

Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Analyse des menschlichen Tränenproteoms von Glaukmapatienten mit
Medikamenten-assoziiierter Sicca Symptomatik

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Laura Carolin Gronbach
aus Speyer

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

06. Juli 2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Das Glaukom und die medikamentöse Glaukomtherapie	3
2.1.1 Das Glaukom	3
2.1.2 Die medikamentöse Glaukomtherapie	6
2.2 Glaukommedikamenten-assoziierte Erkrankungen der Augenoberfläche..	14
2.2.1 Epidemiologie.....	14
2.2.2 Erkrankungen der Augenoberfläche.....	15
2.2.3 Das Glaukommedikamenten-assoziierte trockene Auge.....	35
2.3 Proteomik	39
2.3.1 Grundlagen	39
2.3.2 Tränenproteomik	44
3 Material und Methoden.....	50
3.1 Material	50
3.1.1 Chemikalien	50
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	50
3.1.3 Geräte	51
3.1.4 Software und Datenbanken.....	51
3.2 Methoden	52
3.2.1 Patientenproben.....	52
3.2.2 Discovery Studien	55
3.2.3 Accurate Inclusion Mass Screening (AIMS) basierte Studie	66
4 Ergebnisse	73

4.1	Discovery Proteomik Strategien zur Analyse humaner Tränenflüssigkeit ..	73
4.1.1	Auswertung der eindimensionalen Gelelektrophorese	73
4.1.2	LFQ Analyse und statistische Auswertung	74
4.2	AIMS Strategie zur Analyse humaner Tränenflüssigkeit	77
4.2.1	LFQ Analyse und statistische Auswertung	77
4.3	Funktionelle Klassifizierung und Proteininteraktionsnetzwerk Analyse	79
4.3.1	Discovery Proteomik	79
4.3.2	AIMS	82
4.3.3	Signalwege, Pathologien und biologische Funktionen	88
5	Diskussion	102
5.1	Discovery Proteomik Strategie zur Analyse humaner Tränenflüssigkeit ..	105
5.2	AIMS Strategie zur Analyse humaner Tränenflüssigkeit	114
6	Zusammenfassung	125
	Literaturverzeichnis	VIII
	Anhang	XXI
	Danksagung	XXI
	Tabellarischer Lebenslauf.....	XXII

Abkürzungsverzeichnis

1DE	Eindimensionale Gelelektrophorese
%	Prozent
>	mehr als
<	weniger als
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Ach	Acetylcholin
ACN	Acetonitril
ADDE	Aqueous Deficient Dry Eye
AGC	Automatic Gain Control
AIMS	Accurate Inclusion Mass Screening
ANOVA	Analysis of Variance
BAK	Benzalkoniumchlorid
BCA	Bicinchoninic Acid
bspw.	beispielsweise
BST I	Basaler Schirmer Test I
BVA	Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V.
ca.	circa
CAM	Cystein Carbamidomethylierung
CFS	Corneal Fluorescein Staining
CGRP	Calcitonin Gene-Related Protein
CID	Collision-induced Dissociation
COX2	Cyclooxygenase 2
CTRL	Kontrollgruppe
Da	Dalton
DE	Dry Eye
DES	Dry Eye Syndrome
DEWS	Dry Eye Workshop
DOG	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft
DRY	Dry Eye
DRYaq	Aqueous Deficient Dry Eye
DRYlip	Evaporative Dry Eye
DTT	Dithiotreitol
EDE	Evaporative Dry Eye
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP-Rezeptor	Prostaglandin E-Rezeptor
ESI	Electrospray Ionisation
FDR	False Discovery Rate
FP-Rezeptor	Prostaglandin F2-alpha Rezeptor
GC	Glucocorticoid

GLM	Glaukomgruppe
GLM + DRYaq	Glaukom-Sicca Gruppe
GO	Gene Ontology
HbA1C	Hämoglobin A1c
IAA	Iodacetamid
IL	Interleukin
IOD	Intraokulärer Druck, Augeninnendruck
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
iTRAQ	Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
kV	Kilovolt
L, I	Liter
LASIK	Laser-in-situ-Keratomileusis
LC	Liquid Chromatography
LDL	Low Density Lipoprotein
LFQ	Label-free Quantitative
LIPCOF	Lidkantenparallele konjunktivale Falten
LTQ	Linear Quadrupole Ion Trap
<i>m/z</i>	Masse zu Ladungs Verhältnis
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization
MAO	Monoaminoxidase
MAP	Mitogen-activated Protein
MCG	Medically Controlled Glaucoma
MGD	Meibomian Gland Dysfunction
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mOsm	Milliosmol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
MUC	Muzin, Muzine
NA	Noradrenalin
NCE	Normalized Collision Energy
Ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor
NMCG	Non-medically Controlled Glaucoma
NPY	Neuropeptid Y
NSDE	Non-Sjögren Dry Eye
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
NTG	Normal Tension Glaucoma
o.	oder
OAHFA	(O-Acetyl)- ω -hydroxyfettsäuren
OH	Ocular Hypertension
OSDI	Ocular Surface Disease Index

P	Preserved, konservierungsmittelhaltig
PACG	Primary Angle Closure Glaucoma
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCG	Primary Congenital Glaucoma
PEXG	Pseudoexfoliation Glaucoma
PF	Preservative-free
PGA	Prostaglandinanaloga
POAG	Primary Open Angle Glaucoma
ppm	Parts per million
PRP	Platelet Rich Plasma
PTM	Posttranslational Modifications
PXF	Exfoliation Syndrome
PXG	Pseudoexfoliation Glaucoma
Rh-NGF	Recombinant Human Nerve Growth Factor
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMILE	Small Incision Lenticule Extraction
sog.	sogenannt, sogenannter, sogenannte
SRM	Selected Reaction Monitoring
SS	Sjögren Syndrom
SSDE	Sjögren Syndrom Dry Eye
TBUT	Tear Breakup Time
TFA	Trifluoressigsäure
TFOS	Tear Film & Ocular Surface Society
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TOF	Time of Flight
TSG-6	Tumornekrosefaktor-induzierbares Gen-6-Protein
u.a.	unter anderem
u.w.	und weitere
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumen/Volumen
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kammerwasserabfluss	5
Abbildung 2: Die Augenoberfläche	16
Abbildung 3: Die Lakrimale Funktionseinheit.....	19
Abbildung 4: Der Tränenfilm	22
Abbildung 5: DES Klassifikation	25
Abbildung 6: Pathophysiologie DES	29
Abbildung 7: LTQ Orbitrap.....	40
Abbildung 8: 1DE Gel	73
Abbildung 9: Venn Diagramm.....	74
Abbildung 10: Heatmap Discovery I	75
Abbildung 11: Heatmap Discovery II	76
Abbildung 12: Heatmap AIMS	78
Abbildung 13: IPA Discovery I	80
Abbildung 14: IPA Discovery II	81
Abbildung 15: IPA AIMS GLM vs. CTRL.....	85
Abbildung 16: IPA AIMS GLM+DRYaq vs. CTRL.....	86
Abbildung 17: IPA AIMS DRYaq vs. CTRL.....	87
Abbildung 18: Identifizierte Signalwege	93
Abbildung 19: Darstellung der mit relevanten Signalwegen assoziierten Proteine ...	94
Abbildung 20: Heatmap „Upstream Regulators“	95
Abbildung 21: IL6 assoziierte Proteine	96
Abbildung 22: IL15 und IL22 assoziierte Proteine	97
Abbildung 23:Heatmap Erkrankungen und biologischen Funktionen	98
Abbildung 24:"Inflammatory Response" assoziierte Proteine bei GLM + DRYaq vs. CTRL.	99
Abbildung 25: „Apoptosis“ assoziierte Proteine aus AIMS.....	100
Abbildung 26: „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ und „Antimikrobielle Antwort“ assoziierte Proteine für GLM+DRYaq.....	101
Abbildung 27: Möglicher pathophysiologischer Mechanismus bei der Entstehung eines Glaukommedikamenten-assoziierten trockenen Auges.....	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zu aktuell verwendeten Antiglaukomatosa mit Informationen zu Anwendung, Wirkmechanismus, Nebenwirkungen und Konservierungsmitteln	11
Tabelle 2: Übersicht zu potenziellen Risikofaktoren für DES	24
Tabelle 3: Übersicht über relevante proteomische Studien zum Thema Glaukommedikamenten-assoziiertes trockenes Auge	49
Tabelle 4: Studienproben Discovery	57
Tabelle 5: Studienproben AIMS	66
Tabelle 6: Weiterführende Informationen zu den Studienproben der Glaukom Gruppen.	69
Tabelle 7: AIMS Peptidliste	XXI
Tabelle 8: Darstellung der signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen GLM + DRYaq und CTRL. Die Proteine sind nach ihren Gennamen aufgelistet (Discovery I and II).	XXIV
Tabelle 9: Ergebnisse statistische Auswertung. Zur Darstellung der Signifikanz der Angaben wurden der p-Wert und die log ₂ Differenz herangezogen.	XXVI
Tabelle 10: p-Werte Canonical pathways	XXIX
Tabelle 11: p-Werte Upstream Regulators	XXX
Tabelle 12: z-score Upstream Regulators	XXX
Tabelle 13 p-Werte diseases and biological functions	XXXI
Tabelle 14 z-Score diseases and biological functions	XXXII

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Das Glaukom, im Volksmund auch als grüner Star bezeichnet, zählt zu den bedeutendsten Erkrankungen im Bereich der Ophthalmologie. Dies ist zum einen der Vielschichtigkeit des Krankheitsbildes geschuldet, zum anderen aber auch seiner verheerenden Folgen bei unerkannter Progredienz. In Deutschland gilt das Glaukom nach der altersbedingten Makuladegeneration als zweithäufigste Ursache für Erblindung [1]. Eine Erhöhung des Augeninnendrucks gilt als Hauptrisikofaktor [2]. Ungefähr 10% der Betroffenen entwickeln daraus ohne rechtzeitige Behandlung ein manifestes Glaukom [3].

Beim Glaukom handelt es sich nicht um ein klar abgrenzbares Krankheitsbild, vielmehr steht der Terminus für eine Reihe ophthalmologischer Erkrankungen unterschiedlichster Genese, die allesamt in der Zerstörung retinaler Ganglienzellen resultieren [4, 5]. Zu Beginn sind meist keine Symptome zu vermerken, sodass die Diagnose meist erst in späten Stadien gestellt werden kann [6, 7]. Zudem gilt die Verwendung topischer Medikamente zur Augeninnendrucksenkung noch immer als Therapie der ersten Wahl. Doch diese Therapieform birgt Risiken: In Deutschland leiden über 50% der Glaukumpatienten, die mit einem oder mehreren topischen Medikamenten zur Augeninnendrucksenkung behandelt werden, an einem trockenen Auge [8]. Zahlreiche klinische Studien konnten bereits bestätigen, dass die Bestandteile antiglaukomatöser Augentropfen zu relevanten Veränderungen auf der Augenoberfläche führen. Diese Veränderungen können entweder durch den aktiven Wirkstoff bedingt sein oder aber durch Zusatzstoffe wie Konservierungsmittel ausgelöst werden. Das in diesem Zusammenhang wohl am meisten erforschte sowie diskutierte Konservierungsmittel ist Benzalkoniumchlorid. Trotz scharfer Kritik und deutlicher Evidenz für den negativen Einfluss auf die Augenoberfläche ist es noch immer fester Bestandteil einer Mehrzahl an erhältlichen Präparaten [9].

Der Preis, den diese Patienten für die Vermeidung fortschreitender Schädigungen am Sehnerv zahlen, scheint also die progrediente Schädigung der Augenoberfläche zu sein. Was folgt sind Missempfindungen, visuelle Störungen und massive Einschränkungen der Lebensqualität. Der Leidensdruck wird zusätzlich maximiert und es folgen negative Auswirkungen auf die Therapieadhärenz. Um diesen Teufelskreis zu durchbrechen, möchten wir klären welche Prozesse auf der Augenoberfläche von Glaukumpatienten unter topischer Therapie ablaufen.

Im Bereich der Glaukumforschung wurden in den letzten Jahren vermehrt Versuche unternommen durch die Identifizierung pathognomischer Biomarker pathologische Prozesse zu klären, eine frühere Diagnose zu ermöglichen und damit möglicherweise auch die Therapie zu revolutionieren. Dabei hat sich die Untersuchung der Proteine des Tränenfilms als sehr vielversprechend erwiesen [10]. Nicht nur die minimalinvasive Probengewinnung, sondern auch die Tatsache, dass der Tränenfilm als Spiegel der okulären Gesundheit angesehen wird, machen ihn zu einem ausgezeichneten Medium zur Erforschung der molekularen Vorgänge auf der Augenoberfläche [6]. Proteine erfüllen im Körper vielfältige Funktionen. Nicht umsonst gelten sie als „molekulare Werkzeuge“ der Zellen. Die Proteomik bietet nie dagewesene Möglichkeiten zur Charakterisierung und Differenzierung verschiedener Krankheitsbilder und ermöglicht es auch die Dynamik pathologischer Prozesse zu erfassen [11]. Bei der Untersuchung von Tränenflüssigkeit bei Glaukumpatienten muss allerdings berücksichtigt werden, dass viele Proben unter Anwendung topischer Antiglaukomatosa entnommen und analysiert werden. Diese Medikamente verursachen nachgewiesenermaßen relevante Veränderungen aller Komponenten der Augenoberfläche und müssen sich demnach auch in der Proteinzusammensetzung des Tränenfilms widerspiegeln.

Daher ist es sowohl unter therapeutischen als auch unter diagnostischen Aspekten wichtig zu klären, welche molekularen Vorgänge auf der Augenoberfläche von Glaukumpatienten unter topischer Therapie vor sich gehen. Aus diagnostischer Sicht ist die Charakterisierung der Proteinprofile zur Identifikation pathognomischer Moleküle mehr als relevant. Therapeutisch interessant ist es zu klären, wie es zur Ausbildung dieser Sicca Symptomatik kommt, warum einige Glaukom Patienten trotz langjähriger topischer Therapie keine Sicca Symptomatik entwickeln, was beide Patientengruppen voneinander unterscheidet und ob es möglicherweise Unterschiede zwischen der Glaukommedikamenten-assoziierten Sicca Symptomatik und dem klassischen Dry Eye Syndrom ohne zugrundeliegende Glaukomerkrankung gibt.

Ziel dieser Forschung ist es daher, unter Verwendung modernster Methoden im Bereich der Tränenproteomik, potenzielle Zielstrukturen zu benennen, denen eine Schlüsselrolle in der Ausbildung eines Glaukom-assoziierten trockenen Auges zukommt.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Glaukom und die medikamentöse Glaukomtherapie

2.1.1 Das Glaukom

2.1.1.1 Definition

Das Glaukom ist definiert als eine Gruppe okulärer Erkrankungen multifaktorieller Ätiologie. Es handelt sich gewissermaßen um eine Art Sammelbegriff für Augenerkrankungen von neurodegenerativem Charakter. Allen gemeinsam ist eine potenziell progressive optische Neuropathie mit klinisch sichtbaren Veränderungen im Bereich der Papilla nervi optici, welche den irreversiblen Verlust retinaler Ganglienzellen markieren. Zu den typischen klinischen Zeichen einer optischen Neuropathie zählen die lokale oder generalisierte Ausdünnung des neuroretinalen Randsaums und die zunehmende Exkavation der Papille. Meist besteht dabei eine Assoziation zu individuell erhöhten Augeninnendruckwerten, daher stellen diese einen relevanten Risikofaktor dar [4, 5]. Es sind allerdings auch andere Schädigungsmechanismen bekannt, man spricht dann von Normaldruckglaukomen.

Die Frühstadien der Erkrankung verlaufen meist unbemerkt, gelegentlich wird von Visuseinschränkungen berichtet. Diagnostiziert wird das Glaukom überwiegend in späteren Stadien, meist wenn es zur Manifestation charakteristischer Gesichtsfeldausfälle, sog. Skotome kommt. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits eine Vielzahl an Nervenzellen irreversibel geschädigt [12].

2.1.1.2 Epidemiologie

Das Glaukom gilt als zweithäufigste Ursache für Erblindung weltweit. Schätzungen zufolge werden im Jahr 2020 auf der ganzen Welt ca. 80 Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen sein. Darunter 11,2 Millionen irreversibel erblindet [13, 14]. Weitere 20 Jahre später soll die Zahl der Erkrankten bereits auf ca. 112 Millionen angestiegen sein [15]. In Deutschland beschäftigt sich aktuell die Gutenberg Gesundheitsstudie mit der Prävalenz des Glaukoms im Rhein-Main Gebiet. Dabei wird eine Studienpopulation von ca. 15.000 Patienten untersucht. Kürzlich veröffentlichte Daten geben eine vorläufige Prävalenz von 1,44% an [16]. Diese Zahlen machen deutlich, wie viele Menschen von dieser Erkrankung und ihren vielfältigen Folgen betroffen sind.

2.1.1.3 Pathophysiologie

Um die Pathophysiologie des Glaukoms besser zu verstehen und therapeutische Ansatzpunkte zu entwickeln, ist es wichtig sich zunächst mit der Physiologie der Kammerwasserzirkulation zu beschäftigen. Das Kammerwasser erzeugt den Augeninnendruck, der Kammerwasserabfluss reguliert ihn. Physiologische intraokuläre Druckwerte befinden sich im Bereich von 10-21 mmHg [12]. Der Augeninnendruck sorgt für eine glatte Wölbung der Korneaoberfläche, eine konstante Distanz zwischen Kornea, Linse und Retina und eine gleichmäßige Ausrichtung retinaler Photorezeptoren und des Pigmentepithels auf der Bruchmembran. Damit erfüllt er wichtige Funktionen für die optische Abbildung [17]. Das Kammerwasser hat ernährende Funktionen für angrenzende Strukturen wie Kornea und Linse. Zudem spielt es eine wichtige Rolle bei Detoxifikationsprozessen und dient als eine Art Lymphersatz [12].

Das Kammerwasser wird vom Ziliarepithel durch Plasmaultrafiltration gebildet. Die Sekretion wird durch das sympathische Nervensystem gesteuert. Über beta-2-Rezeptoren kann die Sekretion verstärkt, über alpha-2-Rezeptoren minimiert werden. Einen weiteren wichtigen regulatorischen Faktor bei der Sekretion stellt das Enzym Carboanhydrase dar [18]. Zudem unterliegt die Produktion einer zirkadianen Rhythmik [12]. Das Kammerwasser wird in die hintere Augenkammer sezerniert. Um in die Vorderkammer zu gelangen, muss zunächst der erste physiologische Pupillarwiderstand überwunden werden. Dieser entsteht durch die enge Lagebeziehung zwischen Iris und Linse. Nur durch die Erzeugung eines ausreichend hohen Drucks hebt sich die Iris von der Linse ab und erlaubt den Kammerwasserfluss durch die Pupille von der Hinter- in die Vorderkammer. Dadurch entsteht ein pulsatile Fluss. Der Abfluss der Kammerwassers erfolgt zu 85% durch das Trabekelwerk. Das Trabekelwerk befindet sich im Kammerwinkel und besteht aus spongiösem, lockerem, gefäßfreiem Bindegewebe. Dort vermutet man den zweiten physiologischen Widerstand. Über das Trabekelwerk fließt das Kammerwasser unter physiologischen Bedingungen in den Schlemm-Kanal und von dort aus über die episkleralen Kammerwasservenolen in den Blutkreislauf. Die übrigen 15% des Kammerwassers fließen über ein uveosklerales Gefäßsystem in den venösen Kreislauf ab.

Pathophysiologisch kann der Kammerwasserabfluss an zwei Stationen gestört werden. Besteht ein erhöhter Pupillendurchflusswiderstand, führt dies zu einer

Druckerhöhung in der Hinterkammer und damit zum Verschluss des Trabekelwerks aufgrund einer Lageveränderung der Iris. Man spricht dann von einem Winkelblockglaukom. Besteht ein erhöhter Widerstand im Bereich des Trabekelwerks, spricht man von einem Offenwinkelglaukom. Der Kammerwinkel ist offen, der Abfluss aber durch Veränderungen im Maschenwerk behindert [17]. Zum besseren Verständnis sind in **Abbildung 1** die Kammerwasserabflusswege sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen dargestellt [19].

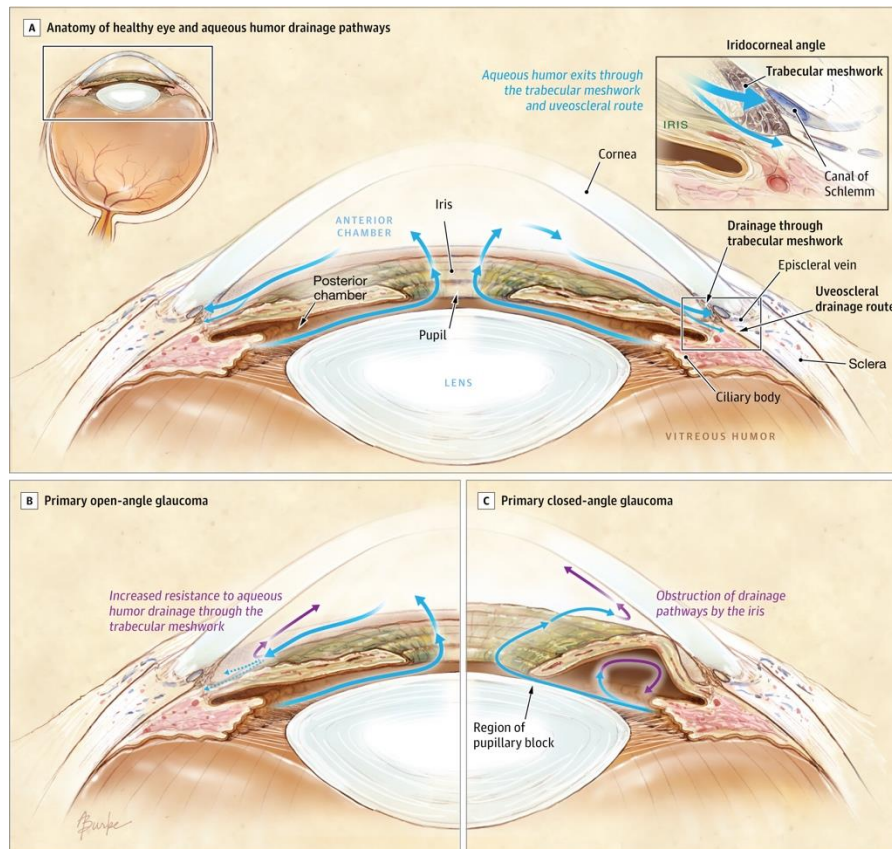


Abbildung 1: Kammerwasserabfluss

A) Unter physiologischen Konditionen, B) Primäres Offenwinkelglaukom, C) Primäres Winkelblockglaukom [19].

2.1.1.4 Klassifikation

Die Einteilung der verschiedenen Glaukomformen kann anhand unterschiedlicher Kriterien erfolgen. Man unterscheidet zunächst zwischen primären und sekundären Formen. Sofern eine andere Allgemein- oder Augenerkrankung vorliegt, die mit der Ausbildung des Glaukoms einhergeht, spricht man von einem sekundären Glaukom. Ein Beispiel für sekundäre Glaukome ist das Neovaskularisationsglaukom, welches infolge einer Diabetes mellitus Erkrankung auftreten kann. Weiterhin zu nennen, sind das Pigmentdispersionsglaukom, das Pseudoexfoliationsglaukom oder das

Kortisonglaukom, bei denen der Kammerwinkel durch diverse Ablagerungen verschlossen wird. Alle anderen Formen, die nicht infolge einer Augenerkrankung auftreten, werden als primär bezeichnet. Glaukome können zudem sowohl aufgrund entwicklungsbedingter Anomalien entstehen als auch erworben im Erwachsenenalter vorkommen. Nach der Verlaufsform kann das Glaukom in akut und chronisch eingeteilt werden [12]. Anhand der Anatomie des Kammerwinkels unterscheidet man bei den Glaukomen zwischen Offenwinkel- und Winkelblockformen. Das primäre Offenwinkelglaukom stellt mit über 90% aller Glaukome die häufigste Glaukomform dar [17].

2.1.2 Die medikamentöse Glaukomtherapie

2.1.2.1 Allgemeines

Ziel der Glaukombehandlung ist es, weitere Schäden am Sehnerv zu verhindern und damit das Gesichtsfeld zu erhalten. Es kann also nur die Progredienz der Erkrankung verhindert werden, eine Heilung ist bisher nicht möglich. Die Glaukomtherapie konzentriert sich noch immer vorwiegend auf die Senkung des Augeninnendrucks (IOD). Jeder Sehnerv hat eine individuelle Drucktoleranz. Wird diese überstiegen, sind Schäden zu erwarten. Deshalb wird zu Therapiebeginn ein individueller Zieldruck festgelegt. Bewegen sich die IOD Werte unterhalb dieses Zieldruckwerts ist voraussichtlich nicht mit einem Fortschreiten der Glaukomschäden zu rechnen. Die medikamentöse Glaukomtherapie bildet eine der drei möglichen Therapieoptionen und ist in den meisten Fällen lebenslang durchzuführen. Alternative Ansätze stellen die Laserbehandlung oder operativ-chirurgische Maßnahmen dar, die meist erst bei Versagen der Erstmaßnahmen Anwendung finden. Nach Diagnosestellung wird also üblicherweise mit einem Monopräparat zur medikamentösen Augeninnendrucksenkung begonnen. Falls sich dieses als nicht ausreichend wirksam erweist, werden Kombinationspräparate angewendet. Die Applikation erfolgt vorwiegend lokal [12]. Der Augeninnendruck kann auf unterschiedliche Art und Weise reguliert werden. Zum einen kann dies durch die Hemmung der Kammerwasserproduktion geschehen, zum anderen durch Erhöhung des trabekulären oder uveoskleralen Abflusses [17]. Die fünf relevantesten Substanzen sollen im Folgenden in ihrer Wirkungsweise erläutert werden. Die wichtigsten Informationen sind in **Tabelle 1** zusammenfassend dargestellt.

2.1.2.2 Prostaglandinanaloga

Die Prostaglandinanaloga stellen die jüngste Substanzgruppe dar und wirken unter anderem regulierend auf den IOD indem sie den uveoskleralen Abfluss verstärken. Dies geschieht über den Agonismus an FP- und EP-Rezeptoren im Ziliarmuskel. Durch die Rezeptoraktivierung kommt es zu einer Relaxation des Muskels, sowie zu einer verstärkten Bildung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Die vermehrte Expression von MMPs verstärkt abbauende Prozesse und fördert Remodellationsvorgänge der extrazellulären Matrix. Das Gewebe lockert auf und das Kammerwasser vermag es das Gewebe besser zu durchdringen [20]. Prostaglandinanaloga sind in der Lage den IOD im Vergleich zu anderen Substanzgruppen am stärksten zu senken und gelten deshalb aktuell als Mittel der ersten Wahl. Die Wirkdauer erstreckt sich über mehrere Tage, die Applikation erfolgt üblicherweise einmal täglich. Eine Überdosierung kann eine paradoxe Erhöhung des IOD bewirken und sollte daher vermieden werden. Die systemischen Nebenwirkungen fallen relativ gering aus. Zu den okulären Nebenwirkungen zählen beispielsweise die Entstehung einer okulären Hyperämie, lokale Abwehrreaktionen, irreversible Hyperpigmentierungen der Iris, reversible Hyperpigmentierungen der okulären Haut und Verstärkung des Wimpernwachstums. Es sind 4 verschiedene Wirkstoffe verfügbar: Bimatoprost, Tafluprost, Latanoprost und Travoprost.

Bimatoprost ist unter dem Handelsnamen „Lumigan“ erhältlich und scheint den größten Effekt auf den Augeninnendruck zu haben. Dafür kommen okuläre Nebenwirkungen vergleichsweise häufig vor. Um dies zu verbessern, wurden mittlerweile Präparate mit verringerter Wirkstoffkonzentration und ohne Zusatz von Konservierungsmitteln entwickelt. Auch Tafluprost (Handelsname: Saflutan) ist konservierungsmittelfrei erhältlich. Latanoprost (Handelsname: Xalatan) wird momentan als Mittel der ersten Wahl verordnet, da es weniger okuläre Nebenwirkungen als die anderen Vertreter zu verursachen scheint. Travoprost (Handelsname: Travatan) scheint den Augeninnendruck stärker zu senken als Latanoprost und bietet in Kombination mit dem neuartigen Konservierungsmittel Polyquad eine Alternative zur herkömmlichen Konservierung mit Benzalkoniumchlorid [18].

2.1.2.3 Betablocker

Beta-Rezeptor-Antagonisten wirken an Beta-adrenergen-Rezeptoren im Ziliarepithel und führen so zu einer Reduktion der Kammerwassersekretion [18]. Man unterscheidet selektive Betablocker, die überwiegend an einem Rezeptortyp wirken, von unselektiven, die ihre Wirkung an beiden Rezeptortypen entfalten können [12]. In ca. 10% der Fälle sinkt nach einiger Zeit der IOD-reduzierende Effekt ab. Dieses Phänomen wird als Tachyphylaxie bezeichnet. Bei der Indikationsstellung muss außerdem berücksichtigt werden, dass die Substanzen in den systemischen Kreislauf gelangen können und unerwünschte Wirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem und die Atemwege haben können. Zu den systemischen Nebenwirkungen zählen beispielsweise Bronchospasmen bei vorbestehenden pulmonalen Grunderkrankungen. Ist anamnestisch eine Erkrankung mit Asthma bronchiale bekannt, zählt dies als Kontraindikation. Auch bei kardial vorgeschädigten Patienten kann es zu schweren Zwischenfällen kommen. Indiziert können Betablocker bei einer monokulären Behandlung sein, da im Gegensatz zu den Prostaglandinanaloga keine kosmetischen Nachteile zu erwarten sind. Die lokalen Nebenwirkungen fallen relativ gering aus und umfassen unter anderem Allergien und punktförmige Hauterosionen [18]. Trotzdem sollte die Indikationsstellung bei Kontaktlinsenträgern und Patienten die zusätzlich an einem trockenen Auge leiden eher zurückhaltend gestellt werden, da manche Betablocker eine Hyposensibilisierung der Kornea bewirken und die Symptomatik somit noch verstärken können [12]. Die verschiedenen Wirkstoffe umfassen Timolol, Betaxolol, Levobunolol, Carteolol und Metipranolol. Timolol ist sowohl als Lösung als auch in Gelform erhältlich. Als Lösung kommen Konzentrationen von 0,25% und 0,5% zur Anwendung. Die gelbildenden Präparate sind zusätzlich noch in 0,1%iger Konzentration erhältlich. In der Regel wird ein- bis zweimal täglich instilliert. Bei Betaxolol handelt es sich um einen Beta-1-Rezeptor-selektiven Antagonisten. Der hypotensive Effekt fällt im Vergleich zu Timolol etwas geringer aus. Betaxolol ist durch die Blockade eines Kalziumkanals in der Lage den papillären Blutfluss zu erhöhen und trägt damit zum besseren Erhalt des Gesichtsfeldes bei. Levobunolol, Carteolol und Metipranolol sind in ihrer Wirkung vergleichbar mit Timolol, wobei die systemischen Nebenwirkungen bei Carteolol etwas geringer ausfallen. Die Ausbildung einer granulomatösen Uveitis steht im Zusammenhang mit der Anwendung von Metipranolol [18].

2.1.2.4 Alpha-2-Agonisten

Alpha-2-Agonisten wirken über die Stimulation okulärer alpha-2-Rezeptoren im Ziliarepithel hemmend auf die Kammerwasserproduktion und erhöhen zusätzlich den uveoskleralen Abfluss. Zudem werden neuroprotektive Effekte angenommen. Alpha-2-Agonisten sind in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Daher sind sie bei Kleinkindern und Patienten unter Medikation mit oralen MAO-Hemmern kontraindiziert. Die üblichen Wirkstoffe umfassen Brimonidin und Apraclonidin. Brimonidin wird in Konzentrationen von 0,2% angewendet und ist Timolol in seiner IOD senkenden Wirkung unterlegen. Als unerwünschte okuläre Wirkungen kann es verzögert zur Ausbildung einer allergischen Konjunktivitis kommen. Selten wird von granulomatösen Uveitiden berichtet. Bei den systemischen Nebenwirkungen sind Xerostomien und starke Fatigue bekannt. Unter dem Handelsnamen Alphagan-P ist ein Brimonidinpräparat auf dem Markt, welches als Alternative zu Benzalkoniumchlorid mit dem Konservierungsmittel Purite® angereichert ist. Apraclonidin findet meist nur akut Anwendung beispielsweise nach Laserbehandlungen, zur Vermeidung postoperativer IOD Anstiege. Eine Langzeitanwendung ist aufgrund der Abnahme des therapeutischen Effekts und der Häufigkeit unerwünschter okulärer Wirkungen nicht sinnvoll [18].

2.1.2.5 Carboanhydrasehemmer

Wie bereits erwähnt nimmt das Enzym Carboanhydrase durch die aktive Sekretion von Bicarbonat eine Schlüsselrolle bei der Bildung des Kammerwassers ein. Eine Hemmung resultiert somit in einem Rückgang der Kammerwassersekretion. Ein zusätzlicher Effekt bei lokaler Anwendung ist die Förderung der okulären Durchblutung [17]. Zudem werden adjuvante neuroprotektive Effekte diskutiert. Als lokal applizierbare Präparate sind die Wirkstoffe Dorzolamid und Brinzolamid erhältlich. Systemisch können Azetazolamid, Dichlorfenamid und Methazolamid angewendet werden [18]. Die lokale Anwendung ist allerdings vor allem bei chronischen Glaukompatienten der systemischen überlegen, da die Durchdringungsfähigkeit der Hornhaut sehr gut ist und systemische Nebenwirkungen weitestgehend umgangen werden können. Carboanhydrasehemmer gelten als effektive Drucksenker [12]. Dennoch kommt es vor allem bei der Anwendung von Dorzolamid zu unangenehmen okulären Nebenwirkungen wie z.B. Augenbrennen oder allergischen Blepharokonjunktividen [18].

2.1.2.6 Parasympathomimetika

Die Parasympathomimetika sind die älteste Substanzgruppe in der Glaukomtherapie. Die drucksenkende Wirkung ist ausgesprochen stark. Durch Aktivierung postsynaptischer cholinergischer Rezeptoren kommt es zu einer Tonussteigerung im Ziliarmuskel. Durch den mechanischen Zug auf das Trabekelwerk werden die Maschen gespreizt und der Kammerwasserabfluss erleichtert [12]. Zusätzlich kontrahiert der M. sphincter pupillae und zieht die periphere Iris vom Trabekelwerk weg, der Kammerwinkel öffnet sich. Dies erweist sich vor allem bei der Therapie eines Winkelblockglaukoms als vorteilhaft. Zu den okulären Nebenwirkungen zählen unter anderem Miosis, Myopie, sowie Verstärkung von Kataraktsymptomen. Systemische Nebenwirkungen sind eher selten und beinhalten Bradykardie, Bronchospasmen, Gastrointestinale Symptome oder Verwirrtheit [18]. Aktuell werden nur noch Pilocarpin und Carbachol verwendet. Aufgrund der sehr begrenzten Wirkdauer sollte die Instillation mehrmals täglich erfolgen [12].

2.1.2.7 Kombinationspräparate

Die medikamentöse Glaukomtherapie sollte im Normalfall zeitlebens durchgeführt werden. Doch nach nur zwei Therapiejahren wird bei 40-75% der Patienten unter einer Monotherapie keine suffiziente Augeninnendrucksenkung mehr erreicht. Die folgende Maßnahme wäre der Wechsel auf ein anderes Monopräparat und im zweiten Schritt die Verwendung von Kombinationspräparaten. Der Vorteil von Kombinationspräparaten liegt darin, dass dennoch nur „ein Medikament“ angewandt werden muss. Dies verbessert die Compliance und die Therapie bleibt möglichst unkompliziert [17]. Vor allem Betablocker werden häufig zusammen mit anderen Substanzgruppen kombiniert. Bekannte Kombinationen umfassen: Cosopt® (Timolol + Dorzolamid), Azarga® (Timolol + Brinzolamid), Xalacom® (Timolol + Latanoprost), DuoTrav® (Timolol + Travoprost), Ganfort® (Timolol + Bimatoprost), Fotil® (Timolol + Pilocarpin) und Combigan® (Timolol + Brimonidin) [18].

Tabelle 1: Antiglaukomatosa.

Übersicht zu aktuell verwendeten Antiglaukomatosa mit Informationen zu Anwendung, Wirkmechanismus, Nebenwirkungen und Konservierungsmitteln.

Substanzklasse/ Vertreter (Beispiel)	Anwendung (Täglich)	Wirkmechanismus	Lokale Nebenwirkungen	Konservierungsmittel	Referenz
Prostaglandinanaloga Bimatoprost, Tafluprost, Latanoprost, Travoprost	1x	Erhöhung des uveoskleralen Kammerwasserabflusses	Hyperämie der Konjunktiva, Veränderungen der Wimpern, Iris Hyperpigmentierungen, Uveitis, Makulaödem	konservierungsmittelhaltig (BAK + Alternativen) und konservierungsmittelfrei erhältlich	[19]
Betablocker Timolol, Betaxolol, Levobunolol, Carteolol, Metipranolol	1-2x	Reduktion der Kammerwassersekretion	Allergien, Irritationen, trockene Augen	konservierungsmittelhaltig (BAK), konservierungsmittelfrei	[18, 19, 21]
Alpha-2-Agonisten Brimonidin, Apraclonidin	2-3x	Reduktion der Kammerwassersekretion, Erhöhung des uveoskleralen Abflusses	allergische Konjunktivitis, Irritationen, trockenes Auge, granulomatöse Uveitis	konservierungsmittelhaltig (BAK + Alternativen)	[18, 19]
Carboanhydrasehemmer Dorzolamid, Brinzolamid, Azetazolamid, Dichlorfenamid, Methazolamid	2-3x	Reduktion der Kammerwasserproduktion	bei lokaler Instillation: Augenbrennen, allergische Blepharokonjunktivitis, Irritationen	konservierungsmittelhaltig (BAK), konservierungsmittelfrei	[9, 12, 17-19]
Parasympathomimetika Pilocarpin, Carbachol	~4x	Erhöhung des Kammerwasserabflusses, Öffnung des Kammerwinkels	Miosis, Myopie, Verstärkung von Kataraktsymptomen, Visusverschlechterung, Irritationen	konservierungsmittelhaltig, konservierungsmittelfrei	[12, 18, 19]

2.1.2.8 Osmotische Wirkstoffe

Osmotische Wirkstoffe sind vor allem der Therapie temporärer IOD Erhöhungen wie bspw. bei einem akuten Winkelblockglaukom vorbehalten. Die Wirkweise beruht auf der Erzeugung eines osmotischen Gradienten zwischen Blut und Glaskörper. Bekannte Wirkstoffe sind Mannitol, Glycerin und Isosorbid. Die Verabreichung erfolgt oral oder intravenös [18].

2.1.2.9 Zusätze

Topische Glaukommedikamente enthalten über die pharmazeutisch wirksamen Bestandteile hinaus noch weitere Zusätze. Vor allem Konservierungsmittel stellen häufig einen festen Bestandteil in der Zusammensetzung dar. Der Einsatz von Konservierungsmitteln begründet sich unter anderem darin, dass sie durch ihre antibakterielle Aktivität eine längere Produkthaltbarkeit garantieren und das Risiko von Augeninfektionen senken. Durch die längere Haltbarkeit können außerdem Kosten gesenkt werden. Alternativen sind häufig kostspieliger und gesetzliche Vorgaben erschweren den Entwicklungsprozess. Gängige Konservierungsmittel in ophthalmologischen Kompositionen umfassen Benzalkoniumchlorid (BAK), sofZia® (ein Konservierungsmittelsystem das in Travatan Z verwendet wird), der stabilisierte Oxy-Chloro-Komplex (SOC) Purite® in Alphagan P, Natriumperborat als GenAqua® in Genteal und Polyquaternium-1, auch bekannt als Polyquad® in Travatan [22].

Etwa 70% der verfügbaren Präparate enthalten Benzalkoniumchlorid (BAK). BAK wird seit fast 80 Jahren verwendet und ist damit das älteste Präparat. Angewendet wird es in Konzentrationen zwischen 0,004% – 0,2%. BAK wirkt als ein Detergens und führt zur Lyse der bakteriellen Zellmembran. Benzalkoniumchlorid gilt als schwach allergen, wirkt jedoch in höheren Konzentrationen überaus toxisch auf okuläre Strukturen. Seine antimikrobielle Aktivität verhält sich umgekehrt proportional zu seiner Kompatibilität mit der Augenoberfläche. BAK verursacht nachweislich Schäden am Gewebe der Bindehaut, am Epithel der Kornea und der Linse, sowie am Trabekelwerk [22]. Eine Vielzahl klinischer Studien unterstützt die These, dass eine direkte Korrelation zwischen der Verwendung konservierter Augentropfen und dem vermehrten Auftreten okulärer Symptome besteht. Die Effekte sind sowohl zeit- als auch dosisabhängig. Es konnten immunoinflammatorische Reaktionen mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, apoptotische Vorgänge und erhöhter oxidativer Stress im Zusammenhang mit BAK nachgewiesen werden. Außerdem

kommt es zu einer Interaktion mit der Lipidschicht des Tränenfilms und der Zellmembran. Die Folge ist eine gestörte Homöostase des Tränenfilms. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren vermehrt BAK-freie Formulierungen entwickelt, welche alternative oder keine Konservierungsmittel beinhalten [9].

