related protein homolog	55544	3359		30/ 3/ 3
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	7758	7738	7775	34/ 2/ 2
Intraflagellar transport 74 homolog	69310	7580, 8483		62/ 11/ 2
Neuromedin-B receptor	43995	5808,9275		32/ 3/ 3
Rabenosyn-5	89613	5822		65/ 11/ 2
Small ubiquitin-related modifier 3	11687	7120,9290		28/ 3/ 3
Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein	44404	3359, 7575		38/ 4/ 4
Toll-like receptor 7 precursor	122384	9286	9299	60/ 14/ 2
Twinfilin-2	4337	4337		78/ 9/ 2
Identifizierungen aus der Träne				
Antigen KI-67	360698	3456,5816	3450	66/ 23/ 1
Armadillo repeat-containing X-linked protein 1	49720	3458		69/ 9/ 1
Beta-2-microglobulin precursor	13820	12721		127/ 2/ 2
Lipocalin	19409	3901,5800,11785,17544		225/ 5/ 2
Lipophilin-A	10234	10220	10223	71/ 3/ 1
Lipophilin-C	11104	10103		234/ 5/ 3
MACF1	623626	4974	4986,4999	55/ 33/ 4
Peroxiredoxin-5, mitochondrial precursor	22298	3314		155/ 5/ 1
Prolactin-inducible protein precursor	16847	3452	3450	259/ 6/ 3
Proline-rich protein 4 precursor	15116	4063,5076,5809	4056,5066	266/ 5/ 3
Protein S100-A8 (S100 calcium-binding protein A8)	10885	4999, 10898	4999	93/ 5/ 1
Spectrin alpha chain, brain	285163	4973	4986,4999	95/ 41/ 5
TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	155361	3388		61/ 15/ 0

Tabelle 7: Auflistung aller identifizierten Proteine aus Serum und Tränenflüssigkeit

5 Diskussion

Die beim niedergelassenen Augenarzt zur Glaukomdiagnostik vorgenommene Messung des Augeninnendrucks ist nicht mehr als eine Momentaufnahme. Heute wissen wir, dass auch der Augeninnendruck einem circadianen Rhythmus folgt und das Risiko besteht, für die Messung einen Moment gewählt zu haben, in dem der IOD gerade nicht pathologisch erhöht war (Loewen, Liu et al. 2010). Hinzu kommt, dass Patienten, die zu einem Normaldruck-Glaukom (NTG) neigen, von einer IOD-Messung ohnehin nicht profitieren können (Kass, Heuer et al. 2002; Grus, Joachim et al. 2004). Bleibt dem Ophthalmologen also der Blick durch die Spaltlampe, um eine pathologische Veränderung des Augenhintergrundes zu erkennen oder den Patienten zur weiterführenden Diagnostik an eine Augenklinik zu überweisen.

Viel zu häufig fallen aber offensichtlich Glaukompatienten durch dieses Überwachungsraaster oder unterlassen wegen ausbleibender Beschwerden den Arztbesuch, so dass für das Jahr 2010 mit weltweit 8,4 Millionen, für 2020 mit 11,2 Millionen glaukombedingten beidseitigen Erblindungen gerechnet werden muss (Quigley and Broman 2006). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, der Ophthalmologie für die Glaukomdiagnostik klinisch einsetzbare Biomarker zur Verfügung zu stellen.

5.1 Methodenentwicklung

Der in dieser Arbeit entwickelte „Workflow“ ermöglicht es, den im Rahmen des vorangegangenen klinischen Protein-Profilings an der Augenklinik der Universität Mainz ermittelten Biomarker-Kandidaten, die nach statistischer Auswertung lediglich als Molekulargewichte vorliegen, eine Identität zu geben. Dies setzt im Gegensatz zum etablierten *Bottom-up*-Ansatz die Befolgung des *Top-down*-Ansatzes voraus, bei dem die Proteine zur Identifikation erst nach allen Aufreinigungs- und Fraktionierungsschritten dem tryptischen Verdau zugeführt werden. Die methodisch größte Herausforderung bei der Arbeit mit Probenmaterial wie dem Serum, stellt dessen immense Komplexität und Konzentrationsdynamik dar. Faktoren, die den Einsatz von Zentrifugalfiltern mit definiertem Cut-off, Vorfractionierungen mit *Beads* und Multiaffinitätssäulen, sowie der Elektroelutionsapparaturen „Elutrap“ und dem „Whole-Gel-Eluter“ als nur bedingt empfehlenswert erscheinen lassen. Vorversuche haben gezeigt, dass die Filter bezüglich ihres „Cut-offs“ recht ungenau arbeiten und durch hochabundante Proteine schnell verstopfen. Die in dieser Arbeit verwendeten *Beads* eignen sich zwar gut zur Vorfractionierung, besitzen jedoch nur begrenzte Bindungskapazitäten, mit denen es sehr schwierig ist, mit vertretbarem Materialeinsatz auch sehr niedrig konzentrierte Proteine zu isolieren. Die Kombination aus sehr hohen Kosten und nur eingeschränkten Möglichkeiten der Wiederverwendung, lassen *Beads* als wirtschaftliche Methode zur Biomarkersuche

ausscheiden. Die notwendige Abreicherung hochabundanter Proteine durch das *Multiple Affinity Removal System* (MARS) konnte aus zweierlei Gründen nicht überzeugen: Zum einen scheinen viele niedrig-abundante Proteine, die als Glaukom-Biomarker in Frage kommen könnten, sehr effektiv an hochabundante Transportproteine wie dem Albumin zu binden. Dies führt dazu, dass die erwünschten Zielproteine zusammen mit den unerwünschten Kandidaten von der Säule eluieren, so daß man also nichts gewonnen hat. Zum anderen handelt es sich bei den mit der MARS-Säule mitgelieferten Puffern, deren Rezepturen der Geheimhaltung unterliegen, offensichtlich um Hochsalzpuffer, was den direkten Einsatz der Eluate für eine massenspektroskopische Messung oder eine Ionenaustauscher-Chromatographie ausschließt und zunächst verlustbehaftete und zeitaufwändige Fällungs – oder Dialyseschritte zur Entsalzung durchgeführt werden müssen. Aus den genannten Gründen wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Erst die Kombination aus präparativer Flüssigchromatographie, präparativem SDS-Proteingel, SELDI-TOF® und Maldi-MSMS brachte den erwünschten Erfolg in Gestalt reproduzierbarer Identifikationen auch niedrigabundanter Proteine, zu denen beispielsweise Cytokine wie das CXCL4 und CXCL7 gehören. Ein entscheidender Schritt dabei war die Optimierung der eingesetzten Elutionslösung, mit der die im SDS-Gel fixierten Proteine für die SELDI-Messung aus dem Gel heraus eluiert werden müssen. Denn nur mit einem eindeutig zuzuordnendem, aus der selben Gelbande resultierenden SELDI-Peak ist die signifikante Identifikation verwertbar. Als signifikant, also hinreichend nicht-zufällige Identifikation, wird im Fall der eingesetzten MASCOT-Datenbank ein Signifikanzwert von $p < 0,05$ angesehen. Wurden in einer Fraktion mehrere Proteine signifikant identifiziert, erfolgte die Zuordnung des Proteins nach dem Ausschlussverfahren durch den Vergleich mehrerer Messungen, deren aussagekräftigste Resultate im Ergebnisteil aufgeführt sind.

5.2 Auswahl des Probenmaterials

Berücksichtigt man die diskutierten Mechanismen, die zur Manifestation eines Glaukomschadens führen, tendiert man zunächst dazu, ein Probenmaterial zu wählen, welches diese Pathomechanismen auf Ebene des Proteoms bestmöglich widerspiegelt. Im Auge trifft dies für das Kammerwasser zu. Allerdings erweist sich Kammerwasser als für die Entwicklung einer analytischen Methode als viel zu kostbar und ist zudem in Deutschland nur im Rahmen einer Operation am offenen Auge gewinnbar.

In dieser Arbeit wurde deshalb das „zweitbeste“ Probenmaterial eingesetzt: Die mit der Kapillare gewonnene Tränenflüssigkeit aus dem ungereizten Auge. Auch Serum wurde eingesetzt, da es sich durch eine gute Verfügbarkeit und die Tatsache auszeichnet, dass auch im Serum von Glaukomkranken im Vergleich zu Gesunden signifikante Unterschiede im Proteinprofil zu registrieren sind. Die dabei gefundenen Proteine lassen sich durchaus mit

einer zunehmenden Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke unter degenerativen Prozessen im ZNS erklären (Abschnitt 1.2.5).

Im Idealfall könnten klinische Glaukommarker im Serum vielleicht dazu führen, die Glaukomdiagnostik als alltägliche Routinediagnostik zwischen Kreatinin und Hämatokrit auf dem Laborbericht für den Hausarzt zu finden.

5.3 Identifikationen aus der Tränenflüssigkeit

Die Tränenflüssigkeit übernimmt die Aufgabe, das Auge gegen bakterielle und virale Angriffe zu schützen, die Augenoberfläche zu benetzen und für die Versorgung der Kornea zu sorgen (McKown, Wang et al. 2009). Tränenflüssigkeit steht zudem neben dem Kammerwasser in unmittelbarem Kontakt zu okulären Strukturen und ist damit dazu prädestiniert, potentiell pathologische Prozesse aus dem Inneren des Auges widerzuspiegeln.

Die im Rahmen dieser Arbeit in der Träne identifizierten Biomarker-Kandidaten sind sämtlich als signifikant identifiziert und nach dem Ausschlußverfahren einem entsprechenden SELDI-Peak zugeordnet worden. Aufgrund von Messtoleranzen, der Verwendung von SELDI-Arrays mit abweichender funktioneller Oberfläche und den Ungenauigkeiten der während der Studien eingesetzten „*Automatic Peak Detection*“, insbesondere bei niedriger „*Signal-to-Noise Ratio*“, war nicht davon auszugehen, dass die mit der Identifikation korrelierende und im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen SELDI-Peaks exakt denen entsprechen, die im Rahmen von Profiling-Studien als Glaukom-Biomarker ermittelt wurden. Entsprechend wurde hier vom Studienleiter eine Toleranz von etwa 40 Da eingeräumt.

Das ***Proline-rich protein 4*** übernimmt mutmaßlich protektive Funktionen und konnte hochsignifikant als Biomarker-Kandidat identifiziert werden (Abschnitt 4.7.9). Als Protein, welches durch zellulären Stress induziert wird, konnte eine Kinase, die ***TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK)*** identifiziert werden (Abschnitt 4.7.12). TNIK ist beteiligt an der Induktion inflammatorischer und neurodegenerativer Prozesse, sowie der Induktion der Apoptose (Fu, Shen et al. 1999; Oltmanns, Issa et al. 2003; Taira, Umikawa et al. 2004). Ebenfalls an der Etablierung inflammatorischer Prozesse beteiligt ist das proinflammatorische Zytokin ***S100-A8***, welches von Phagozyten der angeborenen Immunität freigesetzt wird und bei Rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom oder Multipler Sklerose mit erhöhten Serum-Titern nachweisbar ist (Abschnitt 4.7.10) (Nacken 2003; Foell and Roth 2004). Ebenfalls an der Koordination der angeborenen Immunität beteiligt sind das ***Prolactin-inducible protein (PIP)*** (Abschnitt 4.7.8) sowie das ***Beta-2-microglobulin*** (Abschnitt 4.7.3).

Als Proliferationsmarker, der auch von proliferierenden Astrozyten im Verlauf einer Gliose exprimiert wird, konnte ***Ki-67*** identifiziert werden (Abschnitt 4.7.1).

Als intrazelluläre neuronale Antigene konnten ***α-Fodrin*** als neuronales Zytoskelett-Protein (Abschnitt 4.7.11), sowie ***Lipophilin-A*** (Abschnitt 4.7.5) und ***Lipophilin-C*** (Abschnitt 4.7.5)

als Hauptbestandteil der Myelinscheiden im ZNS identifiziert werden. Proteine, die nur unter degenerativen Prozessen freigesetzt werden dürften, wie es beispielsweise bei der **Neuronenspezifische Enolase (NSE)** im ZNS der Fall ist, die bei traumatischen Ereignissen oder degenerativen Prozessen im ZNS als diagnostischer Marker verwendet wird (Pineda, Wang et al. 2004).

Schließlich konnte als Biomarker-Kandidat **Ubiquitin** identifiziert werden, welches als Reaktion auf zellulären Stress mit einer gesteigerten Expressionsrate auffällt. Nachweislich ist **Ubiquitin** an neurodegenerativen Prozessen beteiligt und hier, wie auch im normalen Zellstoffwechsel, für die geordnete Proteindegradation im Proteasom erforderlich (Abschnitt 4.7.13).

Als Proteine, die *noch* nicht im Rahmen von Profiling-Studien als Biomarker-Kandidaten identifiziert werden konnten, jedoch bezüglich der Pathogenese des Glaukoms eine Rolle spielen könnten, wurden das **Peroxisomal antioxidant enzyme 5**, welches bei zellulärem Stress an der Neutralisation von ROS beteiligt ist (Abschnitt 4.7.7), der an Verknüpfung von F-Aktin mit Mikrotubuli beteiligte **Microtubule-actin cross-linking factor 1** (Abschnitt 4.7.6) und das an Zelladhäsion an Tumorgenese, Embryogenese und am Zellstoffwechsel beteiligte **Armadillo repeat-containing X-linked protein 1 (ARMX1)** (Abschnitt 4.7.2) identifiziert.

5.4 Identifikationen aus dem Serum

Die erste signifikante Identifikation, der ein korrespondierender Peak mit einem verwertbarem SELDI-Spektrum zugeordnet werden konnte, war die für das **Platelet basic protein (PBP)** (Abschnitt 3.2.11), für die in der ersten HPLC-Dimension eine *Strong cation Exchanger* - Säule (SCX) verwendet wurde. Eine SCX-Säule wurde gewählt, da sie, geprägt durch die negativen Erfahrungen in den Vorversuchen, eine gute Trennleistung bei geringer Empfindlichkeit gegenüber hochkonzentrierter Proteinproben wie dem Serum in sich vereinigt. Es zeigte sich allerdings, dass ausgerechnet Glaukom-Biomarker-Kandidaten mit einer Masse zwischen 4kDa und 20 kDa zusammen mit Albumin von der Säule eluierten, welches sich in der zweiten Dimension (*Reversed Phase*) nicht mehr abtrennen ließ. Im Einzelfall setzte sich das Albumin in der *Reversed Phase*-Säule fest und führte zu unerwünschten *Memory-Effekten*. Für die übrigen Identifikationen wurde deshalb für die erste Dimension die robustere Methode der *Size Exclusion*-Chromatographie (Fonseca, Kawas et al.) eingesetzt. Dies hatte zudem den Vorteil, dass hierfür keine Salzpuffer eingesetzt werden mussten, die die massenspektrometrische Messung der HPLC-Fractionen gestört hätten. Der Einsatz der an magnetischen *Beads* gebundenen α -PDGF-Antikörper führte neben der erneuten Identifikation des Biomarker-Kandidaten **Platelet basic protein (PBP, CXCL7)** im Serum zur Identifikation eines weiteren thrombozytären Cytokins, dem **Platelet factor 4 (PF-4, CXCL4)**, der ebenfalls als Biomarkerkandidat gelten kann. Daß

unter Verwendung dieser Antikörper auch Proteine identifiziert wurden, die nichts mit **PDGF** gemein haben, dürfte an der polyklonalen Zusammensetzung der verwendeten Antikörper gelegen haben (Abschnitt 3.2.12).

5.5 Zytokine als Mediatoren von inflammatorischen Prozessen beim Glaukom?

Thrombozyten sind essentielle Bestandteile der Hämostase und Gerinnung, spielen jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung inflammatorischer Prozesse und der Koordination der angeborenen Immunität (Brandt 2000).

Während der Aggregationsphase, die typischerweise bei einer Verletzung der endothelialen Gefäßwand eintritt, werden eine Reihe vorproduzierter Mediatoren, inklusive dreier Chemokine, aus den thrombozytären α -Granulae sezerniert. Dieses sind **Connective tissue-activating peptide III (CTAP-III)**, **Neutrophil activating peptide 2 (NAP-2; CXCL7)**, **RANTES (CCL5)** und **Platelet factor 4 (PF4; CXCL4)** (Kameyoshi, Dorschner et al. 1992; Brandt, Petersen et al. 2000). **NAP-2**, ein N-terminal verkürzter Abkömmling von **CTAP-III** wirkt positiv chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und induziert die Freisetzung von Elastase und den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in diesen Zellen (Walz, Dewald et al. 1989). **RANTES** aktiviert Monozyten, T-Zellen und dendritische Zellen (Rollins 1997; Chapple, Grayson et al.). **PF4** ist ein Zytokin, dass zur Familie der CXC-Chemokine zählt und hauptsächlich durch Thrombozyten während der Aggregationsphase in einer Konzentration von 0.4 – 1.9 $\mu\text{mol/l}$ (Serum) sezerniert wird, wobei ursprünglich **PF-4** lediglich die Neutralisierung des antikoagulierenden Effekts von Heparin zugeschrieben wurde (Brandt 2000; Xiao, Visentin et al. 2008). Trotz ihrer kernlosen Existenz sind Thrombozyten in der Lage bei Aktivierung aus gespeicherter mRNA Proteine zu synthetisieren und freizusetzen (Lindemann, Tolley et al. 2001). Charakteristisch für die Gruppe der CXC-Chemokine ist ein Glu-Leu-Arg-Tripeptid (ELR-Motiv), welches sich N-terminal der CXC-Gruppe befindet und die biologische Funktion und chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids bestimmt. PF4 fehlt dieses Motiv und wird folglich als ELR⁻ Zytokin bezeichnet. Es wirkt in physiologischen Konzentrationen nicht chemotaktisch auf Neutrophile und Monozyten, induziert jedoch in diesen Zellen die Synthese und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies wie O_2^- (Brandt 2000). Die Bezeichnung Cytokin für PF4 ist historisch zu bewerten, denn es vermittelt keine eigentlichen Cytokin-Funktionen, wie Chemotaxis oder Ca^{2+} -Flux (Brandt 2000). Vielmehr induziert es die Ausschüttung von Histamin durch basophile Granulozyten, die Adhäsion von eosinophilen Granulozyten an Endothelzellen, die Freisetzung von IL-8 durch NK-Zellen und die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen und die Freisetzung sekundärer Granulae (Brindley 1983; Petersen, Bock et al. 1999; Marti, Bertran et al. 2002; Woller, Brandt et al. 2008). Daneben hat **PF-4** langfristige Auswirkungen auf das Überleben hämatopoetischer Stammzellen und deren Vorläufer, die Inhibition der T-Zell-Aktivierung und die Hemmung der Endothelzell-Proliferation durch

Arretierung des Zellteilungszyklus in der S-Phase (Maione, Gray et al. 1990; Han, Lu et al. 1997; Liu, Battaglia et al. 2005). Als exklusiver Bindungspartner für **PF4** konnte der auf mikrovaskulären Endothelzellen und aktivierten T-Lymphozyten exprimierte G-Proteingekoppelte Rezeptor CXCR3-B identifiziert werden, eine durch alternatives Spleissen um 52 Aminosäuren verlängerte Variante. CXCR3-B, ist neben dem „normalen“ CXCR3 auf aktivierten T-Zellen zu finden (Lasagni, Francalanci et al. 2003).

Die Aktivität und Funktion sezernierter Chemokine werden durch Proteasen kontrolliert zu deren Substraten unter anderem auch **CTAP-III** und **PF4** gehören (Moser, Wolf et al. 2004).

Die Identifizierung von **PF4** als Biomarker-Kandidat deutet darauf hin, dass es auch bei der Pathogenese des Glaukoms eine wichtige Rolle spielen könnte.

In Abbildung 15 ist ein Peak bei 9311 Da zu erkennen, der mit einer Identifizierung für das **Platelet basic protein (PBP)**, einem **Platelet-Derived Growth Factor**, im Serum korreliert. **PBP** (Synonym: **C-X-C motif chemokine 7**, **Small-inducible cytokine B7**, **Leukocyte-derived growth factor (LDGF)** **Macrophage-derived growth factor (MDGF)**) wird nach der Translation in folgende Untereinheiten gespalten: **Connective tissue-activating peptid III (CTAP-III)**, **Synonym: Low-affinity platelet factor IV (LA-PF4)**, **TC-2**, **Connective tissue-activating peptide III (CTAP-III)**, **Beta-thromboglobulin (Beta-TG)**, **Neutrophil-activating peptide 2 (NAP-2)**, **TC-1** (Castor, Miller et al. 1983; Holt, Harris et al. 1986; Walz and Baggiolini 1989; Wenger, Wicki et al. 1989; Walz and Baggiolini 1990; Majumdar, Gonder et al. 1991; Watson 1994; Iida, Haisa et al. 1996; Schaffner, King et al. 2004). Neben der Koordination der Inflamationsreaktion der angeborenen Immunität und der Transition zum adaptiven Immunsystem, spielen diese Proteine für die Integrität des Endothels und damit für die Blut-Hirn-Schranke eine essentielle Rolle (Harker, Ross et al. 1976; Iida, Haisa et al. 1996; Iida, Haisa et al. 1996; Han, Lu et al. 1997; Brandt 2000; Brandt, Petersen et al. 2000; Scheuerer, Ernst et al. 2000; Bajetto, Bonavia et al. 2001; Eikelenboom, Killestein et al. 2002; Fleischer, Grage-Griebenow et al. 2002; Nguyen, Julien et al. 2002; Schenk, Petersen et al. 2002; Rappert, Bechmann et al. 2004; Liu, Battaglia et al. 2005; Jo, Mailhos et al. 2006; Hundelshausen 2007; Kasper, Brandt et al. 2007; Andrae, Gallini et al. 2008; de Jong 2008; Gleissner, von Hundelshausen et al. 2008; Mueller, Meiser et al. 2008; Weiner 2008; Woller, Brandt et al. 2008; Xiao, Visentin et al. 2008; Walshe, Saint-Geniez et al. 2009; Woller, Leonhardt et al. 2009).

Da Fehlfunktionen der Blut-Hirn-Schranke eine der Hauptfaktoren bei der Pathogenese degenerativer Prozesse innerhalb des ZNS und damit auch des Glaukoms zu sein scheinen, ist eine thrombozytäre Beteiligung an der Pathogenese wahrscheinlich (Abbott 2002; Buckley and Vincent 2005; Hawkins and Davis 2005; Grieshaber and Flammer 2007; Yong and Marks 2010). Tatsächlich scheinen Effektorsubstanzen der PDGF-Familie in besonders sensiblen Bereichen, wie der *Lamina cribrosa* und des Sehnervenkopfes des glaukomatösen Auges, eine Rolle zu spielen (Fukuchi, Ueda et al. 2001; Kirwan, Leonard et al. 2005). Auch

bei der Manifestation ischämischer Zustände in der Retina scheinen Thrombozyten beteiligt zu sein (Leoncini, Signorello et al. 2009).

Das in der Träne identifizierte ***Prolactin-inducible protein (PIP)*** (Abschnitt 4.7.8) schlägt durch die Fähigkeit zur Bindung an TCR CD4⁺ T-Zellen und der Fc-Region von IgG-Antikörpern eine direkte Brücke zur adaptiven Immunität.

Trotz seiner geringen Größe wirkt es modulierend auf das Immunsystem ein und besitzt gleichzeitig einen antiapoptotischen Effekt.

Aufgrund der vielfältigen Bindungspartner von ***PIP***, zu denen beispielsweise auch Vimentin gehört, ist der Wirkmechanismus bis heute ungeklärt (Hassan, Waheed et al. 2009). Bei Autoimmunerkrankungen wie dem Sjögren-Syndrom ist die Transkriptionsrate von ***PIP*** signifikant heruntergeregt (Giusti 2007). Diagnostisch wird das ***Prolactin-inducible protein*** als Tumormarker beim Mammakarzinom eingesetzt. Das proinflammatorische Zytokin ***S100-A8*** (Abschnitt 4.7.10), welches ebenfalls in der Träne identifiziert werden konnte, wird von Phagozyten der angeborenen Immunität freigesetzt und korreliert bei Rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom oder MS mit erhöhten Serum-Titern (Nacken 2003; Foell and Roth 2004).

Die hier beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Zytokine ***CXCL4***, ***CXCL7***, ***S100-A8*** und das ***Prolactin-inducible protein (PIP)*** korrelieren sämtlich mit entsprechenden SELDI-Peaks, die im Molekulargewichtsbereich von Glaukom-Biomarkerkandidaten liegen.

Deren Einfluß auf inflammatorische Prozesse, der Apoptoserate, der Integrität der Blut-Hirnschranke und der Modulation des Immunsystems empfehlen diese Proteine für eine eingehenderen Untersuchung bezüglich ihrer potentiellen Rolle in der Pathogenese des Glaukoms. Im Fall des *Pterygium conjunctivae*, einer Bindehautwucherung, die auf die Kornea übergreift, konnte eine erhöhte Konzentration von ***S100-A8*** in der Tränenflüssigkeit betroffener Augen registriert werden (Zhou, Beuerman et al. 2009). Insgesamt spielt das Immunsystem, speziell die angeborene Immunität, bei der Induktion autoimmuner Erkrankungen und damit mutmaßlich auch der des Glaukoms eine tragende Rolle (Abschnitt 1.2.3 oben). Komplementär zur zellulären Abwehr aus Thrombozyten und Makrophagen scheint auch die azelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems, das Komplementsystem, daran beteiligt zu sein.

5.6 Das Komplementsystem und die angeborene Immunität

Das Komplementsystem stellt den wichtigsten Bestandteil der angeborenen Immunabwehr dar. Das im Serum als signifikant identifizierte ***C1q*** (Abschnitt 4.5.2) ist die erste Komponente des klassischen Wegs, der Antikörper-vermittelt oder durch direkte Bindung an der Oberfläche eines Pathogens die Komplementaktivierung einleitet. Im Falle der Bindung von ***C1q*** an apoptotischen Zellen, Pathogenen oder Zelldebris, der sogenannten

Oponierung, erfolgt die Aktivierung einer Proteasenkaskade, die zur Synthese der Komplementkomponente **C3** führt (Gasque 2004).

Die potentielle Rolle des Faktors **C1q** bei der Pathogenese des Glaukoms wurde in der Einleitung bereits eingehend erläutert (Abschnitt 1.2.8).

Fest steht, dass bei glaukomatösen neurodegenerativen Prozessen im OHT-Tiermodell (DBA/2-Maus) und in Spenderaugen von OHT-Patienten eine Beteiligung des aktivierten Komplementsystems über die Detektion signifikant erhöhter Transkriptionsraten von **C1q** und **C3** nachgewiesen werden konnte (Miyahara, Kikuchi et al. 2003; Ahmed, Brown et al. 2004; Stasi, Nagel et al. 2006; Johnson, Jia et al. 2007). Interessanterweise konzentriert sich die Komplement-mRNA in der Retina hauptsächlich in jenen Schichten in denen Ganglienzellen und Nervenfasern überwiegen. Im Bereich der *Lamina cribrosa* konnten dagegen keine signifikant erhöhten mRNA-Titer detektiert werden, was eine Beteiligung des Komplementsystems an dort stattfindenden pathologischen Prozessen unwahrscheinlich macht. Der Nachweis des MAC, des "membrane attack complex" in der Ganglienzellschicht scheint nicht nur der Funktion der Entsorgung von Zelldebris geschuldet, vielmehr lässt dies eine aktive Schädigung retinaler Ganglienzellen durch direkte lytische Prozesse oder die Oponierung und anschließende Phagozytose durch Makrophagen, auch Mikroglia, wahrscheinlich erscheinen (Singhrao, Neal et al. 2000). Astrozyten und Mikroglia scheinen gegen direkte oder indirekte lytische Prozesse durch die Synthese inhibitorischer Substanzen geschützt zu sein (Singhrao, Neal et al. 1999). Die Formation des "MAC" als Folge eines erhöhten IOD lässt auf die Beteiligung des Komplementsystems an der Entstehung sekundärer degenerativer Prozesse beim Glaukom schließen.

Zwar wurde die Beteiligung eines solchen Prozesses durch Beobachtungen beim *Nerve-Crush-Modell* postuliert, jedoch sind die molekularen Mechanismen bis heute ungeklärt. Eine weitere Ursache für die Akkumulation von C1q-mRNA könnte die Aktivierung von Gliazellen durch das Komplementsystem sein, die darauf ihrerseits mit der Sekretion von NO, TNF- α , Hydroperoxid (O_2^-), und weiterer Komplementkomponenten reagieren und so an der Umorganisation des Sehnervenkopfes und dem Untergang retinaler Ganglienzellen beteiligt sind (Hernandez 2000; Tezel and Wax 2000; Neufeld and Liu 2003; Kulkarni, Kellaway et al. 2004; Tezel and Wax 2004). Antikörper gegen körpereigene okuläre Strukturen legen eine autoimmune Komponente bei der glaukomatösen Neurodegeneration nahe (Maruyama, Ohguro et al. 2000; Wax, Yang et al. 2001; Yang, Tezel et al. 2001; Schori, Yoles et al. 2002). Ein Mechanismus könnte die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg durch die Interaktion von Autoantikörpern mit **C1q** sein. Wo **C1q** während der embryonalen und einer kurzen postnatalen Reifungsphase des ZNS noch eine Rolle als Eliminator überflüssiger synaptischer Verknüpfungen innehat, ist dessen Expression im adulten zentralen Nervensystem unter physiologischen Bedingungen herunter geregelt.

Allerdings kann die Expression von **C1q** durch Neuronen und Mikroglia unter ischämischen, traumatischen und anderen pathologischen Bedingungen sehr schnell wieder hochreguliert werden.

Außer beim Glaukom ist die massive Steigerung der **C1q**-Expression auch bei Morbus Alzheimer und der *Amyotrophen Lateralsklerose* (ALS) nachgewiesen (Dangond, Hwang et al. 2004; Fonseca, Kawas et al. 2004; Stasi, Nagel et al. 2006; Steele, Inman et al. 2006). Auslöser hierfür könnten reaktive Astrozyten sein, die einen während der neuronalen Reifung des ZNS erforderlichen Mechanismus der **C1q**-Aktivierung im adulten ZNS zum Pathomechanismus für retinale Ganglienzellen werden lässt (Stevens, Allen et al. 2007).

5.7 Die Beteiligung der TLR an autoinflammatorischen Prozessen

Neben dem Komplementsystem zählen zu den zellulären Bestandteile der angeborenen Immunität Makrophagen, dendritische Zellen (Chapple, Grayson et al.), Mastzellen, Eosinophile, Neutrophile, Basophile und NK-Zellen die zur Pathogenerkennung mit Rezeptoren der *Toll-like-Rezeptorfamilie*, den **TLR**, ausgestattet sind (Beutler 2009).

TLR sind dimer organisierte, mehrheitlich nach außen gerichtete und die Plasmamembran einfach durchspannende Rezeptoren, die auf eine Aktivierung durch „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs), wie LPS oder bakterielle CpG DNA, mit einer Konformationsänderung reagieren (Janeway and Medzhitov 2002; Choe, Kelker et al. 2005). Ausnahmen bilden **TLR3, 7, 8** und **9**, die innere zelluläre Kompartemente, wie z.B. Endosomen, überwachen. Neben der Eliminierung intrazellulärer Pathogene durch Autophagie, triggert **TLR7** über die Adapterproteine **MYD88**, **TRAF6** und **NF-κB** die Sekretion von inflammatorischen Cytokinen, wie beispielsweise Interleukin 1, welches an der Entstehung autoinflammatorischer Prozesse maßgeblich beteiligt ist (Abbildung 116) (Beutler 2009).

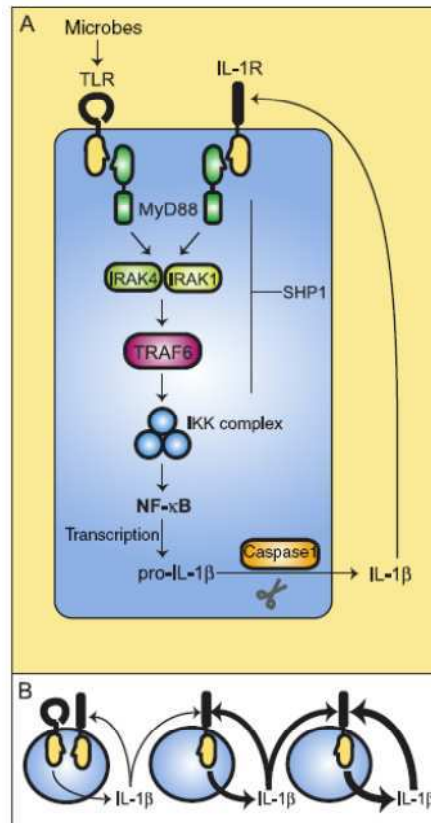


Abbildung 116: Die unkontrollierte Freisetzung von IL-1 als auslösender Mechanismus von inflammatorischen und autoimmunen Prozessen. (A) Die IL-1-Signalkaskade wird initialisiert durch die Stimulation des Toll-like-Rezeptors durch PAMPs, Einzelstrang-RNA und andere Bindungspartner, zu denen auch modifizierte körpereigene Proteine gehören können. Die Aktivierung der IL-1 "Receptor-associated kinase 1" (IRAK1), IRAK4, des "Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6" (TRAF6), "Inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-κB) kinase complex" mündet schließlich in der NF-κB-Aktivierung. Diese führt zur Transkription und Sezernierung von IL-1β, was über die Aktivierung des eigenen Rezeptors und unter Nutzung des „TLR-Pathways“ die IL-1β-Produktion immer weiter anheizt. Durch einen nicht bekannten Mechanismus kann die hemmende Funktion der „Protein tyrosine phosphatase“ (SHP1) außer Kraft gesetzt, und die einmal angefachte IL-1β-Synthese schließlich (B) zur Manifestation autoimmuner Prozesse führen (Beutler 2009).

Die Autoreaktivitäten gegen HSP, die im Rahmen der Glaukomerkrankung auftreten, werden mutmaßlich durch die Interaktionen von aus untergehenden Neuronen freigesetzter HSP und TLR induziert (Luo, Yang et al. 2009). Die Identifikation von TLR als Glaukom-Biomarker-Kandidat (Abschnitt 4.6.10) spricht für eine Beteiligung der geschilderten autoinflammatorischen Prozesse beim Glaukom.

5.8 Die Expression von Beta-2-Microglobulin macht Neuronen im ZNS verwundbar

Axonale Schädigungen treten nicht nur durch neurodegenerative Mechanismen oder eine Unterversorgung durch Neutrophine auf. Sie können auch eine Konsequenz direkter Angriffe **zytotoxischer T-Zellen** sein. Neuronen innerhalb des ZNS exprimieren unter physiologischen Umständen **kein MHC-I** an ihrer Oberfläche, was sich unter dem Einfluss von Cytokinen unter inflammatorischen Bedingungen ändert (Neumann, Cavalie et al. 1995). Die Expression des **MHC-I-Komplexes** auf neuronalen Oberflächen macht die Axonen verwundbar gegenüber Attacken **CD8⁺ T-Zellen** durch Perforin-vermittelte Zytotoxizität und der Freisetzung von **Granzyme** (Abbildung 117) (Neumann, Medana et al. 2002).

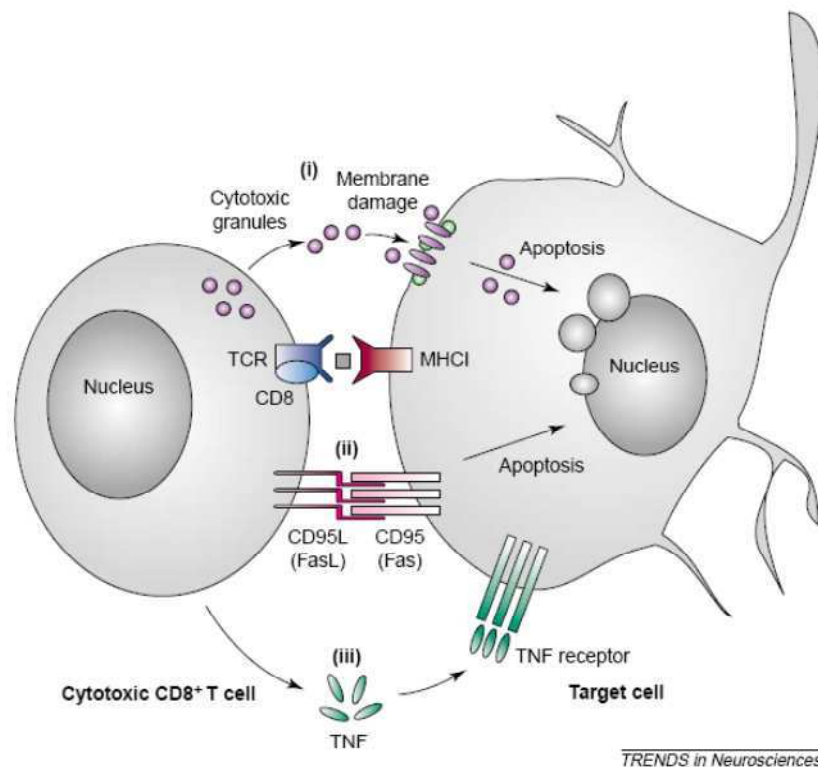


Abbildung 117: Angriffsmechanismen zytotoxischer T-Zellen. Es existieren drei unterschiedliche Wege, die zytotoxische T-Zellen (CTL) zur Zerstörung ihrer Ziel-Zellen beschreiten. Ihre Zielzelle erkennt die CD8⁺ CTL durch die Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) mit deren MHC-I inklusive präsentiertem Peptid (Quadrat). Die Zerstörung der Zielzelle erfolgt entweder (i) durch Freisetzung zytotoxischer Granulae und der daraus resultierenden Perforation der Zellmembran, (ii) Aktivierung von Fas/CD95-rezeptor der Zielzelle durch Fas-Ligand/CD95-Ligand, oder (iii) der Freisetzung von Zytokinen wie beispielsweise TNF α (Neumann, Medana et al. 2002).

Beta-2-Microglobulin stellt die β -Kette des MHC-1-Moleküls dar und wird beim Untergang von Neuronen zumindest teilweise freigesetzt. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose korreliert die Konzentration an freiem **Beta-2-Microglobulin ($\beta 2M$)** mit der Schwere des Krankheitsverlaufs. **$\beta 2M$** , das in der Tränenflüssigkeit identifiziert werden konnte (Abschnitt 4.7.3), eignet sich deshalb als diagnostischer Marker zur Verlaufskontrolle chronisch entzündlicher Prozesse im ZNS (Thomas 2000; Bagnato, Durastanti et al. 2003).

5.9 Transferrin: Eisenlieferant für das visuelle System und Ziel oxidativer Schädigung

Transferrin wurde bislang zwar nicht als Biomarker-Kandidat vorgeschlagen, ist aber von besonderer Bedeutung, da **Eisen** für den Prozess der Phototransduktion in den Photorezeptorzellen der Retina benötigt wird.

Hier erfordert die kontinuierliche Erneuerung der membranumschlossenen Discs im äußeren Segment einen stetigen Zufluß eisenhaltiger Enzyme, insbesondere der **Fettsäuren-Desaturase**, die für die Synthese der Discmembran erforderlich ist (Shichi 1969).

cGMP, der *second messenger* der Phototransduktionskaskade, wird durch die **Guanylatcyklase** synthetisiert, die ihrerseits Eisen als Cofaktor benötigt (Yau and Baylor 1989). Die Konversion von **all-trans-Retinylester** in **11-cis-Retinal** im retinalen Pigmentepithel wird von einer eisenhaltigen Isomerhydrolase, **RPE65**, katalysiert (Moiseyev, Chen et al. 2005). Während gebundenes Eisen für den Sehvorgang unabdingbar ist, können überschüssige freie Fe^{2+} -Ionen über die **Fenton-Reaktion** die **Konversion von H_2O_2 zu OH** dem Hydroxyl-Radikal, katalysieren. Hydroxyl-Radikale verursachen **Lipid-Peroxidationen, DNA-Strangbrüche und Degradierung** anderer wichtiger Moleküle (Halliwell 1984) und stehen im Verdacht an der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie Alzheimer, beteiligt zu sein (Smith, Harris et al. 1997). Insbesondere die in den Photorezeptorzellen benötigten mehrfach ungesättigten Fettsäuren bieten in diesem Zusammenhang ein leichtes Ziel **oxidativer Schädigungen** (He, Hahn et al. 2007).

5.10 Transthyretin versorgt das ZNS mit Thyroxin

Transthyretin (TTR) wurde als Biomarker-Kandidat im Serum identifiziert (Abschnitt 4.5.7). Es wird in Leber und *Plexus choroideus* exprimiert, bindet Thyroidhormon und ist am **Thyroxintransport** ins ZNS beteiligt. Im Tiermodell konnte dessen Synthese am Bildungsort des Kammerwassers, dem ziliären Pigmentepithel des Auges nachgewiesen werden, wobei **Aberrationen im TTR-Gen** als Ursache für die Manifestation der **Familiären Amyloiden Polyneuropathie (FAP)** gelten (Benson 1991; Li and Sommer 1993; Kawaji, Ando et al. 2005). Neben den bekannten Punktmutationen konnten mithilfe der SELDI-TOF® -Analyse auch verschiedene **posttranslationale Modifikationen** und deren Auswirkungen auf das Molekulargewicht des **Transthyretin** ermittelt werden. Demnach existieren im Plasma Gesunder zwei Varianten mit 13732 und 13851 Da, neben einer **S-glutathionylierten** dritten Variante bei 13736 Da (Schweigert, Wirth et al. 2004). Ursächlich für die Pathogenese der **FAP** sind durch fehlerhafte Faltung entstandene unlösliche Proteinfibrillen, die sich in dem die Blutgefäße umgebenden Gewebe und in Nervenfasern anreichern und so zu **neurodegenerativen Prozessen** mit Beeinträchtigungen im zentralen und peripheren Nervensystem führen (Hou, Aguilar et al. 2007). Diese neurodegenerativen Prozesse scheinen in Zusammenhang mit oxidativem Stress und gesteigerter Apoptoserate zu stehen,

was **TTR** zu einem der **vielversprechendsten Biomarker-Kandidaten für das Glaukom** macht (Macedo, Batista et al. 2007).