Noch immer hält sich das Gerücht hartnäckig, dass die Verwendung von BAK die Durchdringungsfähigkeit des Medikaments in die Kornea erhöhe und damit zu einer besseren Wirksamkeit des aktiven Wirkstoffs beitrage. Dies konnte in zahlreichen Studien widerlegt werden. Die augeninnendrucksenkenden Eigenschaften konservierungsmittelfreier Zusammensetzungen sind derer mit Konservierungsmittel nicht unterlegen. Auch im Vergleich der verschiedenen Konservierungsmittel, tritt kein klarer Sieger hervor. Daraus ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit [9].

Problematisch ist nach wie vor, dass viele pharmazeutische Studien und Tests zur Entwicklung neuer Formulierungen an Patienten mit gesunder Augenoberfläche durchgeführt werden. Die Realität sieht leider anders aus, denn die Mehrzahl der Glaukompatienten haben bereits eine vorgeschädigte Augenoberfläche oder leiden unter Veränderungen des Tränenfilms und reagieren unter Umständen anders auf bestimmte Inhaltsstoffe. Aufgrund des Verlusts der protektiven Eigenschaften des bereits geschädigten Tränenfilms, kann es wesentlich leichter zur Ausbildung bestimmter Krankheitsbilder wie dem trockenen Auge oder einer Schädigung der Kornea kommen [9].

2.1.2.10 Alternative Therapiemöglichkeiten

Die selektive Lasertrabekuloplastik gilt als primäre Alternative zur lokalen Medikation. Sie wird meist durchgeführt, wenn eine Unverträglichkeit gegenüber lokalen Antiglaukomatosa besteht oder wenn die lokale Behandlung nicht die gewünscht Wirkung zeigt; weiterhin bei nicht-adhärenenten Patienten oder als adjuvante Maßnahme, wenn eine Polymedikation vermieden werden soll. Dabei kommt ein 532 nm frequenzverdoppelter Q-switched Nd:YAG Laser zum Einsatz, der selektiv auf die pigmentierten Zellen des Trabekelwerks zielt. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Man vermutet eine Stimulation der Zellen des Maschenwerks und eine Rekrutierung von Makrophagen und Extrazellulärmatrix. Die Ergebnisse sind recht vielversprechend. Nach 6 Monaten kann mit einer IOD Senkung von ca. 25% gerechnet werden. Der vorherige Einsatz von lokalen

Glaukommedikamenten scheint keinen Einfluss auf das Ergebnis zu nehmen. Weitere Laserverfahren sind die Argonlasertrabekuloplastik und die Micro-Pulse-Lasertrabekuloplastik.

Ist die Glaukomerkrankung bereits weit fortgeschritten oder verschlechtert sich trotz lokal medikamentöser IOD Regulierung progressiv, besteht die Möglichkeit der Trabekulektomie. Es handelt sich hierbei um ein operatives Verfahren, bei dem eine Fistel gebildet wird, durch die das Kammerwasser aus der Vorderkammer in den Sub-Tenon-Raum abfließen kann [18]. Die Filtrationsoperation ist wirksamer als die medikamentöse Therapie oder die Behandlung mit Laser, allerdings auch sehr viel risikoreicher. Zudem ist der dauerhafte postoperative Erfolg nicht immer gegeben, da die einsetzende Wundheilung zur Vernarbung und damit zum Verschluss der operativ geschaffenen Öffnung führen kann [12]. Häufig kommen Antiglaukomatosa trotz chirurgischer Eingriffe als adjuvante Maßnahmen zum Einsatz. Daher kann auch bei chirurgischer Intervention nicht immer auf topische Medikamente verzichtet werden [9].

2.2 Glaukommedikamenten-assoziierte Erkrankungen der Augenoberfläche

2.2.1 Epidemiologie

Patienten, die an einer Glaukom Erkrankung oder an erhöhten Augeninnendruckwerten leiden, entwickeln vergleichsweise häufiger Schäden an der Augenoberfläche. Die Prävalenz liegt hier bei ca. 42% [23, 24]. Glaukom Patienten sind meist auf die lebenslange Anwendung topischer Glaukommedikamente angewiesen. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Entwicklung eines trockenen Auges und der Anwendung dieser Medikamente. Nicht nur die Anwendung selbst, sondern auch die Häufigkeit der Anwendung, die Zusammensetzung und die Anzahl der angewendeten Präparate zeigen Auswirkungen auf die Entwicklung okulärer Symptome [23, 25-27]. Es kann entweder zu einer akuten Exzerbation einer vorbestehenden Störung kommen oder aber die pathologischen Konditionen werden erst durch iatrogene Einflüsse geschaffen [28]. Weitere Faktoren, die die Entwicklung eines trockenen Auges unter Glaukomtherapie begünstigen sind die Länge der Anwendungsdauer, höhere IOP Werte, Schweregrad der Glaukomerkrankung und die Verwendung von benzalkoniumchlorid-haltigen Augentropfen [26]. In Deutschland leiden ca. 53% der Glaukopatienten an einem trockenen Auge [8].

2.2.2 Erkrankungen der Augenoberfläche

2.2.2.1 Die Augenoberfläche:

2.2.2.1.1 Definition und Aufbau

Die Augenoberfläche wird aus einer Vielzahl von Strukturen gebildet. Sie umfasst Oberflächen- und Drüsenepithelien der Kornea und Konjunktiva, der Tränendrüsen (Haupttränendrüse sowie der akzessorischen Tränendrüsen) und des Tränennasengangs. Weiterhin die Meibom-Drüsen (Glandulae tarsales), die Wimpern mit Zeis- (Glandula sebacea) und Moll-Drüsen (Glandulae ciliares conjunctivales) und diejenigen Komponenten der Augenlider, die am Lidschlag beteiligt sind [29]. Die Augenoberfläche wird von einem kontinuierlichen Epithel ektodermaler Herkunft überzogen, welches lokale Spezialisierungen aufweist. Damit bildet das Oberflächenepithel auch die Grundlage für die Ausbildung der Drüsensysteme. Die Kommunikation erfolgt über Gap Junctions und Zytokine. Alle Komponenten der Augenoberfläche werden gemeinsam innerviert und vaskularisiert. Damit unterliegen sie einer gemeinsamen neuronalen, endokrinen und immunologischen Steuerung. **Abbildung 2** stellt die genannten Strukturen übersichtlich dar [29].

Die verschiedenen Anteile sind aber nicht nur strukturell, sondern auch funktionell miteinander verbunden. Die Funktion der Augenoberfläche ist es, eine glatte refraktive Oberfläche auf der Kornea zu schaffen, diese zu schützen und konstant aufrecht zu erhalten. Dies geschieht durch die Ausbildung eines Schutzfilms, des Tränenfilms [30]. Jede Epithelkomponente leistet einen Beitrag zur Ausbildung dieses Films. Der Tränenfilm ist demnach eine Komposition aus Sekreten der Tränendrüsen, Meibom-Drüsen, Becher- und Epithelzellen sowie eines plasmatischen Ultrafiltrat des Blutes, was ihn zu einer überaus komplexen Körperflüssigkeit macht. Der dynamische Charakter begründet sich unter anderem in seiner hohen Turnover-Rate, dem Einfluss emotionaler Faktoren und Umweltfaktoren. Weitere Faktoren die den Tränenfilm beeinflussen sind Alter, Geschlecht bzw. Hormonstatus [10]. Die Qualität des Tränenfilms gibt Aufschluss über den Zustand der Augenoberfläche, er gilt als Spiegel der okulären Gesundheit. Er kann nur voll funktionsfähig sein, wenn ein reibungsloses Zusammenspiel aller Komponenten gewährleistet ist [31].

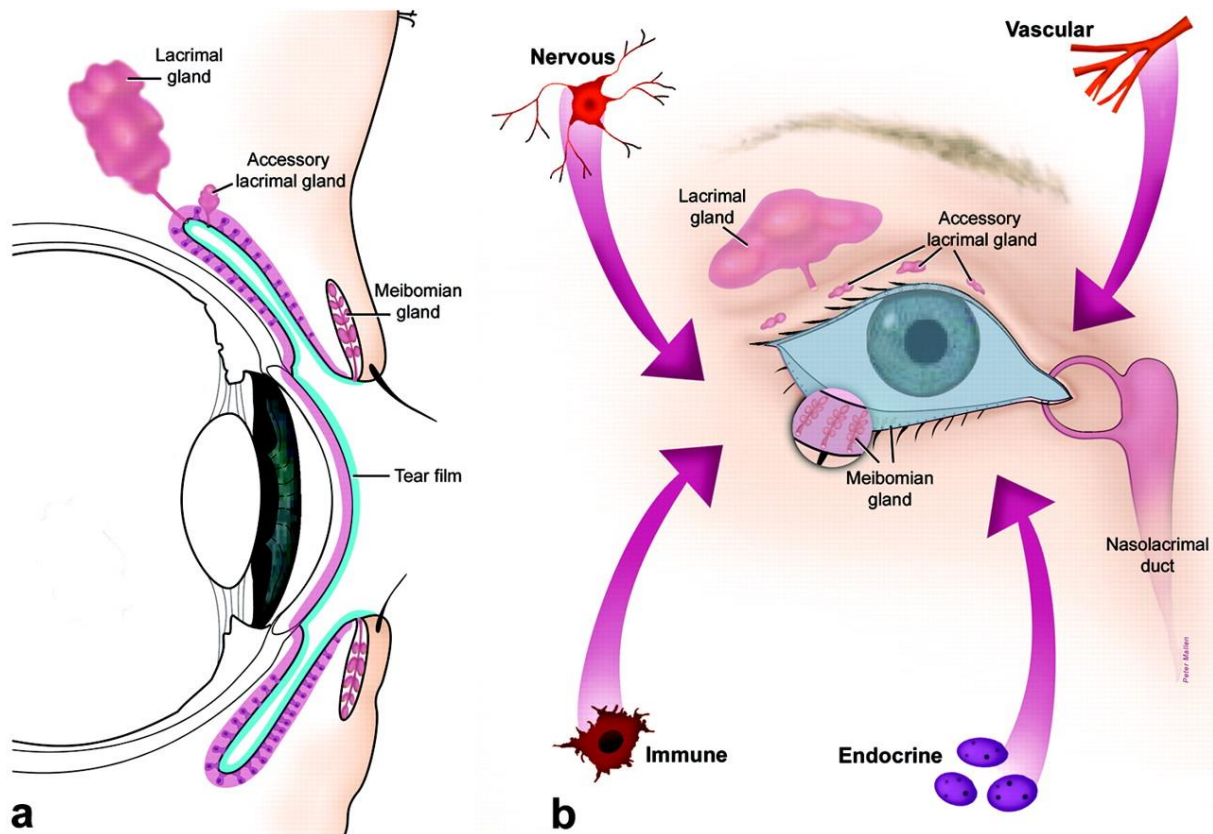


Abbildung 2: Die Augenoberfläche

Schematische Darstellung der Komponenten der Augenoberfläche in der Sagittalebene (a) und der Frontalebene (b) [30].

2.2.2.1.2 Die Tränendrüse (Glandula lacrimalis)

Die Tränendrüse ist eine tubuloazinöse Drüse und besteht aus 3 Hauptzelltypen. Zelltyp Nr. 1 stellen die Azinuszellen dar, die 80% der Tränendrüse ausmachen. Die Azinuszellen sind pyramidenförmige Zellen, die durch apikale Tight Junctions miteinander verbunden sind. Dadurch entstehen 2 Zellpole [32]. Die Tight Junctions trennen die apikale und die basolaterale Zellmembran voneinander und ermöglichen es somit Elektrolyte, Proteine und Wasser ins Lumen zu sezernieren. In der basolateralen Membran befinden sich Rezeptoren für Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin), Neuropeptide (z.B. Vasoaktives intestinales Peptid, VIP) und Wachstumsfaktoren (z.B. Epidermaler Wachstumsfaktor, EGF), die in der Lage sind, sekretorische Prozesse anzuregen. Außerdem Transportproteine und Ionenkanäle, die für die Wasser- und Elektrolytsekretion zuständig sind. In der apikalen Membran befinden sich ebenfalls Transportproteine und Ionenkanäle. Hier verschmelzen intrazelluläre Granula bepackt mit sekretorischen Proteinen der Azinuszellen mit der Membran und geben ihren Inhalt (Proteine der Tränendrüse) ins Lumen ab. Die Lumina der Azinuszellen konvergieren zu den Ausführungsgängen. Im Gegensatz zu

den Azinuszellen sind in den Zellen der Ausführungsgänge Transportproteine und Ionenkanäle anders angeordnet, aber auch sie sezernieren Proteine, die in Granula oder der Plasmamembran gespeichert werden. Den dritten Zelltyp stellen die Myoepithelzellen dar. Die kontraktile, flache, sternförmige Zelle befindet sich basal beider zuvor genannter Zelltypen und unterhalb der Nervenfasern und Blutgefäße. Ihre Funktion bei der Produktion von Tränenflüssigkeit ist allerdings noch nicht vollständig bekannt. Weiterhin konnten einige Zellen der Immunabwehr in der Tränendrüse nachgewiesen werden, darunter Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen, dendritische Zellen und Makrophagen [32].

2.2.2.1.3 Die Lakrimale Funktionseinheit

Der Tränenfilm ist eine fein regulierte Flüssigkeit. Die Haupttränendrüse gibt wie zuvor beschrieben regelmäßig ein wässriges Sekret bestehend aus Elektrolyten, Wasser, Proteinen und Muzinen in den Tränenfilm ab. Jede Konzentrationsänderung einer der Komponenten kann weitreichende Folgen nach sich ziehen, sodass die optimale Menge und Komposition des Tränensekrets der Haupttränendrüse sichergestellt werden muss. Dies geschieht unter anderem auf neuronaler Ebene. Die Sekretion von Elektrolyten, Proteinen sowie Wasser und damit Tränenvolumen und -zusammensetzung werden streng reguliert [32]. Zu diesem Zweck bildet die Augenoberfläche zusammen mit ihren sekretorischen Anhangsgebilden und den zugehörigen innervierenden Strukturen die sogenannte „Lakrimale Funktionseinheit“ [33]. Dabei spielt vor allem die Schnelligkeit der neuralen Reizantwort eine wichtige Rolle. Die Augenoberfläche muss meist umgehend auf veränderte Umwelteinflüsse (z.B. mechanische/chemische Reize, Pathogene, Temperaturänderungen, Veränderungen der Luftfeuchtigkeit) oder die Bedürfnisse der Oberflächenepithelien reagieren, um Schädigungen erfolgreich abzuwehren. Daher ist es naheliegend, dass es sich hier um einen Reflexbogen handelt. Der komplexe Reflexbogen besteht aus sensorischen afferenten Nervenfasern ausgehend von Kornea und Konjunktiva, efferenten parasymphatischen und sympathischen Nervenfasern, die die Haupttränendrüse innervieren sowie sekretorischen Drüsenzellen und Drüsenausführungsgängen und ist in **Abbildung 3** schematisch dargestellt. Demnach führt die Stimulation sensorischer Nervenendigungen auf Kornea und Konjunktiva zu einer Aktivierung der efferenten, überwiegend parasymphatischen Nervenfasern, welche wiederum Drüsenzellen der Haupttränendrüse dazu veranlassen Elektrolyte, Proteine und Wasser zu sezernieren. Dieses Drüsensekret verlässt die Tränendrüse

über die Drüsenausführungsgänge, welche das Tränensekret auf die Augenoberfläche abgeben. Die erste Station bilden also die sensorischen Nervenendigungen in der Kornea und Konjunktiva. Ungefähr 20% der sensorischen Nerven sind Mechanorezeptoren und Mechano-Nozizeptoren, die vor allem auf mechanische Reize reagieren. Weitere 70% der Nerven sind polymodale Nozizeptoren. Sie können, wie der Name schon sagt, durch eine Vielzahl von Reizen stimuliert werden. Dazu zählen: Mechanische Irritationen, chemische Reize oder endogene Mediatoren die von beschädigten Geweben, Entzündungszellen o. Blutgefäßen ausgehen können. Die übrigen 10-15% der Nervenfasern reagieren auf thermische Reize (Kälte). Die polymodalen Nozizeptoren sind besonders effektiv, wenn es um die Stimulation des Reflexbogens geht. Die afferenten Fasern leiten die aufgenommenen Stimuli aus Kornea und Konjunktiva zunächst an Regulationszentren im ZNS, wo sie verarbeitet und analysiert werden, anschließend wird anhand der Intensität/ Stärke des Inputs festgelegt, inwieweit die Tränensekretion (Zusammensetzung und Volumen) angepasst werden muss. Somit führen leichte Stimuli zu einer leichten Zunahme an Tränensekretion und starke Stimuli zu entsprechend verstärkter Tränensekretion. Diese Informationen erreichen die Tränendrüse über die efferenten, vorwiegend parasympathischen Nervenfasern. Die wichtigsten Neurotransmitter bei der Reizweiterleitung sind hierbei Acetylcholin (ACh) , Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) und Noradrenalin (NA). Sie wirken alle stimulierend auf die Tränendrüse und fördern damit die Sekretion. Neben der Sekretion kann durch die Stimulation kornealer Nervenendigungen eine Vasodilatation von Gefäßen innerhalb der Tränendrüse ausgelöst werden. Die Mehrdurchblutung wirkt sich zusätzlich stimulierend auf die Sekretion aus, eine Minderdurchblutung hemmend. Somit kann die Sekretion auch über die Durchblutungsverhältnisse mitreguliert werden.

Neben der Regulation der Haupttränendrüse können die sensorischen Nerven der Augenoberfläche zudem die Sekretionsprodukte konjunktivaler Becher- und Epithelzellen sowie kornealer Epithelzellen regulieren. Im Gegenzug können die sezernierten Produkte ebenfalls Einfluss auf die Funktion sensorischer Nerven nehmen. Kommt es nun auf einer der Ebenen des Reflexbogens zu einer Störung, führt dies zu einer veränderten Sekretion der Tränendrüse und hat damit direkte und indirekte Folgen für Strukturen der Augenoberfläche. Beispielsweise führt eine Veränderung/ Abnahme der Sensitivität kornealer Nervenendigungen zu einer Blockade der lakrimalen Sekretion. Dies kann als Folge zunehmenden Alters oder

auch bei Diabetes mellitus Patienten auftreten. Ein weiteres Beispiel sind die Auswirkungen einer peripheren Neuropathie, wie sie unter anderem beim Sjögren Syndrom auftritt. Hier ist der efferente Zweig des Reflexbogens betroffen, was ebenfalls in einer verminderten Tränensekretion resultiert [32].

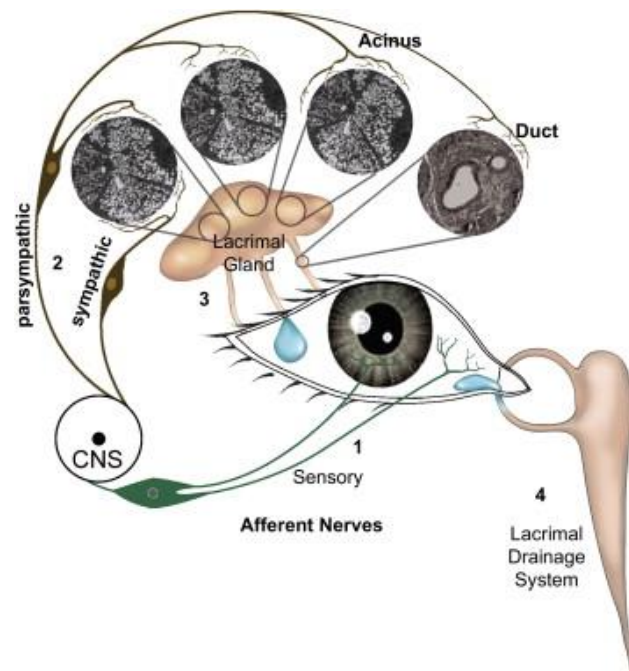


Abbildung 3: Die Lakrimale Funktionseinheit

Schematische Darstellung der Organisation der Lakrimalen Funktionseinheit mit ihren peripheren und zentralen Stationen [32].

2.2.2.1.4 Der Tränenfilm

Der Tränenfilm erfüllt vielfältige Funktionen: Wie bereits kurz beschrieben dient der Tränenfilm dem Ausgleich von Unebenheiten auf der Kornea, um eine adäquate Lichtbrechung zu erreichen. Der Tränenfilm hat aber nicht nur Einfluss auf den Visus. Er dient weiterhin der Ernährung und dem Schutz der Kornea, welche keinen Anschluss an das Gefäßsystem hat, sowie dem Abtransport von zellulärem Debris. Damit spielt er auch eine wichtige Rolle in epithelialen Turnover Prozessen [34]. Um eine fehlerfreie Optik und optimale Versorgung der Gewebe zu gewährleisten, muss der Tränenfilm regelmäßig aufgefrischt werden. Dies wird durch den Lidschlag und die ständige Tränenfilmsekretion gewährleistet [33]. Bei geöffnetem Auge verteilt sich der Tränenfilm über die gesamte Augenoberfläche und kann in drei Komponenten unterteilt werden: das fornikale Kompartiment, die Tränenmenisken und der präokuläre Film. Der präokuläre Film bedeckt Kornea und Konjunktiva und kann weiter in

präkorneal und präbulbär unterteilt werden [34]. Der Tränenfilm misst eine Dicke von ungefähr $3 \mu\text{m}$ [10].

Der Aufbau des Tränenfilms wird klassischerweise anhand eines dreilagigen Modells beschrieben, welches in **Abbildung 4** skizziert wurde:

Die erste Schicht des Tränenfilms wird durch Transmembranmuzine gebildet. Diese befinden sich apikal der Kornea- und Konjunktivaepithelzellen und ragen als Glykokalix bis zu $0,5 \mu\text{m}$ in den Tränenfilm. Ihr werden vor allem protektive Funktionen zugeschrieben. Sie beinhaltet die Transmembranmuzine MUC1, MUC4 und MUC16 [34]. Die Muzinschicht bildet eine Art fließenden Übergang zwischen Tränenfilm und Augenoberflächenepithelien. Muzine sind große, komplexe, stark glykosylierte Glykoproteine [29, 30, 34, 35]. Man unterscheidet membrangebundene von sekretorischen, freien Muzinen, welche wiederum unterteilt werden in große, gelbildende Muzine und kleine, nicht gelbildende Muzine. Die gelbildenden Muzine wie beispielsweise MUC5AC werden von konjunktivalen Becherzellen gebildet. Im Tränenfilm konnten sowohl membrangebundene (MUC1, MUC4), als auch freie, gelbildende Muzine (MUC5AC) nachgewiesen werden [30]. Sie werden von den Epithelzellen der Kornea und Konjunktiva sowie von der Tränendrüse gebildet. Sie erhöhen die Hydrophilie der Epithelzellen und erleichtern somit die Verteilung des Tränenfilms über der Augenoberfläche. Außerdem tragen sie zur Abwehr und zum Schutz der Epithelzellen bei. Im Tränenfilm selbst sorgen sie für die Aufrechterhaltung der Hydratisierung [34]. Es liegt also nahe, dass sich Veränderungen im Muzinfilmm negativ auf die Gesundheit der Augenoberfläche auswirken. Unmittelbar an die Muzinschicht schließt sich die wässrige Phase an. Aufgrund des fließenden Übergangs ist eine klare Trennung dieser beiden Schichten in vivo wenig sinnvoll. Daher werden beide auch häufig als eine einzige Schicht zusammengefasst. Es wird dann von einer wässrig-mukösen Phase gesprochen. Die wässrige Phase bildet den Hauptanteil des Tränenfilms und wird primär von der Haupttränendrüse sezerniert. Aber auch die akzessorischen Wolfring- und Krause-Drüsen sowie die Epithelzellen der Augenoberfläche tragen zur Sekretbildung bei. Das wässrige Sekret enthält neben Muzinen, Sauerstoff, Metaboliten und Elektrolyten auch antimikrobielle Peptide und Proteine wie Lysozym und Laktoferrin sowie lösliche Immunglobuline zum Schutz der Augenoberfläche vor Infektionen [34]. Diese Schicht verleiht dem Tränenfilm seine charakteristische Osmolarität. Sie dient der Ernährung der Komponenten der

Augenoberfläche und der Kommunikation zwischen Muzin- und Lipidschicht [10]. Das physiologische menschliche Tränenproteom besteht aus ca. 1800 Proteinen [34]. Den Hauptanteil bilden Lysozym, Lactoferrin, Lipocalin-1, Lacritin, Prolin-reiche Proteine und das sekretorische Immunglobulin A. Die Proteine der Tränendrüse, Muzine, antimikrobielle Peptide und Proteine, die S100 Protein Familie, Cystatine, die 14-3-3 Protein Familie und die Matrix Metalloproteinasen spielen wichtige Rollen bei der Gesunderhaltung der Augenoberfläche [36].

Die äußerste Schicht des Tränenfilms bildet die Lipidschicht. Sie dient der Reduktion der Oberflächenspannung des präokulären Tränenfilms und erleichtert die Verteilung des Tränenfilms über die Augenoberfläche. Eine intakte Lipidschicht schützt den Tränenfilm vor Verdunstung. Produziert wird die Lipidschicht fast ausschließlich von den Meibom-Drüsen. Das Meibom Sekret besteht zu 95% aus unpolaren Lipiden und zu 5% aus amphipathischen Lipiden. Man kann die Lipidschicht grob in zwei Komponenten unterteilen: Eine unpolare äußere und eine polare innere Schicht. Zur wässrig-mukösen Phase ordnen sich grenzflächenaktive „Surfactant“ Moleküle an. An der Grenzfläche zur Luft befinden sich vermehrt lipophile Moleküle. Zu den unpolaren Lipiden zählen Wachsester, Cholesterolester, Phospholipide sowie Triglyceride. Zu den amphipathischen Lipiden zählen vor allem die (O-Acetyl)- ω -hydroxyfettsäuren (OAHFAs), eine Gruppe von Fettsäuren, die als grenzflächenaktive Substanzen agieren [34].

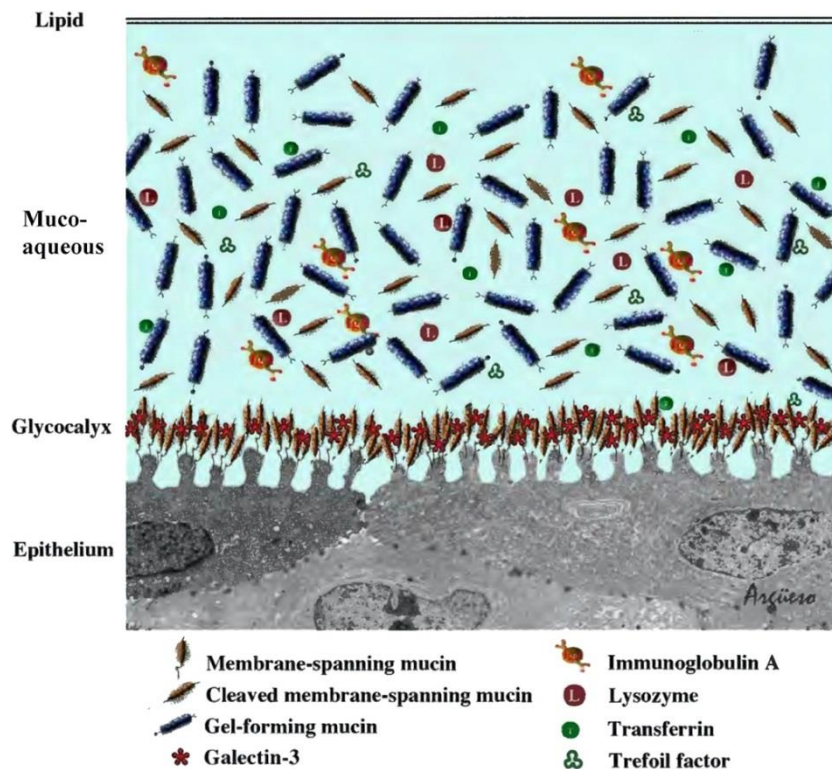


Abbildung 4: Der Tränenfilm

Darstellung des klassischen Aufbaus des Tränenfilms anhand eines 3-Lagen Modells [34].

2.2.2.2 Das trockene Auge

2.2.2.2.1 Definition und Epidemiologie

Das trockene Auge (DES), im Fachjargon auch als Keratokonjunktivitis sicca bezeichnet, ist eine multifaktorielle Erkrankung der Augenoberfläche. Als grundlegender pathogener Prozess gilt eine Störung der Homöostase des Tränenfilms, woraus charakteristische Befeuchtungsdefizite entstehen. Die subjektiven Symptome reichen von Diskomfort (z.B. Augenbrennen, Schmerzen, Fremdkörpergefühl) bis hin zu Störungen der visuellen Wahrnehmung. Tränenfilminstabilität, Hyperosmolarität, okuläre Entzündungsreaktionen sowie strukturelle Schäden an der Augenoberfläche und neurosensorische Abnormitäten spielen dabei wichtige ätiologische Rollen [37].

In Deutschland betrifft das trockene Auge weitaus mehr Menschen als zunächst angenommen. Nicht umsonst sprechen die Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) und der Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. (BVA) in ihrer aktuellen Leitlinie (3/2019) von einer Volkskrankheit mit einer Prävalenz von 15-17% [38]. Insgesamt sind Frauen häufiger betroffen als Männer, dies manifestiert sich wirklich signifikant jedoch erst mit zunehmendem Alter. Generell tritt die Erkrankung in

älteren Populationen vermehrt auf. Die weltweite Prävalenz liegt je nach Land zwischen 5-50%. Menschen asiatischer Abstammung leiden vergleichsweise häufiger an einem trockenen Auge, deshalb zählt dies zu den Risikofaktoren [39].

Es gibt zahlreiche Risikofaktoren, die bei der Entwicklung eines trockenen Auges eine Rolle spielen. Dazu zählen unter anderem die Meibom-Drüsen Dysfunktion [33], das weibliche Geschlecht [40], asiatische Ethnizität [41], die Anwendung bestimmter Medikamente (systemisch o. lokal), das Tragen von Kontaktlinsen [26] sowie bestimmte anatomische Gegebenheiten o. systemische Erkrankungen. Einige relevante Risikofaktoren sind in **Tabelle 2** klassifiziert und aufgelistet. Sowohl die aktuellen TFOS DEWS Report Paper als auch eine von der DOG/BVA erarbeitete Tabelle zu möglichen Risikofaktoren dienten hierbei als Vorlagen [26, 33, 38, 40].

Tabelle 2: Potenzielle Risikofaktoren für DES

Risikofaktoren	Beispiele
Intrinsisch	
1. Alter	
2. Hormone	Weibliches Geschlecht, Schwangerschaft/Stillzeit/ Menopause
3. Anatomie	u.a. Lidanomalien
4. Genetik	MHC Antigene
5. Grunderkrankungen	Rosazea, Sjögren Syndrom, Stevens-Johnson-Syndrom, Diabetes mellitus, Androgen-Mangel, Erkrankungen der Schilddrüse, GvHD
Extrinsisch	
1. Umweltbedingungen	Geringe Luftfeuchtigkeit, klimatisierte Räume, Rauch, Computerarbeit
Iatrogen	
1. Medikamente - systemisch	Betablocker, Psychopharmaka, Antihistaminika, Diuretika, Anticholinergika
2. Medikamente - lokal	Antiglaukomatose, Betablocker, Antihistaminika, Sympathomimetika, Anästhetika, Konservierungsmittel
3. Kontaktlinsen	Hart/ weich
4. Nach OP	LASIK, SMILE, Katarakt und Glaukom OPs, Lidchirurgie, Keratooplastiken
5. Kosmetika	Augen Make-up, Filler, Wimpernseren

2.2.2.2.2 Klassifikation

Das trockene Auge kann auf verschiedenen Ebenen klassifiziert werden: Zum einen kann eine Unterteilung nach diagnostischen Kriterien erfolgen, zum anderen können aufgrund der Ätiologie drei Subtypen benannt werden. Auf diagnostischer Ebene kann zwischen Patienten unterschieden werden, die zwar Symptome verspüren, jedoch klinisch keine objektivierbaren Zeichen aufweisen und solchen, bei denen sowohl Symptome als auch klinische Zeichen auffindbar sind. Bei symptomatischen Patienten ohne Klinik unterscheidet man zwischen präklinischen Stadien eines trockenen Auges und Patienten mit neuropathischem Schmerz, die im engeren Sinne keine Erkrankung der Augenoberfläche aufweisen. Die zweite große Gruppe stellen Patienten dar, bei denen keine Symptome vorhanden sind, jedoch klinische Zeichen auf ein trockenes Auge hindeuten. Diese Gruppe kann weiter unterteilt werden in Patienten im Prodromalstadium, die ein erhöhtes Risiko tragen manifest zu erkranken und Patienten mit verringerter dysfunktioneller Korneasensibilität. Bei dieser Gruppe handelt es sich

meist um langjährige Keratokonjunktivitis sicca Patienten, die im Verlauf der Krankheit eine Hyposensibilität aufgrund der pathologischen Konditionen entwickeln [37]. **Abbildung 5** stellt ein solches Klassifikationsschema dar unter Berücksichtigung diagnostischer und therapeutischer Parameter.

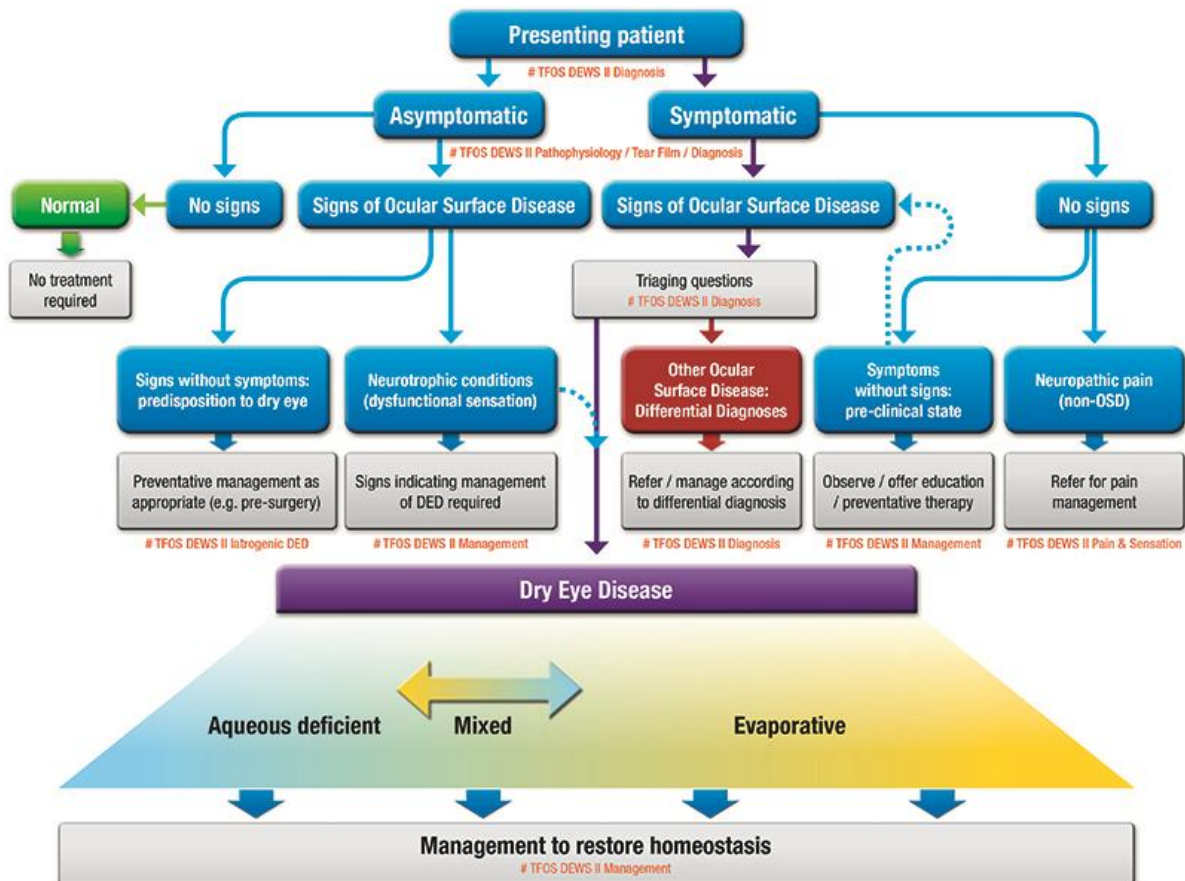


Abbildung 5: DES Klassifikation

Aktuelles Klassifikationsschema der Tear Film & Ocular Surface Society (TFOS) aus 2017 [37].

Aufgrund der Ätiologie kann die Keratokonjunktivitis sicca klassischerweise nach zwei vorherrschenden Konditionen unterteilt werden, die sich allerdings nicht gegenseitig ausschließen. Damit wird meist eine Untergliederung in 3 Subtypen vorgenommen, die Übergänge können jedoch fließend sein. Die Entwicklung eines trockenen Auges ist demnach entweder erhöhter Verdunstung oder mangelnder Tränenproduktion zuzuschreiben. Das evaporative oder auch verdunstungsbedingte trockene Auge, kurz EDE (Evaporative Dry Eye) hier auch als DRYlip bezeichnet, kommt meist häufiger vor als das durch Flüssigkeitsmangel hervorgerufene hyposekretorische trockene Auge, kurz ADDE (Aqueous Deficient Dry Eye) hier auch als DRYaq bezeichnet. Es wird

vermutet, dass Evaporation die Grundursache ist und EDE/ DRYlip damit eine Art Primärstadium darstellt [37].

Das EDE/ DRYlip kann subklassifiziert werden in Augenlid-assoziiertes EDE und Augenoberflächen-assoziiertes EDE. Unter Lid-assoziiertem EDE werden die Meibom-Drüsen Dysfunktion (MGD) oder Pathologien des Lidschlags als potenzielle Ursachen erhöhter Verdunstungsraten zusammengefasst [37]. Unter physiologischen Bedingungen dient unter anderem die intakte Tränenfilmlipidschicht dem Schutz vor vermehrter Evaporation und trägt zur Tränenfilmstabilisierung bei. Die Lipidschicht wird hauptsächlich von den Meibom-Drüsen sezerniert. Es liegt also nahe, dass eine Funktionsstörung der Meibom-Drüsen mit Hyposekretion zu erhöhtem evaporativem Flüssigkeitsverlust führen kann. Eine Funktionsstörung der Meibom-Drüse kann entweder primär auftreten oder sekundär z.B. im Rahmen bestimmter Haut- oder Augenerkrankungen vorkommen. Beispiele hierfür sind Rosazea, atopische Dermatitis, Pemphigus oder das Stevens-Johnson-Syndrom. Die MGD kann darüber hinaus auch auf bestimmte lokal applizierte Medikamente wie beispielsweise Antiglaukomatosa zurückzuführen sein. Diese stehen im Verdacht durch Zellschädigung eine Meibom-Drüsen Dysfunktion zu begünstigen [42]. Zu den Lid-assoziierten Faktoren zählt weiterhin der Lidschlag. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Verteilung und Erneuerung des Tränenfilms. Die Blinzelrate hängt von einigen Faktoren wie der Umgebung, sozialer Umstände und persönlichem Verhalten ab. Die Länge des Blinzelintervalls steht in direktem Zusammenhang mit der Osmolarität des Tränenfilms. Je geringer die Blinzelrate, desto mehr Verdunstung. Auch eine vergrößerte Lidöffnung führt zu vermehrter Evaporation. Es kommt zu einer Erhöhung der Osmolarität des Tränenfilms, die Augenoberfläche wird zunehmend verdunstungsbedingtem Stress ausgesetzt und reagiert entsprechend [33]. Augenoberflächen-assoziiertes EDE kann beispielsweise durch das Tragen von Kontaktlinsen oder Änderungen in der Muzin Qualität/ Quantität ausgelöst werden [37].

Dem ADDE/ DRYaq liegt meist eine Funktionsstörung der Haupttränendrüse zugrunde. Die Tränensekretion ist verringert, es herrschen normale Verdunstungsraten. Erkrankungen oder Schädigungen der Tränendrüse können beispielsweise durch Autoimmunerkrankungen verursacht werden. Die in diesem Zusammenhang am häufigsten vorkommende ist das sog. Sjögren Syndrom, das in westlichen Ländern die häufigste Ursache für ADDE darstellt. Bei dieser chronischen

Erkrankung werden Autoantikörper gegen Strukturen exokriner Drüsen gebildet. Es kommt zu Entzündungszellinfiltraten und zur Zerstörung der Drüse. Befallen sind typischerweise die Tränen- und Speicheldrüsen. Das Sjögren Syndrom wird häufiger bei Frauen diagnostiziert und führt zur typischen Symptomkombination aus Keratokonjunktivitis sicca und Xerostomie. Das ADDE wird daher häufig subklassifiziert in Sjögren Syndrome Dry Eye (SSDE) und Non-Sjögren Syndrome Dry Eye (NSDE). Die Subgruppe NSDE vereint multiple Ursachen, die zu einer Reduktion des Tränenflusses führen: Zum einen kann es altersbedingt oder durch Schäden an innervierenden Strukturen zu einer Hyposekretion kommen. Durch die Verwendung von Lokalanästhetika, trigeminale oder postoperative Nervschädigungen kann es zu einer Blockade des lakrimalen Reflexbogens kommen. Auch die Einnahme systemisch wirksamer Medikamente wie Betablocker, Antihistaminika, Spasmolytika, Diuretika und einige psychotrope Substanzen können als unerwünschte Arzneimittelwirkungen die Tränensekretion vermindern. Nicht nur verminderte Sekretion, sondern auch eine Obstruktion der Tränenabflusswege kann zu einem Flüssigkeitsmangel führen. Ursachen hierfür können beispielsweise Vernarbungen im Rahmen chemischer Verbrennungen oder einer Graft-versus-Host Disease (GvHD) sein. [33]. Wie oben schon erwähnt, ist es jedoch vor allem in späteren Krankheitsstadien nicht unüblich, dass beide Konditionen koexistieren, daher stellt der dritte Subtyp die Kombination aus ADDE und EDE (DRYaq/lip) dar [37].