Zudem konnte im Kammerwasser von POAG-Patienten ein erhöhter TTR-Titer nachgewiesen werden. Möglicherweise führt hier die Anreicherung unlöslicher Proteinfibrillen, durch die Verlegung des Kammerwasserabflusses und dem daraus resultierenden Anstieg des IOD, zum Untergang retinaler Ganglienzellen (Grus, Joachim et al. 2008)

5.11 Apolipoprotein M als Glaukom-Biomarker?

Apolipoprotein M (ApoM) gehört zur Familie der **Lipopaline** und wird ausschließlich in der Leber und in den Nieren synthetisiert und ist Bestandteil des Lipidstoffwechsels.

Die Expression von **ApoM** ist durch **Platelet Activating Factor**, **TNF- α** und **IL-1** induzierbar und Bestandteil der **High-density-Lipoprotein- (HDL)** Partikel im Serum (Xu, Zhang et al. 2002; Wolfrum, Poy et al. 2005; Sevana, Ahnström et al. 2009). **ApoM** konnte im Serum hochsignifikant identifiziert werden (Abschnitt 4.6.2) und ist, bezogen auf sein Molekulargewicht, ein Biomarker-Kandidat. Eine klinische Studie konnte kürzlich eine **Korrelation zwischen HDL-Konzentration im Serum und der Manifestation eines Glaukoms belegen** (Pavljasevic and Asceric 2009).

5.12 SUMO reagiert binnen Minuten auf zellulären Stress

Ein Vertreter der **Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)** konnte im Serum identifiziert werden (Abschnitt 4.6.8). **SUMO** stellen eine Familie kleiner Proteine mit 101 Aminosäuren dar, die über die ϵ -Aminogruppe der Lysin-Seitenketten kovalent an ihr Substrat binden und damit Einfluß auf Funktion, Transkription, Replikation, DNA-Reparatur, intrazellulären Transport und Kommunikation nehmen (Hay 2005; Bossis and Melchior 2006; Scheschonka, Tang et al. 2007). Evolutionär stark konserviert, stellen die **SUMO** eine Proteingruppe dar, die **innerhalb von Minuten auf zellulären Stress mittels Konjugation der Bindungspartner reagieren** können (Saitoh and Hinchev 2000). Diese „**SUMOylation**“ ist eine posttranslationale Modifikation, bei der kleine ubiquitinartige Modifikatoren kovalent an deren Zielproteine gebunden werden. Dieser reversible Prozess dient der Steuerung der Lokalisation, Aktivität und Stabilität einer Vielzahl von Substraten.

Beim Menschen sind vier Isoformen des Proteins bekannt, wobei **SUMO-1** hauptsächlich im Bereich der Kernmembran, **SUMO-2 und -3** im Zytoplasma und in „nuclear bodies“ zu finden sind. Das erst kürzlich beschriebene **SUMO-4** wird hauptsächlich in den Zellen des Immunsystems exprimiert und soll an der **Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 1** beteiligt sein (Guo, Li et al. 2004). Die sogenannte **SUMOylation** von Proteinen beeinflusst als post-translationale Modifikation wichtige zelluläre Prozesse, wie die Steuerung des

Zellzyklus oder die Reaktion auf zellulären Stress und führt nicht zur Degradation im Proteasom.

Im Vergleich zu *Ubiquitin* besitzt *SUMO* weit weniger Substrate, dafür befinden sich unter dessen Zielproteinen **wichtige zelluläre Regulatoren**, die **SUMO** einen direkten Einfluss auf die wichtigsten zellulären Stoffwechselwege, auch den der Einleitung der Apoptose, sichern (Müller, Hoegge et al. 2001). Vor dem Hintergrund der neurodegenerativen Prozesse beim Glaukom, ist natürlich der Einfluss von **SUMO** auf die Apoptoserate von besonderem Interesse. Ähnlich wie *Ubiquitin*, ist auch **SUMO** in den bei **neurodegenerativen Erkrankungen**, wie beispielsweise *Chorea Huntington* üblichen amyloidähnlichen Inclusionen anzutreffen. Die Identifikation von *Huntingtin*, *Ataxin 1*, *Tau* und *α -Synuclein* als **Substrate für SUMO** untermauert die Rolle der **SUMOylation** bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen. Darüber hinaus ist die **SUMOylation** als posttranslationale Modifikation an der Proteindegredation über das Proteasom, der Protein-Aggregation und als Reaktion auf oxidativen Stress beteiligt (Abbildung 118) (Dorval and Fraser 2007).

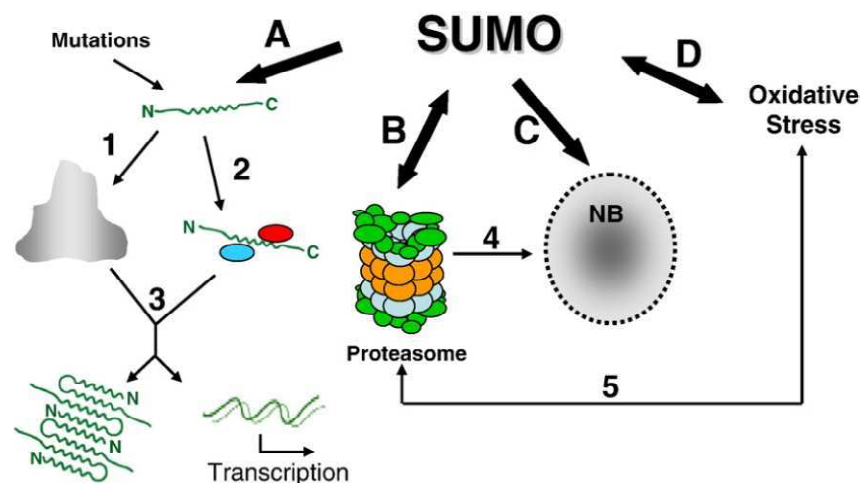


Abbildung 118: Die Beteiligung von SUMO an neurodegenerativen Prozessen. (A) Die Modifikation eines Substrates durch SUMO kann dessen subzelluläre Lokalisation beeinflussen (1) und zur Formation „kritischer“ Proteine führen (2). Beide Vorgänge tragen zur Entstehung von „inclusion bodies“ und zu veränderter Gentranskription bei und schädigen so die Zelle (3). (B) Der „Wettbewerb“ zwischen Ubiquitin und SUMO führt zur Behinderung der Abbauprozesse über das Proteasom. Umgekehrt führt die Inhibition des Proteasoms zur vermehrten Anlagerung von SUMO und damit zur Anhäufung SUMO-positiver Proteinaggregate. (C) Als Reaktion darauf formt die Zelle „inclusion bodies (nuclear bodies)“, um deren Abbau über das Proteasom zu befördern. (4). (D) SUMOylation ist einer der zellulären Reaktionen auf oxidativen Stress, wobei dieser Vorgang über den Redox-Status der Zelle beeinflusst wird. Schließlich beeinflusst oxidativer Stress auch unmittelbar die Aktivität des Proteasoms (5). Quelle: (Dorval and Fraser 2007)

SUMO-Substrate im ZNS legen eine Verbindung von **SUMOylation** und der Entstehung **neurodegenerativer Erkrankungen** nahe. Darunter finden sich auch molekulare Chaperone wie **HSP90** und **HSP70**, sowie Untereinheiten des Proteasoms, deren Organisation und Funktion sich unter dem Einfluß von **SUMO** ändern können. Mit den Chaperonen und dem Proteasom sind genau die zellulären Komponenten betroffen, die zum einen für eine korrekte

Faltung neu exprimierter Proteine, zum anderen für die Degradation fehlerhafter Polypeptide und Proteinaggregate sorgen.

Zudem sind Chaperone an der **Entstehung von Aggresomen (*inclusion bodies*)** beteiligt, wie sie bei vielen neurodegenerativen Prozessen zum zellulären Verteidigungsrepertoire gehören. Eine Beeinträchtigung des **Chaperon-Proteasom-Systems** durch **SUMO** hat demnach schwerwiegende Konsequenzen (Meriin and Sherman 2005).

5.13 Identifizierte Proteine, die an zellulären Stressreaktionen beteiligt sind

Die **TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK)** ist ein Biomarker-Kandidat, der im Serum und in der Tränenflüssigkeit identifiziert werden konnte (Abschnitt 4.5.6 und 4.7.12). **TNIK** ist eine durch zellulären Stress induzierbare Serin / Threoninkinase, die zur Gruppe der **Germinal Center Kinases (GCKs)** zählt. **TNIK** wirkt aktivierend oberhalb des *c-JUN N-terminal pathway* der MAP-Kinase-Kaskade und besitzt die Fähigkeit F-Aktin zu spalten und ist auf diese Weise an der **Regulation des Zytoskeletts** beteiligt (Fu, Shen et al. 1999; Wajant, Pfizenmaier et al. 2003; Taira, Umikawa et al. 2004).

Ein Aktin-bindendes Protein wurde mit **Twinfilin-2 (TWF2)** identifiziert (Abschnitt 4.6.11), das über das Zytoskelett an der Zellmotilität und morphologischen Prozessen beteiligt ist. **TWF2** spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der **Clathrin-vermittelten Endozytose** und der Disposition endozytotischer Organellen (Vartiainen, Sarkkinen et al. 2003; Nevalainen, Skwarek-Maruszewska et al. 2009).

Die DNA, die die Mitochondrien und damit die Großproduzenten freier Sauerstoffradikale zum Nachbarn hat, ist oxidativer Schädigung im besonderen Maße ausgesetzt. Im postmitotischen Milieu des ZNS muss die DNA darüber hinaus auch ein Leben lang mutationsfrei vorliegen, weil sonst degenerative Erkrankungen drohen (Abschnitt 1.4.1). Gefährdet sind insbesondere die Telomeren, die von einem komplexen Proteinkomplex geschützt und gewartet werden (Zhang, Dilley et al. 2007). Zwei Vertreter dieses Komplexes konnten im Serum identifiziert werden: Ein Biomarker-Kandidat, der **H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein (H/ACA snoRNP) complex (NOLA3)** (Abschnitt 4.6.4) ist im Nukleus lokalisiert und an der Synthese von Ribosomen, sowie an der Erhaltung der Telomeren beteiligt (Mitchell, Cheng et al. 1999; Wang and Meier 2004; Meier 2005; Fu and Collins 2007; Venteicher, Abreu et al. 2009). Als weiterer Vertreter konnte ein Bestandteil des Shelterin-Komplexes (Telosom), das **Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1 (TE2IP)** im Serum identifiziert werden (Abschnitt 4.6.9). TE2IP ist für die Längenregulation und den Schutz der Telomeren verantwortlich (Ye, Donigian et al. 2004; Ye, Donigian et al. 2004; de Lange 2005; Fu and Collins 2007; Zhang, Dilley et al. 2007; Sarthy, Bae et al. 2009).

5.14 Identifizierte Proteine, die am Zellstoffwechsel beteiligt sind

Als Faktoren, die an der neuronalen Neurotrophinversorgung beteiligt sind, wurde im Serum das ***Intraflagellar transport 74 homolog (IFT74)*** identifiziert (Abschnitt 4.6.5), das am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt und im ZNS am Transport neuronaler Komponenten vom Perikaryon in und entlang der Dendriten und Ausläufer der Nervenzellen beteiligt ist (Goldstein and Philp, 1999; Momeni et al., 2006). Am Ziel angekommen erfolgt die Aufnahme der Vesikel durch Rezeptor-vermittelte Endozytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes.

Der Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes folgt der retrograde Transport zum Soma des Neurons, der durch die G-Proteine Rabenosyn 1 und 5 (*Rab1 und Rab5*) koordiniert wird, wobei ***Rab5*** (Abschnitt 4.6.7) im Serum identifiziert werden konnte (Abschnitt (Nielsen, Severin et al. 1999; Nielsen, Christoforidis et al. 2000; Schnatwinkel, Christoforidis et al. 2004; Eathiraj, Pan et al. 2005; Shin, Hayashi et al. 2005; Valdez, Philippidou et al. 2007). Wenn man die Abhängigkeit der Neuronen von einer ausreichenden Versorgung mit trophischen Faktoren bedenkt, sind im Fall einer Fehlfunktion *IFT74* und *Rab5* als pathogene Faktoren für das Glaukom anzusehen (Abschnitt 1.5).

Ebenso erfüllen ***ADP-ribosylation factor-like protein 15 (ARL15)*** (Abschnitt 4.6.1) als Tumorsuppressor und Auslöser der Mitochondrien-abhängigen intrinsischen Apoptose, ***Fizzy-related protein (FZR)*** (Abschnitt 4.6.3) als Bestandteil des ***APC*** Koordinator des Zellzyklus' und der ***Neuromedin-B-Rezeptor (NMBR)*** (Abschnitt 4.6.6) bei der Steuerung sekretorischer Prozesse im ZNS, zelluläre Funktionen, die bei der Pathogenese des Glaukoms eine Rolle spielen könnten (Fang, Yu et al. 1998; Bhamidipati, Lewis et al. 2000; Bhamidipati, Lewis et al. 2000; Nakazawa, Kamijo et al. 2003; Pimentel and Venkatesh 2005; Jensen, Battey et al. 2007; Uren, Kool et al. 2008).

5.15 Schlußfolgerung

Der Einsatz massenspektroskopischer Methoden in Kombination mit multivariaten statistischen Methoden ermöglichten die Identifizierung kleinster Deviationen im Proteom von Glaukompatienten. Da diese mit bloßem Auge nicht wahrnehmbaren Abweichungen, im Proteinprofil bestimmter Patientenkollektive zuverlässig wiederkehren, liegt es nahe, zu versuchen, diese als Biomarker für das Glaukom nutzbar zu machen. In der hier vorliegenden Arbeit ist es gelungen, aus der unüberschaubaren Masse an Signalen, sich Schritt für Schritt jenen zu nähern, die in zurückliegenden Studien mit Glaukomerkrankungen korrelierten. Im Idealfall war es sogar möglich, die Zahl der Peaks in einer Fraktion bis auf einen einzigen zu reduzieren und aus dieser Fraktion dementsprechend auch eine einzige signifikante Identifikation zu erhalten.

Die eindeutige Zuordnung von Proteineluat und anschließender SELDI-Analyse mit dem entsprechenden MALDI-Spektrum wird hierbei dadurch sichergestellt, dass jedes der

mindestens 30 pro Spur, maximal ein Millimeter starken Gelstücke, wiederum in drei gleich große Gelstücke zerteilt wird. Das zentrale Gelstück dient über den tryptischen Verdau der Identifizierung, die beiden peripheren Stücke der Gelelution und Protein-Messung im SELDI-TOF®. Dies gewährleistet, dass der im SELDI-Spektrum sichtbare Protein-Peak auch tatsächlich der Identifikation entspricht, die die aus dem tryptischen Verdau resultierenden Peptidfragmente an Übereinstimmungen in der MASCOT-Datenbank erbracht hat. Die optimierte Rezeptur der Elutionslösung, die durch die niedrigdosierte Zugabe von SDS die zuverlässige Elution von Proteinen bis an die 100 kDa-Grenze ermöglicht, macht den Einsatz von Elektroelutern überflüssig.

Mehrfach-Identifikation ermöglichten zudem die Zuordnungen von Proteinen auch in Fraktionen mit mehr als nur einem Protein-Signal. Unter den Identifikationen, die bezüglich ihres korrespondierenden SELDI-Peaks als Biomarker-Kandidaten infrage kommen, finden sich unter anderem Cytokine und Rezeptoren, die an der Koordination der angeborenen Immunität, beteiligt sind, stressinduzierbare Kinasen, Bestandteile des neuronalen Neutrophintransports, bzw. des Proteasoms, sowie neuronale Antigene, die unter neurodegenerativen Bedingungen detektierbar und somit als klinischer Marker nutzbar wären. Neben den aus klinischen Profiling-Studien der Augenklinik hervorgegangenen Biomarker-Kandidaten wurden zusätzlich jene Identifikationen charakterisiert, bei denen ein Kontext zwischen Protein und postulierten Pathomechanismen beim Glaukom unterstellt werden kann. Zu diesen Identifikationen gehören Mediatoren der angeborenen Immunität wie dem Komplementfaktor C1q oder β 2-Mikroglobulin oder jene Proteine, die unter zellulärem Stress und hohen ROS-Konzentrationen ihre Aufgabe nicht mehr oder gerade unter solchen Bedingungen erfüllen. Das Peroxiredoxin in der Träne ist nur ein Beispiel.

Wie in der Einleitung bereits ausführlich geschildert, scheint der Ursprung für die glaukomatöse Neurodegeneration in zellulärem Stress zu liegen. Dieser Stress wird induziert durch einen erhöhten IOD, durch ischämische und damit hypoxische Zustände oder eine gestörte Neutrophinversorgung. Bei retinalen Ganglienzellen führt jede Deviation des Stoffwechsels schnell zu oxidativem Stress, Exzitotoxizität und einer Aktivierung der angeborenen Immunität, der Glia. Den Abschluß findet dieser Vorgang stets in der Induktion der Apoptose der betreffenden Ganglienzelle. Folgerichtig müsste ein klinischer Glaukom-Biomarker im Proteom jene pathologische Mechanismen widerspiegeln, die man beim Glaukom unterstellt. Die nachfolgende Grafik (Abb. 119) gibt einen Überblick über Faktoren, die nach heutigem Kenntnisstand zum Untergang retinaler Ganglienzellen führen können. Was hiervon als kausativ für die Pathogenese erachtet werden muss und was als Epiphänomen eingestuft werden kann, ist bislang völlig offen. Eines scheint jedoch klar zu sein: Eine singuläre Ursache, wie ein erhöhter IOD, als Auslöser für eine Glaukomerkrankung, erscheint nach heutigem Kenntnisstand unwahrscheinlich.

Spielt man einen Prozess, der zur Manifestation eines Glaukoms führt, gedanklich durch, müssten zunächst die klassischen Faktoren in Aktion treten, die durch zellulären und oxidativen Stress induzierbar sind. Hierzu zählen die Klassen der Hitzeschockproteine (HSP), der intermediären Filamente (IF) und der Peroxigenasen. Zusätzlich kämen Akteure der angeborenen Immunität, des Proteasoms und der Apoptose hinzu.

Schließlich könnte man mit Proteinen rechnen, die unter physiologischen Bedingungen stets intrazellulär, unter degenerativen Zuständen aber auch extrazellulär nachweisbar sind. Dass solch ein Gedankenspiel durchaus der Realität entspricht, belegen Erkenntnisse, die in den Abschnitten 1.2.1 bis 1.6 detailliert beschrieben sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten und charakterisierten Glaukom-Biomarker-Kandidaten sind dazu geeignet, in einen solchen hypothetischen Prozess der Glaukom-Pathogenese eingebettet zu werden (Abbildung 119). So korrespondieren erhöhte Titer von **Tranthyretin** und **Apolipoprotein M** bei Glaukompatienten mit einem erhöhten IOD. **Peroxisomal antioxidant enzyme-5**, **TNIK SUMO**, **TE2IP**, **NOLA3**, **FZR** und **Ubiquitin** werden durch oxidativen Stress induziert, bzw. in ihrer Funktion beeinflusst. **Ki-67** korreliert mit einer Glia-Aktivierung, **Transferrin** ist Ziel oxidativer Schädigungen. Als wichtige Faktoren der Neutrophinversorgung dienen **Intraflagellar transport74 homolog** und **Rab5**. **Armadillo repeat-containing X-linked protein**, **Microtubule-actin cross-linking factor 1**, **α -Fodrin**, **TWF2**, **NMBR** und **Lipophilin** sind intrazelluläre Proteine, die als Marker für degenerative Prozesse dienen können. **ARL15**, eine GTPase, erfüllt eine Funktion als Tumorsuppressor und Auslöser der Mitochondrien-abhängigen intrinsischen Apoptose. Schließlich dienen **S100-A8**, **CXCL4**, **CXCL7**, **C1q**, **Beta2-microglobulin**, **TLR** und **Prolactin-inducible protein** als Effektorsubstanzen, die an der Koordination autoimmuner Prozessen beteiligt sein können.

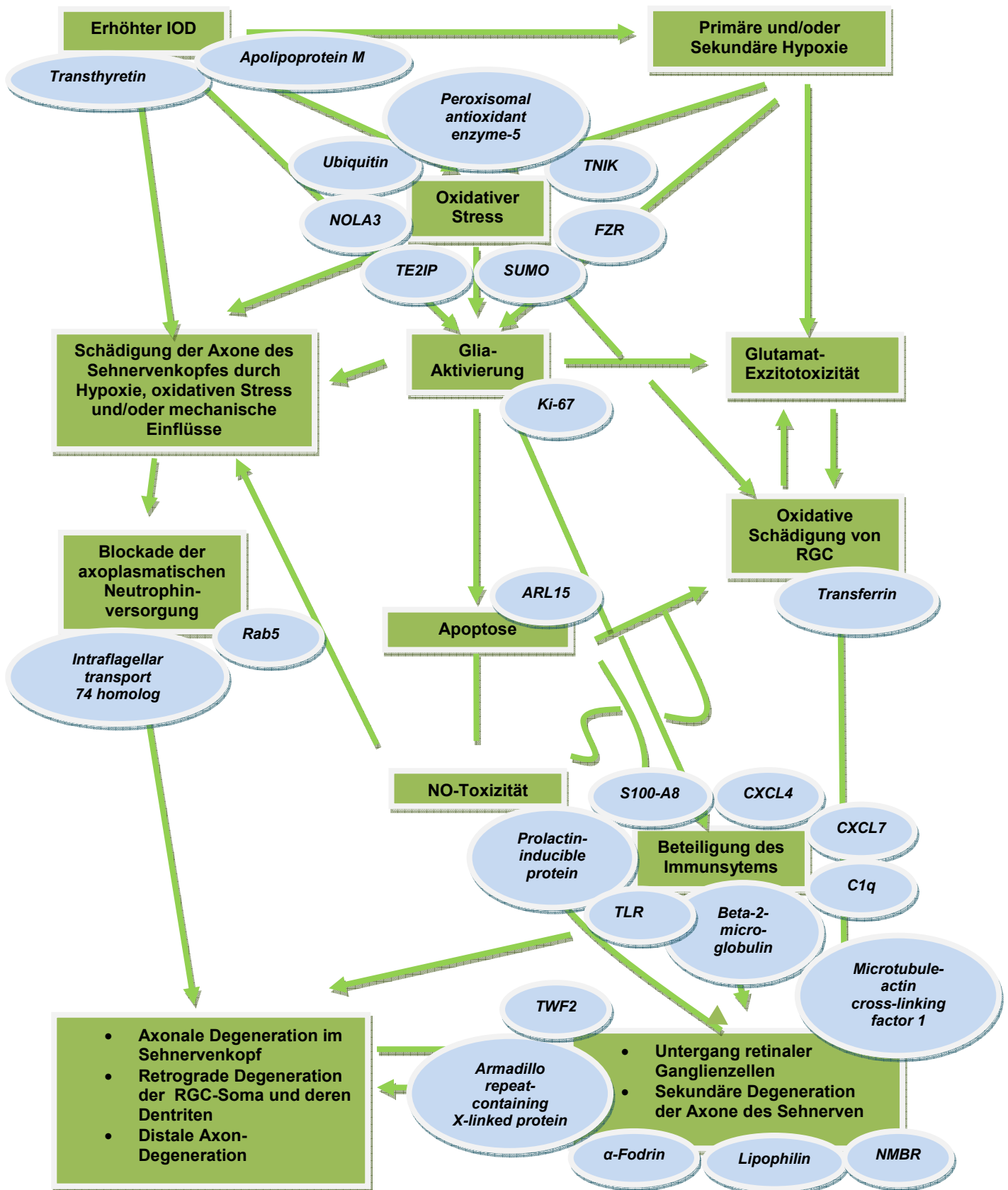


Abbildung 119: Zusammenfassung aller bekannten Faktoren und Mechanismen, die beim Glaukom über das Schicksal der RGC bestimmen, versehen mit identifizierten Biomarker-Kandidaten.

Dargestellt sind identifizierte Proteine, die anhand ihrer möglichen Rolle bei der Pathogenese des Glaukoms entsprechenden pathogenen Faktoren zugeordnet sind.

6 Zusammenfassung

Das Glaukom ist eine der häufigsten Ursachen für Erblindungen weltweit mit Millionen von Betroffenen, die von dieser zunächst weitgehend symptomfreien neurodegenerativen Erkrankung heimgesucht werden. Die Möglichkeiten auf dem Feld der Diagnose beschränken sich bislang weitestgehend auf die Messung des Augeninnendrucks und der Beurteilung des Augenhintergrundes. Eine labordiagnostische Prophylaxe ist bis heute nicht verfügbar, die Zahl unerkannter Erkrankungen dementsprechend hoch.

Bezüglich der Pathogenese geht man heute von mehreren, miteinander wechselwirkenden Pathomechanismen aus, zu denen neben mechanischen Einflüssen durch einen erhöhten IOD auch Hypoxie, verminderte Neutrophinversorgung, Exzitotoxizität, oxidativer Stress und eine Beteiligung autoimmuner Prozesse gezählt werden. Unabhängig vom Pathomechanismus folgt stets die Etablierung umfangreicher degenerativer Prozesse im Sehnervenkopf, den retinalen Ganglienzellen und den Axonen des Sehnerven, die letztlich im irreversiblen Untergang dieser Neuronen münden. Diese pathologischen Prozesse im ZNS hinterlassen auf Proteomebene Spuren, die mithilfe moderner massenspektrometrischer Methoden in Kombination mit multivariaten statistischen Methoden detektierbar und als sogenannte Biomarker-Kandidaten mit definiertem Molekulargewicht darstellbar sind. In dieser Arbeit wurde ein „Workflow“ entwickelt, der es ermöglicht, diese Biomarker-Kandidaten im Blutserum und in der Tränenflüssigkeit in einfachen, reproduzierbaren Schritten zu identifizieren und zu charakterisieren. Abweichend von der etablierten Methodik der *Bottom-Up-Proteomics* musste hierfür eine Methode entsprechend einer *Top-Down-Philosophie* entwickelt werden, die es erlaubt, die Spuren des Glaukoms im Proteom zu detektieren und zu charakterisieren.

Dies erfolgte in dieser Arbeit durch sowohl massenspektroskopischen Methoden wie SELDI-TOF® und MALDI-ToF als auch durch Bead-, Gel- und Flüssigkeits-chromatographisch-basierte Separations und Fraktionierungstechniken.

Die erfolgreiche Kombination dieser Methoden führte zu Identifikationen auch niedrig abundanter Proteine, was sie als für den Einsatz zur Entschlüsselung der Pathogenese des Glaukoms geeignetes Werkzeug qualifiziert.

Unter den identifizierten Proteinen, die bezüglich ihres korrespondierenden SELDI-Peaks im Massenbereich von Biomarker-Kandidaten liegen, finden sich Zytokine und Effektormoleküle der angeborenen Immunität, stressinduzierbare Kinasen, Faktoren, die zum Schutz der Telomeren dienen, Proliferationsmarker, neuronale Antigene und Transportproteine. Darüber hinaus wurden Komponenten identifiziert, denen man unter Berücksichtigung der postulierten Pathomechanismen eine Beteiligung an der Genese des Glaukoms unterstellen kann. Darunter finden sich Proteine, die an der neuronalen Neutrophinversorgung beteiligt sind, neuronale Rezeptoren und Antigene, Komponenten des Komplementsystems und des

MHC-I-Komplexes. All diese identifizierten Proteine sind bezüglich ihrer Funktion und möglichen Rolle innerhalb der Pathogenese des Glaukoms detailliert beschrieben und charakterisiert und erlauben dadurch vielfältige Einblicke in mögliche Pathomechanismen, deren Validation oder Falsifikation noch ausstehen.

7 Zitierte Literatur

- Abbott, N. (2002). "Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability." *J Anat* **200**(5): 527.
- Abu-Amero, K. K., J. Morales, et al. (2006). "Mitochondrial Abnormalities in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(6): 2533-2541.
- Abu-Helo, A. and F. Simonin (2010). "Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs)." *Pharmacol Ther In Press, Corrected Proof*.
- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival." *Science* **281**(5381): 1322-1326.
- Ahmed, F., K. M. Brown, et al. (2004). "Microarray analysis of changes in mRNA levels in the rat retina after experimental elevation of intraocular pressure." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(4): 1247-58.
- Aizawa, S., H. Nakano, et al. (1997). "Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation." *J Biol Chem* **272**(4): 2042-5.
- Akira, S., M. Yamamoto, et al. (2003). "Role of adapters in Toll-like receptor signalling." *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 3): 637-42.
- Albert, M., L. , L. Austin, M. , et al. (2000). "Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration." *Ann Neuro* **47**(1): 9-17.
- Albert, M. L., J. C. Darnell, et al. (1998). "Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration." *Nat Med* **4**(11): 1321-4.
- Allcutt, D., M. Berry, et al. (1984). "A quantitative comparison of the reactions of retinal ganglion cells to optic nerve crush in neonatal and adult mice." *Dev Brain Res* **16**(2): 219-230.
- Anderson, N. L. and N. G. Anderson (2002). "The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects." *Mol Cell Prot* **1**(11): 845-867.
- Andrae, J., R. Gallini, et al. (2008). "Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine." *Genes Dev* **22**(10): 1276-1312.
- Avrameas, S. and T. Ternynck (1995). "Natural autoantibodies: the other side of the immune system." *Res Immunol* **146**(4-5): 235-48.
- Bagnato, F., V. Durastanti, et al. (2003). "Beta-2 microglobulin and neopterin as markers of disease activity in multiple sclerosis." *Neuro Sci* **24**(0): s301-s304.
- Bajetto, A., R. Bonavia, et al. (2001). "Chemokines and Their Receptors in the Central Nervous System." *Front Neuroendo* **22**(3): 147-184.
- Banati, R. B., J. Gehrman, et al. (1993). "Cytotoxicity of microglia." *Glia* **7**(1): 111-118.
- Bellezza, A. J., C. J. Rintalan, et al. (2003). "Deformation of the Lamina Cribrosa and Anterior Scleral Canal Wall in Early Experimental Glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(2): 623-637.
- Benson, M. D. (1991). "Inherited amyloidosis." *J Med Genet* **28**(2): 73-78.
- Beutler, B. (2009). "Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases." *Immunol Rev* **227**(1): 248-63.
- Bhamidipati, A., S. A. Lewis, et al. (2000). ADP Ribosylation Factor-like Protein 2 (Arl2) Regulates the Interaction of Tubulin-folding Cofactor D with Native Tubulin. **149**: 1087-1096.
- Bhamidipati, A., S. A. Lewis, et al. (2000). "ADP Ribosylation Factor-like Protein 2 (Arl2) Regulates the Interaction of Tubulin-Folding Cofactor D with Native Tubulin." *J Cell Biol* **149**(5): 1087-1096.
- Biber, K., H. Neumann, et al. (2007). "Neuronal On and Off signals control microglia." *Trends Neurosci* **30**(11): 596-602.
- Bignami, A. and D. Dahl (1979). "The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein." *Exp Eye Res* **28**(1): 63-9.
- Bjerrum, J. (1889). "Om en tilføjelse til den sædvanlige synsfelt – undersøgelse samt om synsfeltet ved glaukom." *Nord ophthal Tidsskrift* **2**.
- Bonfanti, L., E. Strettoi, et al. (1996). "Protection of Retinal Ganglion Cells from Natural and Axotomy-Induced Cell Death in Neonatal Transgenic Mice Overexpressing bcl-2." *J Neurosci* **16**(13): 4186-4194.
- Bossis, G. and F. Melchior (2006). "Regulation of SUMOylation by Reversible Oxidation of SUMO Conjugating Enzymes." *Mol Cell* **21**(3): 349-357.
- Botto, M., C. Dell'Agnola, et al. (1998). "Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies." *Nat Genet* **19**(1): 56-9.
- Bouchon, A., J. Dietrich, et al. (2000). "Cutting Edge: Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes." *J Immunol* **164**(10): 4991-4995.
- Boulanger, L. M. (2009). "Immune proteins in brain development and synaptic plasticity." *Neuron* **64**(1): 93-109.
- Bovolenta, P., F. Wandosell, et al. (1992). "CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth." *Prog Brain Res* **94**: 367-79.
- Boz, C., M. Ozmenoglu, et al. (2006). "Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta." *Clin Neurol Neurosci* **108**(2): 124-128.
- Brandt, E., Ludwig A., Petersen, F., Flad, H.- D. (2000). "Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games." *Immunol Rev* **177**(1): 204-216.
- Brandt, E., F. Petersen, et al. (2000). "The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation." *J Leukoc Biol* **67**(4): 471-478.

- Braun, R. J., S. Büttner, et al. (2009). "Nervous yeast: modeling neurotoxic cell death." *Trends Biochem Sci* **35**(3): 135-144.
- Breustedt, D. A., Chatwell, Lorenz and A. and Skerra (2009). "A new crystal form of human tear lipocalin reveals high flexibility in the loop region and induced fit in the ligand cavity." *Acta Cryst* **65**(10): 1118-1125.
- Breustedt, D. A., I. P. Korndörfer, et al. (2005). "The 1.8-Å Crystal Structure of Human Tear Lipocalin Reveals an Extended Branched Cavity with Capacity for Multiple Ligands." *J Biol Chem* **280**(1): 484-493.
- Brindley, L. L., Sweet, J. M. and Goetzl, E. J. (1983). "Stimulation of Histamine Release from Human Basophils by Human Platelet Factor 4." *J Clin Invest* **72**: 1218-1223.
- Bringmann, A., T. Pannicke, et al. (2006). "Müller cells in the healthy and diseased retina." *Prog Retin Eye Res* **25**(4): 397-424.
- Bringmann, A. and A. Reichenbach (2001). "Role of Muller cells in retinal degenerations." *Front Biosci* **6**: E72-92.
- Broadway, D. C. and S. M. Drance (1998). "Glaucoma and vasospasm." *Br J Ophthalmol* **82**(8): 862-870.
- Buchakjian, M. R., Kornbluth, S. (2010). "The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death." *Nature Rev Mol Cell Biol* **11**: 715-727.
- Buckley, C. and A. Vincent (2005). "Autoimmune channelopathies." *Nat Clin Pract Neurol* **1**(1): 22-33.
- Butchi, N., B. M. Du, et al. (2009). "Interactions between TLR7 and TLR9 agonists and receptors regulate innate immune responses by astrocytes and microglia." *Glia* **58**(6): 650-664.
- Calandrella, N., G. Scarsella, et al. (2007). "Degenerative and apoptotic events at retinal and optic nerve level after experimental induction of ocular hypertension." *Mol Cell Biochem* **301**(1): 155-163.
- Cardona, A. E., E. P. Pioro, et al. (2006). "Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor." *Nat Neurosci* **9**(7): 917-24.
- Carelli, V., F. N. Ross-Cisneros, et al. (2004). "Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies." *Prog Retin Eye Res* **23**(1): 53-89.
- Carson, M., J., J. Doose, M., et al. (2006). "CNS immune privilege: hiding in plain sight." *Immunol Rev* **213**(1): 48-65.
- Caspi, R. (2008). "Autoimmunity in the immune privileged eye: pathogenic and regulatory T cells." *Immunol Res* **42**(1-3): 41-50.
- Castagna, A., D. Cecconi, et al. (2005). "Exploring the Hidden Human Urinary Proteome via Ligand Library Beads." *J Proteome Res* **4**(6): 1917-1930.
- Castor, C. W., J. W. Miller, et al. (1983). "Structural and biological characteristics of connective tissue activating peptide (CTAP-III), a major human platelet-derived growth factor." *PNAS J* **80**(3): 765-769.
- Cauwe, B., Martens, Erik, Proost, Paul, Opdenakker, Ghislain (2009). "Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates." *Integr Biol* **1**: 404-426.
- Chapple, J. P., C. Grayson, et al. (2003). "Organization on the plasma membrane of the retinitis pigmentosa protein RP2: investigation of association with detergent-resistant membranes and polarized sorting." *Biochem J* **372**(Pt 2): 427-33.
- Charriaut-Marlangue, C., D. Aggoun-Zouaoui, et al. (1996). "Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp 120 toxicity." *Trends Neurosci* **19**(3): 109-14.
- Chaudhary, P., F. Ahmed, et al. (1999). "Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection." *Mol Brain Res* **67**(1): 36-45.
- Cheney, R., N. Hirokawa, et al. (1983). "Intracellular movement of fodrin." *Cell Motil* **3**(5): 649-655.
- Chiba, S., S. Yokota, et al. (2006). "Autoantibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis." *J Neurol Sci* **241**(1-2): 39-43.
- Choe, J., M. S. Kelker, et al. (2005). "Crystal Structure of Human Toll-Like Receptor 3 (TLR3) Ectodomain." *Science* **309**(5734): 581-585.
- Choi, D. W. (1988). "Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage." *Trends Neurosci* **11**(10): 465-469.
- Choi, D. W. and S. M. Rothman (1990). "The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death." *Annu Rev Neurosci* **13**(1): 171-182.
- Cohen, I. R. (2001). "Antigenic Mimicry, Clonal Selection and Autoimmunity." *J Autoimmun* **16**(3): 337-340.
- Cohen, I. R. (2007). "Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus." *J Autoimmun* **29**(4): 246-9.
- Cohen, I. R. and D. B. Young (1991). "Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus." *Immunol Today* **12**(4): 105-110.
- Coleman, A. L. (1999). "Glaucoma." *Lancet* **354**(9192): 1803-1810.
- Collins, A. R., M. Ai-guo, et al. (1995). "The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells." *Mutation Res* **336**(1): 69-77.
- Colonna, M. (2003). "TREMs in the immune system and beyond." *Nat Rev Immunol* **3**(6): 445-53.
- Cowell, R. M., J. M. Plane, et al. (2003). "Complement Activation Contributes to Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats." *J Neurosci* **23**(28): 9459-9468.
- Crawford, M. L. J., R. S. Harwerth, et al. (2001). "Experimental Glaucoma in Primates: Changes in Cytochrome Oxidase Blobs in V1 Cortex." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(2): 358-364.
- Currie, R. W., J. A. Ellison, et al. (2000). "Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal Hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of Hsp27." *Brain Res* **863**(1-2): 169-181.
- Damian, R. T. (1964). "Molecular Mimicry: Antigen Sharing by Parasite and Host and Its Consequences." *Am Naturalist* **98**(900): 129-149.
- Damian, R. T. (1965). "Molecular Mimicry in Biological Adaptation." *Science* **147**(3660): 824.

- Dandona, L., A. Hendrickson, et al. (1991). "Selective effects of experimental glaucoma on axonal transport by retinal ganglion cells to the dorsal lateral geniculate nucleus." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**(5): 1593-1599.
- Dangond, F., D. Hwang, et al. (2004). "Molecular signature of late-stage human ALS revealed by expression profiling of postmortem spinal cord gray matter." *Physiol Genomics* **16**(2): 229-39.
- Davalos, D., J. Grutzendler, et al. (2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." *Nat Neurosci* **8**(6): 752-8.
- de Jong, E. e. a. (2008). "Expression of CXCL4 in microglia in vitro and in vivo and its possible signaling through CXCR3." *J Neurochem* **105**(5): 1726-1736.
- de Lange, T. (2005). "Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres." *Genes Dev* **19**(18): 2100-10.
- Deber, C. M. and S. J. Reynolds (1991). "Central nervous system myelin: structure, function, and pathology." *Clin Biochem* **24**(2): 113-134.
- Debily, M. A., S. E. Marhomy, et al. (2009). "A functional and regulatory network associated with PIP expression in human breast cancer." *PLoS One* **4**(3): e4696.
- Di Polo, A., L. J. Aigner, et al. (1998). "Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells." *PNAS J* **95**(7): 3978-3983.
- Dickinson, D. P. and M. Thiesse (1995). "A major human lacrimal gland mRNA encodes a new proline-rich protein family member." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(10): 2020-2031.
- Dooremaal, J. C. (1873). "Die Entwicklung der in fremden Grund versetzten lebenden Gewebe." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **13**(3): 359-73.
- Dorval, V. and P. E. Fraser (2007). "SUMO on the road to neurodegeneration." *Biochim Biophys Acta* **1773**(6): 694-706.
- Drejer, J., O. M. Larsson, et al. (1982). "Characterization of L-glutamate uptake into and release from astrocytes and neurons cultured from different brain regions." *Exp Brain Res* **47**(2): 259-269.
- Duchen, M. R. (2004). "Roles of Mitochondria in Health and Disease." *Diabetes* **53**(suppl 1): S96-S102.
- Eathiraj, S., X. Pan, et al. (2005). "Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5." *Nature* **436**(7049): 415-419.
- Eathiraj, S., X. Pan, et al. (2005). "Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5." *Nature* **436**(7049): 415-9.
- Eckerskorn, C. and F. Lottspeich (1989). "Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix." *Chromatographia* **28**(1): 92-94.
- EGS (2003) "Terminology and guidelines for glaucoma." **Volume**, DOI:
- Eikelenboom, M. J., J. Killestein, et al. (2002). "Chemokine receptor expression on T cells is related to new lesion development in multiple sclerosis." *Journal of Neuroimmunology* **133**(1-2): 225-232.
- Elul, T. M., N. E. Kimes, et al. (2003). "N- and C-Terminal Domains of {beta}-Catenin, Respectively, Are Required to Initiate and Shape Axon Arbors of Retinal Ganglion Cells In Vivo." *J Neuro Sci* **23**(16): 6567-6575.
- Fang, G., H. Yu, et al. (1998). "Direct Binding of CDC20 Protein Family Members Activates the Anaphase-Promoting Complex in Mitosis and G1." *Mol Cell* **2**(2): 163-171.
- Fatma, N., E. Kubo, et al. (2008). "Peroxiredoxin 6 delivery attenuates TNF-[alpha]-and glutamate-induced retinal ganglion cell death by limiting ROS levels and maintaining Ca²⁺ homeostasis." *Brain Res* **1233**: 63-78.
- Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." *Science* **272**(5258): 50-3.
- Fechtner, R. D. and R. N. Weinreb (1994). "Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma." *Surv Ophthalmol* **39**(1): 23-42.
- Ferrer, E. (2006). "Trabecular meshwork as a new target for the treatment of glaucoma." *Drug News Perspect* **19**(3): 151-8.
- Fisher, R. A. (1936). "The use of multiple measurements in taxonomic problems." *Analys Eugen* **7**: 179-188.
- Fleischer, J., E. Grage-Griebenow, et al. (2002). "Platelet Factor 4 Inhibits Proliferation and Cytokine Release of Activated Human T Cells." *J Immunol* **169**(2): 770-777.
- Fleming, C. E., M. J. Saraiva, et al. (2007). "Transthyretin enhances nerve regeneration." *J Neurochem* **103**(2): 831-9.
- Foell, D. and J. Roth (2004). "Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease." *Arthritis Rheum* **50**(12): 3762-3771.
- Fogarty, W. M. and P. J. Griffin (1973). "Production and purification of the metalloprotease of Bacillus polymyxa." *Appl Microbiol* **26**(2): 185-90.
- Fonseca, M. I., C. H. Kawas, et al. (2004). "Neuronal localization of C1q in preclinical Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* **15**(1): 40-6.
- Ford, J. W. and D. W. McVicar (2009). "TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease." *Curr Opin Immun* **21**(1): 38-46.
- Foster, A., C. Gilbert, et al. (2008). "Changing patterns in global blindness: 1988-2008." *Comm Eye Health* **21**(67): 37-9.
- Franklin, T. B., A. M. Krueger-Naug, et al. (2005). "The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system." *Int J Hyperthermia* **21**(5): 379-392.
- Friedlander, R. M. (2000). "Role of Caspase 1 in Neurologic Disease." *Arch Neurol* **57**(9): 1273-1276.
- Fu, C. A., M. Shen, et al. (1999). "TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton." *J Biol Chem* **274**(43): 30729-37.
- Fu, D. and K. Collins (2007). "Purification of Human Telomerase Complexes Identifies Factors Involved in Telomerase Biogenesis and Telomere Length Regulation." *Mol Cell* **28**(5): 773-785.