2.2.2.2.3 Tränenfilmosmolarität und Pathophysiologie

Bei geöffnetem Auge muss der Tränenfilm vor Austrocknung geschützt werden. Unter physiologischen Bedingungen sorgen eine Reihe homöostatischer Mechanismen für die Aufrechterhaltung eines gesunden und stabilen Tränenfilms. Die Augenoberfläche sendet Signale, woraufhin die Tränenfilmsekretion und -verteilung reguliert wird [33].

Die Osmolarität des Tränenfilms spielt eine entscheidende Rolle für die Gesundheit der Augenoberfläche. Sie kann durch verschiedene intrinsische und extrinsische Faktoren beeinflusst werden, die in **Abbildung 6** zusammenfassend dargestellt sind. Physiologische Werte liegen bei ungefähr $302 \pm 9,7$ mOsm/L und müssen stets stabil gehalten werden. Schon kleinste Abweichungen können mit Symptomen und Anzeichen eines trockenen Auges einhergehen. Daher gilt die Tränenfilmosmolarität als einer der zentralen Faktoren bei der Pathogenese der Keratokonjunktivitis sicca. Ausgelöst werden kann die Hyperosmolarität entweder durch verringerten lakrimalen

Tränenfluss oder durch vermehrte Verdunstung des Tränenfilms [33]. Eine hyperosmolare Umgebung verursacht sowohl direkt als auch indirekt im Rahmen der Entzündungsreaktionen Schäden an der Augenoberfläche. Die kornealen und konjunktivalen Epithelzellen bilden zusammen mit der Muzinschicht, der Glykokalix und antimikrobiellen Proteinen (Lysozym, Laktoferrin, Lipocalin und Defensine) das Abwehrsystem der Augenoberfläche. Den Epithelzellen kommt eine Art Wächterfunktion zu. Bei vermehrtem hyperosmolarem Stress wird innerhalb der Epithelzellen eine Signalkaskade initiiert, die zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren (u.a. IL-1, IL-6, TNF-alpha) und Proteasen führt. Diese sind für die Aufrechterhaltung und Progression entzündlicher Prozesse essenziell. Beispielsweise kommt es zu einer verstärkten Freisetzung gewebezersetzender Matrix-Metalloproteinasen (MMP-9) in kornealen Epithelzellen und zu einer T-Zell Aktivierung. Dies führt zu einer progredienten Zerstörung der epithelialen Barriere. Es folgen lokale Epithelopathien. Die Schädigung produzierender Strukturen (Becher- und Epithelzellen) resultiert in der Ausbildung eines instabilen Tränenfilms. Dieser Tränenfilm ist charakterisiert durch frühe Aufrisszeiten und ist somit nicht in der Lage das Auge während eines Blinzelintervalls ausreichend vor Verdunstung zu schützen. Es bilden sich lokale hyperosmolare „Hot Spots“. Diese Bereiche sorgen auf der Augenoberfläche für wiederholte extreme Stressreaktionen. Es stellt sich eine hyperosmolare inflammatorische Umgebung ein, die sich auf Dauer noch schädlicher auf Epithel- und Becherzellen auswirkt. Die parallel ablaufenden Entzündungsprozesse fördern zudem die Genese chronisch neurogener Entzündungsvorgänge und tragen zur Verschlimmerung des Krankheitszustands bei. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung der typischen Schmerzsymptomatik. Befeuchtungsdefizite und erhöhte Friktion führen zu mechanischen Schäden sowie chronischer Irritation der Gewebe. Es entstehen Unebenheiten der Oberfläche die sich als visuelle Symptome bemerkbar machen. Beim trockenen Auge handelt es sich um eine dynamische Erkrankung mit der Tendenz sich selbst zu unterhalten. Daher spricht man auch häufig davon, dass es sich bei der Pathogenese um eine Art Teufelskreis, den „vicious circle“ handle. Ein instabiler Tränenfilm kann jedoch auch ohne eine primär auftretende Hyperosmolarität ausgelöst werden. Dann führt erst die verfrühte Tränenfilmaufrisszeit zu einer hyperosmolaren Umgebung. Primäre Auslöser für eine Destabilisierung können unter

anderem okuläre Allergien, Xerophthalmie, das Tragen von Kontaktlinsen oder die lokale Anwendung von Medikamenten/ Konservierungsmitteln sein [33].

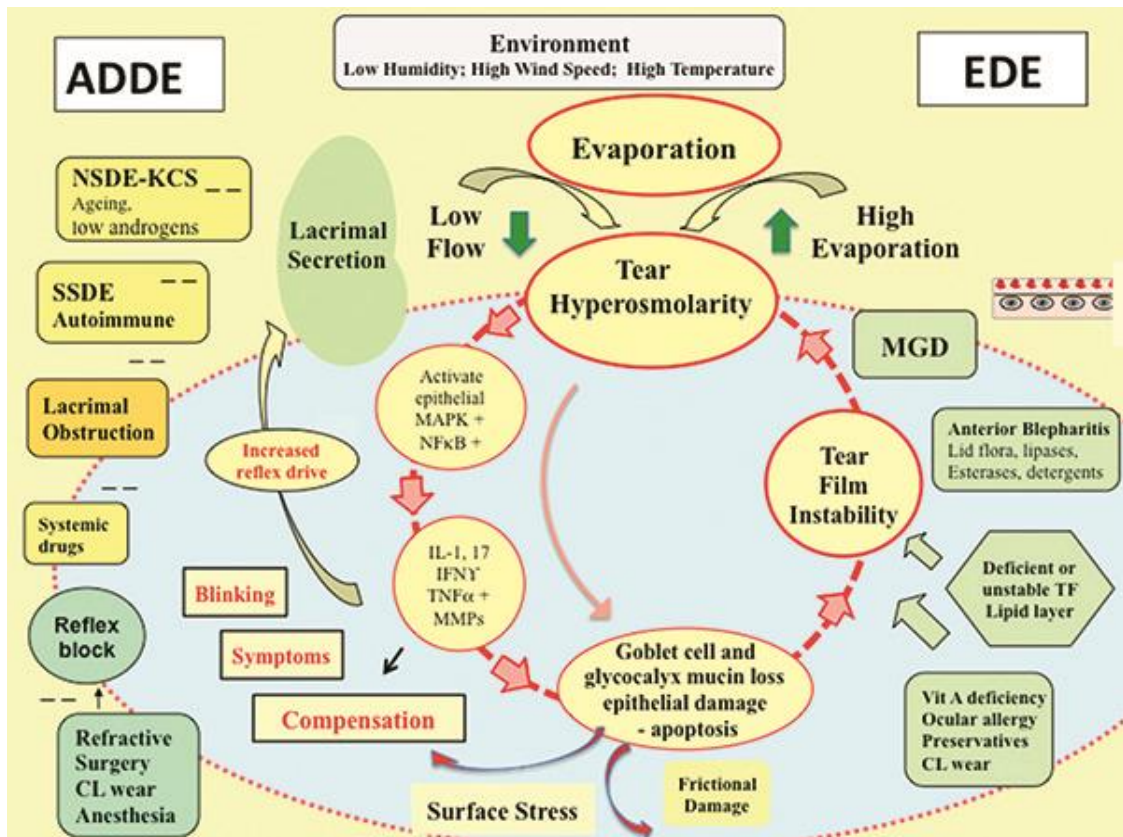


Abbildung 6: Pathophysiologie DES

Übersicht zu extrinsischen und intrinsischen Faktoren die zur Pathogenese und Aufrechterhaltung der Erkrankung beitragen, aus TFOS DEWS II Pathophysiology Report [33].

2.2.2.2.4 Das iatrogen verursachte trockene Auge: Einfluss systemischer und topischer Medikamente

Wie bereits erwähnt, können einige systemisch oder lokal wirksame Medikamente Einfluss auf die Tränenproduktion oder die Augenoberfläche nehmen. Dabei können sie entweder selbst ein trockenes Auge verursachen oder die akute Exazerbation einer bereits bestehenden Erkrankung hervorrufen. Zu den systemischen Medikamenten, die in Bezug zur Trockenheitssymptomatik stehen, zählen einige Analgetika (NSAIDs wie Aspirin oder Ibuprofen, Opioide, Cannabinoide), Anästhetika, anticholinerge Wirkstoffe wie Atropin, einige Antihistaminika (z.B. Diphenhydramin), einige Antidepressiva o. antipsychotische Medikamente (u.a. Amitryptilin, Citalopram, Mirtazapin, Olanzepin), Anti-Parkinson Medikamente (z.B. Levodopa, Benzhexol), Spasmolytika (Oxybutynin), abschwellend wirksame Mittel wie Xylometazolin,

Antihypertensive Wirkstoffe (u.a. Atenolol, Propranolol sowie einige Thiazide), Medikamente gegen Lepra und Malaria (z.B. Hydrochloroquin), außerdem einige Anxiolytika (u.a. Diazepam, Alprazolam, Lorazepam), hormonell wirksame Medikamente (Alfuzosin, Estrogen, Progesteron, u.a.) sowie Neurotoxine (Botulinumtoxine) und Sedativa (z.B. Phenylbarbitol) [26]. Auch die übermäßige Gabe von Vitamin A kann sich negativ auf den Tränenfilm auswirken. Einige der aufgelisteten Medikamente o. Substanzklassen haben nur indirekte Effekte. Eine wichtige Klasse stellen die anticholinergen Medikamente dar. Sie wirken v.a. über G-Protein gekoppelte M-Rezeptoren auf die Tränendrüse und Konjunktivalzellen. Adrenerge Substanzen wie Betablocker oder Alpha-Agonisten können sowohl Effekte auf die Qualität als auch auf die Quantität haben. Dies geschieht meist über eine durch Proteinkinase C vermittelte Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Weiterhin können einige Medikamente o. Substanzen selbst in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden (z.B. Alkohol, Ibuprofen, Aspirin o. Bisphosphonate) und mechanische Irritation, Hypersomolarität und Tränenfilminstabilität verursachen [26].

Veränderungen ausgelöst durch lokal angewandte Medikamente treten vor allem bei Glaukom Patienten unter antiglaukomatöser Therapie auf. Relevante Faktoren sind hierbei die Anzahl verwendeter Produkte, die Verwendung konservierungsmittelhaltiger Produkte, Wirkstoffe und Formulierungen (z.B. pH-Wert). Dabei können die Medikamente auf unterschiedliche Weise wirken. Sie können direkt allergische, toxische o. entzündliche Reaktionen auslösen, andere interagieren mit dem Tränenfilm oder führen zu einer Schädigung wichtiger Gewebe und Zellen. Weiterhin kann auch eine Schädigung kornealer Nerven eine gestörte Tränenfilmsekretion bedingen. Zu den potenziell DES-verursachenden topischen Medikamenten zählen: Betablocker (u.a. Betaxolol, Carteolol, Timolol), Sympathomimetika (z.B. Apraclonidin und Brimonidin), Carboanhydrasehemmer (bspw. Dorzolamid), Cholinergika (z.B. Pilocarpin), Prostaglandinanaloga (Bimatoprost, Latanoprost, Travoprost, u.w.), einige antiallergische o. antivirale Augentropfen, lokale Anästhetika (u.a. Tetracain, Proxymetacain) sowie schmerzstillende Substanzen (bspw. Diclofenac, Bromfenac) [26].

2.2.2.2.5 Klinisches Bild und Diagnostik

Nicht immer korrelieren Symptome mit dem klinischen Erscheinungsbild, was die Diagnostik zusätzlich erschwert. So gibt es Patienten, die trotz nachweisbarer

Epithelschädigungen völlig asymptomatisch sind und solche, die Symptome verspüren, aber keinerlei klinische Zeichen aufweisen. Symptome reichen von Missempfindungen über visuelle Störungen (wie Verschlechterung des Sehens und verschwommenes Sehen) bis hin zur Manifestation einer akuten Entzündung. Patienten berichten unter anderem von geröteten und tränenden Augen, Fremdkörpergefühl und Einschränkungen der Lebensqualität. Um die subjektive Symptomatik erfassen zu können, ermittelt man anhand eines Fragebogens mit 6 Fragen zum Thema visuelle Störungen und Funktion den Ocular Surface Disease Index (OSDI) [43].

Visuelle Symptome entstehen zum einen aufgrund der Instabilität des Tränenfilms [33]. Ein gängiges klinisches Untersuchungsverfahren zur Beurteilung der Stabilität des Tränenfilms ist die Bestimmung der Tränenfilmaufrisszeit. Sie ist definiert als die Zeit, die zwischen dem letzten Lidschlag und dem ersten Riss im Tränenfilm liegt. Um den Tränenfilm sichtbar zu machen, kommt meist Fluorescein zur Anwendung. Je nach Fluoresceinmenge liegen die Grenzwerte unterhalb derer man von einem trockenen Auge ausgeht bei < 5 s oder < 10 s. Die Sensitivität und Spezifität dieses Tests wurden unter anderem bei Patienten mit SSDE bestimmt und liegen bei ca. 72% und 61%. Zum anderen entstehen visuelle Störungen durch Epithelschäden, die zu Oberflächenunebenheiten führen [33]. Diese können anhand der Untersuchung von Lidern, Horn- und Bindehaut mit einer Spaltlampe sichtbar gemacht werden. Der Nachweis sogenannter LIPCOFs (Lid Parallel Conjunctival Folds) im lateralen unteren Quadranten der Konjunktiva erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass der Untersuchte an einem trockenen Auge erkrankt. Auch durch bestimmte Färbemethoden können Schäden an Strukturen der Augenoberfläche nachgewiesen werden. Dazu werden meist Fluorescein oder Lissamingrün verwendet. Fluorescein wird klinisch sichtbar, sobald eine Störung der Integrität des Epithels vorliegt. Lissamingrün färbt Epithelzellen sofern eine Schädigung der Zellmembran vorliegt. Die Färbung von Kornea und Konjunktiva liefern in fortgeschrittenen Stadien zuverlässig Informationen über Schweregrad der Krankheit. In frühen Stadien konnte nur eine schwache Korrelation mit dem Schweregrad nachgewiesen werden [43].

Die Bestimmung der Osmolarität des Tränenfilms stellt einen wichtigen Baustein bei der Diagnosestellung dar [33]. Physiologische Werte liegen bei $302,2 \pm 8,3$ mOsm/l. Meist spricht man ab 308 mOsm/L von einem trockenen Auge. Die Osmolarität zeigt

die stärkste Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung [43]. Es kommt allerdings auch vor, dass Patienten hypersensibel auf normale Osmolaritätslevel reagieren. Es wird vermutet, dass aufgrund des Verlusts der epithelialen Schutzbarriere korneale Nervenendigungen freiliegen und sich die Überempfindlichkeit darin begründet [33]. Das Auftreten von Schmerzen kann unter anderem auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (Zytokine, Prostaglandine und Neurokinine) zurückzuführen sein [33]. Die Entzündung manifestiert sich meist durch eine Rötung der Konjunktiva, die aufgrund der entzündungsbedingten Vasodilatation auftritt. Zum Nachweis von Entzündungsvorgängen stehen diverse Verfahren zur Verfügung: Der Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen in Tränen gilt als Marker für den Verlust der epithelialen Barrierefunktion. Es besteht die Möglichkeit innerhalb weniger Minuten mithilfe eines Assays MMP-9 Level in Tränen zu bestimmen. Auch der Nachweis bestimmter Zyto- und Chemokine kann Aufschluss über spezifische Krankheitsprozesse geben. Der Nachweis von Entzündungen ist allerdings kaum spezifisch für das trockene Auge [43]. Schmerzen können außerdem bedingt durch mechanische Reibung entstehen. Charakteristisch für die Entwicklung eines ADDE (DRYaq), ist ein Mangel an Tränenflüssigkeit. Der Verlust des Gleitmittels zwischen Augapfel und Augenlid, führt zu reibungsbedingten Schäden und die chronische Irritation begünstigt Entzündungsvorgänge [33]. Ein Mangel an Tränenvolumen kann durch den Schirmer Test aufgedeckt werden. Beim Schirmer Test wird ein spezieller Teststreifen ins temporale Drittel des Unterlids eingehängt, sodass die fortan gebildete Tränenflüssigkeit vom Teststreifen aufgesogen wird. Nach 5 Minuten wird der Streifen entnommen und die Länge der Tränenlaufstrecke ermittelt. Diagnostische Grenzwerte liegen auch hier zwischen ≤ 5 mm/ 5 min und ≤ 10 mm/ 5 min. Der Schirmer Test kann mit und ohne die vorherige Applikation eines Lokalanästhetikums durchgeführt werden. Wird auf das Anästhetikum verzichtet, kann auch der Reflextränenfluss mitbestimmt werden. Es wird empfohlen den Test bei geschlossenem Auge durchzuführen, um die Variabilität der Ergebnisse zu reduzieren. Die Sensitivität liegt bei ca. 77-85% und die Spezifität bei 70-83% [43].

2.2.2.2.6 Therapie

Die Wiederherstellung der Homöostase des Tränenfilms wird als eines der Hauptziele der Therapie des trockenen Auges angesehen. Jedoch kann bei Erkrankungen nicht immer die Ursache direkt bekämpft werden. Häufig wird nur symptomatisch therapiert. Um kausal therapieren zu können, müssen einige Faktoren berücksichtigt werden:

Individuelle Symptome müssen aufgenommen werden, die Physiologie der Meibom-Drüsen und die Durchgängigkeit ihrer Ausführungsgänge überprüft werden. Zudem sollten Informationen über Qualität und Quantität der Lipidschicht und Parameter der Tränenproduktion bekannt sein. Auf diese Weise kann herausgefunden werden, welche Form des trockenen Auges (ADDE/EDE) im klinischen Bild dominiert und worauf die Therapie primär abzielen muss. Handelt es sich um Hybridformen, dann ist es sinnvoll therapeutisch an beiden Punkten anzusetzen.

Liegt ein Mangel an Tränenflüssigkeit vor, können diese entweder durch künstliche Tränenflüssigkeit ersetzt oder durch Verschluss der Abflusswege im Auge gehalten werden. Mittlerweile gibt es auch die Möglichkeit die Tränensekretion durch bestimmte Agenzien zu stimulieren. Bei den Tränenersatzmitteln unterscheidet man synthetische von biologischen Tränenersatzmitteln. Bei synthetischen Tränenersatzmitteln werden zur Substitution der wässrigen Phase Stoffe wie Carbomer 940, Carboxymethylcellulose, Dextran, Hylauronsäure, Hydroxypropylmethylcellulose oder Polyvinylalkohol zugesetzt. Sie erhöhen die Viskosität der Formel, wirken wie ein Gleitmittel und erhöhen die Verweildauer auf der Augenoberfläche. Bei evaporativen Formen des trockenen Auges liegt meist ein Defizit in der Lipidschicht vor. Zum Ersatz der Lipidschicht wurden Emulsionen entwickelt, die Phospholipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Triglyceride oder auch Mineralöle und natürliche Pflanzenöle enthalten. Biologische Tränenersatzmittel basieren auf der Verwendung autologer Blutseren. Autologes Serum zeigt ähnliche biochemische Eigenschaften wie die Tränenflüssigkeit und enthält Wachstumsfaktoren, Nährstoffe und Vitamine. Aufgrund des Gehalts von epitheliotrophen Faktoren (EGF, NGF,...) ist es in der Lage die korneale Wundheilung zu fördern. Alternativ kann das Blutserum auch aus Blut der Nabelschnur gewonnen werden oder es können Thrombozytenkonzentrate wie PRP (Platelet-rich-Plasma) angewendet werden. Momentan ist die Verwendung autologer Tränenersatzmittel eher schwerwiegenderen Fällen vorbehalten. Einen anderen Ansatzpunkt bietet der Verschluss der Tränenabflusswege, um die selbst gebildete Tränenflüssigkeit länger auf der Augenoberfläche zu halten. Dabei werden die Puncta lacrimalia dauerhaft oder temporär ein- oder beidseitig verschlossen. Eine weitere Möglichkeit zur Tränensubstitution bildet die pharmakologische Stimulation des eigenen Tränenflusses. Sie können sowohl die wässrige als auch die muköse oder fettige Tränensekretion stimulieren. Es gibt Präparate zur lokalen Anwendung am Auge oder oralen Einnahme (z.B. Pilocarpin). Bei einem hyperevaporativ verursachten

Trockenen Auge (EDE), das meist auf einer Dysfunktion der Meibom-Drüse beruht helfen lipidreiche Sprays, Verbesserung der Lidhygiene oder die Anwendung warmer Kompressen, um das Meibom-Sekret zu verflüssigen und Verstopfungen der Ausführungsgänge zu lösen. Auch physikalische Therapie kann sich positiv auf die Sekretion auswirken. Therapeutische Kontaktlinsen finden in schwerwiegenderen Stadien Anwendung.

Ein weiterer therapeutischer Aspekt ist die anti-entzündliche Therapie: Hier kommen sowohl topische Glucocorticoide (GC) als auch Nicht-steroidale Immunmodulatoren zum Einsatz. Topische GC entfalten ihre immunsupprimierende Wirkung indem sie die Aktivierung der MAP-Kinase, die Expression von MMP-9 und weiterer proinflammatorischer Zytokine unterdrückt. Damit wird die Integrität kornealer Tight-Junctions bewahrt. Außerdem spielen GC eine Rolle in der neuronalen Schmerzmodulation und könnten daher für die Therapie neuropathischer Schmerzen genutzt werden. In zahlreichen Tierstudien konnten selektive GC-Rezeptor Agonisten und COX2 Rezeptor Antagonisten positive Ergebnisse erzielen. Eine Langzeitanwendung sollte allerdings streng abgewogen werden, da okuläre Hypertension, die Entwicklung eines Katarakts sowie opportunistische Infektionen zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen zählen. Zu den Nicht-steroidalen Immunmodulatoren zählen Cyclosporin A, Tacrolimus, NSAIDs, Biologicals und Neuropeptide. Außerdem kann auch mit systemischer oder lokaler Antibiose (Tetrazykline, Azithromycin) gearbeitet werden. Cyclosporin A und Tacrolimus bewirken eine Hemmung der IL-2 abhängigen T- Lymphozyten Aktivität . Cyclosporin A , das anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften besitzt, liefert in klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit bestehen allerdings Probleme eine Formel zur lokalen Anwendung bereit zu stellen. Im Gegensatz zu Cyclosporin A hat Tacrolimus ein höheres immunsupprimierendes Potential. Es wird aktuell in diversen Studien auf seine Effizienz getestet. In klinischen Studien konnte bei Anwendung Nicht-steroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) eine Reduktion okulärer Symptome nachgewiesen werden. Vor allem Diclofenac ist in der Lage die korneale Sensibilität herabzusetzen. Die Anwendung von NSAIDs wird bei Patienten mit Sjögren Syndrom empfohlen. Alternativen sind unter anderem der Einsatz biologischer Substanzen wie Lubricin, die Anwendung von Wachstumsfaktoren (rh-NGF), die gegen Interleukine gerichtetet Therapie mit Interleukin-Rezeptor Antagonisten oder Antikörpern (IL-1Ra, IL-17), die

auf Tumor-Nekrose Faktoren gerichtete Therapie mit TNF-alpha oder TSG-6 oder die Verwendung von Neuropeptiden (VIP, NPY und CGRP). Sie werden zurzeit erforscht.

Neben der pharmakologischen Therapie kann in manchen Fällen auch die chirurgische Intervention in Betracht gezogen werden. Beispielsweise, wenn anatomische Gegebenheiten für die Trockenheitssymptomatik verantwortlich sind. Auch durch Achtsamkeit und Lebensstil-Veränderungen (ausreichende Flüssigkeitszufuhr, ausgewogene Ernährung reich an essentiellen Fettsäuren, Reduktion austrocknender Umgebungsfaktoren) können ganz konservativ Verbesserungen erzielt werden [25].

2.2.3 Das Glaukommedikamenten-assoziierte trockene Auge

2.2.3.1 Klinisches Bild

Das klinische Bild entspricht dem einer Keratokonjunktivitis sicca. Die Symptome umfassen: Augenbrennen, das Gefühl von Augentrockenheit, Fremdkörpergefühl, Stechen, Augentränen sowie Rötung der Bindehaut und Lidränder. In einigen klinischen Studien konnten bei Glaukompatienten unter topischer Therapie sowohl Zeichen für korneale und konjunktivale Schädigungen als auch verkürzte Tränenfilmaufriss- und Schirmer-Test Zeiten nachgewiesen werden [26, 27, 44]. Auch konnte belegt werden, dass die Osmolarität des Tränenfilms mit der Anzahl der verwendeten Medikamente, der Häufigkeit der Anwendung und der Dosis verwendeter Konservierungsmittel korreliert [10].

2.2.3.2 Pathophysiologie

Besteht eine Glaukomerkrankung kommt es im Verlauf der Krankheit zu zahlreichen Veränderungen okulärer Strukturen. Zum einen ist dies der Erkrankung selbst geschuldet, zum Großteil jedoch therapiebedingt [10]. Topische Antiglaukomatosa können auf Ebene der Augenoberfläche immunologische, entzündliche, allergische oder toxische Effekte ausüben oder durch chemische Interaktion mit dem Tränenfilm eine Destabilisierung bewirken. Glaukommedikamente bestehen aus mehreren Komponenten. Dem aktiven Wirkstoff sind einige Zusatzstoffe beigemischt, damit dieser lokal angewendet werden kann. Um mikrobielle Kontamination zu reduzieren enthalten die Formulierungen meist Konservierungsmittel. Die toxische Wirkung von Konservierungsmitteln bei chronischer Exposition konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [26]. Aber nicht nur die Zusatzstoffe, sondern auch die aktiven Wirkstoffe können molekulare und strukturelle Veränderungen auf der Augenoberfläche induzieren [10].

Das am häufigsten in Formulierungen zur Glaukomtherapie vorkommende Konservierungsmittel ist Benzalkoniumchlorid (BAK). BAK zählt zu den quartären Ammoniumverbindungen. Seine chemischen Eigenschaften beinhalten eine hohe Wasserlöslichkeit, durch die bipolaren Komponenten ist es in der Lage Oberflächenspannungen zu reduzieren. Seine antimikrobiellen Eigenschaften beruhen auf seiner Wirkung als Detergenz. Es löst Lipide und zerstört damit bakterielle Zellwände und -membranen. Diese Wirkung ist allerdings nicht nur auf Bakterienzellen begrenzt: Kommt es zum Kontakt zwischen BAK und der Lipidschicht des Tränenfilms, werden auch hier Lipide herausgelöst [26]. Die Destabilisierung des Tränenfilms begünstigt eine Zunahme von Verdunstungsvorgängen, was wiederum eine Hyperosmolarität mit sich bringt. Darüber hinaus werden zytotoxische Entzündungsmediatoren freigesetzt. BAK selbst wirkt ebenfalls proinflammatorisch und kann die Freisetzung bestimmter Entzündungsmediatoren fördern [26, 45, 46]. In einer Studie zur Beurteilung der Epithelbarriere der Hornhaut, konnte nachgewiesen werden, dass die Permeabilität durch die Anwendung mit BAK konservierter Augentropfen gesteigert wird [26, 47]. Die schädliche Wirkung von BAK auf die Augenoberfläche ist seit Jahren bekannt. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass BAK Strukturen schädigt, die an der Homöostase und Bildung des Tränenfilms beteiligt sind. Konjunktivale Becherzellen tragen durch die Sekretion löslicher Muzine zur Stabilisierung und zum Schutz des Tränenfilms bei. Diese Zellen reagieren sehr sensibel auf entzündlichen oder toxischen Stress. BAK führt bei längerer Exposition in Konzentrationen wie sie in gängigen Formulierungen vorkommen zur Zerstörung der Muzinschicht und zur Reduktion der Becherzellichte [26, 48, 49]. Die Muzinschicht wird außerdem stärker geschädigt, wenn Antiglaukommedikamente mehrmals täglich angewandt werden [10, 50]. Auch die aktiven Komponenten konservierungsmittelfreier Präparate können sich auf die Becherzellichte auswirken. Es wurden sowohl von Reduktionen als auch von gleichbleibenden Becherzellichten berichtet [10]. Interessant ist allerdings, dass sich die Anwendung konservierungsmittelfreier Prostaglandinanaloga (PGF 2 alpha) positiv auf konjunktivale Becherzellen auszuwirken scheint [10, 51-55]. Es wird vermutet, dass die Proliferation über den FP-Rezeptor angeregt und damit die Produktion der Muzine (MUC5AC) gefördert wird [10, 56].

An der Kornea induziert BAK den Zelltod von Epithelzellen sowie Nervenschädigungen und verzögert Wundheilungsprozesse [25, 26]. Alternative Konservierungsmittel wie

das „SofZia“ System oder Polyquaternium-1 scheinen weniger schädliche Effekte zu haben [9, 10].

Das Sekret der Meibom Drüsen bildet die Grundlage für eine funktionierende Lipidschicht des Tränenfilms. Auch die Drüsen selbst zeigen unter Anwendung von Antiglaukommedikamenten bestimmte Veränderungen. Es wird vermutet, dass sich BAK und PGA am stärksten irritierend auf die Drüsen auswirken [10].

Auch an epithelialen Strukturen konnten einige Veränderungen festgestellt werden: Das erhöhte Auftreten von Keratinisierungen, Desquamationsprozessen, squamösen Metaplasien, Epithelverdickungen und Entzündungszellinfiltraten dient als Nachweis schädigender Prozesse. Das Korneaepithel zeigt unter anderem Veränderungen der Zelldichte, Polymorphismen und Zelldesquamation. Durch vermehrte Desquamation kommt es zur Ausbildung einer unregelmäßigen Oberflächenstruktur. Veränderungen des Epithels resultieren auch in Modifikationen des Tränenfilms, vorwiegend der wässrigen Phase. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass der Großteil der Antiglaukomatosa die Sekretion der wässrigen Phase reduziert. Dabei scheint sich Brimonidin (Sympathomimetikum) am stärksten auf die Tränenproduktion auszuwirken [10, 57].

Alle diese Faktoren begünstigen oder induzieren Mechanismen, die bei der Ausbildung eines trockenen Auges von Bedeutung sind.

Da sich bereits eine Vielzahl an Studien mit der Auswirkung von Benzalkoniumchlorid auf die Lipidschicht und die zellulären Komponenten der Augenoberfläche beschäftigt haben, wird es zunehmend interessanter, inwieweit sich die aktiven Wirkstoffe auf die Qualität und Quantität des Tränenfilms auswirken. Insbesondere Veränderungen in der Proteinzusammensetzung der wässrigen Phase könnten weitere Hinweise auf pathophysiologische Mechanismen liefern.

2.2.3.3 Therapie

Um Patienten mit bestehender Beschwerdesymptomatik zu helfen, ist es vor Therapiebeginn relevant herauszufinden, welche Rolle die angewandten Medikamente spielen. Dies wird durch einige Faktoren erschwert: Beschwerden treten meist erst mit einer gewissen Latenzzeit auf. Viele Patienten bemerken die ersten Symptome weit nach Erstdiagnose der Glaukomerkrankung und Therapiebeginn. Zu diesem Zeitpunkt ist es schwierig Rückschlüsse auf den primären Auslöser zu ziehen.

Zudem werden häufig mehrere Medikamente gleichzeitig angewendet. Ein weiterer Punkt ist, dass beide Erkrankungen gehäuft im Alter auftreten und dabei weitere Komorbiditäten und Medikamenteneinnahme nicht auszuschließen sind. Außerdem ist die Augenoberfläche möglicherweise durch andere Faktoren vorgeschädigt. Zu guter Letzt darf nicht vergessen werden, dass ein Therapieabbruch häufig keine Alternative darstellt, da sonst eine Progression der Grunderkrankung zu befürchten wäre. Wenn der Verdacht besteht, dass das trockene Auge iatrogen verursacht sein könnte, wird empfohlen eine subtraktive Strategie zu verfolgen. Da die negativen Effekte meist dosisabhängig auftreten, kann es hilfreich sein, die Anzahl der Augentropfen die Konservierungsmittel enthalten zu reduzieren. Es kann auch auf Formulierungen mit alternativen Konservierungsmitteln oder auf konservierungsmittelfreie Präparate zurückgegriffen werden. Hier fehlen allerdings klinische Langzeitdaten zur Verträglichkeit. Tritt immer noch keine Besserung auf, kann symptomatisch mit Tränenersatzmitteln Abhilfe geschaffen werden. Als Alternative zur medikamentösen Glaukomtherapie stehen chirurgische Verfahren wie die Laser Trabekuloplastik zu Verfügung [26]. Meist müssen aber auch hier adjuvant Augentropfen angewendet werden [9].

Die hier zusammengefassten Therapieansätze erweisen sich in der klinischen Anwendung manchmal als unbefriedigend. Auch der Kostenunterschied zwischen konservierungsmittelhaltigen und freien Präparaten, die meist deutlich teurer sind, spielt bei der Therapiewahl eine Rolle [58]. Um die Therapieadhärenz der Patienten nicht zu gefährden bedarf es unter anderem neuer Therapieansätze. Auch ein Medium zur Vorhersagbarkeit oder zur Identifikation noch unbekannter Risikofaktoren wäre sinnvoll. So könnten pathologische Mechanismen auf molekularer Ebene vor der Entwicklung unangenehmer Symptome unterbunden werden.

Bei der Therapie und Diagnostik der klassischen Keratokonjunktivitis sicca und vielen weiteren Augenerkrankungen setzt man zunehmend auf die Erforschung von potenziellen Biomarkern [59]. Ein Biomarker ist weitläufig definiert als festgelegtes Charakteristikum, das als Indikator für physiologische oder pathophysiologische Prozesse angesehen wird oder das auf eine (therapeutische) Maßnahme oder Exposition reagiert [60]. Es gibt demnach verschiedene Arten von Biomarkern, darunter beispielsweise diagnostische Biomarker, die charakteristisch für das Vorhandensein einer Erkrankung sind und zu dessen Nachweis dienen. Weiterhin gibt

es prognostische Biomarker, die das Auftreten eines Krankheitsbildes oder einen bestimmten Krankheitsverlauf vorhersagen können. Darüber hinaus gibt es Biomarker zum Monitoring von Krankheitsstadien oder Zuständen, dazu zählen z.B. der HbA1C Wert oder die LDL-Cholesterin Konzentration im Blut sowie Biomarker der pharmakodynamischen Antwort, die auf die Applikation eines bestimmten Medikaments reagieren und prädiktive Biomarker [61]. Auch im Hinblick auf das Glaukommedikamenten-assoziierte trockene Auge gibt es bereits eine überschaubare Anzahl an Studien zu potenziellen Biomarkern, die im nächsten Kapitel thematisiert werden sollen.

2.3 Proteomik

2.3.1 Grundlagen

Um die Entstehung und Entwicklung bestimmter Erkrankungen besser zu verstehen und um molekulare Marker zu identifizieren, die die Diagnostik und Therapie erleichtern, wurden in den letzten Jahren viele Versuche unternommen Veränderungen im Genom, Transkriptom und Proteom zu detektieren. Man geht von folgender Hierarchie aus: An erster Stelle stehen die Gene, durch Transkription und Translation werden diese in Proteine übersetzt. An letzter Stelle stehen die Metaboliten als Endprodukte der Enzyme [62]. Studien zur Genexpression liefern Informationen zu Veränderungen auf RNA Ebene. Diese Erbinformation wird im Laufe der Weiterverarbeitung zum Protein auf unterschiedliche Weise modifiziert, sodass die Diskrepanz zwischen RNA und Protein/ Enzym Outcome durch RNA Analysen nicht erfasst werden kann. Auch Informationen zu Protein-Protein-Interaktionen oder Transportvorgängen fehlen. Deshalb ist es von wesentlicher Bedeutung die fehlenden Informationen durch proteomische Studien zu komplettieren [11].

Die Proteomik beschäftigt sich mit der Erforschung der Abundanz, Aktivität, Struktur und dem Status der Modifikation der vorhandenen Proteine sowie ihrer Interaktionen [62]. Sie dient der deskriptiven und quantitativen Analyse von Molekülen, die direkt oder indirekt an der Kontrolle der biologischen Prozesse im Körper beteiligt sind. Das Proteom ist unglaublich komplex und dynamisch, denn das Proteinprofil verändert sich abhängig zum physiologischen Status oder mit der Phase der Zelldifferenzierung. Der Vergleich von Proteinprofilen zwischen gesunden und veränderten Körperflüssigkeiten oder Geweben in verschiedenen Stadien oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten kann somit wichtige Informationen über

Pathomechanismen liefern und potenzielle Biomarker identifizieren [11]. Diese Dynamik zu erfassen stellt allerdings eine technische Herausforderung dar. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Methoden zur Untersuchung des Proteoms entwickelt, doch bisher konnte keine „allround“ Strategie entwickelt werden, bei der alle Anforderungen proteomischer Untersuchungen gleichzeitig erfüllt werden können. Die wichtigsten Anforderungen in der quantitativen Proteomik sind hohe Durchsatzraten bei gleichzeitig hoher Sensitivität [63]. Die Massenspektrometrie ermöglicht es tausende von Proteinen in komplexen Proben anhand des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) zu identifizieren und präzise zu quantifizieren. Daher wird sie heute als Methode der Wahl bei der Analyse komplexer Proteingemische verwendet [64]. Dies ist der Einführung der Elektrospray Ionisation im Jahr 1989 zu verdanken. Erst dadurch wurde es ermöglicht auch labile Moleküle wie Proteine zu ionisieren und vaporisieren [65]. Ein Massenspektrometer besteht grob aus einer Ionen Quelle, einem Massenanalysator, der das Masse zu Ladungsverhältnis der entstandenen Ionen misst und einem Detektor, der die Anzahl der Ionen eines jeden m/z Werts erfasst. Die Verwendung von Elektrospray zur Ionisation der Peptide/ Proteine stellt eine der Hauptionisationstechniken dar. Die Analyten werden aus einer Lösung heraus ionisiert, daher kann auch ein auf Flüssigkeitschromatographie (LC) basierendes System zur Separation vorangeschaltet werden. Man spricht dann von LC-ESI-MS Systemen [64]. Darunter fällt auch das in dieser Studie verwendete LTQ Orbitrap XL System, welches in **Abbildung 7** schematisch dargestellt ist.

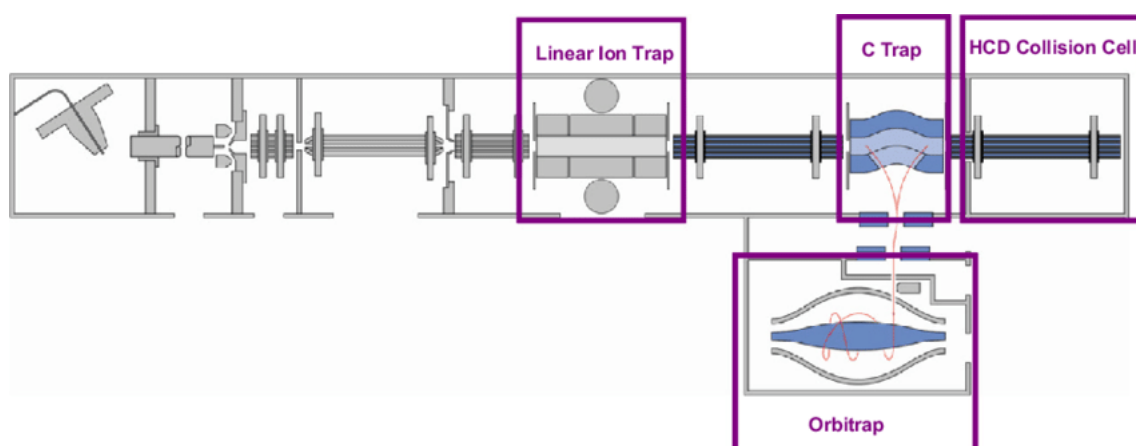


Abbildung 7: LTQ Orbitrap

Schematische Darstellung des Aufbaus einer LTQ Orbitrap [66].

Die Methoden zur Untersuchung der Proteine können in zwei Kategorien unterteilt werden. Man unterscheidet „Bottom-up“ von „Top-down“ Methoden. Bei der „Bottom-up“ Vorgehensweise werden die zu untersuchenden Proteingemische zuerst getrennt und anschließend zu Peptiden verdaut, um die Komplexität der Gemische für die anschließende massenspektrometrische Analyse zu reduzieren. Bei der „Top-down“ Methode werden intakte Proteine massenspektrometrisch analysiert. Vorteile der „Bottom-up“ Methode sind die erhöhte Sensitivität und Reproduzierbarkeit, zudem können so wesentlich komplexere Gemische analysiert werden. Nachteilig ist, dass die Identifikation der Proteine anhand ihrer Bruchstücke, der Peptide, erfolgt und damit posttranslationale Modifikationen (PTM) weniger gut erfasst werden können [11].

Die Suche nach potenziellen Biomarkern folgt meist einem bestimmten Workflow: Mithilfe eines Discovery Verfahrens werden zunächst möglichst viele Proteine identifiziert und potenzielle Biomarker benannt. Diese müssen sich für die weitere Untersuchungen qualifizieren und ihr Vorkommen muss verifiziert werden. Nach Optimierung der Versuchsansätze müssen die Kandidaten gezielt validiert und zuletzt kommerzialisiert werden [67].