- Fu, Q.-I., X. Li, et al. (2009). "Synaptic Degeneration of Retinal Ganglion Cells in a Rat Ocular Hypertension Glaucoma Model." *Cell Mol Neurobiol*.
- Fukuchi, T., J. Ueda, et al. (2001). "Distribution and expression of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor in the normal and glaucomatous monkey optic nerve heads." *Jpn J Ophthalmol* **45**(6): 592-9.
- Fullard, R. J. and C. Snyder (1990). "Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**(6): 1119-1126.
- Galloway, P. H., S. J. Warner, et al. (2003). "Helicobacter pylori infection and the risk for open-angle glaucoma." *Ophthalmology* **110**(5): 922-925.
- Garcia-Castineiras, S., M. E. Andino Moreno, et al. (1993). "Antibodies to lens crystallins after endocapsular cataract surgery." *P R Health Sci J* **12**(2): 123-8.
- Garcia-Valenzuela, E., S. Shareef, et al. (1995). "Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma." *Exp Eye Res* **61**(1): 33-44.
- Garrido, C., J.-M. Bruey, et al. (1999). "HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9." *FASEB J* **13**(14): 2061-2070.
- Garrido, C., S. Gurbuxani, et al. (2001). "Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death." *Biochem Biophys Res Commun* **286**(3): 433-442.
- Garsia, R. J., L. Hellqvist, et al. (1989). "Homology of the 70-kilodalton antigens from Mycobacterium leprae and Mycobacterium bovis with the Mycobacterium tuberculosis 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes." *Infect Immun* **57**(1): 204-12.
- Gasparini, L., R. Anthony Crowther, et al. (2009). "Tau inclusions in retinal ganglion cells of human P301S tau transgenic mice: Effects on axonal viability." *Neurobiol Aging*.
- Gasque, P. (2004). "Complement: a unique innate immune sensor for danger signals." *Mol Immunol* **41**(11): 1089-98.
- Gasser, P. (1989). "Ocular vasospasm: A risk factor in the pathogenesis of low-tension glaucoma." *Int Ophthalmol* **13**(4): 281-290.
- Genein, C. P., Cannella, B. et al. (1999). "Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis." *Nature Med* **5**: 170-175.
- Giusti, L., Baldini, Chiara, Bazzichi, Ciregia, Laura, Federica, Tonazzini, Ilaria, Mascia, Giannaccini, Giovanni, Stefano, Gino Antonio Lucacchini, Bombardieri (2007). "Proteome analysis of whole saliva: A new tool for rheumatic diseases - the example of Sjögren's syndrome." *Proteomics* **7**(10): 1634-1643.
- Gleissner, C. A., P. von Hundelshausen, et al. (2008). "Platelet Chemokines in Vascular Disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(11): 1920-1927.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction." *Physiol Rev* **82**(2): 373-428.
- Gloor, B., P., Sarra, Gian-Marco (2004). "Visusverlust und Sehstörung (2. Teil)." *Schweiz Med Forum* **4**: 308-312.
- Glovinsky, Y., H. A. Quigley, et al. (1991). "Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**(3): 484-491.
- Golab, J., T. M. Bauer, et al. (2004). "Role of the ubiquitin-proteasome pathway in the diagnosis of human diseases." *Clinica Chimica Acta* **340**(1-2): 27-40.
- Goldstein, L. S. B. and Z. Yang (2000). "Microtubule-Based Transport Systems in Neurons: The Roles of Kinesins and Dyneins." *Annu Rev Neurosci* **23**(1): 39-71.
- Gonzalez-Scarano, F. and G. Baltuch (1999). "Microglia as Mediators of Inflammatory and Degenerative Diseases." *Annu Rev Neurosci* **22**(1): 219-240.
- Gonzalez-Scarano, F. and G. Baltuch (1999). MICROGLIA AS MEDIATORS OF INFLAMMATORY AND DEGENERATIVE DISEASES. **22**: 219-240.
- Goverman, J. (2009). "Autoimmune T cell responses in the central nervous system." *Nat Rev Immunol* **9**(6): 393-407.
- Gow, A. (1997). "Redefining the lipophilin family of proteolipid proteins." *J Neurosci Res* **50**(5): 659-664.
- Granger, J., Siddiqui, Javed, Copeland, Shannon, Remick, Daniel (2005). "Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines." *Proteomics* **5**(18): 4713-4718.
- Gredilla, R., V. A. Bohr, et al. (2010). "Mitochondrial DNA repair and association with aging - An update." *Exp Gerontol In Press, Corrected Proof*.
- Grieshaber, M. C. and J. Flammer (2007). "Does the Blood-brain Barrier Play a Role in Glaucoma?" *Surv Ophthalmol* **52**(6, Supplement 1): S115-S121.
- Grus, F. H., S. C. Joachim, et al. (2006). "Serum autoantibodies to alpha-fodrin are present in glaucoma patients from Germany and the United States." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(3): 968-76.
- Grus, F. H., S. C. Joachim, et al. (2004). "Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma." *Mol Vis* **10**: 132-7.
- Grus, F. H., S. C. Joachim, et al. (2003). "Analysis of complex autoantibody repertoires by surface-enhanced laser desorption/ionization-time-of flight mass spectrometry." *Proteomics* **3**(6): 957-61.
- Grus, F. H., S. C. Joachim, et al. (2008). "Transthyretin and complex protein pattern in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma." *Mol Vis* **14**: 1437-45.
- Grus FH, J. S., Wuenschig D, Rieck J, Pfeiffer N. (2008). "Autoimmunity and glaucoma." *J Glaucoma*. **17**(1): 79-84.
- Grus, F. H., V. N. Podust, et al. (2005). "SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(3): 863-76.
- Guay, J., H. Lambert, et al. (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." *J Cell Sci* **110**(3): 357-368.

- Guo, D., M. Li, et al. (2004). "A functional variant of SUMO4, a new I[κ]B[α] modifier, is associated with type 1 diabetes." *Nat Genet* **36**(8): 837-841.
- Guo, L., S. E. Moss, et al. (2005). "Retinal Ganglion Cell Apoptosis in Glaucoma Is Related to Intraocular Pressure and IOP-Induced Effects on Extracellular Matrix." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(1): 175-182.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." *Biochem J* **219**(1): 1-14.
- Han, H. S. and K. Suk (2005). "The Function and Integrity of the Neurovascular Unit Rests Upon the Integration of the Vascular and Inflammatory Cell Systems." *Curr Neurovasc Res* **2**: 409-423.
- Han, Z. C., M. Lu, et al. (1997). "Platelet Factor 4 and Other CXC Chemokines Support the Survival of Normal Hematopoietic Cells and Reduce the Chemosensitivity of Cells to Cytotoxic Agents." *Blood* **89**(7): 2328-2335.
- Harker, L. A., R. Ross, et al. (1976). "Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis." *J Clin Invest* **58**(3): 731-41.
- Harrington, D. O. (1964). "The Bjerrum Scotoma." *Trans Am Ophthalmol Soc* **62**: 324-48.
- Hassan, M., A. Waheed, et al. (2009). "Prolactin inducible protein in cancer, fertility and immunoregulation: structure, function and its clinical implications." *Cell Mol Life Sci* **66**(3): 447-459.
- Haverkamp, S., U. Grünert, et al. (2000). "The Cone Pedicle, a Complex Synapse in the Retina." *Neuron* **27**(1): 85-95.
- Hawkins, B. T. and T. P. Davis (2005). "The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease." *Pharm Rev* **57**(2): 173-185.
- Hay, R. T. (2005). "SUMO: A History of Modification." *Molecular Cell* **18**(1): 1-12.
- Haynes, S. E., G. Hollopeter, et al. (2006). "The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides." *Nat Neurosci* **9**(12): 1512-9.
- He, X., P. Hahn, et al. (2007). "Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration." *Prog Retin Eye Res* **26**(6): 649-673.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1526-1529.
- Henderson, L. E., S. Oroszlan, et al. (1979). "A micromethod for complete removal of dodecyl sulfate from proteins by ion-pair extraction." *Anal Biochem* **93**(1): 153-7.
- Henderson, P. A., F. A. Medeiros, et al. (2005). "Relationship between central corneal thickness and retinal nerve fiber layer thickness in ocular hypertensive patients." *Ophthalmology* **112**(2): 251-6.
- Henzel, W. J., C. Watanabe, et al. (2003). "Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting." *J Am Soc Mass Spectrom* **14**(9): 931-942.
- Hernandez, M. R. (2000). "The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling." *Prog Retin Eye Res* **19**(3): 297-321.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The Ubiquitin System." *Annu Rev Biochem* **67**(1): 425-479.
- Hickey, W. F. and H. Kimura (1988). "Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo." *Science* **239**(4837): 290-292.
- Hilliard, M. A. (2009). "Axonal degeneration and regeneration: a mechanistic tug-of-war." *J Neurochem* **108**(1): 23-32.
- Holt, J. C., M. E. Harris, et al. (1986). "Characterization of human platelet basic protein, a precursor form of low-affinity platelet factor 4 and .beta.-thromboglobulin." *Biochemistry* **25**(8): 1988-1996.
- Honkanen, R. A., S. Baruah, et al. (2003). "Vitreous Amino Acid Concentrations in Patients With Glaucoma Undergoing Vitrectomy." *Arch Ophthalmol* **121**(2): 183-188.
- Hou, X., M. I. Aguilar, et al. (2007). "Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration." *Febs J* **274**(7): 1637-50.
- Huber, J. D., R. D. Egleton, et al. (2001). "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier." *Trends Neurosci* **24**(12): 719-725.
- Hughes, B. W., Moro de Casillas, M.L., Kaminski, H.J. (2004). "Pathophysiology of Myasthenia Gravis." *Semin Neurol* **24**: 21-30.
- Hundelshausen, P. v. (2007). "Platelet-derived chemokines in vascular biology." *Thromb Haemost* **97**: 704-713.
- Hung, J., M. Chansard, et al. (2010). "Activation of microglia by neuronal activity: Results from a new in vitro paradigm based on neuronal-silicon interfacing technology." *Brain Behav Immun* **24**(1): 31-40.
- Iida, N., M. Haisa, et al. (1996). "Leukocyte-derived growth factor links the PDGF and CXC chemokine families of peptides." *Faseb J* **10**(11): 1336-45.
- Iida, N., M. Haisa, et al. (1996). "Leukocyte-derived growth factor links the PDGF and CXC chemokine families of peptides." *Faseb J* **10**(11): 1336-1345.
- Ingendoh, A., M. Karas, et al. (1994). "Factors affecting the resolution in matrix-assisted laser desorption--ionization mass spectrometry." *Int J Mass Spec Ion Proc* **131**: 345-354.
- Inman, D. M. and P. J. Horner (2007). "Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma." *Glia* **55**(9): 942-953.
- Izawa, I., M. Nishizawa, et al. (2002). "Densin-180 Interacts with delta -Catenin/Neural Plakophilin-related Armadillo Repeat Protein at Synapses." *J Biol Chem* **277**(7): 5345-5350.
- Jacobs, J. M., J. N. Adkins, et al. (2005). "Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery." *J Proteome Res* **4**(4): 1073-85.
- Jakob, U., M. Gaestel, et al. (1993). "Small heat shock proteins are molecular chaperones." *J Biol Chem* **268**(3): 1517-1520.
- Janeway, C. A. and R. Medzhitov (2002). "Innate Immune Recognition." *Annu Rev Immunol* **20**(1): 197-216.

- Janicke, R. U., P. Ng, et al. (1998). "Caspase-3 Is Required for alpha -Fodrin Cleavage but Dispensable for Cleavage of Other Death Substrates in Apoptosis." *J Biol Chem* **273**(25): 15540-15545.
- Jellinger, K. (2009). "Recent advances in our understanding of neurodegeneration." *J Neural Transm* **116**(9): 1111-1162.
- Jensen, R. T., J. F. Battey, et al. (2007). "International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling, and Functions in Normal and Disease States." *Pharmacol Rev*.
- Jian-Zhong Ji, W. E. H. K. Y. V. W. H. L. L.-W. Y. J. H. K.-F. S. (2004). CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway. *19*: 265-272.
- Jo, N., C. Mailhos, et al. (2006). "Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization." *Am J Pathol* **168**(6): 2036-53.
- Joachim, S. C., N. Pfeiffer, et al. (2005). "Autoantibodies in patients with glaucoma: a comparison of IgG serum antibodies against retinal, optic nerve, and optic nerve head antigens." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **243**(8): 817-23.
- John McConville, M. E. F. D. B. U. K. R. M. J. N.-D. A. V. (2004). Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. **55**: 580-584.
- Johnson, E. C., L. M. H. Deppmeier, et al. (2000). "Chronology of Optic Nerve Head and Retinal Responses to Elevated Intraocular Pressure." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(2): 431-442.
- Johnson, E. C., L. Jia, et al. (2007). "Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(7): 3161-77.
- Johnson, E. C. and J. C. Morrison (2009). "Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma." *J Glaucoma* **18**(5): 341-53.
- Johnson, J. D. and M. Fleshner (2006). "Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72." *J Leuko Biol* **79**(3): 425-434.
- Johnson, R. S., S. A. Martin, et al. (1987). "Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine." *Anal Chem* **59**(21): 2621-5.
- Julien, J.-P. (2001). "Amyotrophic Lateral Sclerosis: Unfolding the Toxicity of the Misfolded." *Cell* **104**(4): 581-591.
- Kameyoshi, Y., A. Dorschner, et al. (1992). "Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils." *J Exp Med* **176**(2): 587-592.
- Karas, M., D. Bachmann, et al. (1987). "Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds." *Int J Mass Spec Ion Proc* **78**: 53-68.
- Kasper, B., E. Brandt, et al. (2007). "Platelet factor 4 (CXC chemokine ligand 4) differentially regulates respiratory burst, survival, and cytokine expression of human monocytes by using distinct signaling pathways." *J Immunol* **179**(4): 2584-91.
- Kass, M. A., D. K. Heuer, et al. (2002). "The Ocular Hypertension Treatment Study: A Randomized Trial Determines That Topical Ocular Hypotensive Medication Delays or Prevents the Onset of Primary Open-Angle Glaucoma." *Arch Ophthalmol* **120**(6): 701-713.
- Kawaji, T., Y. Ando, et al. (2005). "Transthyretin synthesis in rabbit ciliary pigment epithelium." *Exp Eye Res* **81**(3): 306-12.
- Kelleher, N. L., H. Y. Lin, et al. (1999). "Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry." *J Am Chem Soc* **121**(4): 806-812.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.
- Kirwan, R. P., M. O. Leonard, et al. (2005). "Transforming growth factor-beta-regulated gene transcription and protein expression in human GFAP-negative lamina cribrosa cells." *Glia* **52**(4): 309-24.
- Kishore, U., C. Gaboriaud, et al. (2004). "C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility." *Trends Immunol* **25**(10): 551-561.
- Klöcker, N. e. a. (1997). "In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells." *Neuro Report* **8**: 3439-3442.
- Koizumi, S., Y. Shigemoto-Mogami, et al. (2007). "UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis." *Nature* **446**(7139): 1091-5.
- Kol, A., A. H. Lichtman, et al. (2000). "Cutting Edge: Heat Shock Protein (HSP) 60 Activates the Innate Immune Response: CD14 Is an Essential Receptor for HSP60 Activation of Mononuclear Cells." *J Immunol* **164**(1): 13-17.
- Kolch, W., H. Mischak, et al. (2005). "The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research." *Clin Sci (Lond)* **108**(5): 369-83.
- Komatsu, H. (2006). "The neural mechanisms of perceptual filling-in." *Nat Rev Neurosci* **7**(3): 220-31.
- Kornberg, A. J. and A. Pestronk (1993). "Immune-mediated neuropathies." *Curr Opin Neurol* **6**(5): 681-7.
- Kountouras, J., N. Mylopoulos, et al. (2003). "Increased levels of Helicobacter pylori IgG antibodies in aqueous humor of patients with primary open-angle and exfoliation glaucoma." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **241**(11): 884-90.
- Kountouras, J., C. Zavos, et al. (2004). "Induction of apoptosis as a proposed pathophysiological link between glaucoma and Helicobacter pylori infection." *Med Hypoth* **62**(3): 378-381.
- Krane, I. M., S. L. Naylor, et al. (1988). "Molecular cloning of cDNAs encoding the human bombesin-like peptide neuromedin B. Chromosomal localization and comparison to cDNAs encoding its amphibian homolog ranatensin." *J Biol Chem* **263**(26): 13317-23.

- Kretz, A., C. Schmeer, et al. (2006). "Simvastatin promotes heat shock protein 27 expression and Akt activation in the rat retina and protects axotomized retinal ganglion cells in vivo." *Neurobiol Dis* **21**(2): 421-430.
- Krueger-Naug, A. M. R., J. G. Emsley, et al. (2002). "Injury to retinal ganglion cells induces expression of the small heat shock protein Hsp27 in the rat visual system." *Neuroscience* **110**(4): 653-665.
- Kruger, R., C. Fischer, et al. (2003). "Mutation analysis of the neurofilament M gene in Parkinson's disease." *Neurosci Lett* **351**(2): 125-9.
- Kuchle, M., T. S. Ho, et al. (1994). "Protein quantification and electrophoresis in aqueous humor of pseudoexfoliation eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**(2): 748-752.
- Kuehn, M. H., J. H. Fingert, et al. (2005). "Retinal ganglion cell death in glaucoma: mechanisms and neuroprotective strategies." *Ophthalmol Clin North Am* **18**(3): 383-95, vi.
- Kuehn, M. H., C. Y. Kim, et al. (2006). "Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension." *Exp Eye Res* **83**(3): 620-8.
- Kulkarni, A. P., L. A. Kellaway, et al. (2004). "Neuroprotection from complement-mediated inflammatory damage." *Ann NY Acad Sci* **1035**: 147-64.
- Kurien, B. T. and R. H. Scofield (2008). "Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens." *Autoimmun Rev* **7**(7): 567-73.
- Kurochkin, I. V., N. Yonemitsu, et al. (2001). "ALEX1, a Novel Human Armadillo Repeat Protein That Is Expressed Differentially in Normal Tissues and Carcinomas." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(1): 340-347.
- LaBaer, J. (2005). "So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue)." *J Proteome Res* **4**(4): 1053-9.
- Ladeby, R., M. Wirenfeldt, et al. (2005). "Proliferating resident microglia express the stem cell antigen CD34 in response to acute neural injury." *Glia* **50**(2): 121-31.
- Lasagni, L., M. Francalanci, et al. (2003). "An Alternatively Spliced Variant of CXCR3 Mediates the Inhibition of Endothelial Cell Growth Induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and Acts as Functional Receptor for Platelet Factor 4." *J Exp Med* **197**(11): 1537-1549.
- Laurie, G. W., L. A. Olsakovsky, et al. (2008). "Dry eye and designer ophthalmics." *Optom Vis Sci* **85**(8): 643-52.
- Lavoie, J. N., E. Hickey, et al. (1993). "Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27." *J Biol Chem* **268**(32): 24210-24214.
- Lavoie, J. N., H. Lambert, et al. (1995). "Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27." *Mol Cell Biol* **15**(1): 505-516.
- Lehnardt, S. (2009). "Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury." *Glia* **58**(3): 253-263.
- Lehrer, R. I., G. Xu, et al. (1998). "Lipophilin, a novel heterodimeric protein of human tears." *FEBS Letters* **432**(3): 163-167.
- Lennon, J. J. (1997) "Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry." **Volume**, DOI:
- Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, et al. (2004). "A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis." *Lancet* **364**(9451): 2106-2112.
- Leoncini, G., M. G. Signorello, et al. (2009). "In retinal vein occlusion platelet response to thrombin is increased." *Thromb Res* **124**(6): e48-e55.
- Leslie, N. R. and C. P. Downes (2002). "PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling." *Cell Signal* **14**(4): 285-95.
- Leung, C. L., K. J. Green, et al. (2002). "Plakins: a family of versatile cytolinker proteins." *Trends Cell Biol* **12**(1): 37-45.
- Leung, C. L., D. Sun, et al. (1999). "Microtubule Actin Cross-linking Factor (MACF): A Hybrid of Dystonin and Dystrophin that Can Interact with the Actin and Microtubule Cytoskeletons." *J Cell Biol* **147**(6): 1275-1286.
- LeVine, S. M., S. G. Lynch, et al. (1999). "Ferritin, transferrin and iron concentrations in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients." *Brain Research* **821**(2): 511-515.
- Levkovitch-Verbin, H., R. Dardik, et al. (2009). "Mechanism of retinal ganglion cells death in secondary degeneration of the optic nerve." *Exp Eye Res In Press, Uncorrected Proof*.
- Levkovitch-Verbin, H., H. A. Quigley, et al. (2003). "A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(8): 3388-93.
- Lewis, G. P. and S. K. Fisher (2003). "Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression." *Int Rev Cytol* **230**: 263-90.
- Li, S. and S. S. Sommer (1993). "The high frequency of TTR M30 in familial amyloidotic polyneuropathy is not due to a founder effect." *Hum Mol Genet* **2**(8): 1303-1305.
- Li, Y., C. L. Schlamp, et al. (2002). "p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate." *Mol Vis* **8**: 341-50.
- Li, Y., C. L. Schlamp, et al. (2000). "Bax-dependent and independent pathways of retinal ganglion cell death induced by different damaging stimuli." *Exp Eye Res* **71**(2): 209-13.
- Li, Y., A. Uccelli, et al. (1997). "Local-clonal expansion of infiltrating T lymphocytes in chronic encephalitis of Rasmussen." *J Immunol* **158**(3): 1428-1437.
- Liberto, C., M., P. J. Albrecht, et al. (2004). "Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes." *J Neurochem* **89**(5): 1092-1100.

- Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Nature* **443**(7113): 787-795.
- Lindemann, S., N. D. Tolley, et al. (2001). "Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 beta synthesis." *J Cell Biol* **154**(3): 485-490.
- Lingor, P., P. Koeberle, et al. (2005). "Down-regulation of apoptosis mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death in vivo." *Brain* **128**(3): 550-558.
- Linker, R. A., E. Rott, et al. (2005). "EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses." *Neurobiol Dis* **19**(1-2): 218-28.
- Linnik, M. D., R. H. Zobrist, et al. (1993). "Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats." *Stroke* **24**(12): 2002-8; discussion 2008-9.
- Liu, B. and A. H. Neufeld (2001). "Nitric Oxide Synthase-2 in Human Optic Nerve Head Astrocytes Induced by Elevated Pressure In Vitro." *Arch Ophthalmol* **119**(2): 240-245.
- Liu, B., Neufeld, Arthur H. (2000). "Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head." *Glia* **30**(2): 178-186.
- Liu, C. Y., M. Battaglia, et al. (2005). "Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (nonregulatory) T cells." *J Immunol* **174**(5): 2680-6.
- Liu, D., H. Yumoto, et al. (2008). "Histone-like DNA binding protein of *Streptococcus intermedius* induces the expression of pro-inflammatory cytokines in human monocytes via activation of ERK1/2 and JNK pathways." *Cell Microbiol* **10**(1): 262-76.
- Loewen, N. A., J. H. Liu, et al. (2010). "Increased 24-hour variation of human intraocular pressure with short axial length." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**(2): 933-7.
- Lucas, D. R. and J. P. Newhouse (1957). "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina." *AMA Arch Ophthalmol* **58**(2): 193-201.
- Luo, C., X. Yang, et al. (2009). "Stress Proteins and Immunostimulatory Signaling Through Toll-Like Receptors in Glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(5): 4048-.
- Luo, C., X. Yang, et al. (2009). Stress Proteins and Immunostimulatory Signaling Through Toll-Like Receptors in Glaucoma. **50**: 4048-.
- Lyu, M. S., S. G. Rhee, et al. (1999). "Genetic mapping of six mouse peroxiredoxin genes and fourteen peroxiredoxin related sequences." *Mamma Gen* **10**(10): 1017-1019.
- Macedo, B., A. R. Batista, et al. (2007). "Biomarkers in the assessment of therapies for familial amyloidotic polyneuropathy." *Mol Med* **13**(11-12): 584-91.
- Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. **273**: 13375-13378.
- Maestre, C., Delgado-Esteban, M., Gomez-Sanchez, J., Bolanos, J., Almeida, A. (2008). "Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity." *The EMBO Journal* **27**: 2736-2745.
- Maione, T. E., G. S. Gray, et al. (1990). "Inhibition of Angiogenesis by Recombinant Human Platelet Factor-4 and Related Peptides." *Science* **247**(4938): 77-79.
- Majumdar, S., D. Gonder, et al. (1991). "Characterization of the human beta-thromboglobulin gene. Comparison with the gene for platelet factor 4." *J Biol Chem* **266**(9): 5785-5789.
- Mansour-Robaey, S. e. a. (1994). "Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1632-1636.
- Manzerra, P., S. J. Rush, et al. (1993). "Temporal and spatial distribution of heat shock mRNA and protein (hsp70) in the rabbit cerebellum in response to hyperthermia." *J Neurosci Res* **36**(4): 480-490.
- Marti, F., E. Bertran, et al. (2002). "Platelet factor 4 induces human natural killer cells to synthesize and release interleukin-8." *J Leukoc Biol* **72**(3): 590-7.
- Martin, K. R. G., H. A. Quigley, et al. (2003). "Gene Therapy with Brain-Derived Neurotrophic Factor As a Protection: Retinal Ganglion Cells in a Rat Glaucoma Model." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(10): 4357-4365.
- Maruyama, I., Y. Ikeda, et al. (2002). "Clinical roles of serum autoantibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients." *Tohoku J Exp Med* **197**(3): 125-32.
- Maruyama, I., H. Ohguro, et al. (2000). "Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(7): 1657-65.
- Mattson, M. P., W. A. Pedersen, et al. (1999). "Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Perturbed Energy Metabolism and Neuronal Degeneration in Alzheimer's and Parkinson's Diseases." *Ann NY Acad Sci* **893**(OXIDATIVE/ENERGY METABOLISM IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS): 154-175.
- McConville, J. e. a. (2004). "Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis." *Ann Neurol* **55**(4): 580-584.
- McKenzie, M., D. Liolitsa, et al. (2004). "Mitochondrial Disease: Mutations and Mechanisms." *Neurochem Res* **29**(3): 589-600.
- McKown, R. L., N. Wang, et al. (2009). "Lacritin and other new proteins of the lacrimal functional unit." *Exp Eye Res* **88**(5): 848-858.
- Medawar, P. B. (1948). "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* **29**(1): 58-69.
- Medawar, P. B. (1961). "Immunological Tolerance." *Nature* **189**(4758): 14-17.
- Meier, U. T. (2005). "The many facets of H/ACA ribonucleoproteins." *Chromosoma* **114**(1): 1-14.
- Merchant, M. and S. R. Weinberger (2000). "Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry." *Electrophoresis* **21**(6): 1164-77.

- Meriin, A. B. and M. Y. Sherman (2005). "Role of molecular chaperones in neurodegenerative disorders." *Int J Hyperthermia* **21**(5): 403-419.
- Merrill, M. H. and M. S. Fleisher (1932). "Factors Involved in the Use of Organic Solvents as Precipitating and Drying Agents of Immune Sera." *J Gen Physiol* **16**(2): 243-256.
- Meyer-Franke, A., M. R. Kaplan, et al. (1995). "Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture." *Neuron* **15**(4): 805-819.
- Meyer-Luehmann, M., T. L. Spires-Jones, et al. (2008). "Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." *Nature* **451**(7179): 720-4.
- Meyerhof, O. and K. Lohmann (1934). "Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxycetonphosphorsäure." *Naturwissenschaften* **22**(14): 220-220.
- Minagar, A., W. Jy, et al. (2006). "Multiple sclerosis as a vascular disease." *Neurol Res* **28**: 230-235.
- Minckler, D. S., A. H. Bunt, et al. (1977). "Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **16**(5): 426-441.
- Mitchell, J. R., J. Cheng, et al. (1999). "A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end." *Mol Cell Biol* **19**(1): 567-76.
- Miyahara, T., T. Kikuchi, et al. (2003). "Gene microarray analysis of experimental glaucomatous retina from cynomolgous monkey." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(10): 4347-56.
- Mochizuki, M., S. Sugita, et al. (2000). "Immunoregulation by aqueous humor." *Cornea* **19**(3 Suppl): S24-5.
- Moiseyev, G., Y. Chen, et al. (2005). "RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle." *PNAS J* **102**(35): 12413-12418.
- Moll, K. J., Moll, M. (2002). *Kurzlehrbuch Anatomie*. **17**: 697.
- Morgan, J. E., G. Jeffery, et al. (1998). "Axon deviation in the human lamina cribrosa." *Br J Ophthalmol* **82**(6): 680-683.
- Moser, B., M. Wolf, et al. (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control[star, open]." *Trends Immunol* **25**(2): 75-84.
- Mrass, P. and W. Weninger (2006). "Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors." *Immunol Rev* **213**(1): 195-212.
- Mueller, A., A. Meiser, et al. (2008). "CXCL4-induced migration of activated T lymphocytes is mediated by the chemokine receptor CXCR3." *J Leukoc Biol*.
- Müller, S., C. Hoege, et al. (2001). "Sumo, ubiquitin's mysterious cousin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 202-213.
- Mulligan, S. J. and B. A. MacVicar (2004). "Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions." *Nature* **431**(7005): 195-199.
- Murad, F. (1986). "Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation." *J Clin Invest* **78**(1): 1-5.
- Musunuru, K. and R. B. Darnell (2001). "Paraneoplastic neurologic disease antigens: RNA-binding proteins and signaling proteins in neuronal degeneration." *Annu Rev Neurosci* **24**: 239-62.
- Nacken, W., Roth, Johannes, Sorg, Clemens, Kerkhoff, Claus (2003). "S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity." *Microsc Res Tech* **60**(6): 569-580.
- Nakazawa, Y., T. Kamijo, et al. (2003). "ARF Tumor Suppressor Induces Mitochondria-dependent Apoptosis by Modulation of Mitochondrial Bcl-2 Family Proteins." *J Biol Chem* **278**(30): 27888-27895.
- Napoli, I. and H. Neumann (2009). "Microglial clearance function in health and disease." *Neuroscience* **158**(3): 1030-1038.
- Naskar, R., M. Wissing, et al. (2002). "Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(9): 2962-8.
- Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." *Cell* **78**(6): 915-8.
- Neufeld, A. H. and B. Liu (2003). "Glaucomatous optic neuropathy: when glia misbehave." *Neuroscientist* **9**(6): 485-95.
- Neufeld, A. H., A. Sawada, et al. (1999). "Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma." *PNAS J* **96**(17): 9944-9948.
- Neumann, H., A. Cavalie, et al. (1995). "Induction of MHC class I genes in neurons." *Science* **269**(5223): 549-552.
- Neumann, H., I. M. Medana, et al. (2002). "Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases." *Trends Neurosci* **25**(6): 313-319.
- Neumann, H. and K. Takahashi (2007). "Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis." *Journal of Neuroimmunology* **184**(1-2): 92-99.
- Nevalainen, E. M., A. Skwarek-Maruszewska, et al. (2009). "Two biochemically distinct and tissue-specific twinfilin isoforms are generated from the mouse Twf2 gene by alternative promoter usage." *Biochem J* **417**(2): 593-600.
- Newman, E. and A. Reichenbach (1996). "The Müller cell: a functional element of the retina." *Trends Neurosci* **19**(8): 307-312.
- Newman, E. A. and K. R. Zahs (1998). "Modulation of Neuronal Activity by Glial Cells in the Retina." *J Neurosci* **18**(11): 4022-4028.
- Nguyen, M. D., J. P. Julien, et al. (2002). "Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?" *Nat Rev Neurosci* **3**(3): 216-27.
- Nichols, J. J. and K. B. Green-Church (2009). "Mass spectrometry-based proteomic analyses in contact lens-related dry eye." *Cornea* **28**(10): 1109-17.
- Nickells, R. W. (1996). "Retinal Ganglion Cell Death in Glaucoma: The How, the Why, and the Maybe." *J Glaucoma* **5**(5): 345-356.

- Nickells, R. W. (1999). "Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death." *Surv Ophthalmol* **43** Suppl 1: S151-61.
- Nickells, R. W. (2007). "From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma." *Can J Ophthalmol* **42**(2): 278-87.
- Niederhorn, J. Y. (2006). "See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege." *Nat Immunol* **7**(4): 354-9.
- Nielsen, E., S. Christoforidis, et al. (2000). "Rabenosyn-5, a Novel Rab5 Effector, Is Complexed with Hvps45 and Recruited to Endosomes through a Fyve Finger Domain." *J Cell Biol* **151**(3): 601-612.
- Nielsen, E., F. Severin, et al. (1999). "Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules." *Nat Cell Biol* **1**(6): 376-382.
- Nielsen, H. H., R. Ladeby, et al. (2009). "Enhanced microglial clearance of myelin debris in T cell-infiltrated central nervous system." *J Neuropathol Exp Neurol* **68**(8): 845-56.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, et al. (2005). "Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo." *Science* **308**(5726): 1314-1318.
- Nobrega, A., M. Haury, et al. (1993). "Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological 'homunculus' of antibodies in normal serum." *Eur J Immunol* **23**(11): 2851-2859.
- Ohashi, K., V. Burkart, et al. (2000). "Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex." *J Immunol* **164**(2): 558-561.
- Ohki-Hamazaki, H. (2000). "Neuromedin B." *Prog Neurobiol* **62**(3): 297-312.
- Ohtsuki, S. (2004). "New Aspects of the Blood-Brain Barrier Transporters; Its Physiological Roles in the Central Nervous System." *Biol Pharma Bull* **27**(10): 1489-1496.
- Oldstone, M. B. A. (2005). Molecular Mimicry, Microbial Infection, and Autoimmune Disease: Evolution of the Concept. *Molecular Mimicry: Infection-Inducing Autoimmune Disease*: 1-17.
- Olson, J. K. and S. D. Miller (2004). "Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs." *J Immunol* **173**(6): 3916-3924.
- Oltmanns, U., R. Issa, et al. (2003). "Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* **139**(6): 1228-34.
- Ouaisi, M. A., C. Auriault, et al. (1981). Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system: role of IgG Fc peptides in the activation of the classical pathway by schistosomula. **127**: 1556-1559.
- Ozyildirim, A. M., G. J. Wistow, et al. (2005). "The Lacrimal Gland Transcriptome Is an Unusually Rich Source of Rare and Poorly Characterized Gene Transcripts." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(5): 1572-1580.
- Paffenholz, R., C. Kuhn, et al. (1999). "The Arm-Repeat Protein NPRAP (Neurojungin) Is a Constituent of the Plaques of the Outer Limiting Zone in the Retina, Defining a Novel Type of Adhering Junction." *Exp Cell Res* **250**(2): 452-464.
- Pappin, D. J., P. Hojrup, et al. (1993). "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting." *Curr Biol* **3**(6): 327-32.
- Pasinetti, G. M. (1998). "Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: Experimental approaches and clinical interventions." *J Neurosci Res* **54**(1): 1-6.
- Pavljasevic, S. and M. Asceric (2009). "Primary open-angle glaucoma and serum lipids." *Bosn J Basic Med Sci* **9**(1): 85-8.
- Pease, M. E., S. J. McKinnon, et al. (2000). "Obstructed Axonal Transport of BDNF and Its Receptor TrkB in Experimental Glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(3): 764-774.
- Pekny, M., C. B. Johansson, et al. (1999). "Abnormal Reaction to Central Nervous System Injury in Mice Lacking Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin." *J Cell Biol* **145**(3): 503-514.
- Pekny, M., Pekna, Marcela (2004). "Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration." *J Pathol* **204**(4): 428-437.
- Pena, J. D. O., O. Agapova, et al. (2001). "Increased Elastin Expression in Astrocytes of the Lamina Cribrosa in Response to Elevated Intraocular Pressure." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(10): 2303-2314.
- Peshenko, I. V., A. K. Singh, et al. (2001). "Bovine Eye 1-Cys Peroxiredoxin: Expression in E. coli and Antioxidant Properties." *J Ocul Pharmacol Th* **17**(1): 93-99.
- Petersen, F., L. Bock, et al. (1999). "Platelet Factor 4-Induced Neutrophil-Endothelial Cell Interaction: Involvement of Mechanisms and Functional Consequences Different From Those Elicited by Interleukin-8." *Blood* **94**(12): 4020-4028.
- Petricoin, E. F., A. M. Ardekani, et al. (2002). "Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer." *Lancet* **359**(9306): 572-7.
- Pfeiffer, N. (2001). Glaukom und okuläre Hypertension - Grundlagen, Diagnostik, Therapie.
- Pillunat, L. E., D. R. Anderson, et al. (1997). "Autoregulation of Human Optic Nerve Head Circulation in Response to Increased Intraocular Pressure." *Exp Eye Res* **64**(5): 737-744.
- Pimentel, A. C. and T. R. Venkatesh (2005). "rap gene encodes Fizzy-related protein (Fzr) and regulates cell proliferation and pattern formation in the developing Drosophila eye-antennal disc." *Dev Biol* **285**(2): 436-46.
- Pineda, J., A., K. Wang, K. W., et al. (2004). "Biomarkers of Proteolytic Damage Following Traumatic Brain Injury." *Brain Pathol* **14**(2): 202-209.
- Poletaev, A. B. (2002). "The Immunological Homunculus (Immunculus) in Normal State and Pathology." *Biochemistry (Moscow)* **67**(5): 600-608.
- Privat, A. (2003). "Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals." *Glia* **43**(1): 91-93.