Die unterschiedlichen Phasen bedürfen unterschiedlicher massenspektrometrischer Methoden. In der Discovery Phase kommen daher häufig sogenannte „Shotgun“ Proteomik Verfahren zum Einsatz. Sie sind Teil der „Bottom-up“ Methode und zielen darauf ab, eine möglichst große Anzahl an Proteinen zu quantifizieren. Bei den Quantifizierungsmethoden unterscheidet man zwischen relativer und absoluter Quantifizierung. Bei der relativen Quantifizierung, die in der Biomarkerforschung sehr häufig angewandt wird, handelt es sich um eine komparative Analyse, die in einer Liste unterschiedlich exprimierter Proteine zwischen gesund und krankhaft resultiert. Es werden also keine absoluten Zahlen geboten, sondern Informationen ob Proteine relativ zum Gesunden herauf- oder herunterreguliert vorkommen bzw. vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Beim Discovery Verfahren steht die schnelle Identifizierung einer möglichst großen Anzahl an Proteinen in einer kleinen Menge an Probe im Vordergrund und bestimmt somit die technischen Anforderungen. Im Gegensatz hierzu stehen die gezielteren Targeted Verfahren, die bei der Qualifizierung, Verifizierung und Validierung der potenziellen Biomarkerkandidaten zum Einsatz kommen. Die Anzahl der Proben steigt, genau wie die Zeit und die Kosten, die für Verifizierungs- und Validierungsverfahren aufgewendet werden müssen [68].

2.3.1.1 Discovery Proteomik

Wie bereits beschrieben stellt die Discovery Proteomik häufig die initiale Phase im Rahmen der Biomarkerforschung dar [67]. Hier steht die Protein Identifikation an erster Stelle. Um eine möglichst große Anzahl an Proteinen pro Probe erkennen zu können, werden meist wenige Proben verwendet, für diese aber mehr Zeit eingeräumt. Außerdem kann die Depletion reichlich vorkommender Proteine sowie die Fraktionierung des Proteingemischs zur Reduktion der Komplexität führen und somit die Identifikationsrate erhöhen [69]. Auch werden häufig Probenpools anstatt individueller Proben analysiert [6, 70]. Bei klassischen „Shotgun“ Proteomik Verfahren werden die Proteine zunächst enzymatisch verdaut und die Peptide mittels Flüssigkeitschromatographie getrennt, anschließend werden sie massenspektrometrisch analysiert [71]. Die initiale Discovery Phase bringt eine Liste potenzieller Kandidaten hervor, von denen einige falsch positiv sind. Gerade bei weniger abundanten Proteinen können die Falscherkennungsraten (FDR) hoch sein [67]. Dies macht Verifizierungsprozesse essenziell. Zudem kann es sinnvoll sein, die Liste potenzieller Marker mit denen in der Literatur vorgeschlagenen Biomarker Kandidaten abzugleichen und zu vervollständigen [72].

2.3.1.2 Targeted Proteomik

Das Hauptziel bei Targeted Strategien ist die gezielte, präzise und reproduzierbare Quantifizierung bestimmter Proteine oder einer Gruppe von Proteinen in einer biologischen Probe. Unter den massenspektrometrischen Methoden hat sich hierfür die Selected Reaction Monitoring (SRM) Technik etabliert. Sie gilt als ELISA der Massenspektrometrie und weist eine hohe Sensitivität und Selektivität auf. Alternativ werden immer noch die klassischen Antikörper-basierten Verfahren (z.B. das klassische Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) eingesetzt. Im Gegensatz zu den immunologischen Verfahren ist die SRM Technik schneller und kostengünstiger, außerdem können weitaus mehr Proteine gleichzeitig quantifiziert werden. Auch Protein Isoformen, PTMs, die verschiedenen Splicing Varianten oder Mutationen können unterschieden werden. Daher eignen sich diese Techniken für die Testung von Hypothesen sowie für die Anwendung in der Verifizierungs- und Validierungsphase [71].

2.3.1.3 AIMS

Die Identifikation einer immer größeren Anzahl potenzieller Biomarker Kandidaten erweist sich als Fluch und Segen zugleich. Denn wie bereits beschrieben, bedarf es der Verifizierung jedes einzelnen Kandidaten. Mittlerweile ist jedoch klar, dass nur die Wenigsten der in der Initialphase entdeckten, unterschiedlich exprimierten Proteine den Sprung Richtung Biomarker schaffen werden. Es wäre also von Vorteil eine Art Screening Methode nutzen zu können, die die große Anzahl an Kandidaten filtert und Aufschluss darüber gibt, für welche Kandidaten sich weitere gezieltere Versuchsansätze lohnen. Es bedarf also einer Methode zur Überprüfung der Authentizität der Kandidaten mit hoher Durchsatzrate und hoher Präzision bei gleichzeitig überschaubaren Kosten [73]. Die Accurate Inclusion Mass Screening Methode (AIMS) eignet sich für diese Indikation. Sie bildet eine Art Brücke zwischen ungezielten Discovery Studien und der Entwicklung eines gezielten Targeted Versuchsansatzes. Mithilfe eines Orbitrap MS Systems wird das Vorkommen zuvor definierter Peptide in der untersuchten Probe bestätigt oder falsifiziert. Die Sensitivität ist dabei vergleichbar mit klassischen Targeted Strategien wie Multiple Reaction Monitoring (MRM). Die AIMS Methode dient also der Qualifizierung einer großen Anzahl potenzieller Biomarker für weitere zeit- und kostenintensive Verifizierungs- und Validierungsverfahren [72].

2.3.2 Tränenproteomik

Die proteomische Analyse von Tränenflüssigkeit zu diagnostischen Zwecken hat in den letzten Jahren immer mehr an Aufmerksamkeit gewonnen. Dies ist zum einen der Einfachheit des Entnahmeprozesses geschuldet und zum anderen des Potenzials dieser komplexen proteinreichen Flüssigkeit sowohl Erkrankungen der Augenoberfläche als auch systemische Erkrankungen in seiner Proteinexpression widerzuspiegeln. Die Komponenten der Tränenflüssigkeit können sowohl quantitativ als auch qualitativ den Gesundheitszustand der darunterliegenden Gewebe reflektieren. Das macht sie vor allem bei okulären Erkrankungen für die Biomarkersuche besonders attraktiv [74]. Vielversprechende Ergebnisse konnten unter anderem beim trockenen Auge [75-77], bei der Glaukom Erkrankung [6, 78, 79], beim Sjögren Syndrom [80] oder der Keratokonus Erkrankung [81] erzielt werden.

Zu Beginn der Analyse muss die Tränenflüssigkeit entnommen werden. Das Entnahmevolumen beträgt je nach Entnahmeverfahren zwischen 5-10 μl . Bei den Entnahmeverfahren unterscheidet man hauptsächlich zwischen der Entnahme mittels Mikrokapillare, der Anwendung eines Schirmer Streifens oder alternativen Entnahmemethoden wie der „Flush-Tear“ Technik. Die Mikrokapillare und der Schirmer Streifen stellen jedoch die am häufigsten genutzten Verfahren dar. Das Entnahmeverfahren mittels Mikrokapillare gestaltet sich wie folgt: Die Mikrokapillare wird für ca. 5 Minuten an den Tränensee am Rande des Auges gehalten und die Tränenflüssigkeit wird über Kapillarkräfte in die Kapillare aufgesogen. Das gewonnene Tränenvolumen beläuft sich dabei meist auf ca. 5 μl . Bei der Entnahme mittels Schirmer Streifen wird ein Schirmer Teststreifen bestehend aus absorbierbarem Material ins Auge eingehängt. Diese Technik ist etwas invasiver als die Sammlung mittels Mikrokapillare, dafür ist der Tränengewinn höher. Die mittels Schirmer Streifen gewonnenen Tränenproben enthalten außerdem mehr zelluläre Proteine, da der Teststreifen während der Entnahme direkten Kontakt zu den Geweben der Augenoberfläche hat. Die Tränenprobe aus der Mikrokapillare wird für weniger stark kontaminiert gehalten. Bei der Schirmer Technik ist außerdem zu beachten, dass durch die Berührung der okulären Gewebe auch eine Reflextränenkomponente auftreten kann. Nachteil bei der Mikrokapillare ist der potenzielle Verlust von Tränenproteinen bei der Überführung aus der Mikrokapillare in ein Analysegefäß [59]. Vorteil beim Schirmer Streifen ist, dass er in manchen Studien ohnehin Teil der

klinischen Untersuchung ist und damit zeitgleich sowohl Tränenflüssigkeit gesammelt als auch das Tränenvolumen bestimmt werden kann.

Die Proteinkonzentration der Tränenflüssigkeit liegt bei 6-10 mg/ ml. Bei entzündlichen Vorgängen auf der Augenoberfläche scheint sie jedoch auf blutähnliche Werte anzusteigen [59, 82]. Die am häufigsten vorkommenden Proteine sind Albumin, Laktoferrin und Lysozym [74, 83]. Laktoferrin ist ein eisenbindendes Glykoprotein, welches auch im Blut und anderen exokrinen Flüssigkeiten vorkommt. Lysozym ist ein Enzym was in Tränen, Nasensekret und im Magen nachgewiesen wurde [59]. Beide Proteine sind für ihre antibakteriellen und antimikrobiellen Eigenschaften bekannt. Ein weiteres Hauptprotein ist das Lipid-bindende Lipocalin-1 [83]. Weitere relevante Tränenproteine sind: sIgA, Lipophilin, Lacritin und die Prolin-reichen Proteine [59]. Die unterschiedlichen Proteinklassen, die in Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden konnten, umfassen Wachstumsfaktoren, Zytokine, Matrix Metalloproteinasen, Immunglobuline, Komplementfaktoren, Hormone, Proteasen/ Proteaseninhibitoren, Kalzium-bindende Proteine sowie Glykoproteine [83].

Das Tränenproteom ist hochdynamisch: Beim Gesunden verändert sich das Tränenproteom abhängig von Alter und Geschlecht. Selbst über Nacht kommt es beim geschlossenen Auge zu Veränderungen in der Proteinkomposition [59]. Systemische Erkrankungen können sich ebenfalls auf die Proteinzusammensetzung auswirken, so konnten beim Diabetes mellitus, bei Schilddrüsen- und Krebserkrankungen Veränderungen im Tränenproteom nachgewiesen werden [59, 83].

2.3.2.1 Keratokonjunktivitis sicca

Eine Vielzahl an Studien konnten Unterschiede der Proteinexpressionsprofile beim trockenen Auge im Vergleich zum Gesunden nachweisen. Vor allem inflammatorische Proteine sind beim trockenen Auge vermehrt nachweisbar, darunter einige Interleukine (IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-12), TNF- α und INF- γ . Weitere Änderungen konnten unter anderem bei Proteinen der S100 Familie (S100A4, S100A8, S100A9, S100A11), Lysozym, Laktoferrin, EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor), Lipocalin-1, Cystatin S100, α 1-Antitrypsin, α -Enolase, α -1-saures Glykoprotein und PIP (Prolaktin-induzierbares Protein) festgestellt werden. [83]. Einige Prolin-reiche Proteine, denen protektive Eigenschaften zugeschrieben werden, konnten in verminderter Anzahl detektiert werden. Darunter Prolin-reiches Protein 3 und 4, sowie das mit dem Nasopharyngealkarzinom assoziierte Prolin-reiche Protein NACPP4 [59, 83]. Vor

allem das Prolin-reiche Protein 4 (PRR4) wurde hinsichtlich seiner Eignung als Biomarker untersucht. PRR4 wird von der Haupttränendrüse gebildet. Seine genaue Funktion im Tränenfilm ist noch nicht hinreichend geklärt, es wird jedoch vermutet, dass es zum Schutz der Augenoberfläche durch antimikrobielle Eigenschaften und zur Stabilisierung des Tränenfilms beiträgt. In gesunden Tränen konnten 4 PTM Varianten und 3 Isoformen des Proteins nachgewiesen werden [84]. Zwei dieser Isoformen zeigten beim trockenen Auge verringerte Expressionsprofile [84-86]. PRR4 wird daher als potenzieller Biomarker für das trockene Auge diskutiert.

Es konnten außerdem Proteine gefunden werden, deren Expression zwischen den Subtypen des trockenen Auges differieren. Dabei wurden die verschiedenen Subgruppen hinsichtlich der Expression proinflammatorischer Zytokine verglichen. Die Resultate lassen vermuten, dass beim evaporativen trockenen Auge (EDE/DRYlip) inflammatorische Pathomechanismen eine weniger große Rolle spielen als beim hyposekretorischen (ADDE/DRYaq) [83, 87].

Die Tear Film and Ocular Surface Society hat im Rahmen ihres 2017 neu verfassten Review Reports folgende Kandidaten als frühe potenzielle Biomarker vorgeschlagen: Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-6 (IL-6), Laktoferrin, Lipocalin-1(LCN-1), Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9), Muzin 5AC (MUC5AC), Plasminogen (PLG), Gruppe IIa Phospholipase A2 (PLA2G2A). Die Mehrzahl muss sich jedoch in weiteren Studien qualifizieren [34].

2.3.2.2 Glaukom und GROSD

Auch bei Glaukom Patienten konnten Veränderungen des Tränenproteoms im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden. Die meisten Studien haben bisher Glaukom Patienten untersucht, die zum Untersuchungszeitpunkt bereits unter lokaler Antiglaukomtherapie standen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass auch die topischen Medikamente für Veränderungen des Tränenproteoms verantwortlich sein können und das Ergebnis auf der Suche nach reinen Glaukommarkern verfälschen können. Eine Studie von Pieragostino et al. hat deshalb die Expressionsprofile von Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom untersucht, die noch keine topische Therapie erhalten haben und sie mit denen von gesunden Probanden verglichen. Ziel war es, glaukomspezifische Marker zu identifizieren. Dabei fanden sie 27 unterschiedlich exprimierte Tränenproteine, darunter zeigten sich 25 bei Glaukompatienten hoch reguliert. Dazu zählen die Immunglobuline IGHA1, IGHA2,

IGJ, IGKC sowie Albumin, HSPB1, CST4, PIGR, PRDX1, ACTB, ACTG1, POTEE/POTEF, POTEI, POTEJ, B2M, AZGP1, TF, PIP, PRR4, PROL1, ZG16B, LTF, LYZ und LCN1 [6]. Eine andere Studie dieser Gruppe fand bei Glaukompatienten unter Therapie mit Prostaglandinanaloga (PGA) Profilveränderungen bei LYZ, LCN1, Protein S100, PIP, phosphoryliertem Cystatin S sowie verschiedenen Immunglobulinen [78]. Beim Vergleich der veränderten Proteine bei nicht-therapierten Glaukompatienten mit denen von medikamentös-kontrollierten Glaukompatienten konnten ebenfalls Unterschiede in der Proteinexpression detektiert werden. So erschienen die Proteine LCN1, LYZ, LTF, PRR4, PIP, AZGP2, PIGR, CST4, IGKC, IGJ, IGHA2 und 1 bei nicht-therapierten Glaukompatienten hoch reguliert und bei Patienten unter Glaukomtherapie herunter reguliert [6].

Malvitte et al. untersuchten zuvor ebenfalls Tränen von Glaukompatienten und charakterisierten inflammatorische Zytokine im Zusammenhang mit der chronischen Anwendung topischer Glaukommedikamente. Dabei konnten signifikant erhöhte Werte der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α sowie den Th1- und Th2-Typ Zytokinen (INF- γ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-4) im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch MCP1 zeigte in diesem Zusammenhang erhöhte Werte [88]. Chong et al. konnten eine Korrelation zwischen erhöhten MCP1 Werten und der Dauer der Anwendung topischer Glaukommedikamente feststellen [89].

Manni et al. untersuchten die inflammatorische Antwort der Augenoberfläche auf Konservierungsmittel. Dazu verglichen sie klinische Parameter wie die Tränenfilmaufriszeit sowie die IL-1 β Konzentrationen zwischen Probanden mit konservierungsmittelfreiem und konservierungsmittelhaltigem Timolol mittels ELISA. Sie konnten neben einer Reduktion der Tränenfilmaufriszeit einen Anstieg der IL-1 β Werte unter konservierungsmittelhaltiger Timolol Therapie nachweisen und schlugen daher bei Langzeittherapien die Verwendung konservierungsmittelfreier Präparate vor [90].

Eine weitere Studie untersuchte die Effekte von Prostaglandinanaloga (PGA) auf die Proteinexpression im Tränenfilm sowie die Expression inflammatorischer Marker in der Kornea und Konjunktiva. In Tränen von PGA Patienten konnten sie erhöhte Werte von IL-1 β , IL-6, MMP-1, MMP-3, MMP-9 und erniedrigte Werte von TIMP-1 und TIMP-2 nachweisen und stellten die Hypothese auf, dass die topische Anwendung von

Prostaglandinanaloga zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ihren Gewebeinhibitoren (TIMP) führe [91].

In einer anderen Studie zur Evaluation der Langzeitanwendung von Glaukommedikamenten konnten Wong et al. 124 Tränenproteine identifizieren. Vor allem den Proteinen S100-A8, S100-A9, Mammaglobin B und 14-3-3- ζ/δ wurde besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Sie erschienen bei Patienten, die länger als 1 Jahr Glaukommedikamente angewendet hatten signifikant erhöht. Zudem konnte ein Rückgang von PRR4 bei Patienten, die kürzer als 1 Jahr unter Glaukommedikation standen festgestellt werden. Da es sich hierbei vorwiegend um Proteine mit inflammatorischer Assoziation handelt, wurde die Hypothese gestärkt, dass die Langzeitanwendung (>1 Jahr) von topischen Glaukommedikamenten zur Induktion entzündlicher Prozesse führt. Zudem konnte festgestellt werden, dass sich die inflammatorischen Tränenproteinprofile bei Glaukopatienten unter chronischer Medikation von denen, die bei einem primären trockenen Auge auftreten, deutlich unterscheiden [70].

Tabelle 3 veranschaulicht noch einmal alle relevanten proteomischen Studien in Bezug auf das Glaukommedikamenten-assoziierte trockene Auge.

Tabelle 3: Proteomische Studien zum Glaukommedikamenten-assoziierten trockenen Auge

Übersicht über relevante proteomische Studien zum Thema Glaukommedikamenten-assoziiertes trockenes Auge und Vergleich der Studiendesigns.

Glaucoma Subgroup	Glaucoma Population	Sample Collection	Experimental Design	Samples per group/ Total Samples	Candidate Biomarkers	Reference
POAG + OH	Medically controlled (Timolol)	Capillary Tube	Immunoassay	POAG/OH total n = 20, Group 1 (PF Timolol) n = 10, Group 2 (P Timolol) n= 10	IL-1 β	[90]
/	Medically controlled (various, preserved)	Capillary Tube	Immunoassay	Glaucoma n = 21, CTRL n = 12	IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10; especially Th1 cytokines IL-2 + INF γ	[88]
NTG	Naïve to therapy	Capillary Tube	Immunoassay	NTG n = 20, CTRL n = 20, Total Samples n = 40	Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	[92]
/	Medically controlled	Schirmer Strip	Proteomics (iTRAQ labeled LC-MS/MS), Western Blot, Quantitative PCR Analysis	NMC CTRL n = 10, MCG n = 18	S100-A8, S100-A9, mammoglobin B	[70]
NTG, POAG	Medically controlled (min. 1 year): PGA (Latanoprost, Bimatoprost, Travoprost) or Timolol	Capillary Tube	Cytokine Antibody Arrays, Immunohistochemical Staining, Western Blot	Array: CTRL (Cataract Patients) n = 20, PGA n = 24, Timolol n = 16, Immunohisto.: Total n = 40, CTRL (BAK)/ Latanoprost/ Tarvoprost/ Bimatoprost n = 10 per group, Western Blot: Total n = 25, 5 per group	IL-1 β , IL-6, MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1	[91]
POAG, PXG	Medically controlled (PGA: Latanoprost 0,005% for min. 2 years)	Schirmer Strip	Shotgun Proteomics & MALDI TOF-MS	Proteomics: POAG n = 4, PXG n = 5, CTRL n = 5; SDS PAGE: POAG: n = 9, PXG n = 7, CTRL n = 8; MALDI TOF MS: POAG n = 8, PXG n = 11, CTRL n = 12	LYZ, LCN1, Protein S100, Immunoglobulins, PIP, phosphorylated Cystatin-S	[78]
POAG	Naïve to therapy	Schirmer Strip	Shotgun Proteomics, Western Blot	Proteomics: POAG n = 9, CTRL n = 10, Total Samples n = 19; Western Blot: POAG n = 4, CTRL n = 4	LCN1, LYZ, LTF, PRR4, PIP, AZGP1, PIGR, CST4, IGKC, IGHA1, IGHA2, IGJ	[6]
POAG, PACG, PXF, PXG	Naïve to therapy	Schirmer Strip	Gelatin Zymography, Immunohistochemistry, Western Blot + Immunofluorescent Assay	CTRL n = 35, POAG n = 27, PACG n = 24, PXF n = 40	MMP-9	[93]

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acetonitrile for LC-MS (ACN)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Ammonium bicarbonate	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
Antioxidant	NuPage novex life technologies, Carlsbad, CA, USA
Formic acid 98-100 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
NuPAGE SDS Running Buffer MES	NuPage novex life technologies, Carlsbad, CA, USA
Novex Colloidal Blue Staining Kit (Stainer A, Stainer B)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPage 4-12% Bis-Tris Gel, 10 Wells	Novex, life technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPage LDS Sample Buffer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPage Reducing Agent	Novex, life technologies, Carlsbad, CA, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
Pierce™ BCA-Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Seebule Plus2 Prestained Standard	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega Corporation, Madison, USA
Trifluoroacetic acid (TFA)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Water for LC-MS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Iodacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96 well cell culture cluster, flat bottom	Costar 3595, Corning Incorporated
96 well cell culture cluster, v-bottom	Costar 3595, Corning Incorporated
C18 ZipTips, Millipore	Merck Millipore Ltd, Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, IRL
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Germany
EppendorfgefäÙe 0,5; 1,0; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany
PCR GefäÙe, 0,2 ml	Ratiolab GmbH, Dreieich, Germany

Polyethylen Abdeckfolie

Ratiolab GmbH, Dreieich, Germany

3.1.3 Geräte

Geräte

BioBasic C18 Säule

BioBasic Phenyl Säule

Hybrid Linear Ion Trap-Orbitrap MS system, LTQ Orbitrap XL

HTS PAL Autosampler

EASY-nLC 1200 system

Acclaim PepMap RSLC, 75µm x 50 cm, nanoViper analytical column

Intelli Mixer

Jupiter C4 Säule

Rheos Allegro Pumpe

Speed Vac Concentrator 5301

Ultrasonic Unit, Sonorex RK31

Kühlschrank Liebherr Premium No Frost CN3956 A+

Kühlschrank Heraeus Hera freeze

Epson Perfection V600 Photo Scanner

Heizblock KTMR 133

Hersteller

Thermo Scientific, Rockford, USA

Phenomenex, Torrence, USA

Thermo Scientific, Bremen, Germany

CTC Analytics AG, Zwinge, Switzerland

Thermo Scientific, Rockford, USA

Thermo Scientific, Rockford, USA

neoLab, Heidelberg, Germany

Phenomenex, Torrence, USA

Thermo Scientific, Rockford, USA

Eppendorf, Hamburg, Germany

Bandelin, Berlin, Germany

Liebherr, Biberach an der Riß, Germany

Thermo Scientific, Waltham, USA

Seiko Epson Corporation, Suwa, Nagano, Japan

Haep Labor Consult, HPL, Germany

3.1.4 Software und Datenbanken

Software

Endnote X8

Ingenuity Pathway Analysis Software Version v01-04

MaxQuant 1.5.2.8

Microsoft Office 2016

Perseus Version 1.6.5.0

Proteome Discoverer Version 1.1.0.263

Statistica 13

Thermo Proteome Discoverer Version 1.1.0.263

Hersteller

Thomson Reuters, New York City, NY

Qiagen, Redwood City, USA

Max Planck Institute of Biochemistry, Cox und Mann 2008

Microsoft Cooperation, Redmond, USA

Computational Systems Biochemistry, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Statsoft, Tulsa, USA

Thermo Scientific, Bremen, Germany

3.2 Methoden

Die experimentelle Analyse bestand aus 2 Versuchsteilen: Im ersten Teil wurden auf Grundlage verschiedener Discovery Proteomik Strategien Tränenproben von Glaukom Patienten mit Sicca Symptomatik (GLM + DRYaq) und gesunden Probanden einer Kontrollgruppe (CTRL) verglichen (Gelbasierte Discovery Studie vs. In-solution Discovery Studie). Ziel war es, einen Überblick über die Unterschiede im Tränenproteom beider Gruppen zu erhalten. Der erste Versuchsteil diente dazu eine möglichst große Anzahl an unterschiedlich exprimierten Proteinen zu identifizieren und zu quantifizieren sowie zwei unterschiedliche Methoden hinsichtlich ihrer Identifikationsraten zu vergleichen.

Im zweiten Versuchsteil wurde mithilfe der sogenannten Accurate Inclusion Mass Screening Methode (AIMS) ein etwas gezielterer Ansatz gewählt. Um die im ersten Versuchsteil detektierten Unterschiede genauer differenzieren zu können, untersuchten wir nicht nur Proben von GLM + DRYaq Patienten und gesunden Probanden (CTRL), sondern zusätzlich noch Proben von Patienten mit einem diagnostizierten Glaukom ohne zugrundeliegende Sicca Symptomatik (GLM) sowie von Patienten, die unter einer Keratokonjunktivitis sicca leiden (DRYaq) und verglichen die Gruppen miteinander. Die AIMS Methode ermöglicht es darüber hinaus individuelle Proben zu analysieren. Somit konnten die zuvor erhaltenen Ergebnisse validiert und genauer bewertet werden.

3.2.1 Patientenproben

3.2.1.1 Probengewinnung und Auswahlkriterien

In dieser Studie wurden Tränenproben von Glaukom Patienten mit und ohne Sicca Symptomatik sowie von Keratokonjunktivitis sicca Patienten und von gesunden Probanden untersucht. Die Proben wurden im Laufe zuvor durchgeführter klinischer Studien in der Augen- und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz gesammelt [36, 94]. Die Studien fanden im Einklang mit den 1964 in der Deklaration von Helsinki formulierten Richtlinien und unter der Zustimmung der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz statt.

Die im Vorfeld dieser experimentellen Arbeit gesammelten Patienteninformationen beinhalteten eine ausführliche Allgemein-, Augen- und Medikamentenanamnese mit Erfassung des Ocular Surface Disease Index (OSDI) sowie eine ausführliche klinische Untersuchung. Dabei wurden der Fernvisus und die objektive Refraktion getestet, eine

Spaltlampenuntersuchung durchgeführt, Schirmer-Test Werte erhoben, die Tränenfilmaufrisszeit gemessen, sowie Färbungen der Hornhaut mit Fluoreszein und Lissamingrün durchgeführt.

Wir entschieden uns ausschließlich für die Untersuchung von Tränenproben, die mithilfe des basalen Schirmer Test I (BST I) gesammelt wurden, da im Gegensatz zur Tränengewinnung mit Mikrokapillaren größere Mengen an Tränenflüssigkeit und damit Proteinen gewonnen werden können und dabei gleichzeitig Informationen zum Tränenvolumen abgerufen werden können.

Beim Schirmer Test handelt es sich um ein nicht-invasives Entnahmeverfahren bei dem ein spezieller Teststreifen, meist aus Lackmuspapier (Maße: 5 mm x 35 mm), zur Sammlung von Tränenflüssigkeit, sowie zur Bestimmung des Tränenvolumens zum Einsatz kommt [43]. In der klinischen Durchführung unterscheidet man zwischen dem Schirmer Test I und dem Schirmer Test II. Bei Letzterem steht die Bestimmung der Reflextränensekretion im Vordergrund. Daher eignet sich der Schirmer II Test nicht zur Diagnostik eines trockenen Auges. Der Schirmer Test I kann mit oder ohne zusätzliche Anwendung eines Lokalanästhetikums durchgeführt werden. Wird kein Lokalanästhetikum instilliert, erhält man sowohl die basale als auch die Reflextränen-Komponente. Mit Anästhetikum entfällt die Reflextränenkomponente und man bestimmt den basalen Tränenfluss [95]. Wir entschieden uns für Proben, die am unbetäubten Auge entnommen wurden, um keine zusätzliche Verfälschung durch den Einfluss lokaler Anästhetika auf die Augenoberfläche und das Tränenproteom zu erhalten. Die Reflextränenkomponente wurde bei der späteren Auswertung mitberücksichtigt, denn Perumal et al. konnten in ihrer Studie zu Reflextränen im Jahr 2015 nachweisen, dass sich das unstimulierte basale Tränensekret und Reflextränen durchaus in ihren Proteinexpressionsprofilen unterscheiden [96].

Die Durchführung des Schirmer Test I am unbetäubten Auge lief folgendermaßen ab: Der Teststreifen wurde ins laterale Drittel des Unterlids eingehängt. Nachdem der Patient 5 min bei leicht geschlossenen Augen ausharrte, konnte der Streifen vorsichtig entnommen und abgelesen werden. Die Teststreifen wurden bis zur weiteren Verwendung in Eppendorfgefäßen bei -80°C gelagert [36, 94].

Aus dieser Probenbank wurde eine limitierte Anzahl geeigneter, gut kategorisierter Proben für die jeweiligen Studien ausgewählt und klassifiziert.

Ausschlusskriterien der klinischen Studien für alle Patientengruppen waren andere Erkrankungen oder Anomalien des Auges, der Adnexen und der Augenoberfläche, welche in irgendeiner Form Einfluss auf die Ergebnisse der Studie nehmen können bzw. auf die Glaukomerkrankung oder die Ausprägung einer Sicca Symptomatik. Dies beinhaltete: Traumata oder Infektionen, welche innerhalb von 90 Tagen vor Beginn der klinischen Studie auftraten; nichtinfektiöse Augenentzündungen; schwere Entzündungen oder Anomalien der Augenlider sowie eine gestörte Blinzelfunktion. Des Weiteren Anomalien des nasolacrimalen Abflusssystem; aktive Herpes-Keratitis oder andere Herpes Manifestationen am Auge; allergische oder chronische Konjunktivitis; eine aktive Rosazea und/ oder ein progressives Pterygium; Strahlenkeratitis; Hornhautulcera; Stevens-Johnson-Syndrom; Sjögren Syndrom und Patienten mit Sicca Syndrom aufgrund der Zerstörung konjunktivaler Becherzellen oder Vernarbung. Weiterhin ausgeschlossen wurden Patienten mit Augenlidtätowierung oder solche, die sich zuvor refraktiven Eingriffen, Eingriffen an der Kornea oder am Lid unterzogen hatten oder Laseranwendungen und operative Eingriffe in den letzten 6 Monaten durchführen ließen.

3.2.2 Discovery Studien

3.2.2.1 Studienproben

Für die Discovery Studien wurden eine Gesamtzahl von 34 Proben aus der Probenbank ausgewählt und in 2 Gruppen unterteilt: Glaukom-Sicca (GLM + DRYaq) und eine Kontrollgruppe (CTRL). Die Klassifizierungskriterien für beide Gruppen sind im Folgenden näher beschrieben:

In die Glaukom-Sicca (GLM + DRYaq) Gruppe wurden Proben von Patienten mit einem diagnostizierten Glaukom und pathologischen Schirmer Test Ergebnissen (≤ 10 mm/ 5 min) eingeschlossen. Zusätzlich mussten die Patienten mindestens ein topisches Glaukom Medikament mit dem Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid anwenden. Dies ergab eine Gesamtzahl von 18 untersuchten Proben.

GLM_DRYaq:

- diagnostizierte Glaukomerkrankung
- diagnostizierte Keratokonjunktivitis sicca
- BST I ≤ 10 mm/ 5 min
- topische Antiglaukommedikation (mind. 1 Präparat mit Konservierungsmittel (BAK))

In die Kontrollgruppe (CTRL) wurden ausschließlich Proben von Patienten inkludiert, bei denen weder Erkrankungen der Augenoberfläche noch systemische Autoimmunerkrankungen bekannt waren und die einen guten bis sehr guten Gesundheitszustand aufwiesen. Dabei wurde auf nicht-pathologische Schirmer Test Werte von > 10 mm/ 5 min geachtet. Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 16 Patientenproben.

CTRL:

- guter - sehr guter Gesundheitszustand
- keine bekannten Erkrankungen der Augenoberfläche
- BST I > 10 mm/ 5 min
- keine Antiglaukommedikation/ konservierungsmittelhaltige Augentropfen

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Studienproben mit Angaben zu Alter, Geschlecht, Schirmer Laufstrecken und Medikation.

3.2.2.2 Probenvorbereitung

Die gelagerten Schirmer Teststreifen wurden zunächst aufgetaut. Zur Extraktion der Tränenproteine aus den Streifen wurden diese für 3 Stunden bei 4°C in 500 μ l phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) gelegt. Im Anschluss wurde die totale Proteinkonzentration einer Probe mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce, Rockford, IL) ermittelt. Das Bicinchoninsäure-Assay, kurz BCA Assay genannt, beruht auf der Reduktion von Kupfer, wobei das Produkt mit BCA einen Farbkomplex ausbildet, welcher einen kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei 562 nm ermöglicht. Dabei ergibt sich die totale Proteinkonzentration aus dem Vergleich der Farbintensität mit einem Proteinstandard bekannter Konzentration [97]. Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurde zur Definition des Probenvolumens benötigt.

3.2.2.3 Pooling

Um eine ausreichende Proteinkonzentration für die Discovery Analyse zu erhalten, mussten die Proben innerhalb der beiden zuvor definierten Gruppen zu Probenpools zusammengefasst werden. Dieses sogenannte Pooling bietet den Vorteil, dass Unterschiede zwischen den Individuen normalisiert werden und damit die interindividuelle Variation reduziert werden kann. Nachteilig gestaltet sich allerdings, dass damit die individuelle Betrachtung der Patientenproben verloren geht, welche die Grundlage für spätere diagnostische und therapeutische Verfahren darstellt. Diesen Nachteil konnten wir durch die Verwendung der AIMS Strategie im zweiten experimentellen Teil ausgleichen. AIMS ermöglicht es jede Probe individuell zu untersuchen, da hier auch mit geringeren Proteinmengen sensitive und zuverlässige Messungen durchgeführt werden können.

Die Tränenproben wurden innerhalb der beiden vordefinierten Gruppen gepoolt und auf 3 biologische Replikate pro Gruppe (R1-3) verteilt. Jeder Probenpool musste eine Gesamtproteinkonzentration von 50 μ g aufweisen. Zum GLM + DRYaq Pool wurden insgesamt 18 Proben zusammengefügt. Der Kontrollpool (CTRL) bestand aus 16 Proben. Die berücksichtigten Parameter bei der Einteilung der Probenpools, wurden in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 4: Studienproben Discovery

	Anzahl		M	W	Alter	Schirmer Länge (mm)	Topische Glaukommedikation
CTRL_R1	6	16	3	3	53.8 ± 13.0	18.3 ± 9.0	nein
CTRL_R2	5		2	3	57.8 ± 9.4	18.6 ± 7.1	nein
CTRL_R3	5		2	3	54.6 ± 10.7	20.2 ± 10.6	nein
GLM_DRYaq_R1	6	18	4	2	59.0 ± 12.3	6.5 ± 1.4	ja
GLM_DRYaq_R2	6		4	2	60.3 ± 15.2	4.2 ± 1.7	ja
GLM_DRYaq_R3	6		3	3	64.3 ± 14.2	4.8 ± 1.9	ja

3.2.2.4 Gelbasierte Discovery Studie (Discovery I)

3.2.2.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Da sich die Identifikations- und Quantifikationsraten direkt proportional zur Probenkomplexität verhalten, ist es von immenser Bedeutung diese vor Beginn der Messungen zu reduzieren [69]. Dies geschah im ersten Schritt durch die Auftrennung der Proteingemische nach ihrer Molekülmasse. Als Trennmedium diente ein Polyacrylamid-Gel. Das Versuchsprotokoll soll im Folgenden erläutert werden:

Zunächst wurden die gepoolten Proben im „SpeedVac“ Vakuumkonzentrator getrocknet und konzentriert. Anschließend wurden die Proben für die Auftrennung im Polyacrylamid-Gel (4-12 % NuPAGE Bis-Tris Gel) vorbereitet. Das Prinzip der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, beruht darauf, dass Proteine zunächst durch die Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und ihre Eigenladungen durch das Anfügen einer uniformen negativen Ladung maskiert werden. Dies ermöglicht die Auftrennung eines Proteingemischs im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Molekülmasse, da sich die Proteine sonst in Abhängigkeit ihrer Eigenladung im Gel bewegen würden. Dabei wandern Proteine mit niedrigen Molekülmassen schneller zum positiv geladenen Gegenpol, da sie weniger stark von der Gelmatrix zurück gehalten werden [98].

Zur Vorbereitung wurden der NuPAGE® LDS Puffer sowie ein Reduktionsmittel zur Tränenprobe hinzugegeben, um ein Endvolumen von 10 μ l zu erhalten. Durch Zugabe des Reduktionsmittels kommt es zur Zerstörung der Disulfidbrückenbindungen. Disulfidbrücken formen und stabilisieren die dreidimensionale Struktur von Proteinen. So kann sichergestellt werden, dass keine Protein Tertiär- oder Quartärstrukturen

zurückbleiben, welche die korrekte Auftrennung im Gel behindern würden [98]. Es folgte die Hitzedenaturierung bei 80°C für 10 min und die Vorbereitung des Laufpuffers. Hierzu wurden 50 ml des MES NuPAGE® Puffer in 950 ml H₂O verdünnt, um ein Gesamtpuffervolumen von 1000 ml zu erreichen. Diese wurden wie folgt auf die Kammern aufgeteilt: Die äußere Kammer wurde mit 600 ml Pufferlösung befüllt, die Innere mit 200 ml. Nach Verteilung der Pufferflüssigkeit auf die beiden Kammern, folgte die Beladung des Gels mit den Tränenproben: Für die Elektrophorese wurden 50 µg der präparierten Proben in je eine Tasche des Elektrophoresegels pipettiert. Als Marker für die Molekulare Masse wurde der SeeBlue Plus 2 Proteinmarker (Invitrogen) verwendet. Zuletzt wurde zum Laufpuffer der inneren Kammer 500 µl Antioxidans hinzugegeben. Nun wurde für 35 min bei 4°C eine konstante Spannung von 200 Volt angelegt. Die negativ geladenen Proteine wanderten abhängig von ihrem Molekulargewicht unterschiedlich schnell im Gel in Richtung Anode (+ Pol) und bildeten für das jeweilige Molekulargewicht typische Banden. Um die Banden im Anschluss durch Färbung zu visualisieren, wurde das Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers angewendet. Nachdem das Gel aus dem Rahmen gelöst wurde, erfolgte die Überführung in eine Fixierlösung bestehend aus 40 ml Wasser, 50 ml Methanol und 10 ml Acetat. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Fixierlösung durch eine Färbelösung ersetzt. Die Färbelösung bestand aus 55 ml Wasser, 20 ml Methanol und 20 ml Stainer A. Nach weiteren 10 Minuten Inkubationszeit wurde Stainer B (5ml) hinzugefügt und das Gel für mindestens 15 Stunden gefärbt. Nach Beendigung des Färbeporgangs wurde das Gel mit H₂O gewaschen und gescannt.

3.2.2.4.2 In-Gel-Verdau und Extraktion

Um die aufgetrennten Proteine aus dem Gel extrahieren zu können, müssen die einzelnen Banden zunächst separiert werden, die Proteine in weniger komplexe Peptidfragmente überführt und die Gelstruktur durch Zugabe von Chemikalien geöffnet werden. Hierfür wurde jede Lane in 15 Banden untergliedert. Zur Weiterverarbeitung wurde das Gel auf eine Glasplatte überführt und die einzelnen Lanes mit dem Mikrotommesser und einem Skalpell in die festgelegten 15 Banden geschnitten. Die Banden wurden anschließend in winzige Würfel zerkleinert und jede Bande einer Lane in ein eigenes Eppendorfgefäß überführt. Es folgte die Entfärbung des Gels durch Zugabe einer Lösung aus 500 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat in Acetonitril (1:1) zu

jedem Eppendorfgefäß. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis keine weitere Färbung der Gelstücke mehr nachzuweisen war.