- Profyris, C., S. S. Cheema, et al. (2004). "Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury." *Neurobiol Dis* **15**(3): 415-436.
- Quigley, H. A. (1996). Number of people with glaucoma worldwide. **80**: 389-393.
- Quigley, H. A. (1999). "Neuronal death in glaucoma." *Prog Retin Eye Res* **18**(1): 39-57.
- Quigley, H. A. and A. T. Broman (2006). "The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020." *Br J Ophthalmol* **90**(3): 262-267.
- Quigley, H. A., S. J. McKinnon, et al. (2000). "Retrograde Axonal Transport of BDNF in Retinal Ganglion Cells Is Blocked by Acute IOP Elevation in Rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(11): 3460-3466.
- Quigley, H. A., R. W. Nickells, et al. (1995). "Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(5): 774-786.
- Radius, R. L. and D. R. Anderson (1981). "Rapid axonal transport in primate optic nerve. Distribution of pressure-induced interruption." *Arch Ophthalmol* **99**(4): 650-654.
- Rajaiah, R. and K. D. Moudgil (2009). "Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity." *Autoimmun Rev* **8**(5): 388-93.
- Ram, M., Y. Sherer, et al. (2006). "Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases." *J Clin Immunol* **26**(4): 299-307.
- Ramirez, J. M., A. TriviÑO, et al. (1996). "Structural Specializations of Human Retinal Glial Cells." *Vis Res* **36**(14): 2029-2036.
- Rancan, M., M. C. Morganti-Kossmann, et al. (2003). "Central Nervous System-Targeted Complement Inhibition Mediates Neuroprotection After Closed Head Injury in Transgenic Mice." *J Cereb Blood Flow Metab* **23**(9): 1070-1074.
- Ransohoff, R. M., P. Kivisakk, et al. (2003). "Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system." *Nat Rev Immunol* **3**(7): 569-581.
- Rappert, A., I. Bechmann, et al. (2004). "CXCR3-Dependent Microglial Recruitment Is Essential for Dendrite Loss after Brain Lesion." *J Neuro Sci* **24**(39): 8500-8509.
- Represa, A., J. Niquet, et al. (1995). "Cell death, gliosis, and synaptic remodeling in the hippocampus of epileptic rats." *J Neurobiol* **26**(3): 413-25.
- Rhee, S. G., S. W. Kang, et al. (2005). "Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins." *Curr Opin Cell Biol* **17**(2): 183-189.
- Rodriguez, D., C. J. Morrison, et al. (2009). "Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics." *Biochim Biophys Acta*.
- Roelofs, M. F., W. C. Boelens, et al. (2006). "Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *J Immunol* **176**(11): 7021-7.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." *Biomed Mass Spectrom* **11**(11): 601.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." *Blood* **90**(3): 909-928.
- Romano, C., D. A. Barrett, et al. (1995). "Anti-rhodopsin antibodies in sera from patients with normal-pressure glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(10): 1968-75.
- Saitoh, H. and J. Hinchey (2000). "Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3." *J Biol Chem* **275**(9): 6252-6258.
- Sakamoto, K. M. (2002). "Ubiquitin-dependent proteolysis: its role in human diseases and the design of therapeutic strategies." *Mol Genet Metab* **77**(1-2): 44-56.
- Sarthy, J., N. S. Bae, et al. (2009). "Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres." *EMBO J* **28**(21): 3390-9.
- Sato, T., M. Van Dixhoorn, et al. (1997). "C1q, a subunit of the first component of complement, enhances antibody-mediated apoptosis of cultured rat glomerular mesangial cells." *Clin Exp Immunol* **109**(3): 510-517.
- Sawai, H., D. B. Clarke, et al. (1996). "Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 Stimulate Growth of Axonal Branches from Regenerating Retinal Ganglion Cells." *J Neuro Sci* **16**(12): 3887-3894.
- Schafer, M. K. H., W. J. Schwaeble, et al. (2000). "Complement C1q Is Dramatically Up-Regulated in Brain Microglia in Response to Transient Global Cerebral Ischemia ,2." *J Immunol* **164**(10): 5446-5452.
- Schaffner, A., C. C. King, et al. (2004). "Induction and antimicrobial activity of platelet basic protein derivatives in human monocytes." *J Leukoc Biol* **76**(5): 1010-8.
- Schaller, M., C. Bigler, et al. (2009). "Autoantibodies against C1q in Systemic Lupus Erythematosus Are Antigen-Driven." *J Immunol* **183**(12): 8225-8231.
- Schenk, B. I., F. Petersen, et al. (2002). "Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL)7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration." *J Immunol* **169**(5): 2602-10.
- Scheschonka, A., Z. Tang, et al. (2007). "Sumoylation in neurons: nuclear and synaptic roles?" *Trends Neurosci* **30**(3): 85-91.
- Scheuerer, B., M. Ernst, et al. (2000). "The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages." *Blood* **95**(4): 1158-66.
- Schlesinger, M. J. (1994). "How the Cell Copes with Stress and the Function of Heat Shock Proteins." *Pediat Res* **36**(1, Part 1): 1-6.
- Schmidt, R. F., Thews, G. (1995). *Physiologie des Menschen*. **26**.
- Schnatwinkel, C., S. Christoforidis, et al. (2004). "The Rab5 Effector Rabankyrin-5 Regulates and Coordinates Different Endocytic Mechanisms." *PLoS Biol* **2**(9): e261.

- Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: From the known and the unknown." *J Cell Physiol* **182**(3): 311-322.
- Schori, H., E. Yoles, et al. (2002). "Immune-related mechanisms participating in resistance and susceptibility to glutamate toxicity." *Eur J Neurosci* **16**(4): 557-64.
- Schweigert, F. J., K. Wirth, et al. (2004). "Characterization of the microheterogeneity of transthyretin in plasma and urine using SELDI-TOF-MS immunoassay." *Proteome Sci* **2**(1): 5.
- Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." *Science* **298**(5594): 789-91.
- Sevvana, M., J. Ahnström, et al. (2009). "Serendipitous Fatty Acid Binding Reveals the Structural Determinants for Ligand Recognition in Apolipoprotein M." *Journal of Molecular Biology* **393**(4): 920-936.
- Shareef, S., A. Sawada, et al. (1999). "Isoforms of Nitric Oxide Synthase in the Optic Nerves of Rat Eyes with Chronic Moderately Elevated Intraocular Pressure." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(12): 2884-2891.
- Sharif, O. and S. Knapp (2008). "From expression to signaling: Roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection." *Immunobiology* **213**(9-10): 701-713.
- Shen, H.-M., Y. Lin, et al. (2004). "Essential Roles of Receptor-Interacting Protein and TRAF2 in Oxidative Stress-Induced Cell Death." *Mol Cell Biol* **24**(13): 5914-5922.
- Shichi, H. (1969). "Microsomal electron transfer system of bovine retinal pigment epithelium." *Exp Eye Res* **8**(1): 60-68.
- Shin, H.-W., M. Hayashi, et al. (2005). "An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway." *J Cell Biol* **170**(4): 607-618.
- Simpson, L. and R. Parsons (2001). "PTEN: Life as a Tumor Suppressor." *Exp Cell Res* **264**(1): 29-41.
- Singh Rao, S. K., J. W. Neal, et al. (1999). "Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease." *Exp Neurol* **159**(2): 362-76.
- Singh Rao, S. K., J. W. Neal, et al. (2000). "Spontaneous classical pathway activation and deficiency of membrane regulators render human neurons susceptible to complement lysis." *Am J Pathol* **157**(3): 905-18.
- Sisto, M., Lisi, S., D'amore, S., D'Amore, M. (2009). "Autoantibodies, human Fcγ receptors, and autoimmunity." *J Receptor Ligand Channel Res* **2**: 45-57.
- Smith, M. A., P. L. R. Harris, et al. (1997). "Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals." *PNAS* **94**(18): 9866-9868.
- Solimena, M. and P. De Camilli (2000). "Synaptic Autoimmunity and the Salk Factor." *Neuron* **28**(2): 309-316.
- Srivastava, S. and R. G. Srivastava (2005). "Proteomics in the forefront of cancer biomarker discovery." *J Proteome Res* **4**(4): 1098-103.
- Stasi, K., D. Nagel, et al. (2006). "Complement Component 1Q (C1Q) Upregulation in Retina of Murine, Primate, and Human Glaucomatous Eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(3): 1024-1029.
- Stasi, K., D. Nagel, et al. (2006). "Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(3): 1024-9.
- Steele, M. R., D. M. Inman, et al. (2006). "Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(3): 977-85.
- Stellwagen, D. and R. C. Malenka (2006). "Synaptic scaling mediated by glial TNF-α." *Nature* **440**(7087): 1054-9.
- Stevens, B., N. J. Allen, et al. (2007). "The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination." *Cell* **131**(6): 1164-1178.
- Streilein, J. W. (1995). "Unraveling immune privilege." *Science* **270**(5239): 1158-9.
- Streilein, J. W. (1999). "Immunoregulatory mechanisms of the eye." *Prog Retin Eye Res* **18**(3): 357-70.
- Sugita, S., T. F. Ng, et al. (2006). "B7+ iris pigment epithelium induce CD8+ T regulatory cells; both suppress CTLA-4+ T cells." *J Immunol* **176**(1): 118-27.
- Tahzib, N. G., N. L. Ransom, et al. (2004). "Alpha-fodrin is cleaved by caspase-3 in a chronic ocular hypertensive (COH) rat model of glaucoma." *Brain Research Bulletin* **62**(6): 491-495.
- Taira, K., M. Umikawa, et al. (2004). "The Traf2- and Nck-interacting Kinase as a Putative Effector of Rap2 to Regulate Actin Cytoskeleton." *J Biol Chem* **279**(47): 49488-49496.
- Takahashi, K., M. Prinz, et al. (2007). "TREM2-Transduced Myeloid Precursors Mediate Nervous Tissue Debris Clearance and Facilitate Recovery in an Animal Model of Multiple Sclerosis." *PLoS Med* **4**(4): e124.
- Taylor, P. R., A. Carugati, et al. (2000). "A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo." *J Exp Med* **192**(3): 359-66.
- Tezel, G., B. C. Chauhan, et al. (2003). "Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(7): 3025-33.
- Tezel, G., M. R. Hernandez, et al. (2000). "Immunostaining of Heat Shock Proteins in the Retina and Optic Nerve Head of Normal and Glaucomatous Eyes." *Arch Ophthalmol* **118**(4): 511-518.
- Tezel, G., G. M. Seigel, et al. (1998). "Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(12): 2277-2287.
- Tezel, G. and M. B. Wax (2000). "Increased production of tumor necrosis factor-α by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells." *J Neurosci* **20**(23): 8693-700.
- Tezel, G. and M. B. Wax (2000). "The Mechanisms of hsp27 Antibody-Mediated Apoptosis in Retinal Neuronal Cells." *J Neurosci* **20**(10): 3552-3562.
- Tezel, G. and M. B. Wax (2004). "Hypoxia-inducible factor 1α in the glaucomatous retina and optic nerve head." *Arch Ophthalmol* **122**(9): 1348-56.
- Tezel, G. M. D. and M. B. M. D. Wax (2003). "Glial Modulation of Retinal Ganglion Cell Death in Glaucoma." *Journal of Glaucoma* **12**(1): 63-68.

- Thatcher, T. H. and M. A. Gorovsky (1994). "Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4." *Nucleic Acids Res* **22**(2): 174-9.
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. (1991). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. **4**: 85.
- Thomas, L. (2000). *Labor und Diagnose*. **5**.
- Trifunovic, A. and N. G. Larsson (2008). "Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing." *J Int Med* **263**(2): 167-178.
- Tsacopoulos, M., C. Poitry-Yamate, L. , et al. (1997). "The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons." *Glia* **21**(1): 84-91.
- Tsan, M. F. and B. Gao (2009). "Heat shock proteins and immune system." *J Leukoc Biol* **85**(6): 905-10.
- Tükel, Ç. (2005). "CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of Salmonella enterica serotype Typhimurium that is recognized by Toll-like receptor 2." *Mol Microbiol* **58**(1): 289-304.
- Ullian, E. M., W. B. Barkis, et al. (2004). "Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity." *Molecular and Cellular Neuroscience* **26**(4): 544-557.
- Uren, A. G., J. Kool, et al. (2008). "Large-scale mutagenesis in p19(ARF)- and p53-deficient mice identifies cancer genes and their collaborative networks." *Cell* **133**(4): 727-41.
- Urich, E., I. Gutcher, et al. (2006). Autoantibody-mediated demyelination depends on complement activation but not activatory Fc-receptors. **103**: 18697-18702.
- Valdez, G., P. Philippidou, et al. (2007). "Trk-signaling endosomes are generated by Rac-dependent macroendocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(30): 12270-5.
- van Domselaar, G. "Peptide Mass Fingerprinting and MS/MS Fragment Ion analysis with MASCOT." **Volume**, DOI:
- Vartiainen, M. K., E. M. Sarkkinen, et al. (2003). "Mammals Have Two Twinfilin Isoforms Whose Subcellular Localizations and Tissue Distributions Are Differentially Regulated." *J Biol Chem* **278**(36): 34347-34355.
- Venteicher, A. S., E. B. Abreu, et al. (2009). "A Human Telomerase Holoenzyme Protein Required for Cajal Body Localization and Telomere Synthesis." *Science* **323**(5914): 644-648.
- Venters, H. D., Q. Tang, et al. (1999). "A new mechanism of neurodegeneration: A proinflammatory cytokine inhibits receptor signaling by a survival peptide." *PNAS J* **96**(17): 9879-9884.
- Vincent, A., J. Palace, et al. (2001). "Myasthenia gravis." *Lancet* **357**(9274): 2122-2128.
- Virchow, R. (1854). "Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose " *Virchows Arch* **6**(1): 135-138.
- Vitzthum, F., F. Behrens, et al. (2005). "Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs." *J Proteome Res* **4**(4): 1086-97.
- Vorwerk, C. K., S. A. Lipton, et al. (1996). "Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**(8): 1618-1624.
- Vorwerk, C. K., R. Naskar, et al. (2000). "Depression of Retinal Glutamate Transporter Function Leads to Elevated Intravitreal Glutamate Levels and Ganglion Cell Death." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(11): 3615-3621.
- Voskuhl, R. R., R. S. Peterson, et al. (2009). "Reactive Astrocytes Form Scar-Like Perivascular Barriers to Leukocytes during Adaptive Immune Inflammation of the CNS." *J Neurosci* **29**(37): 11511-11522.
- Wagstaff, M. J. D., Y. Collaco-Morales, et al. (1999). "Protection of Neuronal Cells from Apoptosis by Hsp27 Delivered with a Herpes Simplex Virus-based Vector." *J Biol Chem* **274**(8): 5061-5069.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." *Cell Death Differ* **10**(1): 45-65.
- Walker, S. M., C. P. Downes, et al. (2001). "TPIP: a novel phosphoinositide 3-phosphatase." *Biochem J* **360**(2): 277-283.
- Wallace, M. N. and S. K. Bisland (1994). "NADPH-diaphorase activity in activated astrocytes represents inducible nitric oxide synthase." *Neuroscience* **59**(4): 905-19.
- Wallin, R. P. A., A. Lundqvist, et al. (2002). "Heat-shock proteins as activators of the innate immune system." *Trends Immunol* **23**(3): 130-135.
- Walshe, T. E., M. Saint-Geniez, et al. (2009). "TGF-beta is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature." *PLoS One* **4**(4): e5149.
- Walter, L. and H. Neumann (2009). "Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration." *Semin Immunopathol*.
- Walz, A. and M. Baggiolini (1989). "A novel cleavage product of [beta]-thromboglobulin formed in cultures of stimulated mononuclear cells activates human neutrophils." *Biochem Biophys Res Commun* **159**(3): 969-975.
- Walz, A. and M. Baggiolini (1990). "Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases." *J Exp Med* **171**(2): 449-454.
- Walz, A., B. Dewald, et al. (1989). "Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils." *J Exp Med* **170**(5): 1745-1750.
- Wang, C.-X., B. C. Fisk, et al. (2000). Overexpression of murine fizzy-related (fzr) increases natural killer cell-mediated cell death and suppresses tumor growth. **96**: 259-263.
- Wang, C. and U. T. Meier (2004). "Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins." *EMBO J* **23**(8): 1857-67.
- Wang, X., S. S.-W. Tay, et al. (2000). "An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma." *Exp Brain Res* **132**(4): 476-484.
- Watson, J. B. e. a. (1994). "Platelet factor 4 modulates the mitogenic activity of basic fibroblast growth factor." *J. Clin. Invest.* **94**: 261-268.

- Wax, M. B., G. Tezel, et al. (1998). "Anti-Ro/SS-a positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma." *Am J Ophthalmol* **125**(2): 145-157.
- Wax, M. B., G. Tezel, et al. (2008). "Induced Autoimmunity to Heat Shock Proteins Elicits Glaucomatous Loss of Retinal Ganglion Cell Neurons via Activated T-Cell-Derived Fas-Ligand." *J Neuro Sci* **28**(46): 12085-12096.
- Wax, M. B., J. Yang, et al. (2001). "Serum autoantibodies in patients with glaucoma." *J Glaucoma* **10**(5 Suppl 1): S22-4.
- Wax, M. B., J. Yang, et al. (2002). "A Model of Experimental Autoimmune Glaucoma in Rats Elicited by Immunization With Heat Shock Protein27." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(12): 2884-.
- Weber, A., C. D. Harman, et al. (2008). "Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina." *J Physiol*.
- Weber, A. J., H. Chen, et al. (2000). "Experimental Glaucoma and Cell Size, Density, and Number in the Primate Lateral Geniculate Nucleus." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(6): 1370-1379.
- Weibel, D., G. W. Kreutzberg, et al. (1995). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in young rat optic nerve." *Brain Research* **679**(2): 249-254.
- Weiner, H. (2008). "A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis." *Journal of Neurology* **255**(0): 3-11.
- Weinreb, R. N. and P. T. Khaw (2004). "Primary open-angle glaucoma." *Lancet* **363**(9422): 1711-1720.
- Wenger, R. H., A. N. Wicki, et al. (1989). "Cloning of cDNA coding for connective tissue activating peptide III from a human platelet-derived lambda gt11 expression library." *Blood* **73**(6): 1498-1503.
- Whitlock, N. A., N. Agarwal, et al. (2005). "Hsp27 Upregulation by HIF-1 Signaling Offers Protection against Retinal Ischemia in Rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(3): 1092-1098.
- Whitlock, N. A., K. Lindsey, et al. (2005). "Heat Shock Protein 27 Delays Ca²⁺-Induced Cell Death in a Caspase-Dependent and -Independent Manner in Rat Retinal Ganglion Cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(3): 1085-1091.
- Whitney, K. D., P. I. Andrews, et al. (1999). "Immunoglobulin G and complement immunoreactivity in the cerebral cortex of patients with Rasmussen's encephalitis." *Neurology* **53**(4): 699-708.
- Wilson, J. X. (1997). "Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes." *Can J Physiol Pharmacol* **75**(10-11): 1149-63.
- Woldemussie, E., M. Wijono, et al. (2004). "Müller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats." *Glia* **47**(2): 109-119.
- Wolfrum, C., M. N. Poy, et al. (2005). "Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis." *Nat Med* **11**(4): 418-22.
- Woller, G., E. Brandt, et al. (2008). "Platelet factor 4/CXCL4-stimulated human monocytes induce apoptosis in endothelial cells by the release of oxygen radicals." *J Leukoc Biol*.
- Woller, G., L. Leonhardt, et al. (2009). "Regulation of T cell chemotaxis by CXCL4." *Cell Comm Signaling* **7**(Suppl 1): A94.
- Wood, Z. A., L. B. Poole, et al. (2003). "Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling." *Science* **300**(5619): 650-653.
- Woodruff, M. F. A. and H. G. Woodruff (1950). "The Transplantation of Normal Tissues: With Special Reference to Auto- and Homotransplants of Thyroid and Spleen in the Anterior Chamber of the Eye, and Subcutaneously, in Guinea-Pigs." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **234**(619): 559-582.
- Wucherpfennig, K. W., H. L. Weiner, et al. (1991). "T-cell recognition of myelin basic protein." *Immunol Today* **12**(8): 277-282.
- Xiao, Z., G. P. Visentin, et al. (2008). "Immune complexes formed following the binding of anti-platelet factor 4 (CXCL4) antibodies to CXCL4 stimulate human neutrophil activation and cell adhesion." *Blood* **112**(4): 1091-1100.
- Xu, H., M. Chen, et al. (2009). "Para-inflammation in the aging retina." *Prog Retin Eye Res* **28**(5): 348-368.
- Xu, H., R. Dawson, et al. (2007). "Identification of Novel Dendritic Cell Populations in Normal Mouse Retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(4): 1701-1710.
- Xu, N., X.-Y. Zhang, et al. (2002). "Effects of Platelet-Activating Factor, Tumor Necrosis Factor, and Interleukin-1[alpha] on the Expression of Apolipoprotein M in HepG2 Cells." *Biochem Biophys Res Commun* **292**(4): 944-950.
- Yamada, K., T. Miwa, et al. (2004). "Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59." *J Immunol* **172**(6): 3869-75.
- Yamaguchi, T., C. Miyashita, et al. (2009). "JNK-binding protein 1 regulates NF-[kappa]B activation through TRAF2 and TAK1." *Cell Biol Int* **33**(3): 364-368.
- Yanase, K., R. M. Smith, et al. (1997). "Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1." *J Clin Invest* **100**(1): 25-31.
- Yang, J., R. V. Patil, et al. (2001). "T cell subsets and sIL-2R/IL-2 levels in patients with glaucoma." *Am J Ophthalmol* **131**(4): 421-426.
- Yang, J., G. Tezel, et al. (2001). "Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(6): 1273-6.
- Yang, L. P., X. A. Zhu, et al. (2007). "A possible mechanism of microglia-photoreceptor crosstalk." *Mol Vis* **13**: 2048-57.
- Yau, K. W. and D. A. Baylor (1989). "Cyclic GMP-Activated Conductance of Retinal Photoreceptor Cells." *Ann Rev Neurosci* **12**(1): 289-327.
- Ye, J. Z.-S., J. R. Donigian, et al. (2004). TIN2 Binds TRF1 and TRF2 Simultaneously and Stabilizes the TRF2 Complex on Telomeres. **279**: 47264-47271.