Vor dem Verdau der im Gel enthaltenen Proteine mit Trypsin, zur weiteren Reduktion der Komplexität, mussten die denaturierten Proteine reduziert und alkyliert werden. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von 250 μl Dithioeritol (DTT), die Inkubationszeit betrug 30 min bei 56°C. DTT ist in der Lage Disulfidbrücken, welche die Proteinstruktur stabilisieren, zu reduzieren und damit zu brechen. Nachdem die DTT Lösung abpipettiert wurde, folgte die Alkylierung. Hierfür wurden 250 μl Iodoacetamid (IAA) in jedes Eppendorfgefäß pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur in absoluter Dunkelheit inkubiert und die Restflüssigkeit danach verworfen. Durch Zugabe von IAA kommt es zur Alkylierung von Cysteinresten in der Peptidsequenz. Damit wird verhindert, dass sich die Proteine wieder in ihre Ursprungsform zurück falten können. Zum Schluss wurden die Gelstücke durch Zugabe von 250 μl Acetonitril dehydriert und geschrumpft. Nach Entfernung der Restflüssigkeit wurden die Gelstücke für 30 min unter dem Abzug getrocknet. Die so vorbereiteten Proteine konnten nun innerhalb der Gelmatrix mit Hilfe des Enzyms Trypsin in weniger komplexe Peptide verdaut werden. Hierfür musste zunächst eine Trypsin Pufferlösung angesetzt werden. Diese bestand aus 10 mM Ammoniumbicarbonat in 10% Acetonitril. Davon wurden 1,5 ml in jedes benötigte Fläschchen Trypsin (a 20 μg) pipettiert, um eine Lösung aus 13 ng/ μl modifiziertem Trypsin (Promega, Madison, USA) in 10 mM Ammoniumbicarbonat in 10 % Acetonitril zu erhalten. Die Gelstücke wurden vollständig von der Trypsin-Lösung bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 37° C im Inkubator wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μl Acetonitril gestoppt. Nachdem der Überstand in kleine PCR Gefäße (200 μl Fassungsvermögen) abpipettiert und in der SpeedVac getrocknet wurde, konnte mit der Extraktion der verdauten Peptide aus dem Gel begonnen werden. Der Extraktionspuffer setzte sich wie folgt zusammen: 5% Ameisensäure in Acetonitril in einem Verhältnis von 1:2. Nachdem 200 μl in jedem Gefäß für 30 Minuten bei 37°C auf dem Rüttler inkubiert wurden, wurde der Überstand erneut abpipettiert und zum Inhalt der jeweiligen zuvor befüllten PCR Gefäße hinzugefügt. Nachdem die Proben in der Thermozyklon-Zentrifuge erneut getrocknet und konzentriert wurden, erfolgte die Lagerung bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung.

3.2.2.4.3 Probenreinigung und -vorbereitung

Um eine störungsfreie Probenanalyse via LC-ESI-MS/MS zu gewährleisten, mussten die Proben zuvor mittels ZipTip C 18 Säulen (Millipore, Billerica, MA, USA) gereinigt und entsalzt werden. Dazu hielten wir uns an folgendes Protokoll: Die eingedampften Proben wurden in 10 μl einer 0,1%igen TFA Lösung resolubilisiert, 5 Minuten im Ultraschallbad belassen und anschließend zentrifugiert. TFA diente hier als Equilibrierungspuffer. In der Zwischenzeit wurden eine 100%ige ACN Lösung sowie der Elutionspuffer bestehend aus 10 μl TFA in 60%iger ACN Lösung angesetzt. Pro ZipTip Zyklus können max. 5 μg Peptide gebunden und gereinigt werden. Jede Probe (a 5 μg Protein) durchlief daher 2 ZipTip Zyklen, um einem übersättigungsbedingten Peptidverlust entgegenzuwirken. Ein ZipTip Zyklus lief wie folgt ab: Für jede Probe wurde eine neue C18 Spitze verwendet. Zu Beginn wurde die Spitze dreimal in 100%igem ACN gewaschen und die Flüssigkeit nach jedem Waschvorgang verworfen. Dies diente der Dekontamination und Aktivierung der Spitze. Zur Equilibrierung des pH-Werts wurde die Spitze ebenfalls dreimal in 0,1%iger TFA Lösung gewaschen. Anschließend wurde die C18 Spitze in die Probe getaucht und zehnmal resuspendiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen in 0,1% TFA. Am Ende des ersten Zyklus wurde die Spitze in den Elutionspuffer getaucht, 10 μl eingezogen und in ein entsprechend beschriftetes neues PCR Tube gegeben. Der Elutionsvorgang wurde im ersten Zyklus zweimal durchgeführt, sodass sich am Ende des 1. Zyklus 20 μl gereinigte Probenflüssigkeit im neuen PCR Tube befanden und am Ende des 2. Zyklus 30 μl . Auf diese Weise wurde jede einzelne Probe entsalzt und gereinigt. Die gereinigten Proben wurden erneut in der Thermozyklone getrocknet und bis zur Messung bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Messung erfolgte die Verflüssigung der getrockneten und konzentrierten Analyten in 10 μl 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) und die Übertragung auf eine V-Boden Mikroplatte. Die Proben wurden in die Mitte des jeweiligen Wells pipettiert und die letzte horizontale Reihe der Platte mit 100 μl 60%iger ACN Lösung versehen. Anschließend wurde die Platte mit einer Fixierfolie abgedeckt und dem System zugeführt.

3.2.2.4.4 LC-ESI-MS/MS

Damit auch niedrig abundante Proteine erfolgreich charakterisiert und identifiziert werden konnten, musste die Komplexität der Proben weiter reduziert werden. Dazu ist dem MS System ein Flüssigkeitschromatographie System vorangeschaltet, welches

die Peptidfragmente fraktioniert. Das LC-ESI-LTQ-Orbitrap MS System (LTQ Orbitrap XL) wurde erst nach ausführlicher Optimierung für die Probenanalyse verwendet. Die Probenzufuhr zum System erfolgte automatisch durch einen HTS PAL Autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz), weiterer Bestandteil des LC Systems war die Rheos Allegro Pumpe (Thermo Scientific, Rockford, USA). Der Autosampler war mit einer BioBasic C18, 30 x 0,5 mm Vorsäule (Thermo Scientific, Rockford, USA) ausgestattet, welche wiederum in Verbindung zu einer Analysensäule stand. Die BioBasic Phenyl, 100 x 0,5 mm Analysensäule wurde mit einer Jupiter 4 μ proteoanalytischen 150 x 0,5 mm Säule (Phenomenex, Torrance, USA) kombiniert. Die verwendeten Lösungsmittel für die Flüssigkeitschromatographie setzten sich wie folgt zusammen: Lösungsmittel A aus ultrareinem speziell für LC-MS geeignetem Wasser mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure und Lösungsmittel B aus LC-MS geeignetem Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure. In einem Zeitraum von 60 min pro Probe wurde der Gradient folgendermaßen verändert: 0 - 35 min: 15-40% B, 35 - 40 min: 40-60% B, 40 – 45 min: 60 – 90% B, 45 – 50 min: 90% B, 50-53 min: 90-10% B und 53-60min: 10% B.

Zur Erfassung der Daten wurde ein hybrides Ionenfallen-Orbitrap-Massenspektrometer (ESI-LTQ Orbitrap XL MS, Thermo Scientific, Bremen, Germany) eingesetzt. Als Grundeinstellungen für das Gerät wurden folgende Parameter gewählt: Das Gerät lief im Kationen Elektrospray Ionisationsmodus und für das Elektrospray wurde eine Spannung von 2.15 kV angelegt. Die Betriebstemperatur der Heizkapillare wurde auf 220°C eingestellt. Um automatisch zwischen Orbitrap-MS und LTQ-MS/MS Erfassung hin und her zu springen, arbeitete die LTQ Orbitrap im datenabhängigen Modus. Die untersuchten vollständigen MS Spektren (Masse zu Ladungsverhältnisse zwischen 300 und 2000) wurden mit einer Auflösung von 30 000 bei einem Masse zu Ladungsverhältnis von $m/z = 400$ aufgenommen. Die automatische Verstärkungsregelung (AGC) wurde auf 1×10^6 Ionen eingestellt. Im MS Modus wurde die „lock-mass“ Einstellung aktiviert, um eine Echtzeit Rekalibrierung durch Korrektur von instrumentell bedingten m/z Verschiebungen zu ermöglichen. Diese interne Echtzeit Rekalibrierung geschah unter Verwendung von Polydimethylcyclsiloxan Ionen m/z 445,120025. Die weitere Fragmentierung der Molekül-Ionen erfolgte durch die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID). Dazu wurden die fünf Vorläufer-Ionen mit der stärksten Intensität sequenziell isoliert. Die daraus hervorgehenden Fragment-Ionen wurden daraufhin in der LTQ Orbitrap aufgenommen. Die Parameter für die

Fragmentierung waren eine normalisierte Kollisionsenergie (NCE) von 35% mit einer Aktivierungszeit von 30ms, einem „repeat count“ von 3 und die dynamische Exklusionsdauer betrug 600s.

3.2.2.4.5 Markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (LFQ Analyse)

Zur Analyse der umfangreichen massenspektrometrischen Datensätzen verwendeten wir die MaxQuant Computerplattform Version 1.6.0.16. MaxQuant zählt zu den am häufigsten verwendeten Plattformen für die MS-basierte Proteomik-Datenanalyse und beinhaltet die integrierte Suchmaschine Andromeda [99]. Außerdem nutzten wir die UniProt Datenbank für die Spezies Homo Sapiens (17. Juli 2019), um Informationen über die Proteinsequenzen, -funktionen und -strukturen zu erhalten. Die Standardeinstellungen für die Suche lauteten wie folgt: Die Peptidmassentoleranz betrug ± 30 ppm, die Fragmentmassentoleranz $\pm 0,5$ Da, als feste Peptidmodifikation zählte die Cystein Carbamidomethylierung (CAM) und als variable Peptidmodifikation die Oxidation von Methionin und der Acetylgruppe am N-Terminus. Unter der Einstellung Enzym wurde Trypsin als Verdauungsenzym angegeben und die maximale Anzahl fehlender Spaltstellen, die pro Peptid zulässig waren, betrug 2. Um eine möglichst verlässliche Identifizierung von Peptiden und Proteinen zu gewährleisten, wählten wir für die False Discovery Rate (FDR) einen Wert von 0,01 mit ≥ 6 Aminosäureresten und die Einstellung „Use Razor and Unique Peptides“, um einer Proteingruppe nur solche Peptide zuzuordnen, die für die Gruppe einzigartig sind. Die hierdurch erhaltenen Ergebnisse wurden von MaxQuant in einer Datei präsentiert. Die weitere Datenverarbeitung erfolgte unter Verwendung der Perseus Software. Die Perseus Software dient der Interpretation von Proteinquantifizierungs-, Interaktions- und posttranslationalen Modifizierungsdaten [100].

3.2.2.5 In-solution Discovery Studie (Discovery II)

3.2.2.5.1 In-Solution-Verdau, Probenreinigung und -vorbereitung

Für die Messungen wurde eine Proteinkonzentration von 500 ng benötigt, sodass das entsprechende Probenvolumen dann entnommen werden konnte. Im Gegensatz zum ersten Discovery Versuchsteil war hier keine gelbasierte Auftrennung des Proteingemischs notwendig. Stattdessen wurden die Proben direkt „in-solution“ mit modifiziertem Trypsin verdaut. Vorteil hierbei sind der geringere Zeitaufwand, sowie eine geringere Fehleranfälligkeit, aufgrund reduzierter Zwischenschritte. Die Proteine

mussten beispielsweise nicht vorab aus der Gelmatrix extrahiert werden. Für den Verdau mit Trypsin wurde zunächst die Trypsin Lösung, analog zum ersten Discovery Versuchsteil, angesetzt. Anschließend wurden jeweils 50 μ l der Trypsin Lösung zu den Proben hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 16 Stunden bei 37°C im Inkubator. Das Verhältnis Trypsin zu Protein betrug 1:20. Nach der Überführung komplexer Proteingemische in für das System messbare Peptidgemische folgte die Reinigung und Entsalzung der Proben, wie im ersten Versuchsteil beschrieben, mit ZipTip C18 Säulen in 4 Zip-Tip Zyklen pro Probe. Zum Schluss wurden die Proben im SpeedVac Vakuumpkonzentrator getrocknet und konzentriert. Bis zur MS Analyse wurden die Proben bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Analyten in 0,1%ige TFA Lösung verflüssigt, um ein Gesamtvolumen von 10 μ l zu erhalten. Das Probenmaterial wurde dann erneut auf V-bottom Mikroplatten übertragen und dem System zugeführt.

3.2.2.5.2 LC-ESI-MS/MS

Für die LC-MS-Analyse wurden eine Peptidkonzentration von 10 μ g in 40 μ l (250 ng/ μ l) 0,1% Ameisensäure aufgelöst, sodass dem System ein Probenvolumen von 2 μ l (= 500ng Peptidgemisch) zugeführt wurde. Das hier verwendete Nanofluss-UHPLC-System war das EASY-nLC 1200 System von Thermo Scientific (Rockford, USA). Dieses System arbeitete mit einer Acclaim PepMap RSLC nanoViper Analysensäule (75 μ m x 50 cm). Die verwendeten Lösungsmittel für die Flüssigkeitschromatographie setzten sich wie folgt zusammen: Lösungsmittel A aus ultrareinem speziell für LC-MS geeignetem Wasser mit 0,1% (v/v) Ameisensäure und Lösungsmittel B aus LC-MS geeignetem Acetonitril mit 20% Wasser und 0,1% (v/v) Ameisensäure. In einem Zeitraum von 120 min pro Probe wurde der Gradient folgendermaßen verändert: 0-90 min: 5% - 30% B, 90-100 min: 30-100% B, 100-120 min: 100% B. Das nano-LC System war direkt verbunden mit der ESI-LTQ-Orbitrap. Die Einstellungen gleichen den Angaben in Kapitel 3.2.2.4.

3.2.2.5.3 Markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (LFQ Analyse)

Zur Analyse der umfangreichen massenspektrometrischen Datensätzen verwendeten wir die MaxQuant Computerplattform Version 1.6.17.0. Außerdem nutzten wir die UniProt Datenbank für die Spezies Homo Sapiens (Datum: 14. Oktober 2020), um

Informationen über die Proteinsequenzen, -funktionen und – strukturen zu erhalten. Alles weitere entspricht den Angaben in Kapitel 3.2.2.4.5.

3.2.2.6 Statistische Analyse der Discovery Studien

Zunächst mussten die Daten beider Versuchsteile aus MaxQuant mithilfe von Perseus (Version 1.6.5.0) gefiltert und transformiert werden. Identifizierte Proteine, die klassifiziert waren als „contaminants“ oder „reverse hits“ wurden aus dem Datensatz entfernt. Der Datensatz mit den normalisierten LFQ Intensitäten wurde einer Pearson Korrelationsanalyse unterzogen, um eine gewisse Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können. Anschließend wurden die LFQ Intensitäten der identifizierten Proteine \log_2 transformiert, um eine Annäherung an die Normalverteilung zu erreichen und die Berechnung des Fold Change der Proteinexpression, sowie deren graphische Darstellung zu vereinfachen. Weitere Filtereinstellungen waren eine „minimal number of values -> in at least one group“ von 3. So konnten inkonstante Daten vor der Analyse aus dem Datensatz entfernt werden. Die fehlenden Werte wurden durch Imputation vervollständigt. Die Imputation erfolgte anhand einer Normalverteilung mit Standardeinstellungen (width: 0,3, down shift: 1,8). Zusätzlich erfolgte eine Normalisierung der Daten via z-Transformation. Die Daten konnten nun für die statistische Analyse im Rahmen eines Signifikanztests genutzt werden. Um signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen den beiden Gruppen zu ermitteln, nutzten wir den Zweistichproben-t-Test mit einem p-Wert von < 0,05.)

3.2.2.7 Ingenuity Pathway Analyse der Discovery Studien

Zum besseren Verständnis der experimentellen Ergebnisse und generierten Daten ist es sinnvoll, diese in einen biologischen Kontext zu setzen. Dazu verwendeten wir die Web-basierte Ingenuity Pathway Analysis Software (IPA). IPA ist in der Lage anhand dynamischer Algorithmen mögliche Gen oder Protein Netzwerke zu berechnen. Somit können die wichtigsten Signalwege identifiziert und potenziell interessante neue regulatorische Netzwerke und Kausalzusammenhänge entdeckt werden [101]. Die Software liefert mit ihrer umfangreichen Knowledge Base eine Vielzahl an Informationen über molekulare Funktionen, biologische Prozesse und zelluläre Komponenten. Diese drei Bereiche werden durch die Gen Ontologie (GO) abgedeckt. Die GO ist eine internationale bioinformatische Initiative zur Vereinheitlichung des biowissenschaftlichen Vokabulars. Sie besteht aus definierten Termini zur

Beschreibung der Genprodukte und bildet die Grundlage für eine Ontologie Datenbank, die viele weitere biologische Datenbanken mit Wissen speist [102]. Durch die Auswahl der Tox Analyse Funktion erhielten wir unter anderem Zusatzinformationen zu klinischen Pathologien und pharmakologischen Prozessen. Anschließend generierten wir Protein-Protein-Interaktions-Netzwerke mit Informationen zu Funktion, Signalwegen und Pathologien. Zur besseren Übersicht wählten wir die visuelle Darstellung. Diese enthält Informationen zu Proteintyp, Interaktionspartnern, Lokalisation und Expressionsprofil. Dabei stellt das Programm direkte Protein-Protein Interaktionen als durchgezogene Verbindungslinien dar, die unterschiedlichen Regulationszustände spiegeln sich in der Farbgebung der Knotenpunkte wider (Die Farbe Rot steht für erhöhte Expression, Grün für erniedrigte Expression).

3.2.3 Accurate Inclusion Mass Screening (AIMS) basierte Studie

Zur Validierung der im ersten Durchgang identifizierten Marker und zur Entdeckung weiterer potenzieller Marker, verwendeten wir die sogenannte Accurate Inclusion Mass Screening Methode (AIMS). AIMS gilt als eine Art Übergangsform zwischen Discovery und gezielteren Targeted Proteomik Ansätzen [72]. Das Prinzip basiert auf der gezielten Suche interessanter Zielpeptide anhand einer zuvor generierten Liste. Die hierfür erstellte Liste beinhaltete das m/z Verhältnis und die Ladungen der Zielpeptide, welche eindeutig jeweils einem der potenziellen Biomarker Kandidaten zugeordnet werden konnten. AIMS bietet zudem die Möglichkeit, auch mit kleineren Proteinmengen, wie sie in individuellen Tränenproben vorkommen, sensitive und zuverlässige Messungen durchzuführen.

3.2.3.1 Studienproben

Für die AIMS Studie wurden insgesamt 44 Tränenproben zur weiteren Untersuchung ausgewählt und klassifiziert. Die Proben wurden in vier Gruppen eingeteilt: Glaukom (GLM), Glaukom-Sicca (GLM + DRYaq), Sicca (DRYaq) sowie eine Kontrollgruppe (CTRL). Die Geschlechterverteilung, das Durchschnittsalter und die durchschnittlichen Schirmer Lauflängen können **Tabelle 5** entnommen werden.

Tabelle 5: Studienproben AIMS

	Anzahl	M	W	Alter	Schirmer Länge (mm)
CTRL	11	2	9	48.0 ± 9.6	16.9 ± 9.6
GLM	13	0	7	61.5 ± 4.5	18.2 ± 4.5
GLM + DRYaq	13	6	7	55.6 ± 13.8	4.8 ± 2.0
DRYaq	7	10	3	53.1 ± 10.8	2.6 ± 1.9

Die Gruppeneinteilung erfolgte nach den folgenden Klassifizierungskriterien:

Für die Einteilung in die Sicca-Gruppen (DRYaq) orientierten wir uns an den Leitlinien der Tear Film and Ocular Surface Society (TFOS). Die Klassifizierung erfolgte anhand der Schirmer Laufstrecken. Miteingeschlossen wurden alle Proben von Patienten mit Schirmer Laufstrecken von ≤ 7 mm/ 5 min. In die Sicca Gruppe konnten somit insgesamt 7 Patientenproben eingeschlossen werden.

Auf die Berücksichtigung weiterer von der TFOS vorgeschlagener Kriterien zur Klassifizierung, wie beispielsweise verkürzte Tränenfilmaufrisszeiten (TBUT) (< 10 s) oder erhöhte CFS Scores (> 2), wurde verzichtet. Dies war vor allem der Tatsache

geschuldet, dass bei > 90% der vorliegenden Proben TBUT Werte von < 10 s ermittelt worden waren. Damit konnten wir die TBUT aufgrund der limitierten Anzahl an Probenmaterial nicht als Klassifizierungskriterium verwenden. Das vermehrte Auftreten pathologischer TBUT Werte resultierte vermutlich auch daraus, dass die Tests direkt im Anschluss an die Einlage des Schirmer Teststreifens durchgeführt worden waren. Somit kann keine sinnvolle Subklassifizierung der Sicca Gruppen in hyposekretorisches und evaporatives trockenes Auge mit Lipiddefizit vorgenommen werden. Es kann also lediglich eine Aussage darüber gemacht werden, ob ein sekretorisches Defizit vorliegt oder nicht. Daher wird die Sicca Gruppe als DRYaq bezeichnet. Ebenfalls entschlossen wir uns den CFS Score bei der Klassifizierung nicht zu berücksichtigen, da auch hier die vorangeschaltete Einlage der Schirmer Teststreifen kurzzeitig Epitheldefekte provoziert haben könnten.

Einschlusskriterien für die Glaukom Gruppe (GLM) waren die Diagnose eines Glaukoms bei nicht-pathologischen Schirmer Test Werten von > 10 mm/ 5 min unter Anwendung von mindestens einem oder mehreren topischen Antiglaukommedikamenten, die das Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid (BAK) beinhalten. Die Glaukomgruppe umfasste damit insgesamt 13 Patientenproben.

Zur Glaukom-Sicca (GLM + DRYaq) Gruppe wurden Proben von Patienten mit einem diagnostizierten Glaukom und pathologischen Schirmer Test Ergebnissen (≤ 7 mm/ 5 min) eingeschlossen, die ebenfalls unter topischer Therapie mit mind. einem antiglaukomatösen Medikament mit BAK standen. Dies ergab eine Gesamtzahl von 13 Proben. Genauere Informationen zur Glaukomschubklassifizierung der GLM und GLM + DRYaq Gruppe sowie zu den topischen Medikamenten sind **Tabelle 6** zu entnehmen.

In die Kontrollgruppe (CTRL) wurden ausschließlich Proben von Patienten inkludiert, bei denen weder Erkrankungen der Augenoberfläche noch systemische Autoimmunerkrankungen bekannt waren und die einen guten bis sehr guten Gesundheitszustand aufwiesen. Dabei wurde auf nicht-pathologische Schirmer Test Werte von > 7 mm/ 5 min geachtet. Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 11 Patientenproben. Zur Übersicht hier noch einmal zusammengefasst:

DRYaq:

- diagnostizierte Keratokonjunktivitis sicca
- $BST I \leq 7 \text{ mm/ 5 min}$

GLM:

- diagnostizierte Glaukomerkrankung
- $BST I > 7 \text{ mm/ 5 min}$
- topische Antiglaukommedikation (mind. 1 Präparat mit Konservierungsmittel (BAK))

GLM_DRYaq:

- diagnostizierte Glaukomerkrankung
- diagnostizierte Keratokonjunktivitis sicca
- $BST I \leq 7 \text{ mm/ 5 min}$
- topische Antiglaukommedikation (mind. 1 Präparat mit Konservierungsmittel (BAK))

CTRL:

- guter - sehr guter Gesundheitszustand
- keine bekannten Erkrankungen der Augenoberfläche
- $BST I > 7 \text{ mm/ 5 min}$
- keine Antiglaukommedikation

Tabelle 6: Weiterführende Informationen zu den Studienproben der Glaukom Gruppen.

Gruppen	Topische Glaukommedikamente								
	PGA	Sympathomimetikum	Carboanhydrase hemmer	Betablocker	Alpha-2 Agonist	Sympathomimetikum, Betablocker	Carboanhydrase hemmer, Betablocker	PGA, Betablocker	BAK
GLM_01							Azarga (Brinzolamid, Timolol)	Ganfort (Bimatoprost, Timolol)	BAK
GLM_02	Xalatan (Latanoprost)					Combigan (Brominidn, Timolol)			BAK
GLM_03	Xalatan (Latanoprost)	Brominidin (Brimonidin)					Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_04	Xalatan (Latanoprost)	Brominidin (Brimonidin)					Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_05	Taflotan (Tafluprost)						Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_06	Taflotan (Tafluprost)			Timo Edo (Timolol)					BAK
GLM_07	Taflotan (Tafluprost)			Timo Edo (Timolol)					BAK
GLM_08	Lumigan (Bimatoprost)	Brominidin (Brimonidin)					Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_09	Travatan (Travoprost)						Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_10	Xalatan (Latanoprost)		Azopt (Brinzolamid)			Combigan (Brominidn, Timolol)			BAK
GLM_11	Taflotan (Tafluprost)						Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_12	Taflotan (Tafluprost)						Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_13			Azopt (Brinzolamid)	Timopthal (Timolol)				Ganfort (Bimatoprost, Timolol)	BAK

Tabelle 6: (Fortsetzung)

Gruppen	Topische Glaukommedikamente								
	PGA	Sympathomimetikum	Carboanhydras e hemmer	Betablocker	Alpha-2 Agonist	Sympatho mimetikum, Betablocker	Carboanhydrase hemmer, Betablocker	PGA, Betablocker	BAK
GLM_DRYaq_01	Xalatan (Latanoprost)						Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_DRYaq_02	Travatan (Travoprost)	Alphagan (Brimonidin)					Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_DRYaq_03	Travatan (Travoprost)	Alphagan (Brimonidin)					Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_DRYaq_04	Xalatan (Latanoprost)		Azopt (Brinzolamid)						BAK
GLM_DRYaq_05	Latanoprost	Brominidin (Brimonidin)					Dorzolamid (Dorzolamid, Timolol)		BAK
GLM_DRYaq_06	Xalatan (Latanoprost)	Brominidin (Brimonidin)					Azarga (Brinzolamid, Timolol)		BAK
GLM_DRYaq_07	Xalatan (Latanoprost)	Brominidin (Brimonidin)					Azarga (Brinzolamid, Timolol)		BAK
GLM_DRYaq_08	Xalatan (Latanoprost)								BAK
GLM_DRYaq_09	Xalatan (Latanoprost)								BAK
GLM_DRYaq_10	Latanoprost		Azopt (Brinzolamid)		Clonidin				BAK
GLM_DRYaq_11	Taflotan (Tafluprost)			Timopthal (Timolol)					BAK
GLM_DRYaq_12								Ganfort (Bimatoprost, Timolol)	BAK
GLM_DRYaq_13	Travatan (Travoprost)						Cosopt (Dorzolamid, Timolol)		BAK

3.2.3.2 Probenvorbereitung

Die Eppendorfgefäße mit den in PBS eingelegten Schirmer Teststreifen wurden aufgetaut und die Proteinkonzentrationen erneut mithilfe des BCA Assays ermittelt. Für die Messungen wurde eine Proteinkonzentration von 15 μg / individueller Probe benötigt, sodass das entsprechende Probenvolumen dann entnommen werden konnte. Im Gegensatz zum ersten Versuchsteil wurde hier keine gelbasierte Auftrennung des Proteingemischs vorangeschaltet. Stattdessen wurden die Proben direkt „in-solution“ mit modifiziertem Trypsin verdaut. Vorteil hierbei sind der geringere Zeitaufwand, sowie eine geringere Fehleranfälligkeit aufgrund reduzierter Zwischenschritte. Für den Verdau mit Trypsin wurde zunächst die Trypsin Lösung, analog zum ersten Versuchsteil, angesetzt. Anschließend wurden jeweils 50 μl der Trypsin Lösung zu den Proben hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 16 Stunden bei 37°C im Inkubator. Das Verhältnis Trypsin zu Protein betrug 1:20. Nach der Überführung komplexer Proteingemische in für das System messbare Peptidgemische folgte die Reinigung und Entsalzung der Proben, wie im ersten Versuchsteil beschrieben, mit ZipTip C18 Säulen in 4 Zip-Tip Zyklen pro Probe. Zum Schluss wurden die Proben im SpeedVac Vakuumkonzentrator getrocknet und konzentriert. Bis zur MS Analyse wurden die Proben bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Analyten in 0,1 %iger TFA Lösung verflüssigt, um ein Gesamtvolumen von 10 μl zu erhalten. Das Probenmaterial wurde dann erneut auf V bottom Mikroplatten übertragen und dem System zugeführt.

3.2.3.3 LC-ESI-MS/MS

Auch im zweiten Versuchsteil wurde das Peptidgemisch vor der MS Analyse mittels Flüssigkeitschromatographie fraktioniert. Der Zeitraum, über welchen der Gradient zwischen Lösungsmittel A und B verändert wurde, betrug 120 Minuten. Diese wurden wie folgt eingeteilt: 10-15% von B in den ersten 0-7 min, 15-30% von B innerhalb der Minuten 7-85, 30-35% B von Minute 85 bis 95, dann folgte innerhalb von 15 Minuten (95-100) ein Anstieg von 35 auf 90% B. Von Minute 100 bis 105 wurde B konstant bei 90% gehalten, um in den nächsten 5 min (105-110) von 90 auf 10% zu fallen. In den letzten 10 Minuten (110-120) blieben die 10% B dann konstant. Die allgemeinen Konditionen für die massenspektrometrische Analyse sind zuvor beschrieben in Kapitel 3.3.3.4.4.

Den AIMS Messungen lag eine Liste zuvor definierter Proteine zugrunde, die bei der Messung gezielt nachgewiesen werden sollten. Grundlage bildeten vielversprechend erscheinende Peptide/ Proteine oder Biomarker aus vorangestellten Discovery Studien. Die Liste ist im **Anhang (Tabelle 7)** aufgeführt.

3.2.3.4 Markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (LFQ Analyse)

Analog zum ersten Versuchsteil wurde die LFQ Analyse mit der MaxQuant Software durchgeführt. Die Einstellungen wurden wie folgt gewählt: Die Peptid-Massen Toleranz betrug ± 10 ppm, die Fragment-Massen Toleranz $\pm 0,5$ Da, der Peptid Ladungszustand +2 und die FDR für die Peptididentifikation lag bei 1% mit ≥ 6 Aminosäureresten. Proteinquantifizierung erfolgte auf Basis von „unique plus razor peptides“. Die Maximalanzahl verfehlter Spaltungen wurde auf 0 eingestellt („missed cleavages“ = 0) und Trypsin als Verdauungsenzym gewählt.

3.2.3.5 Statistische Analyse AIMS

Die statistische Analyse wurde auch hier mithilfe der Perseus Software (Version 1.6.5.0) durchgeführt. Da im zweiten Versuchsteil mehr als 2 Gruppen miteinander verglichen werden sollten, bestand die statistische Analyse zusätzlich zum Zweistichproben t-Test aus einer Varianzanalyse (ANOVA). Hierbei wurde getestet, ob die Varianz zwischen allen untersuchten Gruppen größer ist als innerhalb der Gruppen und somit, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen oder nicht. Bevor die Daten statistisch auswertbar waren, wurden sie log₂ transformiert, um eine Annäherung an die Normalverteilung zu erreichen. Nur Peptide mit 70% korrekt gemessenen Werten in mind. einer Studiengruppe wurden inkludiert. Die fehlenden Werte wurden durch Imputation vervollständigt. Die Imputation erfolgte anhand einer Normalverteilung mit Standardeinstellungen (width: 0.2, down shift: 1.8). Die Daten konnten nun für die weitere statistische Analyse genutzt werden. Der ANOVA Test wurde mit einer FDR von $< 0,05$ durchgeführt, der p-Wert für den Zweistichproben t-Test betrug $< 0,05$.

3.2.3.6 Ingenuity Pathway Analyse AIMS

Analog zu Kapitel 3.2.2.7

4 Ergebnisse

Da die experimentelle Analyse aus 2 Versuchsteilen bestand, werden die Ergebnisse der jeweiligen Versuchsreihen zunächst separat aufgeführt. Im ersten Teil werden die Ergebnisse der Discovery Proteomik Phase (Discovery I und II) präsentiert. Im Anschluss sind die Ergebnisse der AIMS Analyse aufgeführt. Der letzte Teil widmet sich der Auswertung funktioneller Daten und generierter Interaktionsnetzwerke.

4.1 Discovery Proteomik Strategien zur Analyse humaner Tränenflüssigkeit

4.1.1 Auswertung der eindimensionalen Gelelektrophorese

Abbildung 8 stellt die repräsentativen Proteinprofile von Glaukom Patienten mit Sicca Symptomatik (GLM + DRYaq) und gesunden Probanden (CTRL) im 1DE Gel aus der Discovery Phase I nach Beendigung des Färbevorgangs dar. Die Bande links dient als Referenz für die Molekülmasse, das Raster rechts spiegelt die von uns vorgenommene Unterteilung der Lanes (= Spalten) in jeweils 15 Banden wider.

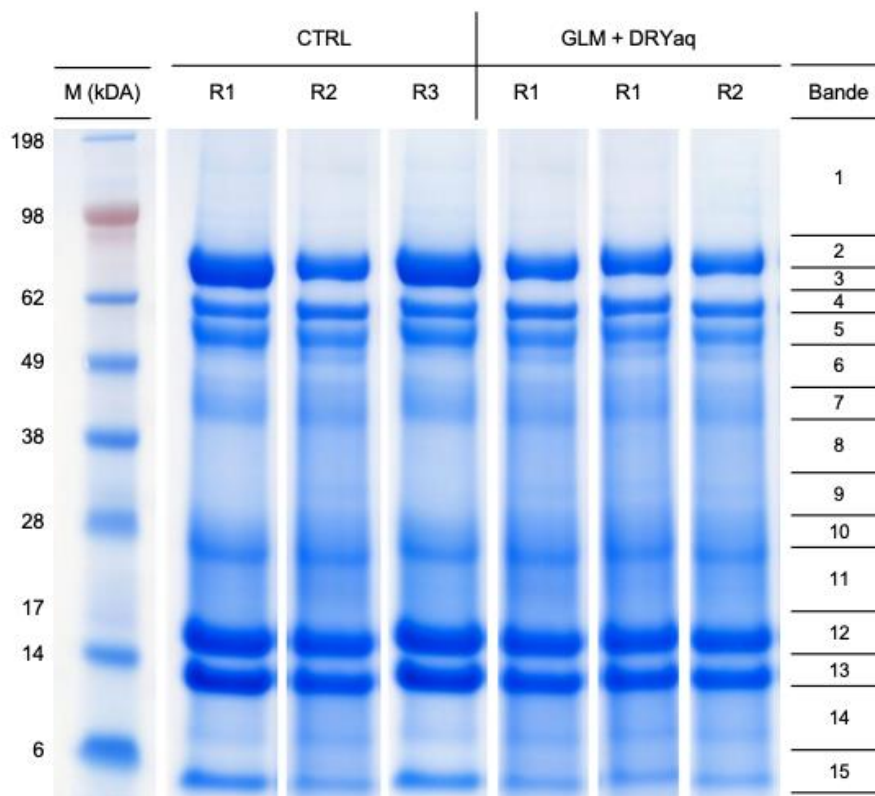


Abbildung 8: 1DE Gel

Darstellung und Vergleich der Expressionsprofile von CTRL und GLM + DRYaq im 1DE Gel. Jede Gruppe bestand aus 3 Replikaten mit je 50 μ g Protein.

4.1.2 LFQ Analyse und statistische Auswertung

Durch die LFQ Analyse via MaxQuant Analyse Software konnten mit einer FDR von 1% insgesamt 470 Proteine identifiziert werden. Mithilfe der gelbasierten Discovery Studie (Discovery I) identifizierten wir eine Gesamtzahl von 252 Proteinen. Die In-solution Discovery Studie (Discovery II) konnte mit 343 Proteinen eine größere Anzahl an Proteinen aus den gleichen Proben generieren. 127 Proteine waren nur in Discovery I nachweisbar und 218 Proteine nur in Discovery II. Eine Gesamtzahl von 125 Proteinen konnte durch beide Ansätze ermittelt werden (siehe **Abbildung 9**).

Anhand eines Zweistichproben t-Tests ($p < 0,05$) konnten signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen den beiden Gruppen CTRL und GLM + DRYaq identifiziert werden. Die Listen unterschiedlich abundanter Proteine für Discovery I und II sind im **Anhang (Tabelle 8)** aufgeführt. Die Gesamtzahl der signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen beiden Gruppen beträgt in Discovery I 56. Davon sind 19 Proteine in der GLM + DRYaq Gruppe im Vergleich zu gesunden Probanden herunter reguliert und 37 herauf reguliert. In Discovery II konnten insgesamt 73 unterschiedlich abundante Proteine zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. Davon 43 hoch reguliert und 30 herab reguliert. Zur visuellen Darstellung der Ergebnisse erstellten wir für beide Discovery Versuchsteile jeweils eine Heatmap. Dazu wurden die Daten zunächst z transformiert und anschließend einem hierarchischen Clustering unterzogen. Die Heatmaps in **Abbildung 10** und **11** stellen prägnant signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine aus Discovery I (Abbildung 10) und Discovery II (Abbildung 11) je nach Regulationszustand farbig dar.

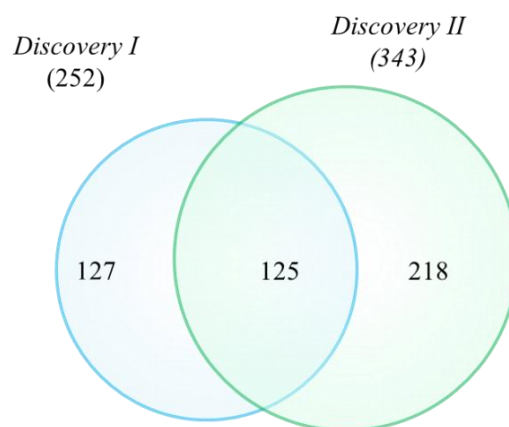


Abbildung 9: Venn Diagramm

Darstellung der Anzahl identifizierter Proteine in Discovery I und II.

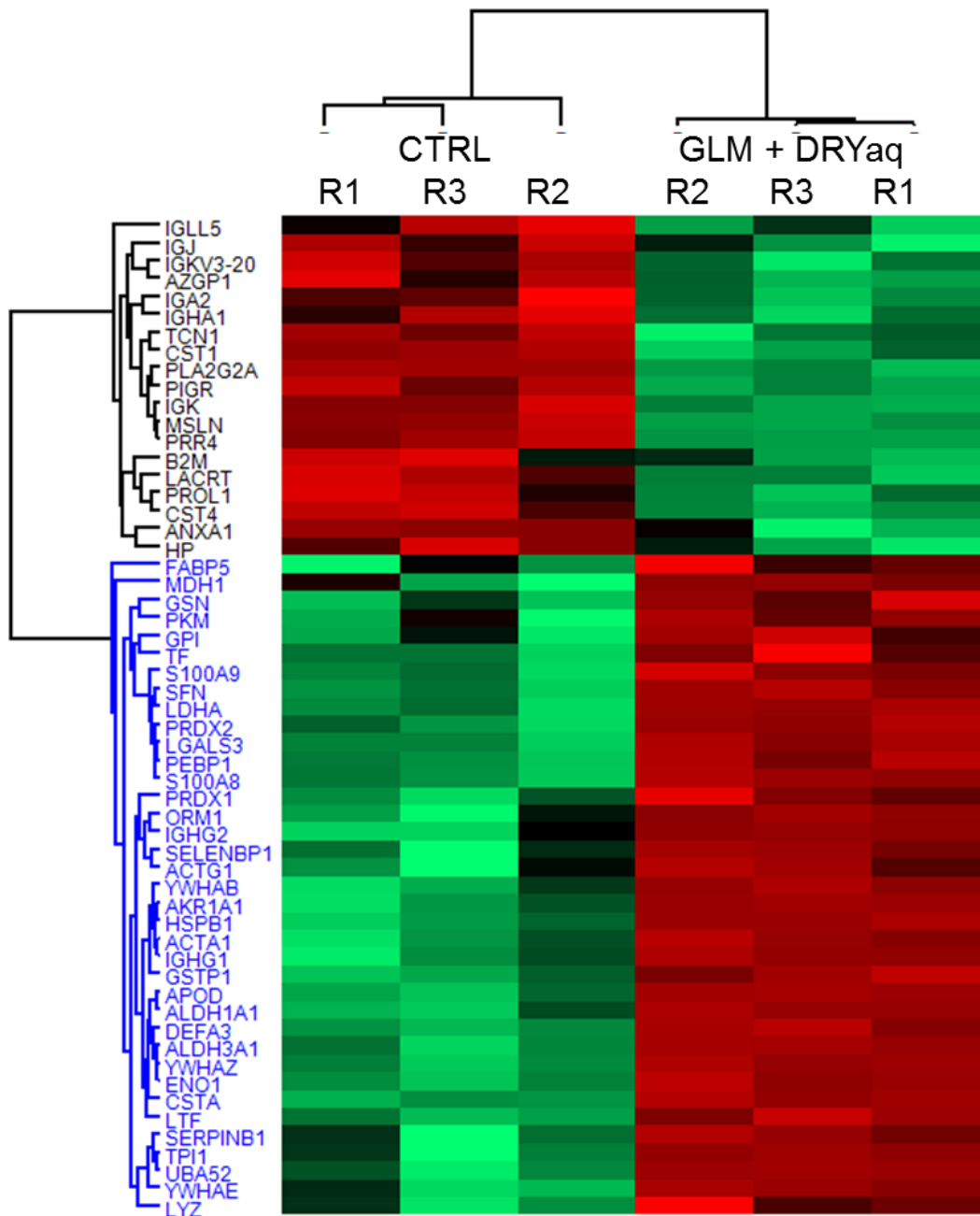


Abbildung 10: Heatmap Discovery I

Heatmap zur Darstellung der unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen GLM + DRYaq und CTRL, sowie zwischen den biologischen Replikaten einer Gruppe R1-3. Grün stellt Proteine dar, die im Vergleich herunter reguliert vorkommen, Rot solche, die herauf reguliert auftreten und Schwarz steht für nicht signifikante Veränderungen. Die Expressionsstärke steigt mit der Farbhelligkeit. Deutlich zu erkennen sind die nahezu vollständig umgekehrten Expressionsprofile beider Gruppen.