- Ye, J. Z., J. R. Donigian, et al. (2004). "TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres." *J Biol Chem* **279**(45): 47264-71.
- Yoles, E. and M. Schwartz (1998). "Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: implications for optic nerve neuropathies." *Exp Neurol* **153**(1): 1-7.
- Yonekura, K., S. Yokota, et al. (2004). "Prevalence of anti-heat shock protein antibodies in cerebrospinal fluids of patients with Guillain-Barre syndrome." *J Neuroimmunol* **156**(1-2): 204-9.
- Yong, V. W. and S. Marks (2010). "The interplay between the immune and central nervous systems in neuronal injury." *Neurology* **74**(1_Supplement_1): S9-16.
- Yuan, L. and A. H. Neufeld (2001). "Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head." *J Neurosci Res* **64**(5): 523-32.
- Yücel, Y. H., Q. Zhang, et al. (2000). "Loss of Neurons in Magnocellular and Parvocellular Layers of the Lateral Geniculate Nucleus in Glaucoma." *Arch Ophthalmol* **118**(3): 378-384.
- Yücel, Y. H., Q. Zhang, et al. (2001). "Atrophy of Relay Neurons in Magno- and Parvocellular Layers in the Lateral Geniculate Nucleus in Experimental Glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(13): 3216-3222.
- Yücel, Y. H., Q. Zhang, et al. (2003). "Effects of retinal ganglion cell loss on magno-, parvo-, koniocellular pathways in the lateral geniculate nucleus and visual cortex in glaucoma." *Prog Retin Eye Res* **22**(4): 465-481.
- Zhang, P., C. Dilley, et al. (2007). "DNA damage responses in neural cells: Focus on the telomere." *Neuroscience* **145**(4): 1439-48.
- Zhong, Y. S., C. K. Leung, et al. (2007). "Glial cells and glaucomatous neuropathy." *Chin Med J (Engl)* **120**(4): 326-35.
- Zhou, L., R. W. Beuerman, et al. (2009). "Elevation of Human {alpha}-Defensins and S100 Calcium-Binding Proteins A8 and A9 in Tear Fluid of Patients with Pterygium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(5): 2077-2086.
- Zhou, L., L. Q. Huang, et al. (2004). "Proteomic analysis of human tears: defensin expression after ocular surface surgery." *J Proteome Res* **3**(3): 410-6.
- Zhou, Y., K. H. Kok, et al. (2000). "Mouse Peroxiredoxin V Is a Thioredoxin Peroxidase That Inhibits p53-Induced Apoptosis." *Biochem Biophys Res Commun* **268**(3): 921-927.
- Zidek, Z., P. Anzenbacher, et al. (2009). Current status and challenges of cytokine pharmacology. **157**: 342-361.
- Zimmermann, C. W., Weiss, G. (1987). "Antibodies not directed against the acetylcholine receptor in myasthenia gravis. An immunoblot study." *J Neuroimmunol*. **16**: 225-236.
- Zlokovic, B. V. (2005). "Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration." *Trends Neurosci* **28**(4): 202-208.
- Zur, D. and S. Ullman (2003). "Filling-in of retinal scotomas." *Vis Res* **43**(9): 971-982.
- Zweifel, L. S., R. Kuruvilla, et al. (2005). "Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling." *Nat Rev Neurosci* **6**(8): 615-25.

8 Anhang

8.1 Veröffentlichung

Grus FH, J. S., Wuenschig D, Rieck J, Pfeiffer N. (2008). "Autoimmunity and glaucoma."
J Glaucoma. **17**(1): 79-84.

8.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Geräte

Aceton (C ₃ H ₆ O)	Merck, Darmstadt
Acetonitril (C ₂ H ₃ N)	Merck, Darmstadt
Ameisensäure (CH ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumcitrat (C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇)	Merck, Darmstadt
α-PDGF-AB produced in goat, IgG fraction of antiserum (Sigma P6101)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua bidest	Apotheke der Uniklinik Mainz
Aqua bidest HPLC-Grade	Mallinckrodt Baker, Holland
BSA (Bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
CHCA (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,5-Dimethoxy-4-hydroxizimtsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMP (Dimethylpimelimidat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Roth, Karlsruhe
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Biomedicals, USA
Monoethanolamin (C ₂ H ₇ NO, MEA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumphosphat (Na ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kupfersulfat (CuSO ₄)	Merck, Darmstadt
n-Dodecyl-β-D-maltosid	Sigma-Aldrich, Steinheim
n-Octyl 1-thio-β-D-glucopyranosid	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Propanol (C ₃ H ₈ O)	Merck, Darmstadt
Methanol (CH ₃ OH)	J.T. Baker, Holland
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
SDS (Sodium Dodecylsulfate)	MP Biomedicals, USA
Triethanolamin (C ₆ H ₁₅ NO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trifluoressigsäure (C ₂ HF ₃ O ₂ , TFA)	Merck, Darmstadt
Trypsin (Proteomics Grade)	Promega, USA

Brut-/Wärmeschränke:

Heraeus B6200
Memmert BKE 50
Memmert KE 400

Elektrophoresekammern:

Boimetra Maxigel
Novex Mini-Cell

Färbesystem:

Novex Stainer A & Stainer B, Invitrogen

Geldokumentation:

Flachbettscanner CanoScan 8400 F

HPLC-Pumpen:

BioRad HPLC-Pump 2800

(Tief-) Kühlschränke:

- 80° C: Thermo- Electron
 - 20° C: Bosch Hausgeräte
 +4 °C: Liebherr
 Klimaschrank: Liebherr

Magnetrührer:

IKA-Combimag

Massenspektrometer:

Ultraflex I, Bruker Daltonik, Bremen
 SELDI TOF, BioRad, USA

Netzgeräte für Elektrophorese:

Amersham Pharmacia ECPS 3000/150

Schüttler:

Heidolph Duomax
 KTMR-133 KühlThermoMixer
 Reax Top Vortexer, Heidolph
 Dr.Lange - LQG 008 Vortexer

Transferpipetten:

2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1 ml, 5 ml

Eppendorf, Hamburg

pH-Meter:

Knick pH-Meter 766 Calimatic

Fotometer:

Multiscan Ascent

Thermo-Electron, Langenselbold

Waagen:

Sartorius A200S

Wasserbäder:

Julabo
 GFL-1012

Zentrifugen:

Eppendorf 5415D
 Eppendorf 5810R
 Eppendorf Concentrator 5301
 Heraeus Biofuge Pico

Verwendete Software:

Adobe Acrobat 7.0 Professional
 Adobe Photoshop 8
 Biotoools 3.1
 CIPHERgenexpress 3.0
 CIPHERgen Protein Chip Software 3.2
 Endnote X

Adobe Systems Software Ireland Ltd.
 Adobe Systems Software Ireland Ltd.
 Bruker Daltonik, Bremen
 BioRad, USA
 BioRad, USA
 Thomson Reuters, USA

Flex Analysis 2.4
 Nero - Burning Rom
 Office 2007
 Statistica 7
 TotalCommander 6.55
 yED

Bruker Daltonik, Bremen
 Nero, Karlsbad
 Microsoft, USA
 Statsoft, USA
 Ghisler & Co., CH-3065 Bolligen
 yWorks, Tübingen

Lösungen und Puffer:

Ammoniumbicarbonat [50 mM] (Stammlösung)
 Ammoniumcitrat [0,1 M], pH 3 (Stammlösung)
 CHCA-Matrix: 20 mg CHCA in 5 ml HPLC- Wasser, 5 ml Acetonitril und 10 µl TFA
 Citrat-Puffer pH 3, 0,1 M
 DMP [20 mM] (Dimethylpimelimidat 2x HCl in 0,2 M Triethanolamin, pH 8,2)
 Elutionslösg.: CH₂O₂ 50%, ACN 25 %, 2-Propanol 15 %, A. bidest 10 %, SDS 0,01 %
 Natriumacetat [100 mM], pH 5
 Natriumacetat [100 mM], pH 5, 0,1 % OGP
 n-Dodecyl-β-D-maltosid [0,1 %] (Stammlösung)
 Natriumphosphat [0,1 M], pH 7 (Stammlösung)
 Natriumphosphat [0,1 M], pH 7 + 0,1 % OGP
 PBS-Fertigpuffer, GIBCO Invitrogen
 PBS + 0,1 % OGP
 SPA-Matrix: 20 mg SPA in 750 µl HPLC-Wasser, 750 µl Acetonitril, 15 µl TFA
 Triethanolamin [0,2 M], pH 8,0
 Tris [50 mM], pH 7,5
 Trypsin Stocksolution [0,1 µg / µl]
 LDS Probenpuffer 4x, Invitrogen
 MES SDS 20x Fertigpuffer, Invitrogen

MW-Standard:

Benchmark, Invitrogen, USA
 Seebblue Plus 2, Invitrogen, USA

Verbrauchsmaterialien:

Blaukappenflaschen
 DynaBeads Protein G
 Falcon Reaktionsgefäße
 Flüssiger Stickstoff
 MTP AnchorChip 600-384
 Microcon-Zentrifugalfilter
 Nitrilhandschuhe
 NuPAGE Fertiggel, BisTris 12%
 Parafilm M
 Pasteurpipetten
 Pipettenspitzen
 Reaktionsgefäße
 Softstrips PCR-Tubes 200 µl
 Protein Chip Arrays (CM10, NP20, H50)
 Whatman - Papier

Fischer, Frankfurt
 Invitrogen, USA
 Becton & Dickinson, USA
 Gaslager, Uniklinik Mainz
 Bruker, Bremen
 Millipore, USA
 Kimberly-Clark, USA
 Invitrogen, USA
 ANC, Greenwich, USA
 WU, Mainz
 Roth, Karlsruhe
 Eppendorf, Hamburg
 Biozym, Hess. Oldendorf
 BioRad, USA
 Fischer, Frankfurt

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt durch das menschliche Auge	8
Abbildung 2: Kammerwasserfluss	9
Abbildung 3: Sehnerv und Papille.....	10
Abbildung 4: <i>bcl-2</i> und <i>bik</i> entscheiden über Leben und Tod	11
Abbildung 5: Die Funktionsweise der TLR-Familie	15
Abbildung 6: Hypothetischer Mechanismus der Neurodegeneration im ZNS unter Beteiligung der angeborenen und adaptiven Immunität	19
Abbildung 7: Verteilung von C1q-Transkripten in der Retina	23
Abbildung 8: Gefrierdünnsschnitte postnataler Mausretinae.....	24
Abbildung 9: Potentielle Signalkaskade des TREM- Rezeptors	29
Abbildung 10: Das Rezeptorrepertoire der Mikroglia	30
Abbildung 11: Distribution von GFAP in der Retina	31
Abbildung 12: Zusammenfassung aller bekannten Faktoren und Mechanismen, die beim Glaukom über das Schicksal der RGC bestimmen	36
Abbildung 13: SELDI-Spektrum von Fraktion 30 (komplettes Spektrum).....	49
Abbildung 14: SELDI-Spektrum von Fraktion 30 (unterer Massenbereich)	49
Abbildung 15: SELDI-Spektrum von Fraktion 31 der C18-Auftrennung.....	50
Abbildung 16: Prinzip des MALDI-ToF®	52
Abbildung 17: Die am häufigsten beobachteten Peptidfragmente sind α , β - und γ -Ionen.....	53
Abbildung 18: Spektrum-Ansicht der Biotools-Software mit detektierten Fragment-Größen und erzielter Sequenzabdeckung	54
Abbildung 19: Workflow für die Biomarkeridentifizierung	56
Abbildung 20: Gellauf einer Kammerwasserfraktionierung nach Fraktionierung über Microcon-Filter	63
Abbildung 21: Gellauf einer Kammerwasserfraktionierung über C18-Beads.....	64
Abbildung 22: SELDI-Spektren der von der MARS-Säule eluierten Fraktionen	65
Abbildung 23: SDS-Gel mit gepoolten Tränen-HPLC-Fraktionen.....	66
Abbildung 24: SDS-Gel mit gepoolten Tränen-HPLC-Fraktionen.....	67
Abbildung 25: Exemplarisches Ergebnis der Eluate mit Polymerkontamination.....	68
Abbildung 26: SELDI-Spektren der Eluat-Fraktionen 6,7 und 8.	68
Abbildung 27: SELDI-Spektrum des Eluates 7 nach der Ionenpaarextraktion.....	69
Abbildung 28: SELDI-Spektrum der SCX-Fraktion 30 mit Peak-Gruppe bei 9 kDa (Pfeil).....	70
Abbildung 29: SELDI-TOF® Spektrum von Fraktion 31 mit CXCL7-Peak bei 9311 Da.....	70
Abbildung 30: Gel mit stark aufkonzentrierten PDGF-Eluaten	72
Abbildung 31: Mascot-Identifizierung für CXCL4.	73
Abbildung 32: SELDI-Spektrum mit CXCL4-Peak bei 7795 Da.....	73
Abbildung 33: Mascot-Identifizierung für C1q	74

Abbildung 34: SELDI-Spektrum mit C1q-Peak bei 19828 Da	74
Abbildung 35: Mascot-Identifizierung für TPTE2.....	75
Abbildung 36: SELDI-Spektrum mit TPTE2-Peak bei 23578 Da	75
Abbildung 37: Mascot-Identifizierung für Albumin	76
Abbildung 38: SELDI-Spektrum mit Albumin-Peak bei 67748 Da	76
Abbildung 39: Mascot-Identifizierung für Transferrin.....	77
Abbildung 40: SELDI-Spektrum mit Transferrin-Peaks bei 80 kDa und 9800 Da	77
Abbildung 41: Mascot-Identifizierung für Transferrin TNIK.....	78
Abbildungen 42 und 43: SELDI-Spektren mit TNIK-Peaks bei 4186 und 4183 Da.....	78
Abbildung 44: Mascot-Identifizierung für Transthyretin	79
Abbildung 45: SELDI-Spektrum mit Transthyretin-Peak bei 13986 Da	79
Abbildung 46: Schematische Übersicht der über ein präparatives Gel aufgetrennten PDGF- Euate.....	80
Abbildung 47: Mascot-Resultat für ARL15.....	81
Abbildung 48: SELDI-Spektrum mit ARL15-Peak bei 7115 Da	81
Abbildung 49: Mascot-Identifizierung von Apolipoprotein M.....	82
Abbildung 50: SELDI-Spektren mit ApoM-Peak bei 15142 Da.....	82
Abbildung 51: Mascot-Identifikation von Fizzy-related protein homolog.....	83
Abbildung 52: SELDI-Spektrum mit FZR-Peak bei 3359 Da	83
Abbildung 53: Mascot-Resultat für NOLA3	84
Abbildung 54: SELDI-Spektrum mit NOLA3-Peak bei 7419 Da	84
Abbildung 55: Mascot-Resultat für NOLA3	84
Abbildung 56: SELDI-Spektrum mit NOLA3-Peak bei 7114 Da	84
Abbildung 57: Mascot-Resultat für NOLA3	85
Abbildung 58: SELDI-Spektrum mit NOLA3-Peak bei 7738 Da	85
Abbildung 59: Mascot-Resultat für IFT74.....	85
Abbildung 60: SELDI-Spektrum mit IFT74-Peaks bei 7581 und 8483 Da	86
Abbildung 61: SELDI-Spektrum mit IFT74-Peak bei 8425 Da.....	86
Abbildung 62: Mascot-Resultat für die NMBR-Identifikation.....	87
Abbildung 63: SELDI-Spektrum mit NMBR-Peaks bei 5808 und 9276 Da	87
Abbildung 64: Mascot-Resultat für die NMBR-Identifikation.....	87
Abbildung 65: SELDI-Spektrum mit NMBR-Peaks bei 5809 und 9275 Da	87
Abbildung 66: Mascot-ID für RBNS5 (a).....	88
Abbildung 67: SELDI-Spektrum mit Rabenosyn-5-Peak bei 5810 Da	88
Abbildung 68: Mascot-ID für RBNS5 (b).....	89
Abbildung 69: SELDI-Spektrum mit Rabenosyn-5-Peak bei 5822 Da	89
Abbildung 70: Mascot-ID für SUMO3 (a).....	89
Abbildung 71: SELDI-Spektrum mit SUMO-3-Peak bei 9294 Da	90

Abbildung 72: Mascot-ID für SUMO3 (b)	90
Abbildung 73: SELDI-Spektrum mit SUMO-3-Peak bei 9286 Da	90
Abbildung 74: Mascot-ID für TE2IP (a)	90
Abbildung 75: SELDI-Spektrum mit TE2IP-Peak bei 3358 Da	91
Abbildung 76: Mascot-ID für TE2IP (b)	91
Abbildung 77: SELDI-Spektrum mit TE2IP-Peak bei 3358 Da	91
Abbildung 78: Mascot-ID für TE2IP (c)	91
Abbildung 79: SELDI-Spektrum mit TE2IP-Peak bei 3359 Da	91
Abbildung 80: Mascot-Identifikation von TLR7 (a)	92
Abbildung 81: SELDI-Spektrum mit TLR7-Peak bei 9275 Da	92
Abbildung 82: Mascot-Identifikation von TLR7 (b)	93
Abbildung 83: SELDI-Spektrum mit TLR7-Peak bei 9286 Da	93
Abbildung 84: Mascot-Identifikation von TLR7 (c).....	93
Abbildung 85: SELDI-Spektrum mit TLR7-Peak bei 9276 Da	94
Abbildung 86: Mascot-Identifikation von Twinfilin 2.....	94
Abbildung 87: SELDI-Spektrum mit TWF2-Peak bei 4337 Da	94
Abbildung 88: Beispiel eines präparativen Gels mit Fraktionen einer C18-Tränen- Auftrennung.....	95
Abbildung 89: SELDI-Spektrum mit Ki-67-Peak bei 5816 Da.....	96
Abbildung 90: SELDI-Spektrum mit Ki-67-Peak bei 5817 Da.....	96
Abbildung 91: SELDI-Spektrum mit ARMX1-Peak bei 3458 Da.....	97
Abbildung 92: SELDI-Spektrum mit ARMX1-Peak bei 3456 Da.....	97
Abbildung 93: Mascot-Identifikation von Beta-2-Microglobulin.....	97
Abbildung 94: SELDI-Spektrum mit B2MG -Peak bei 11796 Da.....	97
Abbildung 95: Mascot-Identifikation von Lipocalin 1	98
Abbildung 96: SELDI-Spektrum mit Lipocalin-Peak bei 17588 Da.....	98
Abbildung 97: Mascot-Identifikation von Lipophilin-C.....	98
Abbildung 98: Mascot-Identifikation von Lipophilin-A.....	98
Abbildung 99: SELDI-Spektrum mit Lipophilin-C-Peak bei 10220 Da und Lipophilin-A-Peak bei 10117Da.....	99
Abbildung 100: SELDI-Spektrum mit MACF1 -Peak bei 4996 Da	99
Abbildung 101: SELDI-Spektrum mit MACF1 -Peaks bei 4974 und 4999 Da.....	99
Abbildung 102: Mascot-Identifikation von PRDX5.....	100
Abbildung 103: SELDI-Spektrum mit PRDX5-Peak bei 3314 Da.	100
Abbildung 104: Mascot-Identifikation von PRDX5.....	100
Abbildung 105: SELDI-Spektrum mit PRDX5-Peak bei 3314 Da.	101
Abbildung 106: Mascot-Identifikation von PIP.....	101
Abbildung 107: SELDI-Spektrum mit PIP-Peak bei 3451 Da	101

Abbildung 108: SELDI-Spektrum mit PRP4-Peaks bei 14446, 5809, 5078 und 4093 Da....	102
Abbildung 109: Doppelpeak bestehend aus Signalen bei 4093 und 4066Da.....	102
Abbildung 110: Mascot-Identifikation von S100-A8.....	103
Abbildung 111: SELDI-Spektrum mit S100-A8-Peaks bei 10898 und 4993 Da.....	103
Abbildung 112: SELDI-Spektrum mit α -Fodrin -Peak bei 4973 Da.....	104
Abbildung 113: SELDI-Spektrum mit TNIK -Peak bei 3388Da.....	104
Abbildung 114: Mascot-Identifikation von Ubiquitin.....	105
Abbildung 115: SELDI-Spektrum mit Ubiquitin- Peaks bei 8605, 3920 und 3347 Da.....	105
Abbildung 116: Die unkontrollierte Freisetzung von Il-1 als auslösender Mechanismus von inflammatorischen und autoimmunen Prozessen.. ..	116
Abbildung 117: Angriffsmechanismen zytotoxischer T-Zellen.....	117
Abbildung 118: Die Beteiligung von SUMO an neurodegenerativen Prozessen	120
Abbildung 119: Zusammenfassung aller bekannten Faktoren und Mechanismen, die beim Glaukom über das Schicksal der RGC bestimmen, versehen mit identifizierten Biomarker- Kandidaten.....	125

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Identifikationen aus der Tränenflüssigkeit	69
Tabelle 2: Mascot-Resultate der Fraktion 31 (1. Messung; Spot E3).....	71
Tabelle 3: Mascot-Resultate der Fraktion 31 (2. Messung; Spot E4).....	71
Tabelle 4: Über α -PDGF-Beads erzielte Identifikationen aus dem Serum.....	79
Tabelle 5: Über 2-D-HPLC erzielte Identifikationen aus dem Serum.....	95
Tabelle 6: Über C18-HPLC erzielte Identifikationen aus der Tränenflüssigkeit.	105
Tabelle 7: Auflistung aller identifizierten Proteine aus Serum und Tränenflüssigkeit.....	106

9 Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Mainz, den 16.05.2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ried', is centered on the page. The signature is written in a cursive style with a large initial 'J'.

Unterschrift