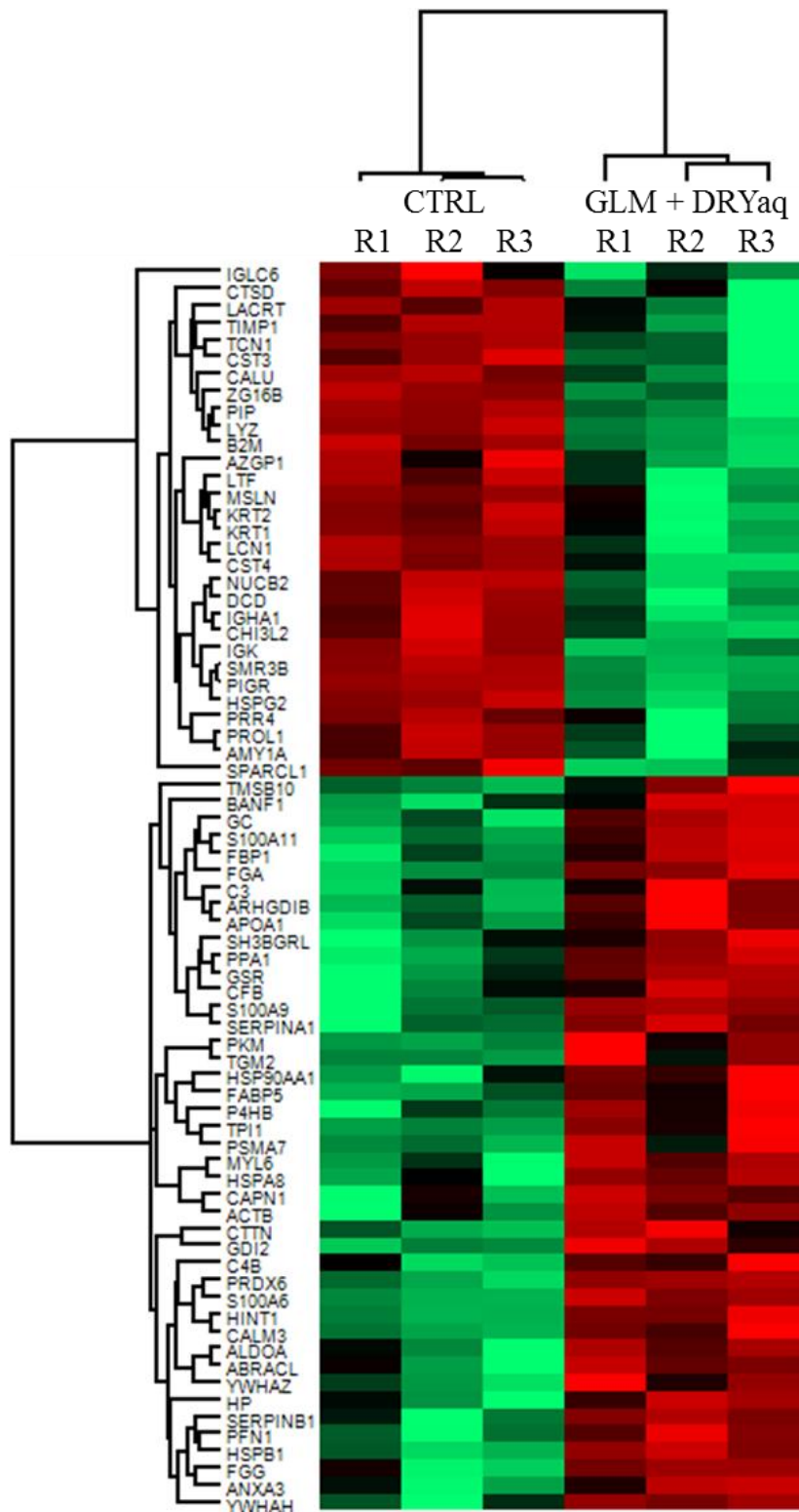


Abbildung 11: Heatmap Discovery II.

Heatmap zur Darstellung der unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen GLM + DRYaq und CTRL, sowie zwischen den biologischen Replikaten einer Gruppe R1-3. Grün stellt Proteine dar, die im Vergleich herunter reguliert vorkommen, Rot solche, die herauf reguliert auftreten und Schwarz steht für nicht signifikante Veränderungen. Die Expressionsstärke steigt mit der Farbelligkeit. Deutlich zu erkennen sind die nahezu vollständig umgekehrten Expressionsprofile beider Gruppen.

4.2 AIMS Strategie zur Analyse humaner Tränenflüssigkeit

4.2.1 LFQ Analyse und statistische Auswertung

Mithilfe von AIMS konnten in den Proben 106 Peptide und insgesamt 102 Proteine detektiert und quantifiziert werden. Um die Proteinexpression der verschiedenen Studiengruppen zuverlässig miteinander vergleichen zu können, wurden ein Signifikanztest und eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Im Zweistichproben-t-Test ($p < 0,01$) wurden die pathologischen Studiengruppen jeweils einer Kontrollgruppe bzw. einander gegenübergestellt. Hierbei wurde ermittelt, ob signifikante Unterschiede in der Proteinregulation oder -expression zwischen den Gruppen bestehen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse hierzu finden sich im **Anhang (Tabelle 9)**. Insgesamt konnten zwischen den Gruppen 46 unterschiedlich exprimierte Proteine nachgewiesen werden.

Vergleicht man zunächst GLM mit CTRL findet man insgesamt 16 unterschiedlich regulierte Proteine. Davon sind 11 in GLM höher reguliert und 5 niedriger reguliert. In GLM + DRYaq sind im Vergleich zu CTRL 43 Proteine anders exprimiert. Davon sind ca. 75% (= 32) höher reguliert und nur 11 niedriger reguliert. Die höher regulierten Proteine werden überwiegend dem Zytoplasma zugeordnet, die niedriger regulierten sind überwiegend Proteine des Extrazellularraums. Beim Vergleich von DRYaq mit CTRL fällt auf, dass 24 unterschiedlich exprimierte Proteine vorkommen. Darunter sind 16 höher reguliert und 8 niedriger reguliert. Vergleicht man nun die pathologischen Gruppen untereinander erhält man folgende Resultate: Die Gegenüberstellung von GLM + DRYaq und GLM resultierte in 27 unterschiedlich exprimierten Proteinen, davon ein Großteil (= 20) höher reguliert. Beim Vergleich von DRYaq mit GLM erhielten wir lediglich 9 unterschiedlich regulierte Proteine. 5 davon höher reguliert, 4 niedriger reguliert. Zu guter Letzt der Vergleich von DRYaq und GLM + DRYaq. Hier konnten 8 unterschiedlich exprimierte Proteine gefunden werden, davon alle niedriger reguliert.

Um einen besseren Überblick über die Datenmenge zu erhalten, wurden die Ergebnisse in einer Heatmap in **Abbildung 12** veranschaulicht. Die Heatmap zeigt auf den ersten Blick, dass der größte Unterschied in der Proteinexpression zwischen GLM+DRYaq Patienten und gesunden Probanden (CTRL) besteht. Schaut man sich nun an, inwieweit sich Glaukom-Patienten ohne trockenes Auge (GLM) von gesunden Probanden (CTRL) unterscheiden, fällt auf, dass der Anteil unterschiedlich

exprimierter Proteine wesentlich geringer ist. Insgesamt dominiert die Farbe Rot. Demnach lässt sich schlussfolgern, dass es bei GLM + DRYaq überwiegend zu einer Hochregulation bestimmter Proteine kommt. Bei den herunter regulierten Proteinen handelt es sich zum Großteil um extrazelluläre Proteine.

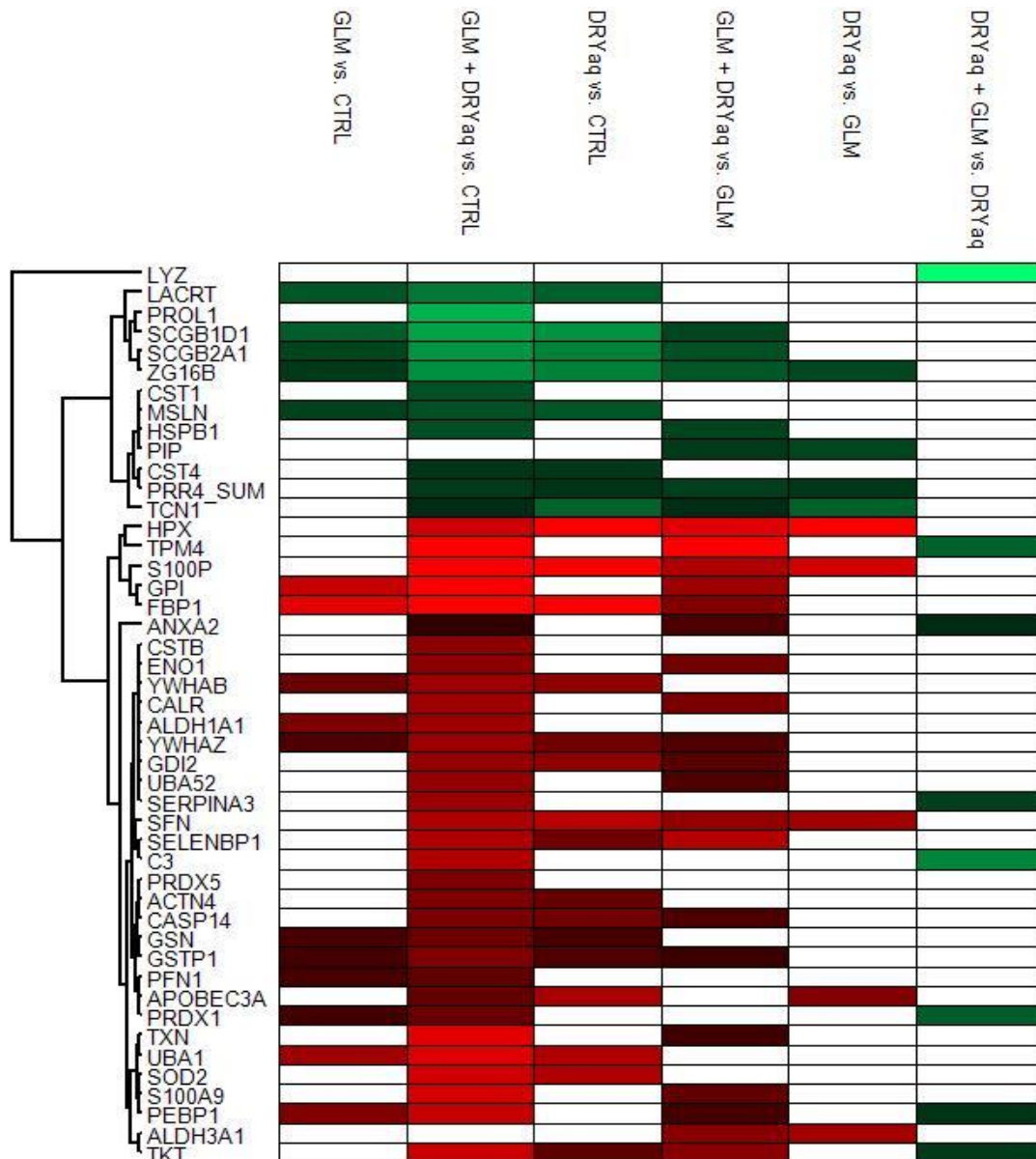


Abbildung 12: Heatmap AIMS

Darstellung der Expressionsprofile der 46 unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen den Gruppen. Die zu vergleichenden Gruppen sind in Spalten nebeneinander angeordnet, die jeweiligen Proteine mit ihren Gennamen in Zeilen. Farbschema: Rot steht für hohe Proteinexpression, grün für niedrige Expressionslevel, weiß für nicht signifikante Expressionsprofile. Die Farbhelligkeitsabstufungen dienen der Beurteilung der Regulationsstärke: Je heller die Farbe desto stärker die Regulation.

4.3 Funktionelle Klassifizierung und Proteininteraktionsnetzwerk Analyse

Die aus der bisherigen Analyse hervorgegangenen Ergebnisse stellen kleine Puzzleteile eines großen Ganzen dar, denn Proteine agieren selten alleine. Um zu verstehen, welche biologischen Prozesse unter bestimmten pathologischen Konditionen wirklich ablaufen, ist es nötig, weitere Kenntnisse über die entsprechenden Proteine, ihre Interaktionsnetzwerke und Rolle im Organismus zu gewinnen. Daher unterzogen wir die Daten einer Ingenuity Pathway Analyse. Die Ingenuity Pathway Analyse der unterschiedlich abundanten Proteine zwischen den Gruppen lieferte wichtige Informationen zu Protein-assoziierten Pathologien und Dysfunktionen, Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen und deren Lokalisation in der Zelle (Zellkompartiment).

4.3.1 Discovery Proteomik

Abbildung 13 stellt das resultierende Proteinnetzwerk aus der IP-Analyse der Discovery Phase I (GLM + DRYaq vs. CTRL) dar. **Abbildung 14** zeigt das IPA Netzwerk der Discovery Phase II (GLM + DRYaq vs. CTRL).

Die unterschiedlich abundanten Proteine sind ihren zellulären Kompartimenten zugeordnet, Interaktionen sind durch Verbindungslinien dargestellt. Die signifikant herabregulierten Proteine zwischen GLM + DRYaq und CTRL erscheinen relativ gleichmäßig über die zellulären Kompartimente Extrazellularraum und Zytoplasma verteilt, mit leichter Tendenz zum Zytoplasma. Deutlich erkennbar ist, dass sich im Bereich des Extrazellularraums vorwiegend vermindert abundante Proteine befinden. Im Gegensatz dazu scheinen eine Vielzahl der Proteine des Zytoplasmas bei GLM + DRYaq Patienten vermehrt abundant vorzukommen. Im Bereich des Extrazellularraums imponieren vor allem die Proteine Laktotransferrin (LTF), Lacritin (LACRT) und die Immunglobuline IGHG1 und IGHA1 mit zahlreichen direkten Netzwerkverbindungen. Im Bereich der Plasmamembran sind nur wenige unterschiedlich abundante Proteine lokalisiert. Auffällig ist, dass in der Discovery Phase II auch unterschiedlich exprimierte Proteine des Zellkerns identifiziert werden konnten, was in der Discovery Phase I nicht gelang. Im Zytoplasma imponieren vor allem die Proteine der 14-3-3 Familie sowie einige Hitzeschockproteine mit einer Vielzahl an intrazytoplasmatischen Verbindungen.

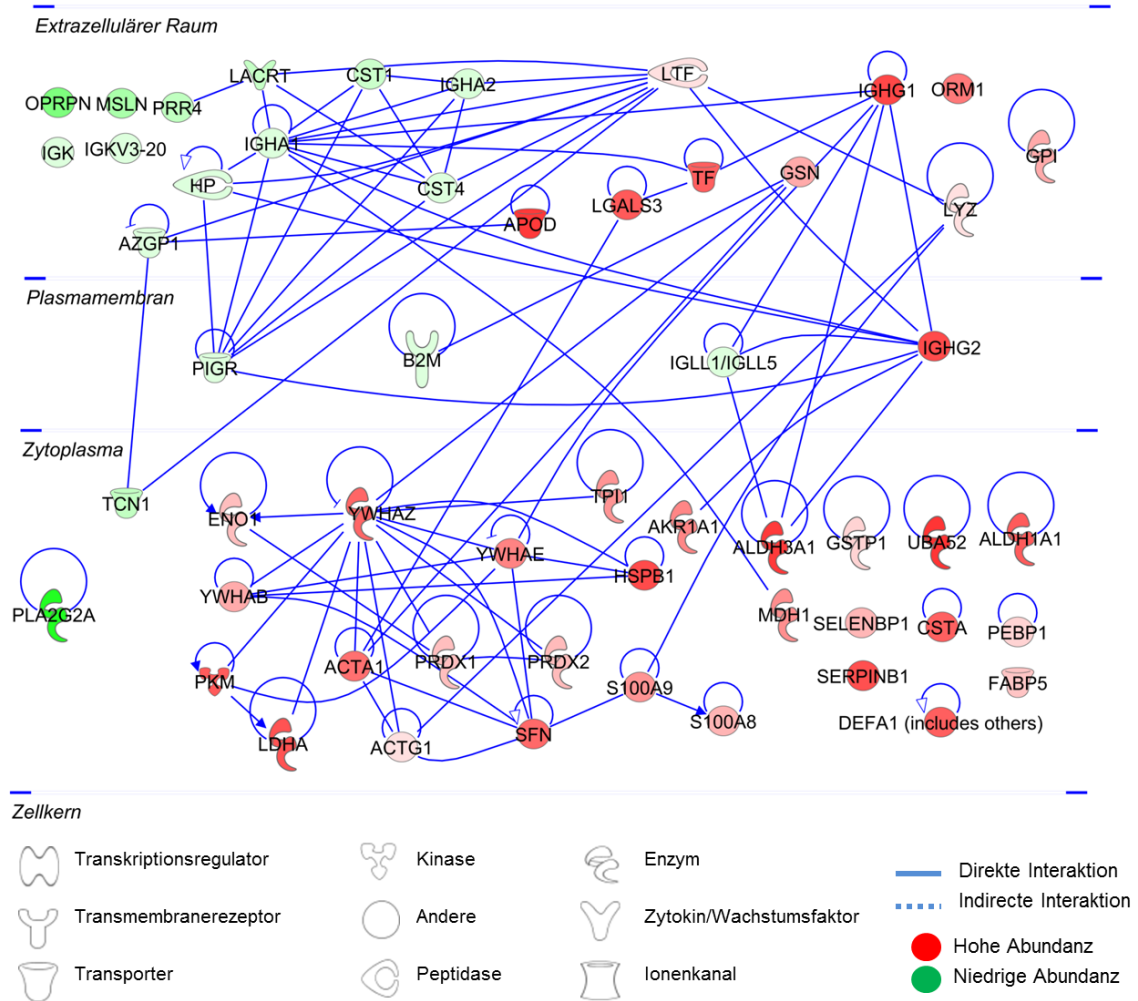


Abbildung 13: IPA Discovery I

IPA der unterschiedlich abundanten Proteine aus der Discovery Phase I (GLM + DRYaq vs. CTRL). Die roten Markierungen stehen für hohe Expressionsprofile, die grünen für niedrige Expressionsprofile. Je signifikanter die Ergebnisse, desto stärker die Farbintensität. Der Proteintyp (funktionelle Klasse) spiegelt sich in der Wahl unterschiedlicher Symbole wider.

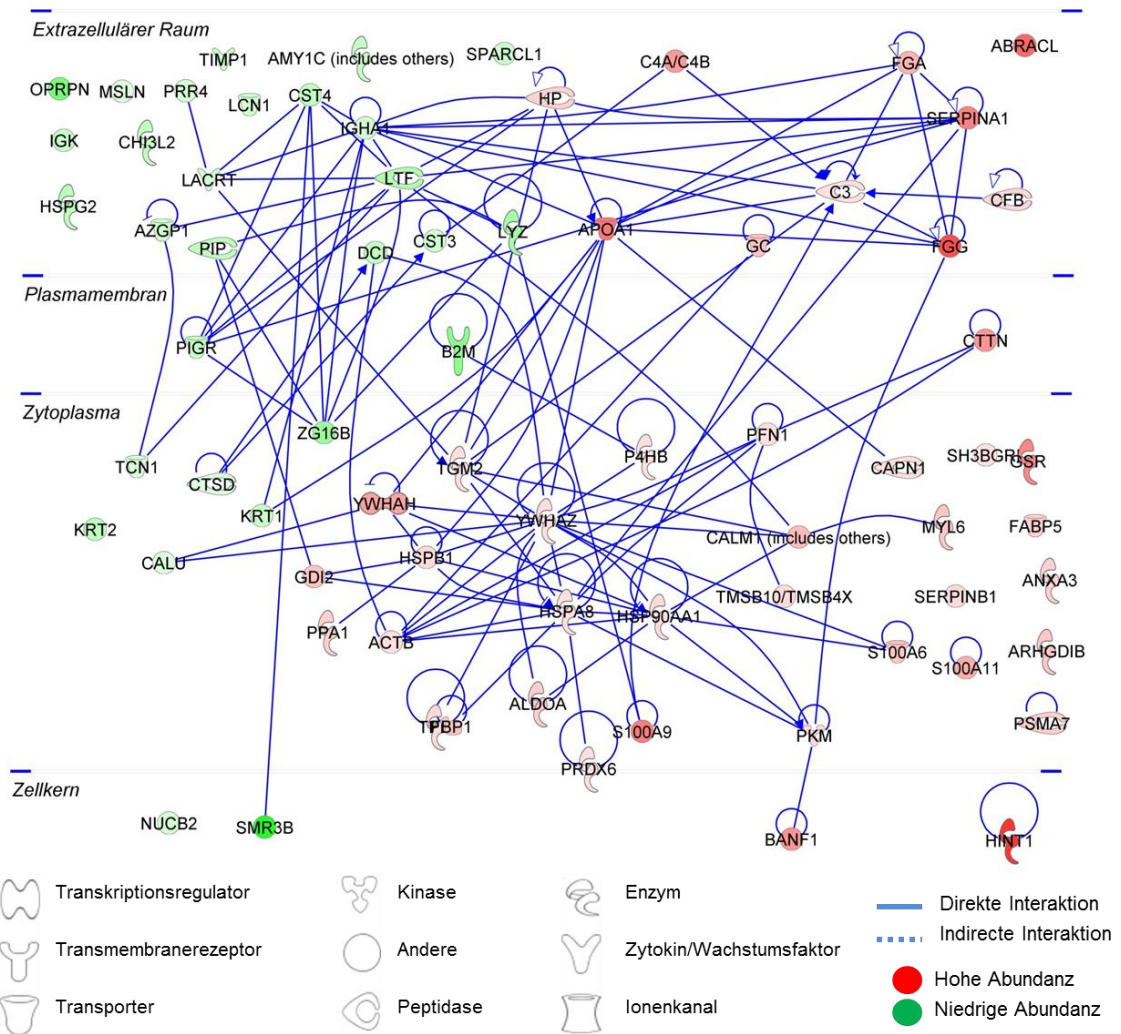


Abbildung 14: IPA Discovery II

IPA der unterschiedlich abundanten Proteine aus der Discovery Phase II (GLM + DRYaq vs. CTRL). Die roten Markierungen stehen für hohe Expressionsprofile, die grünen für niedrige Expressionsprofile. Je signifikanter die Ergebnisse, desto stärker die Farbintensität. Der Proteintyp (funktionelle Klasse) spiegelt sich in der Wahl unterschiedlicher Symbole wider.

4.3.2 AIMS

Die **Abbildungen 15-17** stellen die Proteinnetzwerkverbindungen aus der IPA Analyse für AIMS dar. **Abbildung 15** zeigt das Netzwerk der unterschiedlich regulierten Proteine aus dem Vergleich GLM vs. CTRL. Insgesamt sind 6 Proteine im Extrazellularraum dargestellt. Darunter 2 heraufregulierte Proteine und 4 herabregulierte. Bei den in vermehrter Abundanz vorkommenden Proteinen, handelt es sich um das Aktin-bindende Protein Gelsolin (GSN) und das Enzym Glucose-6-phosphat Isomerase (GPI). Die vermindert abundanten Proteine Lipophilin A (SCGB1D1), Mammaglobin B (SCGB2A1) und das extrazelluläre Glykoprotein Lacritin (LACRT) stehen in enger Netzwerkverbindung zueinander. Das ebenfalls herunterregulierte Protein Mesothelin (MSLN) steht solitär. Im Zytoplasma befinden sich 10 unterschiedlich exprimierte Proteine. Davon sind 9 hochreguliert und nur ein Protein, nämlich Zymogen Granulat Protein 16 homolog B (ZG16B) herunterreguliert. Zu den vermehrt abundant vorkommenden Proteinen zählen die Enzyme Retinal Dehydrogenase 1 (ALDH1A1), Glutathion S-Transferase P (GSTP1), Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1), Peroxiredoxin-1 (PRDX1) und das Ubiquitin-ähnliche Modifikator-aktivierende Enzym 1 (UBA1). Außerdem die Proteine Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein 1 (PEBP1), 14-3-3 Protein zeta/delta (YWHAZ), 14-3-3 Protein beta/alpha (YWHAB) und Profilin-1 (PFN1). 14-3-3 Protein zeta/delta imponiert im Zytoplasma mit zahlreichen intrazytoplasmatischen Netzwerkverbindungen (PFN1, UBA1, YWHAB, PRDX1) und einer Verbindung in den Extrazellularraum (GSN). Alle Proteine dieses Interaktionsnetzwerks kommen heraufreguliert vor.

In **Abbildung 16** sind die unterschiedlich exprimierten Proteine aus dem Vergleich GLM + DRYaq vs. CTRL in ihren Zellkompartimenten dargestellt und durch Verbindungslinien in Relation zueinander gesetzt. Im Extrazellularraum sind von insgesamt 12 Proteinen 8 herabreguliert und 4 heraufreguliert. Zu den 8 vermindert abundanten Proteinen zählen extrazelluläres Glykoprotein Lacritin (LACRT), Mammaglobin B (SCGB2A1), Lipophilin A (SCGB1D1) und Mesothelin (MSLN), die die auch bei GLM vs. CTRL herabreguliert vorkommen. Außerdem die Prolin-reichen Proteine-1 und -4 (OPRPN/PROL1, PRR4), Cystatin-1 (CST1) und Cystatin-S (CST4). Heraufregulierte Proteine des Extrazellularraums sind wie auch bei GLM vs. CTRL GSN und GPI. Zudem die Glykoproteine Hämopexin (HPX) und Alpha-1-Antichymotrypsin (SERPINA3). In der Plasmamembran befindet sich das

heraufregulierte und membrangebundene Protein Annexin A2 (ANXA2). Im Zytoplasma befinden sich insgesamt 29 unterschiedlich exprimierte Proteine. Davon 3 vermindert abundant und 26 vermehrt abundant. Zu den herabregulierten Proteinen gehören das Hitzeschockprotein Beta-1 (HSPB1), Transcobalamin I (TCN1) und Zymogen Granulat Protein 16 homolog B (ZG16B), welches analog zu GLM vs. CTRL exprimiert ist. Zu den hochregulierten Proteinen des Zytoplasmas zählen das Apolipoprotein B-mRNA-Editing-Enzym katalytische Untereinheit 3A (APOBEC3A), Tropomyosin-4 (TPM4), die Fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1), der Rab-BIP-Dissoziationsinhibitor Beta (GDI2). Außerdem die Proteine Profilin-1 (PFN1), YWHAZ, YWHAB, UBA1, PRDX1, ALDH1A1, PEBP1 sowie GSTP1 mit ähnlichen Expressionsprofilen wie in Abbildung 15 (GLM vs. CTRL). Darüber hinaus ebenfalls vermehrt abundant, sind die Proteine Calreticulin (CALR), Alpha-Actinin 4 (ACTN4), das ribosomale 60S Protein L40 (UBA52), das 14-3-3 Protein Sigma (SFN), das inflammatorische Protein S100A9, das calciumbindende Protein S100-P, die Superoxiddismutase (SOD2), Peroxiredoxin-5 (PRDX5), Cystatin-B (CSTB), die Methanthioloxidase (SELENBP1), Caspase 14 (CASP14) und die Enzyme Thioredoxin (TXN), Transketolase (TKT) sowie das glykolytische Enzym Alpha-Enolase (ENO1). Zwischen den Proteinen bestehen zahlreiche Netzwerkverbindungen: Das Glykoprotein Lacritin (LACRT) interagiert im Extrazellularraum mit 4 weiteren Proteinen. Darunter 2 Proteine aus der Sekretoglobin Familie: SCGB2A1 und SCGB1D1. Mammaglobin B und Lipophilin A stehen selbst auch miteinander in Verbindung. LACRT weist weitere Verbindungen zu PRR4 und CST4 auf. CST4 steht in Verbindung mit CST1 sowie mit den zytoplasmatischen Proteinen SOD2 und ZG16B. Auch CST1 interagiert mit der SOD2, die eines der Hauptnetzwerkproteine im Zytoplasma darstellt. Das Aktin-bindende extrazelluläre Protein GSN interagiert mit Proteinen der Plasmamembran und des Zytoplasmas (ANXA2, 14-3-3 Protein zeta/delta, ACTN4 und SOD2). Das membrangebundene Protein Annexin A2 (ANXA2) hat außerdem Verbindungen zu zytoplasmatischen Proteinen wie S100A9 oder 14-3-3 Protein zeta/delta. Letzteres sticht ebenfalls durch eine Vielzahl intrazytoplasmatischer Verbindungen heraus und scheint daher eine Hauptrolle im Interaktionsnetzwerk zu spielen.

Abbildung 17 veranschaulicht das durch den Vergleich von DRYaq vs. CTRL entstandene Protein-Protein Interaktionsnetzwerk. Im Extrazellularraum befinden sich 6 herabregulierte Proteine darunter MSLN, CST4, LACRT, PRR4 und die beiden

Mitglieder der Sekretoglobin Familie SCGB2A1 und SCGB1D1. Neben den herunterregulierten Proteinen sind 2 extrazelluläre Proteine hochreguliert. Das Aktin-bindende Protein Gelsolin (GSN) und Hämopexin (HPX). Ähnliche Expressionsprofile der extrazellulären Proteine sind in Abbildung 16 beim Vergleich GLM+DRYaq vs. CTRL nachweisbar. Im Zytoplasma sind 2 Proteine vermindert abundant. Zum einen ZG16B und zum anderen Transcobalamin-1 (TCN1). Vermehrt abundant sind 14 Proteine darunter, wie auch bei GLM + DRYaq vs. CTRL, die Proteine SOD2, ACTN4, YWHAZ, YWHAB und SFN. Weiterhin UBA1, die Transketolase (TKT), APOBEC3A, GSTP1, SELENBP1, die Caspase 14 (CASP14), FBP1, der Rab-BIP-Dissoziationsinhibitor Beta (GDI2) und das calciumbindende Protein S100-P. Hauptnetzwerkbildner sind die extrazellulären Proteine LACRT, CST4 und SCGB1D1, sowie die zytoplasmatischen Proteine SOD2 und YWHAZ.

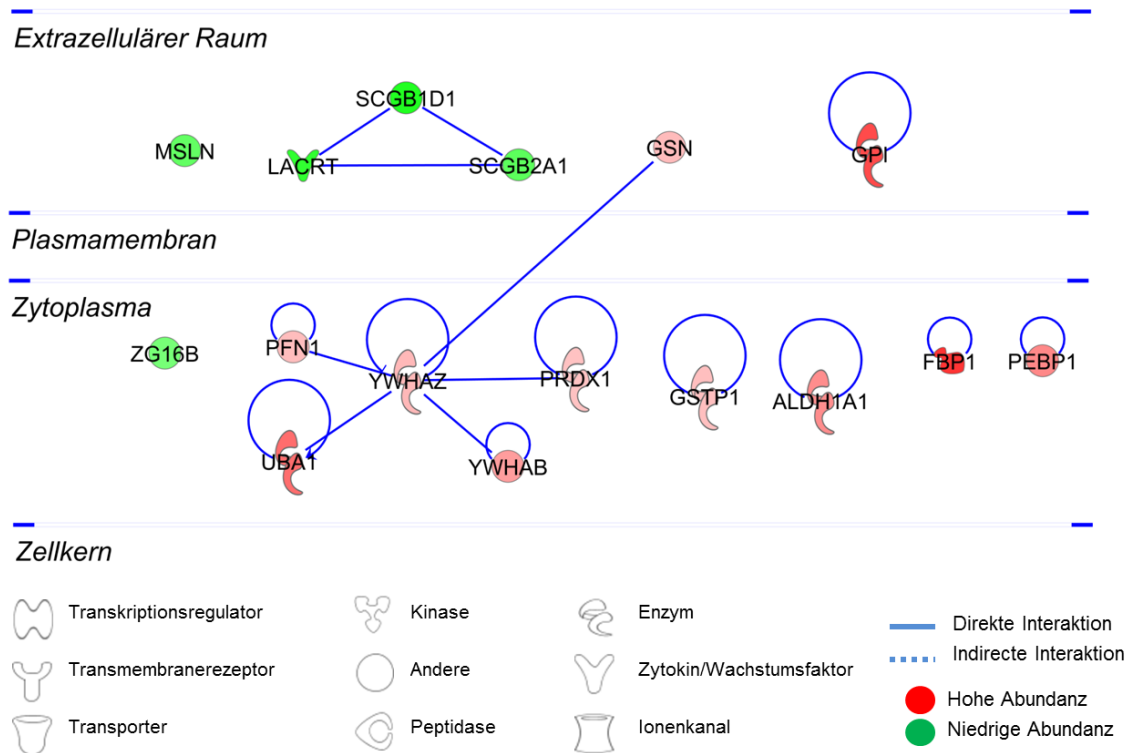


Abbildung 15: IPA AIMS GLM vs. CTRL

Die Proteine ihren zellulären Kompartimenten zugeordnet und Interaktionen durch Verbindungslinien dargestellt. Die roten Markierungen stehen für hohe Expressionsprofile, die grünen für niedrige Expressionsprofile. Je signifikanter die Ergebnisse, desto stärker die Farbintensität. Der Proteintyp spiegelt sich in der Wahl der unterschiedlichen Symbole wider.

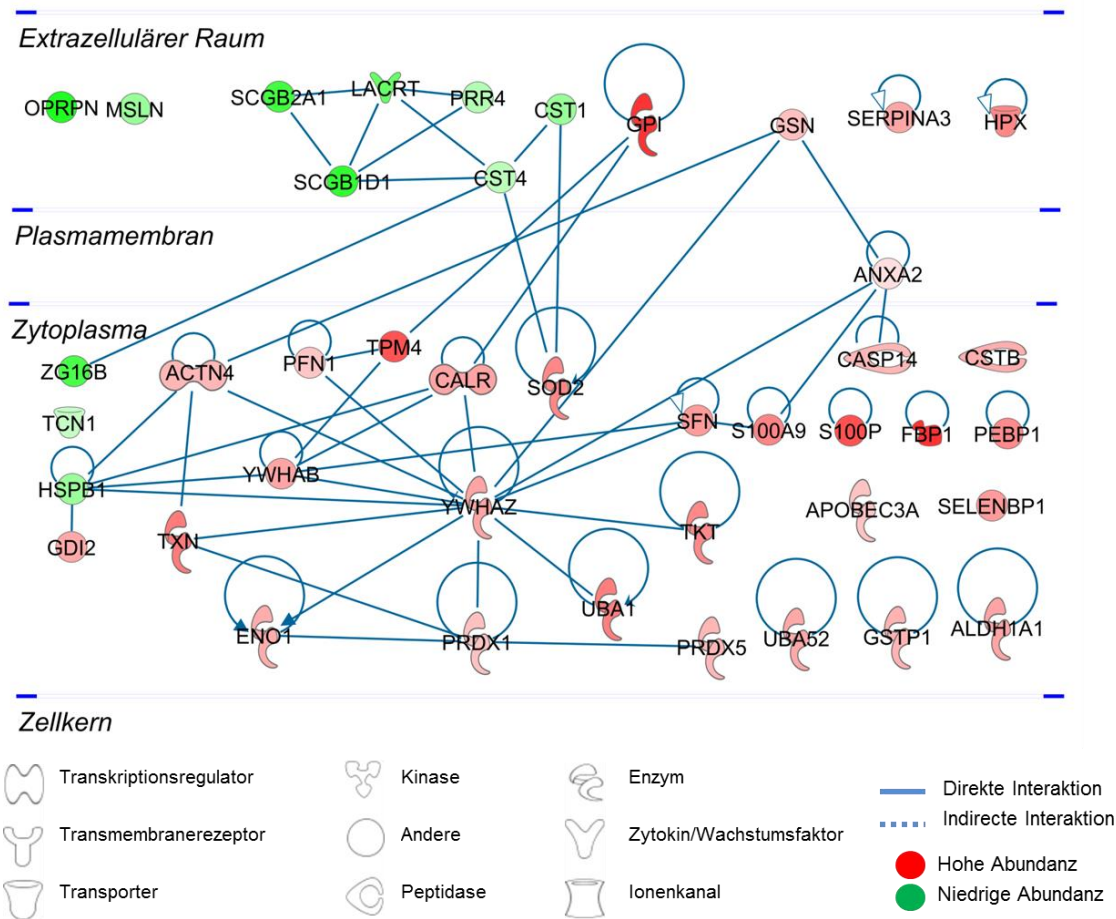


Abbildung 16: IPA AIMS GLM+DRYaq vs. CTRL

Die Proteine ihren zellulären Kompartimenten zugeordnet und Interaktionen durch Verbindungslinien dargestellt. Die roten Markierungen stehen für hohe Expressionsprofile, die grünen für niedrige Expressionsprofile. Je signifikanter die Ergebnisse, desto stärker die Farbintensität. Der Proteintyp spiegelt sich in der Wahl der unterschiedlichen Symbole wider.

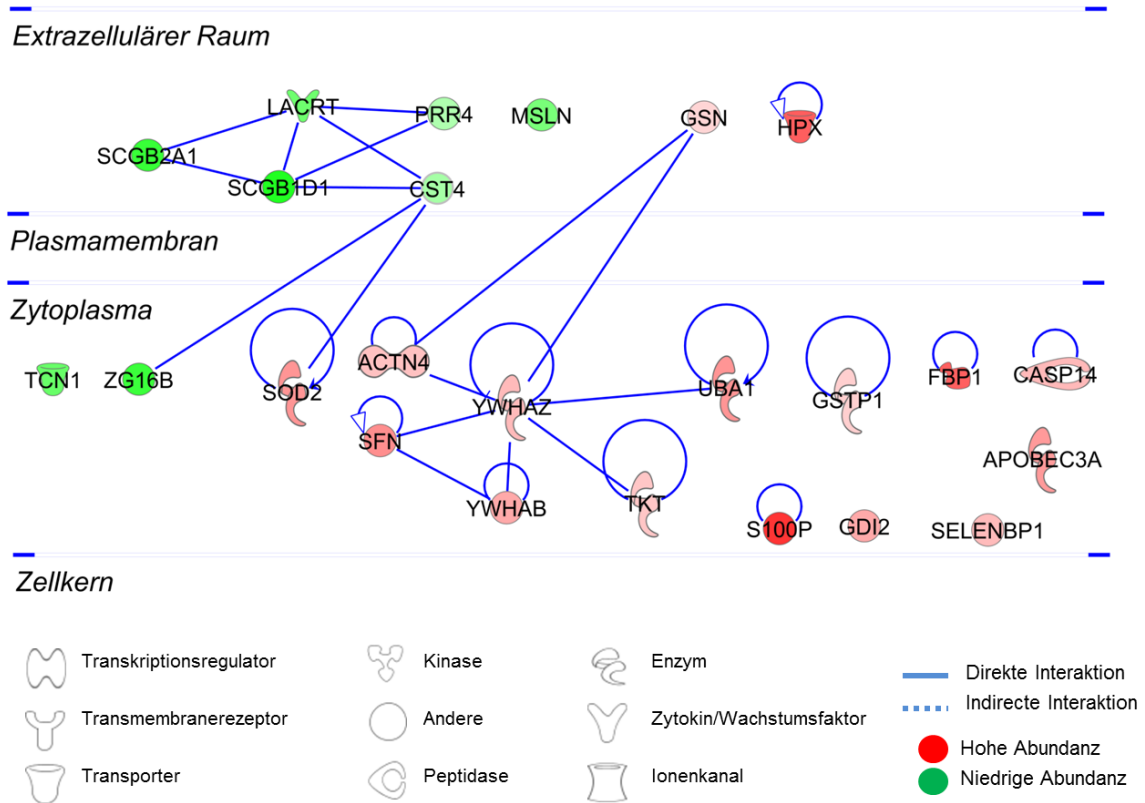


Abbildung 17: IPA AIMS DRYaq vs. CTRL

Die Proteine ihren zellulären Kompartimenten zugeordnet und Interaktionen durch Verbindungslinien dargestellt. Die roten Markierungen stehen für hohe Expressionsprofile, die grünen für niedrige Expressionsprofile. Je signifikanter die Ergebnisse, desto stärker die Farbintensität. Der Proteintyp spiegelt sich in der Wahl der unterschiedlichen Symbole wider.

4.3.3 Signalwege, Pathologien und biologische Funktionen

Durch die IPA Netzwerke erhielten wir wichtige Informationen über mögliche Zusammenhänge zwischen unterschiedlich abundanten Proteinen. Im nächsten Schritt analysierten wir die Daten aus der Discovery und AIMS Phase hinsichtlich relevanter Signalwege, biologischer Funktionen und Erkrankungen, in welche die jeweils unterschiedlich abundanten Proteine involviert sind.

Wir analysierten zunächst die betroffenen Signalwege. Die p-Werte wurden durch Benjamini-Hochberg multiple testing correction ($-\log B-H > 0.05$) ermittelt. **Abbildung 18** zeigt eine Zusammenstellung nach Signifikanz und stellt die Ergebnisse für Discovery und AIMS vergleichend dar. Die Ergebnisse aus der Discovery Versuchsreihe weisen hierbei insgesamt höhere Signifikanzlevel auf.

Die relevantesten betroffenen Signalwege für das Discovery Experiment I (GLM+DRYaq vs. CTRL) waren in folgende biologische Prozesse involviert: Gluconeogenese ($p= 5,91 \times 10^{-4}$), Glykolyse ($p= 3,57 \times 10^{-5}$), Akute-Phase-Reaktion ($p= 3,14 \times 10^{-2}$), Aktin-Zytoskelett Signalgebung ($p=4,31 \times 10^{-2}$), 14-3-3 Protein vermittelte Prozesse ($p= 2,16 \times 10^{-3}$) sowie die NFR-2 vermittelte oxidative Stressantwort ($p= 1,05 \times 10^{-3}$).

Discovery II zeigt besonders signifikante Werte für die Akute-Phase-Reaktion Signalwege ($p= 9,41 \times 10^{-6}$) und die Glykolyse ($p= 6,24 \times 10^{-5}$).

Für AIMS GLM+DRYaq vs. CTRL sind ebenfalls die Glykolyse ($p= 8,39 \times 10^{-4}$) und die Gluconeogenese ($p= 8,39 \times 10^{-4}$) die am signifikantesten unterschiedlich regulierten Signalwege. Eine Tabelle mit allen p-Werten für Discovery I + II und AIMS zur Signalweg Analyse befindet sich im **Anhang (Tabelle 10)**.

In **Abbildung 19** sind die mit den Signalwegen „Gluconeogenesis“, „14-3-3 mediated Signaling“ und „Actin Cytoskeleton Signaling“ assoziierten Proteine dargestellt. Die mit der Gluconeogenese assoziierten, signifikantesten Proteine, sind die heraufregulierten Enzyme FBP1, GPI, α - Enolase (ENO1) und die Malat Dehydrogenase (MDH1). GPI und ENO1 konnten sowohl in der Discovery als auch in der AIMS Phase nachgewiesen werden. FBP1, GPI und ENO1 sind gleichzeitig auch Glykolyse assoziierte Proteine. Insbesondere FBP1 und GPI zeigen sehr signifikante Werte im AIMS Vergleich GLM + DRYaq vs. CTRL.

14-3-3-vermittelte Signalweg assoziierte Proteine sind die Proteine der 14-3-3 Familie SFN, YWHAZ, YWHAB, YWHAЕ und YWHAH. In Discovery I konnten wesentlich mehr Proteine der 14-3-3 Familie detektiert werden. Nur YWHAZ konnte in beiden Discovery Phasen nachgewiesen werden. Durch AIMS validiert werden konnten SFN, YWHAZ und YWHAB. Insgesamt scheinen die 14-3-3 vermittelten Signalwege vor allem bei den Sicca-assoziierten Gruppen (GLM + DRYaq und DRYaq) eine wichtige Rolle zu spielen.

Gelsolin (GSN), Alpha-Aktin-1 Skelettmuskel (ACTA1), Alpha-Aktinin-4 (ACTN4), Profilin-1 (PFN1) und Gamma-Aktin (ACTG1) zählen mitunter zu den Aktin-Skelett Signalweg assoziierten Proteinen. Sowohl in der Discovery als auch in der AIMS Phase wird das heraufregulierte Protein GSN beim Vergleich GLM + DRYaq vs. CTRL als besonders signifikant hervorgehoben. Das calcium-regulierte Protein Gelsolin ist an der Herstellung und am Abbau von Aktinfilamenten beteiligt [103]. Schaut man sich nur die Ergebnisse der Discovery Phase I an, so sticht das vermehrt abundante Protein ACTA1 heraus. Es gehört zur Gruppe der Alpha Aktine, die vorwiegend in Muskelgewebe vorkommen und einen wichtigen Bestandteil des kontraktile Apparates darstellen [104].

Nach der Signalweganalyse wurden für die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine aus der Discovery und AIMS Phase die prognostizierten vorangeschalteten Regulatoren („Upstream Regulators“) identifiziert und in einer Heatmap dargestellt (**Abbildung 20**). Die Regulatoren sind nach Signifikanzniveau angeordnet. Die signifikantesten Werte konnten in der Discovery Analyse (GLM+DRYaq vs. CTRL) ermittelt werden. Besonders deutlich zeigt sich hier eine Beteiligung des mTOR Regulators (mechanistic Target of Rapamycin) in beiden Discovery Versuchen. Man geht von einer Aktivierung aus. Für Interleukin 15 (IL15), Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 22 (IL22) konnten in allen 3 Versuchsteilen (Discovery I, II und AIMS für GLM + DRYaq) eine Aktivierung ermittelt werden. Für IL6 und IL 22 sind die Daten aus AIMS signifikanter als aus der Discovery Versuchsreihe, wobei Discovery II ähnlich signifikante Ergebnisse liefern kann. Für Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFB1) wird in der Discovery Phase ebenfalls eine Aktivierung vorhergesagt, wohingegen in AIMS eine Inhibition bei GLM+DRYaq und DRYaq prognostiziert wird. Bei Tumornekrosefaktor (TNF) zeigen sowohl innerhalb der Discovery Ansätze inkonstante Ergebnisse. Für TNF wird in der Discovery I Phase eine Inhibition

vorausgesagt, wohingegen die Daten aus Discovery II und AIMS für eine Aktivierung sprechen. IL1B konnte nur in der Discovery Phase als Upstream Regulator ermittelt werden, hier unterscheiden sich die Ergebnisse aus Discovery I und II.

Die mit IL6 assoziierten Proteine sind in **Abbildung 21** dargestellt. Anhand der Abbildung wird deutlich, dass in Discovery II die größte Anzahl assoziierter Proteine nachgewiesen werden konnte. Protein S100A9 konnte in allen 3 Versuchsansätzen in Verbindung mit IL6 nachgewiesen werden.

In **Abbildung 22** sind die mit den vorangeschalteten Regulatoren IL15 und IL22 assoziierten Protein dargestellt. Eine Assoziation von IL15 zu den Proteinen ENO1, GPI sowie MSLN konnte durch AIMS validiert werden. Die Proteine der S100 Familie (S100A8 und S100A9) zeigen eine Assoziation zu IL22.

Eine Tabelle mit p-Werten und z-scores für die Upstream Regulator Analyse befindet sich im **Anhang (Tabelle 11 und 12)**.

Die Ergebnisse aus der Analyse zu assoziierten Erkrankungen und biologischen Funktionen für die AIMS und Discovery Phase I und II sind in **Abbildung 23** zusammengefasst. Auch hier befinden sich die Tabellen mit p-Werten und z-scores im **Anhang (Tabelle 13 und 14)**. An erster Stelle steht die Funktion „Degranulation von Zellen“ (Discovery II $p = 5.79 \times 10^{-21}$), gefolgt von „Zellbewegung“ (Discovery II $p = 2.89 \times 10^{-13}$), „Protein Metabolismus“ (Discovery II $p = 2.07 \times 10^{-11}$), „Apoptose“ (Discovery I $p = 8,60 \times 10^{-7}$), „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ (Discovery II $p = 1.23 \times 10^{-7}$), „Endozytose“ (Discovery I $p = 2,07 \times 10^{-6}$), „Antimikrobielle Antwort“ (Discovery I $p = 4,79 \times 10^{-10}$), „Entzündungsreaktion“ (Discovery II $p = 3.46 \times 10^{-6}$), „Rezeptor-vermittelter Endozytose“ (Discovery II $p = 2.03 \times 10^{-6}$), „klassischer Aktivierungsweg des Komplementsystems“ (Discovery I $p = 8,30 \times 10^{-4}$), „Immunantwort der Zellen“ (Discovery II $p = 9.52 \times 10^{-6}$) sowie „Keratokonjunktivitis sicca“ (Discovery II $p = 3.62 \times 10^{-4}$). Viele dieser Erkrankungen und biologischen Funktionen stehen in direktem Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion. Dies unterstreicht den entzündlichen Charakter der untersuchten Pathologien. So findet man die Funktionen „Entzündungsantwort“ und „Antimikrobielle Antwort“ sowohl in der AIMS als auch in der Discovery Phase unter GLM + DRYaq vs. CTRL, aber sonst in keiner anderen Gruppe.

Betrachtet man die Ergebnisse für GLM + DRYaq vs. CTRL aus der AIMS Phase bilden die Funktionen „Apoptose“ ($p = 7,00 \times 10^{-7}$), „Degranulation von Zellen“ ($p = 4,29 \times 10^{-6}$) und „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ ($p = 8,27 \times 10^{-5}$) die Spitzenreiter.

Beim Vergleich GLM vs. CTRL erreichten die Funktionen „Apoptose“ ($p = 3,78 \times 10^{-3}$) und „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ ($p = 8,31 \times 10^{-3}$) die höchsten Scores. DRYaq vs. CTRL zeigt hohe Scores bei Funktionen wie „Degranulation von Zellen“ ($p = 1,53 \times 10^{-2}$), „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ ($p = 1,57 \times 10^{-2}$), „Endozytose“ sowie „Apoptose“ ($p = 2,23 \times 10^{-2}$), und ist richtig assoziiert mit der Erkrankung „Keratokonjunktivitis sicca“ ($p = 9,57 \times 10^{-2}$). Beim Vergleich GLM + DRYaq vs. GLM ist „Apoptose“ die Top Funktion mit einem p-Wert von $6,93 \times 10^{-4}$. „Apoptose“ erreicht unter nahezu allen pathologischen Konditionen signifikante Werte, allerdings zeigen sich bei GLM + DRYaq sowohl bei AIMS ($p = 7,00 \times 10^{-7}$) als auch in der Discovery Phase ($8,6 \times 10^{-7}$) die mit Abstand höchsten Scores. Interessanterweise zeigt die Funktion „Antimikrobielle Abwehr“ ein GLM + DRYaq spezifisches Auftreten, da hier nur bei GLM + DRYaq vs. CTRL und GLM + DRYaq vs. GLM entsprechende Scores erreicht werden.

Schauen wir uns einige Funktionen nun etwas genauer an: In **Abbildung 24** sind die Proteinnetzwerke für die Funktion „Inflammatory Response“ dargestellt. Auch hier wurden die Netzwerke für GLM + DRYaq vs. CTRL Discovery I + II und AIMS nebeneinander angeordnet. Alle 3 Netzwerke sagen eine Aktivierung dieser Funktion voraus. Discovery I und Discovery II konnten eine ähnliche Anzahl an assoziierten Proteinen generieren. In AIMS konnten die beiden bereits in Discovery nachgewiesenen Proteine GSN und S100A9 verifiziert werden. Beide zeigen erhöhte Expressionsprofile und wirken sich aktivierend auf die Induktion inflammatorischer Reaktionen aus.

In den **Abbildungen 25** sind die Proteinnetzwerke für den biologischen Prozess „Apoptosis“ aus AIMS für alle Gruppen (GLM, GLM + DRYaq, DRYaq) dargestellt. GLM + DRYaq zeigt die größte Anzahl Apoptose-assoziiierter Proteine (= 27). Die meisten dieser Proteine zeigen erhöhte Expressionsprofile, nur 2 kommen vermindert abundant vor (HSPB1, LACRT). Aus der Grafik lässt sich außerdem entnehmen, dass viele dieser Proteine eine Hemmung der Apoptose bewirken. Insgesamt wird dieser biologische Prozess demnach inhibiert. Zahlreiche Proteine aus der Discovery Analyse

konnten verifiziert werden, darunter GSN, LACRT, ENO1, GSTP1, GPI, YWHAZ, YWHAB, UBA52, S100A9, PEBP1.

Bei GLM vs. CTRL und DRYaq vs. CTRL konnten weitaus weniger Apoptose-assoziierte Proteine nachgewiesen werden (jeweils 11). Auch hier finden sich in überwiegender Anzahl vermehrt abundante Proteine, die zum Großteil eine Inhibition verursachen. Bei GLM vs. CTRL zeigen die Proteine LACRT, UBA1 und GPI besonders signifikante Werte. Bei DRYaq vs. CTRL sind es die Proteine LACRT, SFN, UBA1 und SOD2.

Abbildung 26 zeigt die mit den biologischen Funktionen „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ für GLM + DRYaq aus Discovery und AIMS assoziierten Proteine. Beide Netzwerke werden zum überwiegenden Teil aus vermehrt abundanten Proteinen gebildet. Die Proteine GSTP1, YWHAZ, PRDX1 zeigen in beiden Netzwerken ähnliche Expressionsprofile. Insgesamt wird die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies gehemmt.

Darüber hinaus ist das Netzwerk mit assoziierten Proteinen zur biologischen Funktion „Antimikrobielle Antwort“ aus Discovery I dargestellt. Die relevantesten Proteine, die mit dieser Funktion in Verbindung stehen sind die herabregulierten Proteine LACRT und Phospholipase A2 (PL2G2A) sowie die hochregulierten Proteine ENO1 und S100A9.



Abbildung 18: Identifizierte Signalwege

Die betroffenen Signalwege aufgelistet nach Signifikanz mit Gegenüberstellung beider Versuchsreihen. Zur Darstellung wurde der negative dekadische Logarithmus der p-Werte angewandt. Es ergeben sich 2 Hauptcluster. Cluster Nr. 1 bildet der Glucosestoffwechsel mit Gluconeogenese und Glykolyse. Hier finden sich die signifikantesten Auswirkungen. Cluster Nr. 2 fasst die betroffenen Signalwege der Akute-Phase-Reaktion, des Aktin Zytoskeletts, der 14-3-3 Protein Familie und der NRF2-vermittelten Oxidativen Stressreaktion zusammen. Insgesamt weist die Discovery Versuchsreihe die signifikantesten Werte auf.

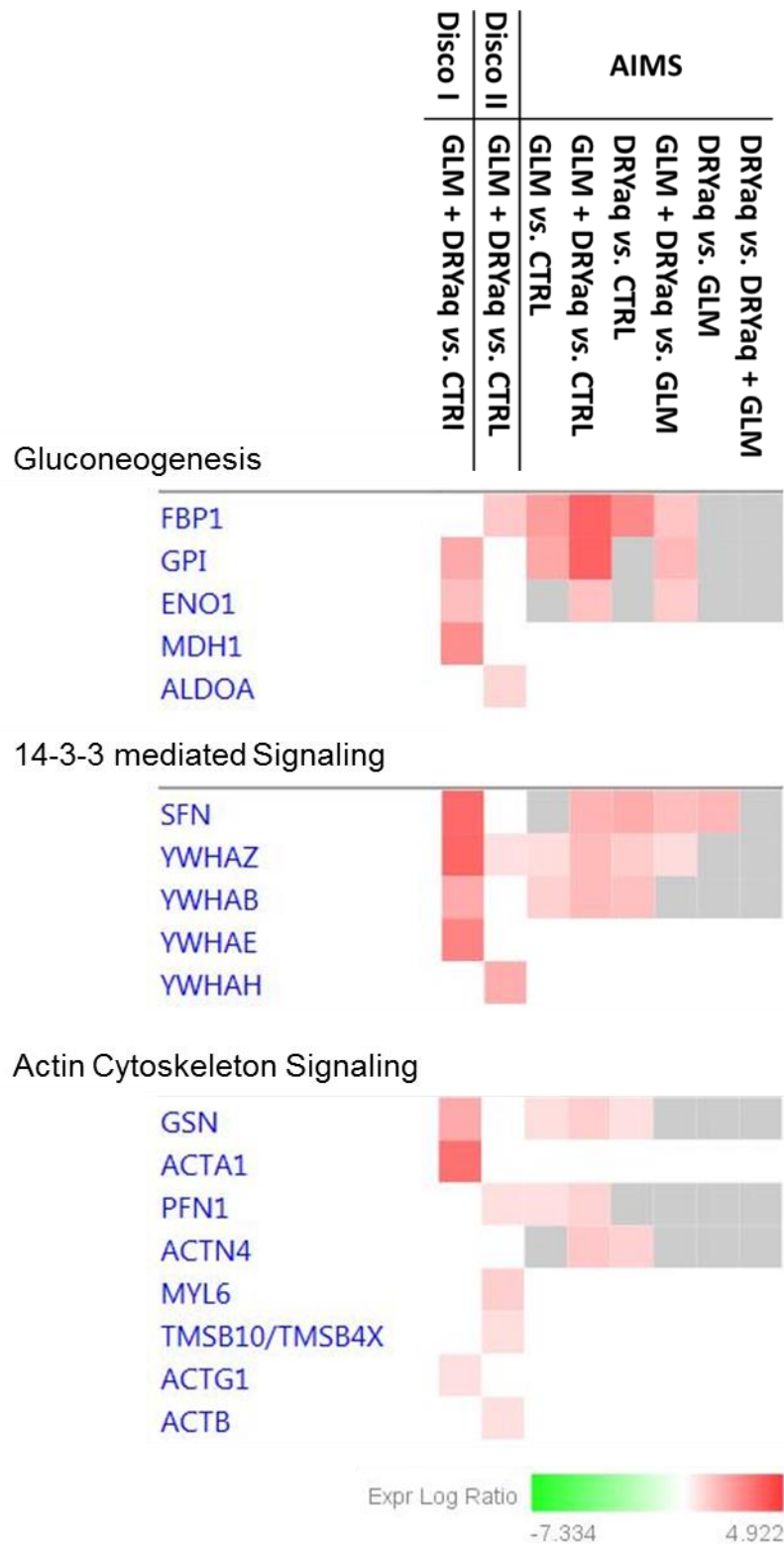


Abbildung 19: Darstellung der mit relevanten Signalwegen assoziierten Proteine

1) Gluconeogenese, 2) 14-3-3 vermittelte Signalwege, 3) Aktin-Zytoskelett Signalgebung

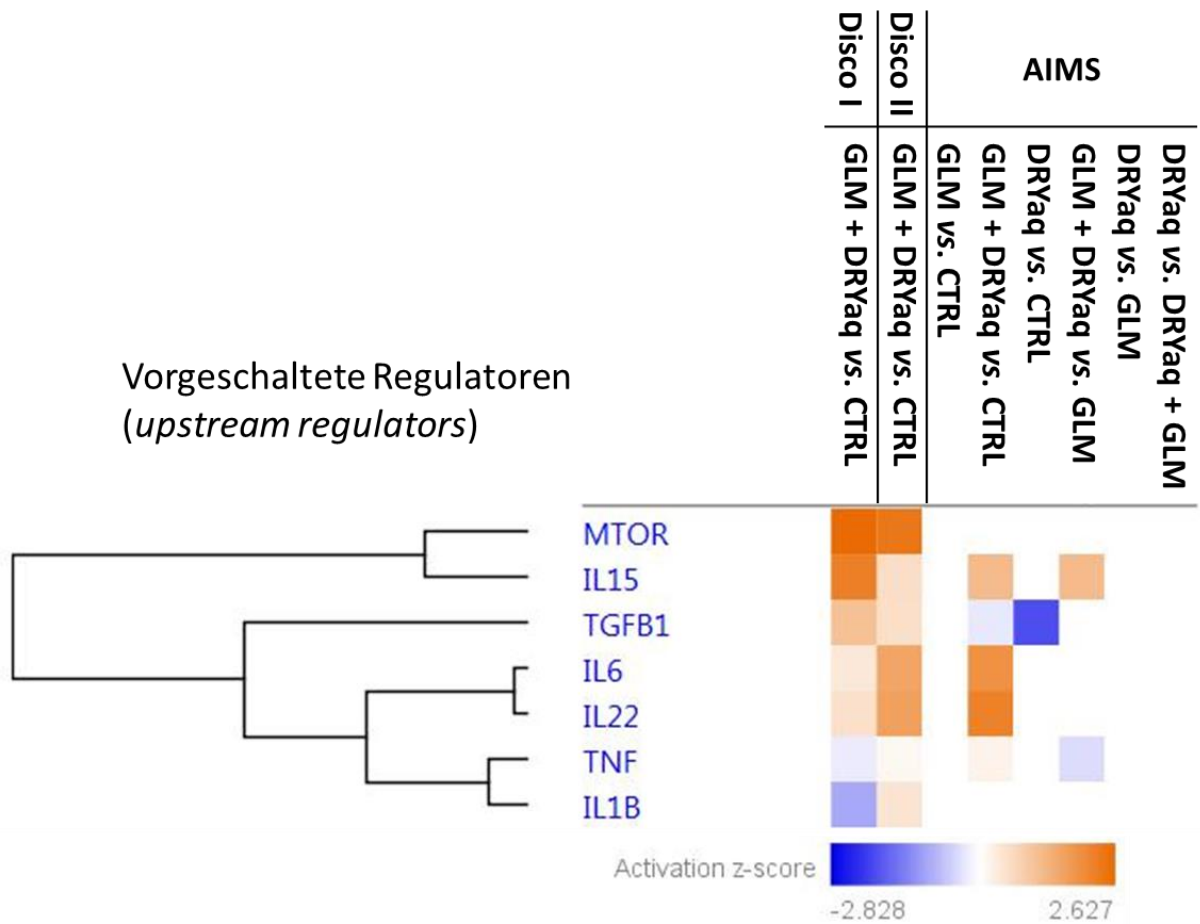
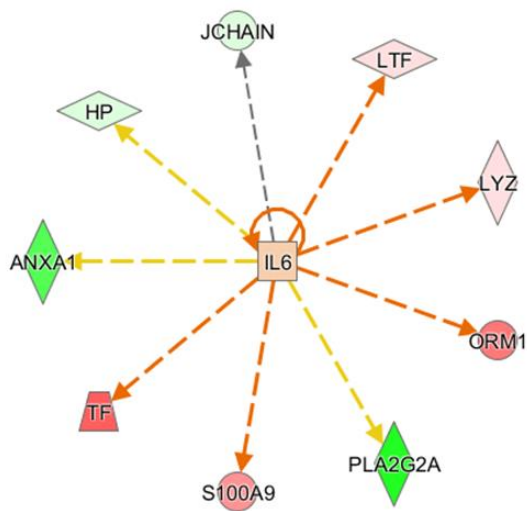


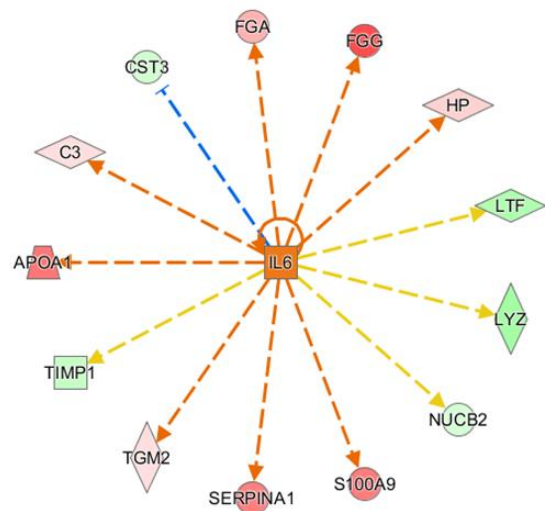
Abbildung 20: Heatmap „Upstream Regulators“

Die Farbe Blau steht für eine prognostizierte Inhibition, Orange für eine prognostizierte Aktivierung. Die Verlässlichkeit der Werte spiegelt sich in ihrer Farbintensität wider (je kräftiger die Farben, desto signifikanter die Werte und damit die prognostizierte Aktivität).

A) Disco I (IL6)



B) Disco II (IL6)



C) AIMS (IL6)

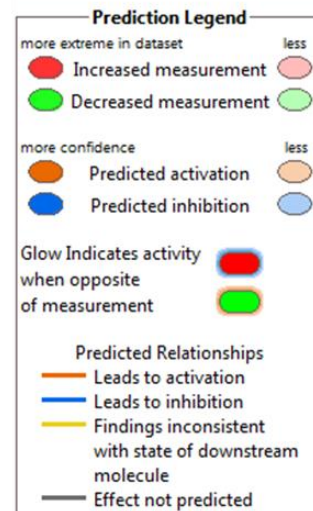
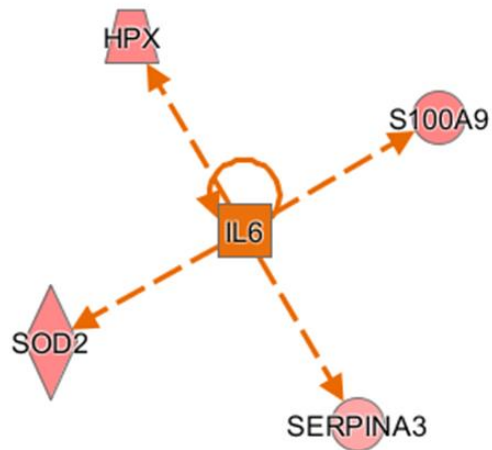
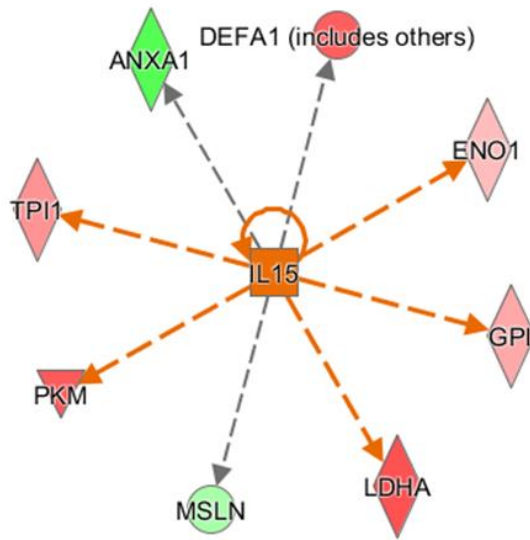


Abbildung 21: IL6 assoziierte Proteine

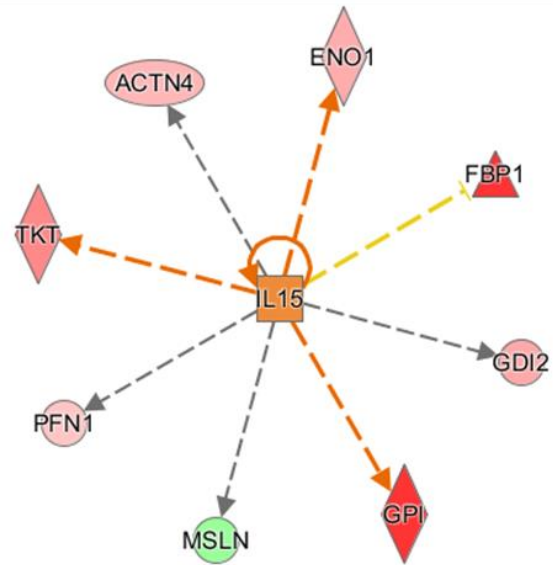
Mit dem Upstream Regulator IL6 assoziierte Proteine für GLM + DRYaq vs. CTRL

A) Discovery I, B) Discovery II, C) AIMS.

A) Discovery (IL15)



B) AIMS (IL15)



C) Discovery (IL22)

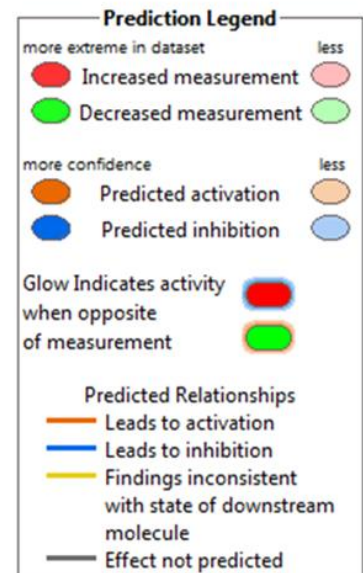
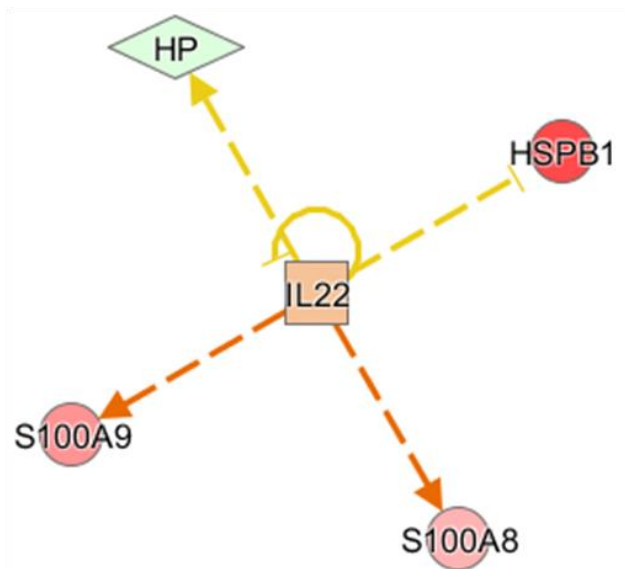


Abbildung 22: IL15 und IL22 assoziierte Proteine

Mit den Upstream Regulatoren IL 15 und IL22 assoziierten Proteine.
 A) IL15 Discovery, B) IL15 AIMS, C) IL22 Discovery

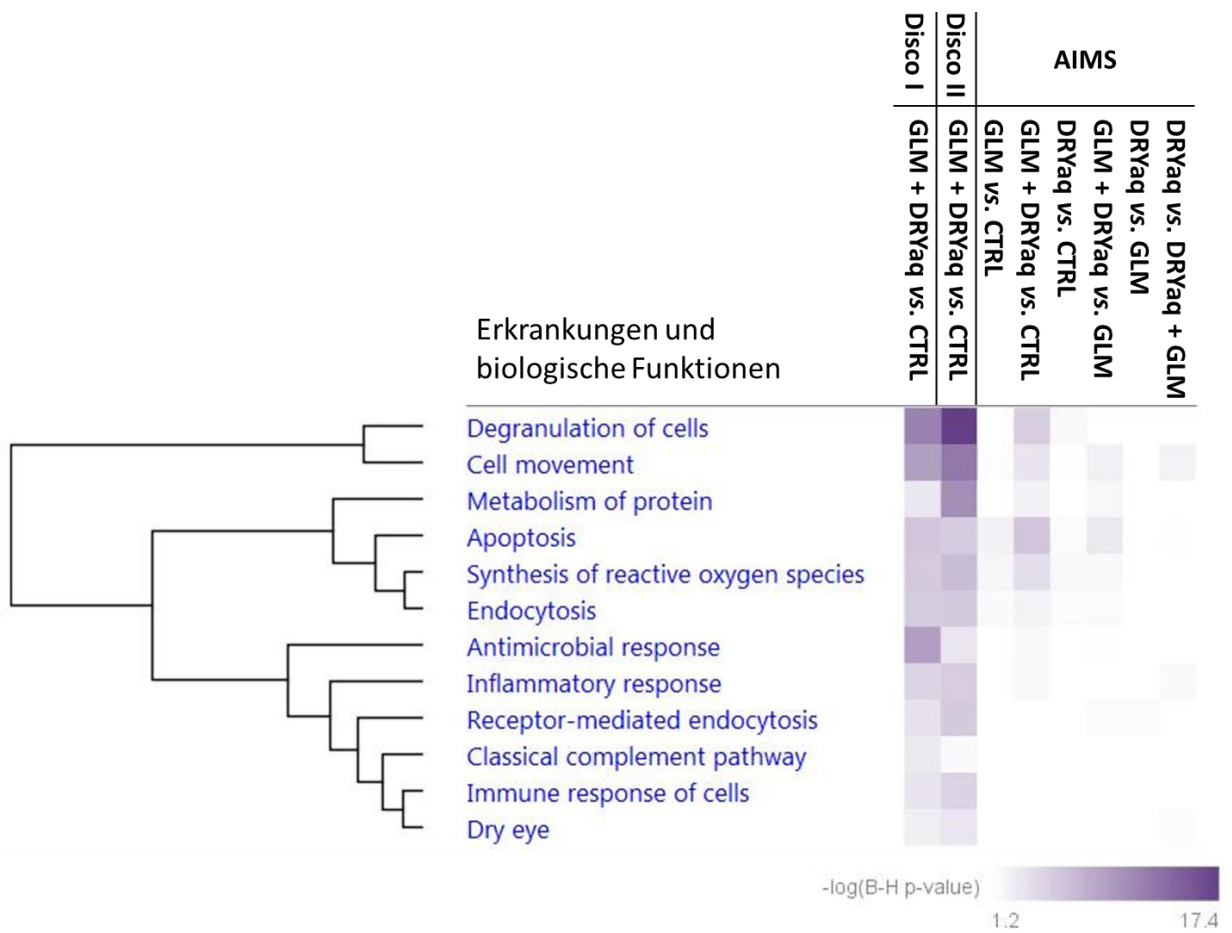
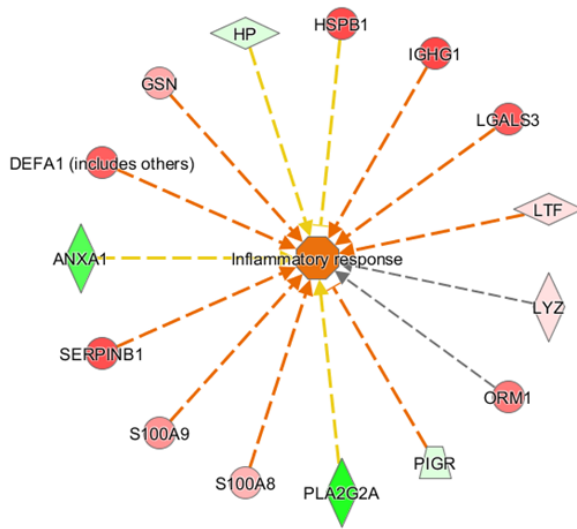
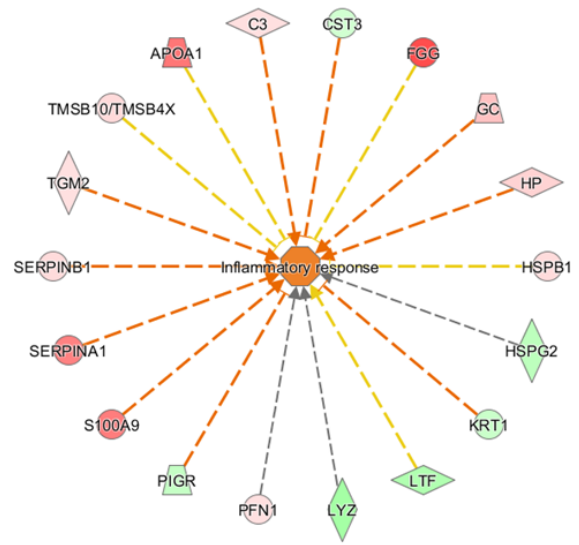


Abbildung 23: Heatmap Erkrankungen und biologischen Funktionen

A) Disco I



B) Disco II



C) AIMS

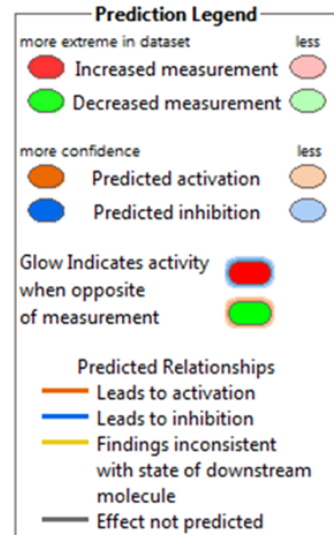
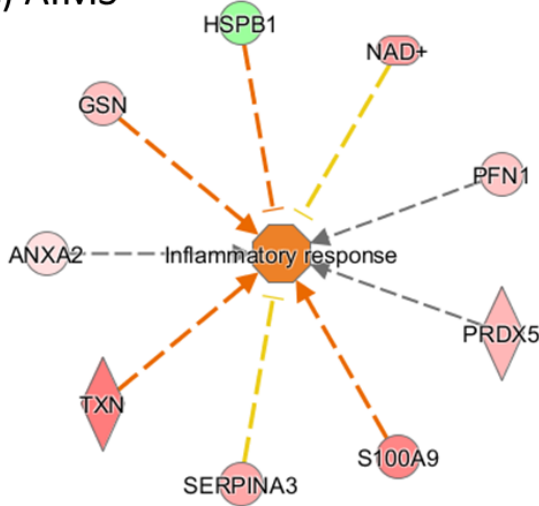
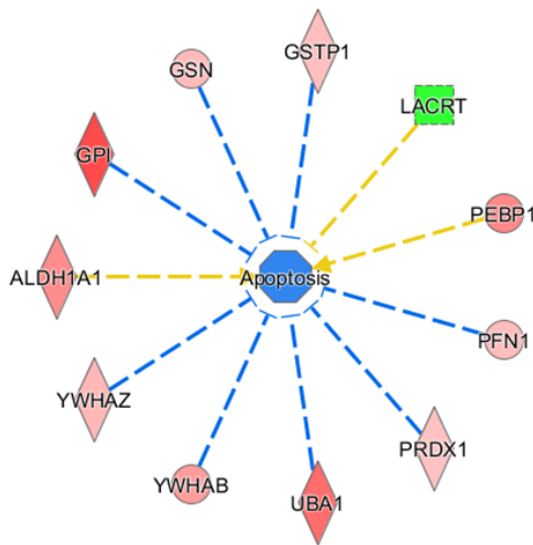


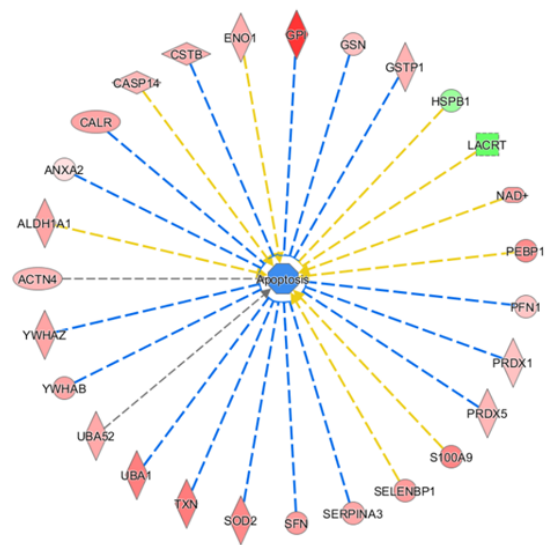
Abbildung 24: "Inflammatory Response" assoziierte Proteine bei GLM + DRYaq vs. CTRL.

Aus A) Discovery I, B) Discovery II, C) AIMS

A) GLM vs. CTRL



B) GLM + DRYaq vs. CTRL



C) DRYaq vs. CTRL

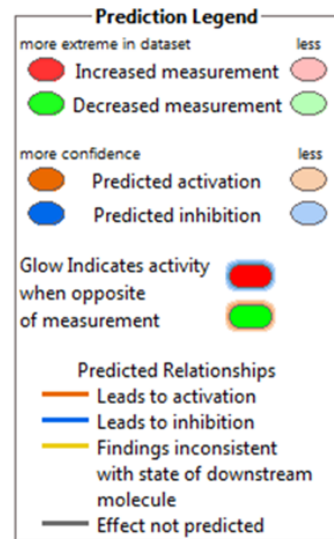
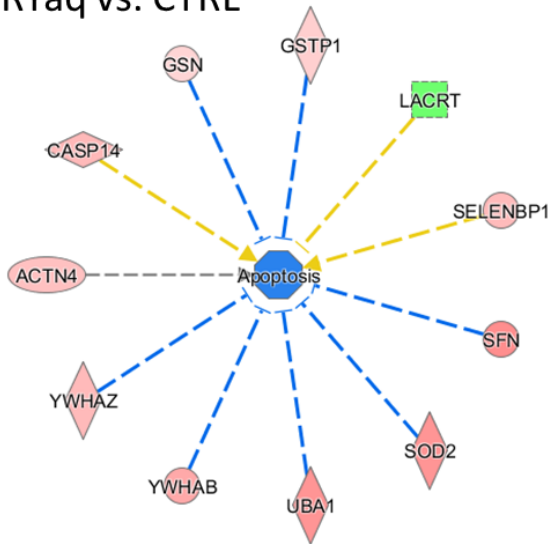
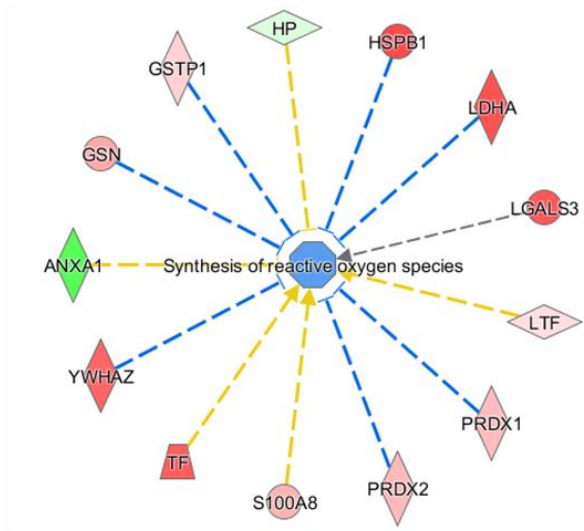


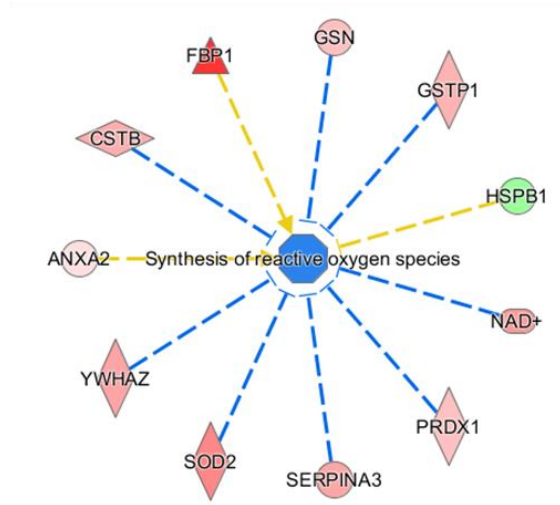
Abbildung 25: „Apoptosis“ assoziierte Proteine aus AIMS.

A) GLM vs. CTRL, B) GLM+DRYaq vs. CTRL, C) DRYaq vs. CTRL

A) Discovery I (Synthesis ROS)



B) AIMS: GLM + DRYaq vs. CTRL (Synthesis ROS)



C) Discovery I (Antimicrobial response)

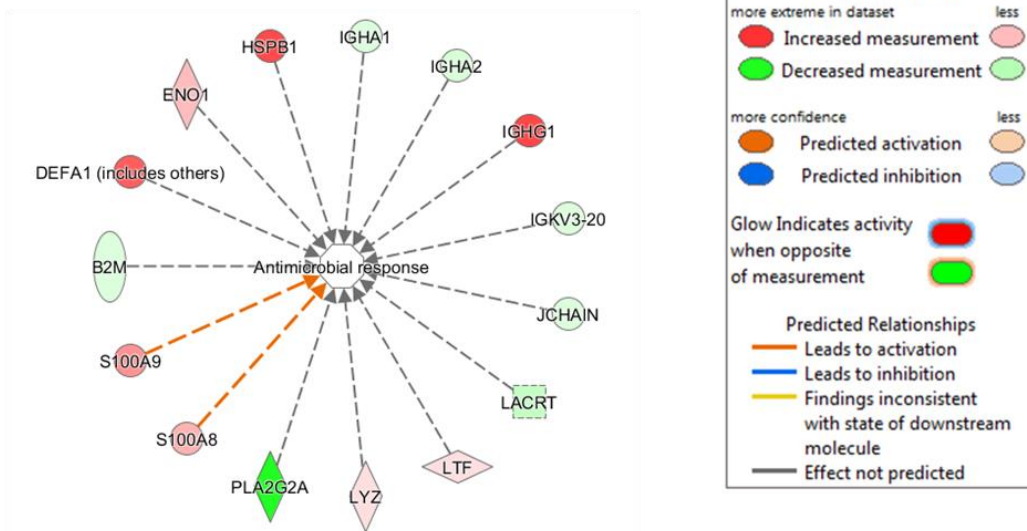


Abbildung 26: „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ und „Antimikrobielle Antwort“ assoziierte Proteine für GLM+DRYaq.

A) Discovery I Synthese ROS, B) AIMS Synthese ROS, C) Discovery I Antimikrobielle Antwort

5 Diskussion

Ein Großteil der Glaukomekranken sind auf die regelmäßige Anwendung augeninnendrucksenkender Medikamente angewiesen [28, 105]. In Deutschland leiden mehr als 50% der Glaukomepatienten an einem trockenen Auge [8]. Es besteht ein enger Zusammenhang zu topischen Glaukome Medikamenten und deren Inhaltsstoffen. Nicht nur die Anwendung selbst, sondern auch die Häufigkeit der Anwendung, die Zusammensetzung und die Anzahl der verschiedenen Präparate zeigen Auswirkungen auf die Entwicklung okulärer Symptome [23]. Es kann entweder zu einer akuten Exzerration einer vorbestehenden Störung kommen oder aber die pathologischen Konditionen werden erst durch iatrogene Einflüsse geschaffen [28]. Zahlreiche klinische Studien konnten negative Auswirkungen der lokal angewandten Augentropfen auf Strukturen der Augenoberfläche bestätigen [90, 106-108].

Noch immer enthalten rund 70% der Medikamente das Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid [22, 109]. Vor allem die Verwendung konservierungsmittelhaltiger Augentropfen steht in engem Zusammenhang zur Entstehung oder Verschlimmerung einer Beschwerdesymptomatik [9, 110]. Aber auch die aktiven Wirkstoffe können Auswirkungen auf Strukturen der Augenoberfläche haben [9, 111-113]. Viele Studien deuten darauf hin, dass sich auf der Augenoberfläche von Patienten unter chronischer topischer Antiglaukome Medikation entzündliche Veränderungen abspielen [70, 88, 90, 114, 115]. Da Patienten meist lebenslanglich auf die Verwendung entsprechender Augentropfen angewiesen sind, alternative Verfahren meist invasiver oder risikoreicher sind und darüber hinaus die Ergebnisse chirurgischer Eingriffe in Zusammenhang mit der vorherigen Anwendung bestimmter Augentropfen stehen können, wird deutlich, wie wichtig es ist, eine iatrogene Schädigung der Augenoberfläche vorzeitig zu erkennen oder zu unterbinden [70, 116, 117]. Das klinische Erscheinungsbild gleicht dem einer Keratokonjunktivitis sicca. Einige wenige vorausgegangene Studien konnten bereits Hinweise liefern, dass sich die Proteinprofile von Patienten mit Glaukome Medikamenten-assoziiertes Sicca Symptomatik und einem medikamentenunabhängigen trockenen Auge unterscheiden [70, 94]. Mit den Ergebnissen dieser Studie konnten wir diese Erkenntnisse nicht nur untermauern, wir konnten die bisher größte Anzahl unterschiedlich exprimierter Proteine zwischen beiden Gruppen identifizieren, welche gleichzeitig wichtige Hinweise auf zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen liefern könnten.

Vorausgegangene Studien haben bisher entweder Probenpools oder individuelle Proben untersucht [70, 78, 94]. In dieser Studie wurden sowohl gepoolte als auch individuelle Tränenproben untersucht. Die Analyse individueller Tränenproben diente dabei nicht nur der Validierung der Ergebnisse aus der Discovery Phase, sondern auch der Analyse interindividueller Veränderungen innerhalb einer pathologischen Gruppe. Vor allem hinsichtlich der Wirkung bestimmter Medikamente ist die Nachfrage nach personalisierter Medizin groß. Viele praktisch tätige Ärzte verlassen sich aktuell meist eher auf eigene Erfahrungswerte als klinische oder experimentelle Studien, wenn es darum geht das passende Medikament für ihren Patienten zu finden [118]. Die individuelle Untersuchung von Tränenflüssigkeiten bringt die Wissenschaft der medizinischen Praxis demnach wieder ein Stück näher. Um im klinischen Alltag bestehen zu können, braucht es Methoden, die schnell präzise Ergebnisse liefern. Mit AIMS haben wir im 2. Versuchsteil ein Untersuchungsverfahren gewählt, welches es uns erlaubte potenziell relevante Proteine in den Tränenproben schnell und präzise zu quantifizieren, nachdem wir uns mittels Discovery Strategie zuvor einen unvoreingenommenen Überblick über das Expressionsprofil von GLM+DRYaq Patienten geschaffen haben [72]. Es wurden nur Tränenproben in die Untersuchungen miteinbezogen, die den strengen Klassifizierungskriterien entsprachen.

In der Discovery Phase wurden die Probenpools unter Berücksichtigung überdurchschnittlich vieler Parameter für die proteomische Untersuchung eingeteilt. Es wurde unter anderem auf eine ausgeglichene Alters- und Geschlechtsverteilung zwischen den biologischen Replikaten und den untersuchten Gruppen geachtet, da Alter und Geschlecht Faktoren darstellen, die durchaus Veränderungen im Tränenproteom bedingen können [40]. Im Vergleich zu anderen proteomischen Studien setzte sich unsere Kontrollgruppe aus vollkommen gesunden Probanden mit vergleichsweise hohen Schirmertest-Werten zusammen, die bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch keine Augentropfen verwendet hatten und an keiner Augen- oder systemischen Erkrankung litten [70, 119]. Zum GLM + DRYaq Pool wurden ausschließlich Tränenproben von Patienten zugelassen, die ein oder mehrere augeninnendrucksenkende Präparate mit dem Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid anwendeten. Somit konnten wir mit dem GLM+DRYaq Pool ein repräsentatives Abbild der Tränen von Glaukom-Sicca Patienten schaffen. Auch im zweiten Versuchsteil wurden in die Glaukomgruppen nur Patienten miteinbezogen die benzalkoniumchloridhaltige augeninnendrucksenkende Augentropfen anwendeten.

Die Unterscheidung zwischen den Gruppen GLM und GLM + DRYaq, DRYaq und CTRL erfolgte ebenfalls wieder mithilfe der Schirmer Test Werte. Der Schirmer Test ist ein valides diagnostisches Verfahren zur Bestimmung des Tränenvolumens. Eine Verringerung des Tränenvolumens deutet auf ein hyposekretorisches trockenes Auge hin (ADDE/DRYaq) [43]. Die Ergebnisse einiger Studien liefern Hinweise dafür, dass die größten proteomischen und homeostatischen Veränderungen in Tränen von Patienten mit hyposekretorischer Komponente nachweisbar sind [36, 76, 120]. Die Tränenprobenentnahme mittels Schirmer Test wurde nach einem strengen Entnahmeprotokoll ohne die vorherige Applikation eines Lokalanästhetikums durchgeführt. Wir entschieden uns für Proben, die am unbetäubten Auge entnommen wurden, um keine zusätzliche Verfälschung durch den Einfluss lokaler Anästhetika auf die Augenoberfläche und das Tränenproteom zu erhalten. Die Reflextränenkomponente wurde bei der späteren Interpretation mitberücksichtigt, denn Perumal et al. konnten in einer Studie zu Reflextränen im Jahr 2015 nachweisen, dass sich das unstimulierte basale Tränensekret und Reflextränen durchaus in ihren Proteinexpressionsprofilen unterscheiden [96]. Auf die Berücksichtigung ermittelter OSDI Werte verzichteten wir in der Klassifizierung, da in der Literatur beim trockenen Auge häufig von einer Diskrepanz zwischen Befund und Befinden gesprochen wird und wir uns in dieser Studie ausschließlich auf objektivierbare Parameter stützen möchten [43]. Alle berücksichtigten Parameter wurden transparent im entsprechenden Methodenteil aufgelistet. Durch zahlreiche Optimierungsschritte konnten wir in der Discovery Phase II eine Methode etablieren, die es uns ermöglichte, mit einer vergleichbaren Anzahl an Proben die bisher größte Anzahl unterschiedlich abundanter Proteine zwischen GLM+DRYaq und einer Kontrollgruppe nachzuweisen. Sowohl AIMS als auch die In-Solution Discovery Methode eignen sich daher ausgezeichnet in komplexen Tränenproben zuverlässig eine große Anzahl unterschiedlich abundanter Tränenproteine zu identifizieren und zu quantifizieren.

5.1 Discovery Proteomik Strategie zur Analyse humaner Tränenflüssigkeit

Im ersten Versuchsteil gelang es uns insgesamt 470 Proteine zu identifizieren. Der In-solution Discovery Ansatz war der Gel-basierten Discovery Methode hinsichtlich der Identifikationsraten überlegen. In Discovery II unterschieden 73 Proteine in ihrem Expressionsprofil zwischen den beiden Gruppen GLM+DRYaq und CTRL und in Discovery I 56. Diese Proteine und insbesondere ihre Beteiligung an biologischen Prozessen können wichtige Hinweise auf pathophysiologische Mechanismen liefern und sollen im Folgenden diskutiert werden.

Von den 73 (Discovery II) / 56 (Discovery I) unterschiedlich abundanten Proteinen kamen 30/ 19 in GLM+DRYaq herunter reguliert vor und 43/ 37 herauf reguliert. Insbesondere zytoplasmatische Proteine kamen bei GLM+DRYaq vermehrt abundant vor. Extrazelluläre Proteine kommen bei GLM+DRYaq tendenziell eher erniedrigt vor. Beide Trends konnten auch im AIMS Versuchsteil beobachtet werden. Die vermindert abundant vorkommenden extrazellulären Proteine sind hauptsächlich Proteine mit Assoziation zur Tränendrüse oder Epithelien der Augenoberfläche (u.a. LACRT, PRR4, PROL1, CST1, CST4, MSLN und IGHA1). Erniedrigte Expressionsprofile dieser Proteine wurden in vorherigen Studien zum Tränenproteom vielfach in Zusammenhang mit einem trockenen Auge oder einem medikamentös behandelten Glaukom detektiert [6, 70, 94, 120-122]. Das Vorkommen erniedrigter Expressionsprofile dieser Proteine scheint ein wichtiger Faktor bei der Entstehung einer Sicca-Symptomatik zu sein. Sie erfüllen vermutlich wichtige Funktionen bei der Homöostase des Tränenfilms und regenerativen Prozessen der Augenoberfläche, die durch die Verwendung IOD-senkender Augentropfen gestört werden [84, 120]. Auch in AIMS konnten einige dieser Proteine in der DRYaq Gruppe in verminderter Abundanz nachgewiesen werden, was diese Hypothese zusätzlich unterstützt. Aber auch die Erhöhung der Expressionsprofile einer nicht unerheblichen Anzahl zytoplasmatischer Proteine könnte den schädigenden Effekt der Glaukommedikamente auf Strukturen der Augenoberfläche widerspiegeln. Wichtige zytoplasmatische Proteine könnten hierbei die Proteine der 14-3-3 Proteinfamilie YWHAZ, YWHAB und YWHAE sein. Erhöhte Expressionsprofile von YWHAZ konnten im zweiten Versuchsteil sowohl für GLM+DRYaq als auch für DRYaq und GLM ermittelt werden. Die erhöhte Abundanz der Proteine S100A8 und S100A9 spiegeln die entzündliche Komponente wider.

Interessanterweise sind unter den vermehrt abundanten Proteinen einige stoffwechselaktive Enzyme zu finden (ENO1, MDH1, GPI). In der Discovery Phase konnte eine besonders signifikante Assoziation der unterschiedlich abundanten Proteine mit Glukosestoffwechselprozessen (Glykolyse und Gluconeogenese) aufgedeckt werden, die im zweiten Versuchsteil via AIMS validiert wurden. Sowohl Glykolyse als auch Gluconeogenese zeigen für GLM+DRYaq die höchsten Scores. Somit liegt die Vermutung nahe, dass vor allem bei der Glaukom-assoziierten Sicca Symptomatik Glukosestoffwechselprozesse verstärkt ablaufen bzw. aktiviert werden. Im AIMS Vergleich wird dies nochmal deutlicher. Es ist zu erkennen, dass bei GLM vs. CTRL und DRYaq vs. CTRL ebenfalls signifikante Scores erreicht werden, die Scores von GLM+DRYaq vs. CTRL liegen jedoch deutlich höher. Als zentrale metabolische Prozesse dienen die Glykolyse und die Gluconeogenese zum einen dem Abbau und zum anderen dem Aufbau von Glucose und damit der Energieversorgung oder -speicherung einer Zelle und stellen essenzielle Pfeiler für das Zellwachstum dar [123]. Bei GLM+DRYaq sind u.a. der Medikation geschuldet eine Vielzahl an Proteinen hochreguliert. Diese Proteine führen vielfältige energieverbrauchende Funktionen aus. Die Zellen benötigen zur Abwehr oder Gegenregulation also besonders viel Energie, was sich in der vermehrten Abundanz metabolischer Enzyme widerspiegeln könnte.

Neben einer Aktivierung von Glukosestoffwechselprozessen bei GLM+DRYaq ergab die Signalweganalyse auch eine Aktivierung der Signalwege der Akute Phase Reaktion („acute phase response signaling“). Dies konnte durch AIMS ebenfalls validiert werden. Auch DRYaq zeigt demnach anhand des Expressionsprofils eine Aktivierung, die aber weniger signifikant als bei GLM+DRYaq ausfällt. Akute Phase Reaktion Signalwege werden demnach bei GLM+DRYaq Patienten im Vergleich zu DRYaq Patienten stärker aktiviert. Die Akute Phase Reaktion (APR) besteht aus einer Serie physiologischer Reaktionen, die unmittelbar nach einer Verletzung, Schädigung oder Infektion der Gewebe initiiert werden, um eine weitere Schädigung der Gewebe zu unterbinden. Die Akute Phase Reaktion ist Teil eines homöostatischen Prozesses mit dem Ziel den Organismus in die Normalfunktion zurückzuführen. Initiiert und aufrechterhalten wird die APR meist durch die Freisetzung von Zytokinen (bspw. TNF, Interleukin-1, Interleukin-6,...), die sowohl lokal als auch systemisch bestimmte Reaktionen auslösen können. Beispielsweise wird durch die Wirkung auf Fibroblasten und Endothelzellen eine weitere Freisetzung bestimmter Zytokine veranlasst, die eine chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen wie Neutrophile und Monozyten

haben und somit eine Einwanderung verschiedener Zelltypen hin zum geschädigten Gewebe bedingen [124]. Darüber hinaus wurde passend zu unseren Ergebnissen im Zuge der systemischen Reaktion der APR auch eine Erhöhung metabolischer Prozesse wie beispielsweise der Gluconeogenese beobachtet [125]. Die Aktivierung der Akute Phase Reaktion steht höchstwahrscheinlich in Zusammenhang mit den durch die Antiglaukommedikamente verursachten Gewebeschädigungen.

Malvitte et al. bestimmten in einer Studie die Zytokinkonzentration in Tränen von Patienten unter chronischer Antiglaukommedikation und stellten fest, dass proinflammatorische Zytokine wie IL1beta, IL6, IL12 und TNFalpha signifikant erhöhte Level in Tränen von Glaukompatienten unter topischer Medikation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aufwiesen. Sie schlussfolgerten daraus, dass Konjunktivalzellen auf die Anwendung topischer Antiglaukommedikamente mit einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reagieren [88]. Im Rahmen unserer Analyse der vorangeschalteten Regulatoren konnten wir ebenfalls eine Aktivierung bestimmter Interleukine (IL6, IL15, IL22) detektieren. Eine Aktivierung von IL6 konnte sowohl in der Discovery als auch in der AIMS Phase für GLM+DRYaq nachgewiesen werden. Die Werte für AIMS sind dabei signifikanter. Manni et al. konnten in Tränenproben von Patienten, die konservierungsmittelhaltige Augentropfen mit dem Wirkstoff Timolol 0,5% anwendeten im Vergleich zur konservierungsmittelfreien Variante signifikant erhöhte IL-1 beta Konzentrationen feststellen. Ihr Fazit war, dass konservierungsmittelhaltige Präparate entzündliche Veränderungen auf der Augenoberfläche herbeiführen [90]. Interessanterweise konnten wir in AIMS für „Acute Phase Response Signaling“ nur in der GLM+DRYaq und in der DRYaq eine signifikante Aktivierung feststellen. Die Akute Phase Reaktion zeigt damit eine klare Assoziation zur Sicca Symptomatik. Bei Glaukompatienten, die noch keine tränendefizitäre Sicca Symptomatik entwickelt haben, sind die Schäden auf der Augenoberfläche durch die medikamentöse Komponente und pathophysiologische Mechanismen noch nicht so ausgeprägt, demnach scheint der Organismus keine Notwendigkeit in der Initiation einer solch entzündlichen Signalkaskade zu sehen.

Auch „Actin Cytoskeleton Signaling“ erreicht hohe Scores für GLM+DRYaq in der Discovery Phase. Dies konnte via AIMS validiert werden. Aktin-Zytoskelett Signalwege scheinen aber auch beim Glaukom sowie beim trockenen Auge eine Rolle zu spielen, was sich an signifikanten Scores für alle 3 Gruppen in AIMS zeigt. GLM erreicht im zweiten Versuchsteil den höchsten Score. Das Aktin-Zytoskelett erfüllt zahlreiche

Funktionen. Zum einen vermittelt es Änderungen der Motilität und Form einer Zelle während des Zellzyklus oder als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli, zum anderen organisiert es das Zytoplasma und generiert mechanische Kräfte innerhalb einer Zelle [126]. Auch bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, spielt das Aktin-Zytoskelett eine wichtige Rolle. Während apoptotischer Vorgänge kommt es im ersten Schritt zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts [127]. Dabei scheint das Protein Gelsolin eine wichtige Rolle zu spielen. Gelsolin (GSN) konnte als „Actin Cytoskeleton Signaling“ assoziiertes Protein identifiziert werden und erreichte für GLM+DRYaq besonders signifikante Werte, die durch AIMS validiert werden konnten. Es gilt als Aktin-Regulator Protein [127]. Eine Studie von Wittmann et al. aus 2018 untersuchte den Einfluss von Gelsolin auf die Zellproliferation und Wundheilung der Augenoberfläche. Die Studie lieferte vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf das Potenzial von GSN. Es konnten positive Effekte auf die korneale Wundheilung nachgewiesen werden. Zudem konnten erhöhte GSN Konzentrationen in Tränen von Sicca Patienten (insb. ADDE/DRYaq) nachgewiesen werden, was die Ergebnisse unserer Studie bestätigt. Gelsolin scheint also unterstützende Funktionen bei der Regeneration und Apoptose von Epithelzellen zu erfüllen.

In diesem Zusammenhang spielt auch der Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta) eine wichtige Rolle [128]. Die Analyse vorangeschalteter Regulatoren prognostiziert für TGFB1 in den Discovery Studien eine Aktivierung, die Ergebnisse aus AIMS sind dagegen widersprüchlich. In AIMS wird für GLM+DRYaq und DRYaq eine Inhibition vorausgesagt. Dies kann unter anderem der Untersuchung individueller Proben in AIMS geschuldet sein. TGF-beta nimmt eine Schlüsselrolle bei der Wundheilung ein. TGF-beta fördert die Umwandlung von Epithel in Mesenchym und reguliert die Reifung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Darüber hinaus führt TGF-beta zu einer verstärkten Expression des GSN Gens, womit sich der Kreis zu schließen scheint [128]. Die Aktivierung des Upstream Regulators TGFB1 in der Discovery Phase würde also zu einer vermehrten Abundanz des Proteins GSN in Tränen bei GLM+DRYaq Patienten passen. Erhöhte Expressionsprofile für GSN konnten auch in AIMS validiert werden. Die erhöhte Expression des Reparaturproteins Gelsolin scheint hier Selbstheilungsmechanismen der Augenoberflächenepithelien widerzuspiegeln, die unter anderem durch die epithelschädigenden Komponenten der lokalen Medikation entstanden sein könnten. Die Augenoberfläche setzt vermehrt Heilungsprozesse in Gang und initiiert das Absterben geschädigter Zellen.

Ein weiterer relevanter Signalweg ist die 14-3-3 vermittelte Signalgebung. Die signifikanten Werte für GLM+DRYaq konnten im AIMS Versuchsteil validiert werden. Auch bei DRyAq und GLM spielen 14-3-3 vermittelte Signalwege eine Rolle. Die mit den 14-3-3-vermittelten Signalwegen assoziierten Proteine 14-3-3 Protein sigma (SFN), 14-3-3 Protein zeta/delta (YWHAZ), 14-3-3 Protein beta/alpha (YWHAB) und 14-3-3 Protein epsilon (YWHAЕ) zeigten in der Discovery Phase I allesamt erhöhte Expressionsprofile für GLM+DRYaq. Die Ergebnisse für SFN, YWHAZ und YWHAB konnten via AIMS validiert werden. Die Proteine der 14-3-3 Protein Familie wirken vor allem als Regulatoren intrazellulärer Signalwege und spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion, dem Zellzyklus und bei Apoptosevorgängen [129]. Darüber hinaus konnten alle 14-3-3 Protein Isoformen im Epithel von Kornea und Konjunktiva nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass ihnen wichtige Aufgaben bei der Homöostase und Reparatur von Strukturen der Augenoberfläche zukommen könnten [130]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Nättinen et al. wurden erhöhte Level von 14-3-3 Protein epsilon und 14-3-3 Protein zeta/delta mit der Verwendung konservierungsmittelhaltiger Antiglaukomatosa und Entzündungsvorgängen auf der Augenoberfläche in Verbindung gebracht [121]. Wong et al. konnten in einer proteomischen Studie aus dem Jahr 2011 ebenfalls erhöhte Werte für 14-3-3 Protein zeta/delta bei Patienten unter Glaukommedikation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vermerken [70].

Ein weiterer Signalweg zum Schutz beschädigter Gewebe ist die NRF2-vermittelte Oxidative Stressantwort. Sowohl in der Discovery als auch in der AIMS Phase konnten die signifikantesten Werte für GLM+DRYaq erreicht werden. Oxidativer Stress (OS) spielt eine Rolle bei einer Vielzahl an Augenerkrankungen (z.B. POAG, Entzündungen) und Verletzungen. OS entsteht bei einem Ungleichgewicht zwischen der Anzahl anfallender reaktiver Sauerstoffspezies ROS und der Kapazität anti-oxidativer Systeme diese zu inaktivieren. Fallen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies an, führt dies zu Zell- und Gewebeschädigung und zu Veränderungen auf Protein- und DNA-Ebene. Insbesondere der vordere Augenabschnitt ist äußeren Faktoren wie Umweltgiften, Luftverschmutzung, Chemikalien und Strahlung direkt ausgesetzt [131]. Auch IOD senkende topische Medikamente werden direkt auf die Kornea appliziert. In der Literatur wird häufig von einer Assoziation von NRF2 mit entzündlichen Erkrankungen berichtet. NRF2 organisiert die Rekrutierung von Entzündungszellen und reguliert die Genexpression mit Hilfe von Antioxidative Response Elements

(AREs). Damit reguliert NRF2 die anti-inflammatorische Genexpression und verhindert das weitere Fortschreiten des Entzündungsgeschehens [132]. Eine Aktivierung NRF2 vermittelter Signalwege zur oxidativen Stressantwort macht deutlich, dass die Augenoberfläche von Glaukom-Sicca Patienten überdurchschnittlich viel oxidativem Stress ausgesetzt ist. Dieser könnte zunehmend durch die Anwendung lokaler Medikamente oder dem Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid entstehen. Wie bereits beschrieben, gilt Benzalkoniumchlorid als gewebetoxisch [9].

Einige relevante Upstream Regulatoren wurden bereits im Rahmen der Signalweganalyse besprochen. In der Discovery Phase konnte mit Hilfe der Upstream Regulator Analyse eine Aktivierung der Interleukine 15, 6 und 22 sowie eine Aktivierung von TGFB1 und mTOR prognostiziert werden. Für TNF und IL-18 wurden sowohl eine Aktivierung (Discovery II) als auch eine Inhibition (Discovery I) vorausgesagt. Die Aktivierung der Interleukine 15, 6 und 22 konnte via AIMS validiert werden. Die AIMS Methode erwies sich als besonders geeignet für die Identifikation der Interleukine 6 und 22, da hier wesentlich signifikantere Level in der GLM+DRYaq Gruppe nachgewiesen werden konnten. Eine Aktivierung der Interleukine 15, 6 und 22 ist allein in den GLM+DRYaq Gruppen zu vermerken.

Interleukin 15 ist Teil der Typ 1 Zytokin Familie und spielt eine wichtige Rolle bei der Homöostase und Expansion von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Bei Stress und im entzündlichen Milieu konnte IL-15 häufig vermehrt abundant auf Zelloberflächen nachgewiesen werden. Eine Überexpression von IL-15 wird außerdem mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [133, 134]. Jabri et. al. stellten die Hypothese auf, dass IL-15 dem Immunsystem als eine Art „Gefahrenmolekül“ Angriffe signalisiert, was in einer weiteren Gewebeerstörung resultiert. IL-15 trägt unter normalen Bedingungen also zum Schutz der Gewebe bei. Kommt es allerdings zu einer chronischen Dysregulation der IL-15 Expression, folgen komplexe T-Zell vermittelte Störungen die mit weiteren Gewebeschädigungen einhergehen können [135]. Dies könnte auch bei GLM+DRYaq einen wichtigen Faktor bei der Zerstörung von Strukturen der Augenoberfläche darstellen. Als vermeintlich protektive Maßnahme wird IL-15 von den Zellen zur Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität als Reaktion auf die chronische Anwendung lokaler Antiglaukomatosa und deren Effekte auf die Zellen freigesetzt. Diese Freisetzung führt

dann aber zu weiteren Schäden an augenoberflächeneigenen Strukturen und könnte eine eigene Art von Teufelskreis darstellen.

Die metabolischen Enzyme ENO1, GPI und TKT zeigen in dieser Studie eine Assoziation mit IL-15. Als vorangeschalteter Regulator scheint IL-15 deren Aktivität zu fördern. Wie bereits beschrieben benötigen Abwehr und Entzündungsmechanismen besonders viel Energie, was durch die vermehrte Aktivierung metabolischer Enzyme abermals unterstrichen wird. Ähnlich wie IL-15 wirkt auch mTOR in dieser Studie als vorangeschalteter Regulator vieler metabolischer Proteine wie ENO1, MDH1, HSPB1, PKM und LDHA bei GLM+DRYaq. Der mTOR Signalweg nimmt eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von Zellwachstum und Proliferation ein [136]. mTOR vermittelt eine Aktivierung metabolischer Enzyme und könnte damit zur zusätzlichen Verstärkung der Stoffwechselaktivität der kämpfenden Zellen beitragen.

Neben Interleukin 15 ist auch Interleukin 22 für seine Rolle bei Autoimmunerkrankungen bekannt [137]. IL-22 fördert die Immunantwort der Gewebe gegen Infektionen [138]. In dieser Studie zeigt sich eine regulative Funktion auf die Proteine der S100 Familie. IL-22 führt zu einer Aktivierung der Proteine S100A8 und S100A9. Erhöhte Expressionsprofile beider inflammatorischer Proteine konnten unter anderem durch Wong et al. sowohl in der Tränenflüssigkeit von Patienten mit Sicca Symptomatik als auch bei Glaukmapatienten unter topischer Medikation nachgewiesen werden und gelten als inflammatorische Marker [70]. Auch Interleukin 6 ist an entzündlichen Prozessen beteiligt, seine Rolle im Rahmen der Akute Phase Reaktion wurde bereits diskutiert. IL-6 kann von den Epithelzellen der Augenoberfläche produziert werden [139]. In der Literatur wird von erhöhten IL-6 Leveln im Tränenfilm bei bestimmten Erkrankungen der Augenoberfläche berichtet (bspw. Sicca-Patienten in Zusammenhang mit dem Sjögren Syndrom und Konjunktivochalasis) [140, 141]. Auch durch das Tragen von Kontaktlinsen, was einen mechanischen Stimulus darstellt, konnte eine Erhöhung der IL-6 Level im Tränenfilm provoziert werden [142]. Das Auftreten verschiedener Interleukine als vorangeschaltete Regulatoren bei GLM+DRYaq untermauert die inflammatorische Komponente dieser Erkrankung und verdeutlicht auf welche Weise die Entzündungsprozesse mit dem verstärkten Ablauf metabolischer Prozesse verknüpft sind.

Dass entzündliche Prozesse bei GLM+DRYaq eine zentrale Rolle spielen, zeigt sich auch bei der Analyse assoziierter biologischer Funktionen und Erkrankungen. Unter anderem ergaben sich in der Discovery Phase besonders signifikante Werte für die Funktion „Degranulation of cells“. Diese konnten via AIMS bestätigt werden. Die Degranulation ist eine Form der Exozytose. Sie kommt vor allem unter entzündlichen Bedingungen vor, wenn beispielsweise Mastzellen ihre Histamin-reichen Granula abgeben. Auch andere Entzündungszellen wie Eosinophile, Basophile oder Neutrophile Granulozyten, Zytotoxische T-Zellen und Natürliche Killerzellen beinhalten Granula, die durch Exozytose abgegeben werden können [143]. Eine verstärkte Degranulation konjunktivaler Mastzellen kommt beispielsweise bei der allergischen Konjunktivitis vor. Eine Aktivierung konjunktivaler Mastzellen kann durch direkte Interaktion mit Medikamenten ausgelöst werden [144]. Neutrophile Granulozyten setzen unter anderem reaktive Sauerstoffspezies und Zytokine frei, um extrazelluläre Bakterien zu bekämpfen und weitere Entzündungszellen anzulocken [145].

Passend dazu konnten wir weiterhin einen Zusammenhang mit den entzündungsassoziierten Funktionen „Antimicrobial Response“, „Inflammatory Response“, „Synthesis of reactive oxygen species“ und „Cell Movement“ nachweisen. Unter anderem konnten die Proteine LACRT, S100A9 und ENO1 in Zusammenhang mit der antimikrobiellen Antwort identifiziert werden. Erniedrigte Expressionsprofile des Tränenproteins Lacritin findet man insbesondere in Zusammenhang mit einer Keratokonjunktivitis sicca. Es wird vermutet, dass Lacritin das Überleben gestresster Korneaepithelzellen fördert, eine Rolle bei Sekretionsvorgängen und der Erneuerung von Tränendrüsen- und Augenoberflächenepithelien spielt und somit einen wichtigen Beitrag zur Gesunderhaltung der Augenoberfläche leistet [120, 146, 147]. Dem prosekretorischen Mitogen werden in der Literatur antimikrobielle Eigenschaften zugesprochen [148]. Eine verminderte Abundanz resultiert demnach im Verlust einer wichtigen Schutzfunktion und macht die Augenoberfläche angreifbarer und weniger regenerationsfähig. Entzündliche Prozesse können ungebremster ablaufen, die übrigen Zellen müssen ihre metabolischen Ressourcen aktivieren, was sich zusätzlich nochmal durch die Assoziation zur Funktion „Metabolism of protein“ zeigt. S100A9 steht sowohl mit antimikrobiellen als auch mit Entzündungsreaktionen in Verbindung. Ein weiteres mit „Inflammatory Response“ assoziiertes Protein ist Gelsolin das schon im Rahmen des Aktin Zytoskelett Signaling besprochen wurde. Eine Überexpression

von GSN im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen ist aufgrund der regenerativen Eigenschaften nachvollziehbar.

Eine weitere wichtige identifizierte und validierte Funktion ist die „Apoptose“. Interessanterweise deuten die Daten auf eine Inhibition der Apoptose Funktion hin. Auch im AIMS Versuchsteil konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Darüber hinaus zeigt sich die Tendenz zur Inhibition der Apoptose auch bei GLM und DRYaq, die Werte für GLM+DRYaq sind jedoch am signifikantesten. Eine Dysregulation apoptotischer Vorgänge steht in Zusammenhang mit einer Vielzahl weiterer Erkrankungen [149]. Mit der Funktion Apoptose sind sowohl in der Discovery als auch in der AIMS Phase die größte Anzahl an Proteinen assoziiert. Darunter die stoffwechselaktiven Proteine GPI und ENO1, die Proteine des 14-3-3 Familie YWHAZ, YWHAB und SFN, das proinflammatorische Protein S100A9, LACRT, GSN, UBA52, PEBP1 sowie die Enzyme ALDH1A1 und ALDH3A1. Bis auf Lacritin handelt es sich hierbei um vermehrt abundante Proteine. Eine Überexpression dieser Proteine steht also mit einer Inhibition der Apoptose in Zusammenhang. Einige dieser Proteine zeigen auch bei der Sicca Symptomatik erhöhte Expressionsprofile, darunter beispielsweise PEBP1 und ALDH3A1. Andere konnten zudem auch bei medikamentös behandelten Glaukompatienten nachgewiesen werden [70, 120, 121]. Beispielsweise konnte ALDH3A1 unter anderem durch Perumal et al. vermehrt abundant in Tränen von Sicca Patienten nachgewiesen werden [120]. ALDH3A1 trägt zusammen mit ALDH1A1 zum Schutz okulärer Strukturen vor oxidativen Schäden bei [150]. Außerdem wird die Rolle von ALDH3A1 als Regulator des Zellzyklus in der Literatur diskutiert. Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnte eine reduzierte Apoptoseaktivität in Zusammenhang mit ALDH3A1 festgestellt werden [151]. Auch das Protein PEBP1 tauchte in Tränenflüssigkeit von Sicca Patienten vermehrt abundant auf. PEBP1 ist an Signaltransduktionsprozessen beteiligt, die unter anderem modulierende Effekte auf apoptotische Vorgänge ausüben [120].

Neben der Apoptose wird auch die biologische Funktion „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ von einigen herauf regulierten Proteinen inhibiert. Beteiligt daran sind unter anderem Gelsolin, die Glutathion-S-Transferase P (GSTP1), einige Peroxiredoxine (PRDX1 und PRDX2) und YWHAZ. Studien um das Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid (BAK) konnten nachweisen, dass eine Exposition die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine initiiert und damit immunoinflammatorische Reaktionen auslöst sowie apoptotische Vorgänge und

oxidativen Stress auf der Augenoberfläche steigert. Folglich kommt es zu einer Instabilität des Tränenfilms, zum Verlust von Becherzellen, zu einer Schädigung der schützenden Epithelbarriere und demnach auch zur Beeinträchtigung tieferliegender Strukturen der Augenoberfläche [9]. Die Inhibition der Apoptose und Synthese reaktiver Sauerstoffspezies bei GLM+DRYaq könnte als Zeichen für gegenregulative Vorgänge gedeutet werden, welche die Zellen den massiven Entzündungsvorgängen und dem damit verbundenen Stress entgegenzusetzen versuchen.

5.2 AIMS Strategie zur Analyse humaner Tränenflüssigkeit

Im ersten Versuchsteil erhielten wir erste Einblicke in die assoziierte Pathomechanismen bei der Glaukom-assoziierten Sicca Symptomatik. Um mögliche pathophysiologische Prozesse und damit verbundene Proteine genauer differenzieren zu können, sowie individuelle Parameter zu berücksichtigen, untersuchten wir im zweiten Versuchsteil, zusätzlich zu den Tränen von GLM+DRYaq Patienten, Tränenproben von Glaukompatienten ohne zugrundeliegende Sicca-Symptomatik und von Keratokonjunktivitis sicca Patienten ohne Glaukomerkrankung.

Schauen wir uns also zunächst an, welche Veränderungen im Tränenproteom von Glaukompatienten unter IOD-senkender Medikation auftreten, bei denen noch kein diagnostiziertes trockenes Auge vorliegt. Im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe konnten 16 unterschiedlich regulierte Proteine zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Davon sind 11 Proteine in der Glaukom-Gruppe hochreguliert und 5 herunterreguliert. Diese Proteine werden im Folgenden genauer beleuchtet. Zu den vermindert abundanten Proteinen zählen Mesothelin (MSLN), Lacritin (LACRT), ZG16B, Mammaglobin B (SCGB2A1) und Lipophilin A (SCGB1D1).

Mesothelin (MSLN) ist ein membrangebundenes Peptid, das unter anderem im Epithel der Kornea und Konjunktiva nachgewiesen werden konnte. Es scheint vor allem im Bereich der oberflächlichen Epithelschichten lokalisiert zu sein. Man vermutet eine Interaktion zwischen MSLN und MUC16 [152]. Die Muzinschicht überzieht die Augenoberfläche und wird als Barriere für Pathogene und andere schädigende Substanzen gesehen. Sie soll verhindern, dass diese die Epithelien der Augenoberfläche erreichen. Außerdem werden ihr hydratisierende und stabilisierende Funktionen zugeschrieben. MUC16 gehört zu den membrangebundenen Muzinen der Kornea- und Konjunktivaepithelien, die einen wichtigen Beitrag zu dieser nicht-adhäsive protektiven Epithelbarriere leisten [153]. Man geht davon aus, dass auch

Mesothelin Bestandteil dieser Epithelbarriere ist [84]. Die Anwendung BAK-haltiger Augentropfen steht in Zusammenhang mit Veränderungen in der Muzinschicht. Eine Studie von Chung et al. untersuchte die Kurzzeiteffekte von Benzalkoniumchlorid auf die präkorneale Muzinschicht. Dabei konnte schon nach kürzester Zeit (5 und 15 Minuten) eine Reduktion der Muzine MUC1 und MUC16 nachgewiesen werden. Eine verlängerte Exposition (60 min) führte zur kompletten Zerstörung der Muzinschicht [48]. Demzufolge kann man sich kaum vorstellen, welche verheerenden Effekte eine langfristige Anwendung benzalkoniumchloridhaltiger Antiglaukommedikamente, wie sie bei nahezu allen Glaukompatienten erfolgt, auf die Muzinschicht und damit die Epithelbarriere hat. Geht man davon aus, dass MUC16 mit MSLN interagiert, liegt die Vermutung nahe, dass BAK für die verminderte Abundanz von Mesothelin im Tränenfilm von GLM Patienten verantwortlich sein könnte. Verringerte Mesothelinlevel konnten in dieser Studie sowohl bei GLM+DRYaq als auch bei DRYaq Patienten detektiert werden, es scheint also ein Zusammenhang mit der Ausbildung einer Sicca Symptomatik zu bestehen. In einer vorherigen Studie konnten bereits verringerte MSLN Level im Tränenfilm von GLM+DRY Patienten nachgewiesen werden [94]. Die verminderte Abundanz von Mesothelin im Tränenfilm von GLM Patienten könnte als erstes Anzeichen für eine Veränderung in der Muzinschicht und folglich einer gestörten Epithelbarrierefunktion gedeutet werden. Schäden an der Epithelbarriere machen darunterliegende Strukturen angreifbar. Dies könnte die vermehrte Abundanz zytoplasmatischer Proteine wie GSN, FBP1, YWHAB, YWHAZ, ALDH1A1, GSTP1 und UBA1 in Zusammenhang mit GLM erklären. Diese Proteine konnten in allen 3 Gruppen (GLM, GLM+DRYaq, DRYaq) im Vergleich zu CTRL verstärkt abundant nachgewiesen werden. Die ermittelten Werte sprechen allerdings dafür, dass diese Proteine in Tränen der GLM+DRYaq Gruppe verglichen mit der GLM Gruppe ohne Sicca Symptomatik nochmals höher abundant vorliegen. Die Abundanz dieser Proteine maximiert sich also im Laufe des Erkrankungsprozesses. Die Proteine FBP1, YWHAB, YWHAZ, ALDH1A1, GSTP1, UBA1 und GSN erfüllen vielfältige Funktionen innerhalb der Zellen.

Das Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1, FBPase) ist ein wichtiges Regulationsenzym der Gluconeogenese und katalysiert die Hydrolyse von Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat [154]. Zudem lieferten die Ergebnisse einer Studie zur Funktion von FBP1 in der Retina von Ratten Hinweise dafür, dass die FBPase nicht nur metabolische Funktionen erfüllt sondern auch Einfluss auf den

Schutz der Retina vor toxischen Effekten oder reaktiven Sauerstoffspezies nimmt [155]. Den gleichen Effekt könnte FBP1 auch auf die Zellen der Kornea ausüben. In dieser Studie konnte ebenfalls im Rahmen der Funktions- und Signalweganalyse eine Assoziation von FBP1 zur Funktion „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ hergestellt werden. Anhand unserer Daten zeigt sich eine Inhibition der Synthese reaktiver Sauerstoffspezies, neben FBP1 sind auch die Proteine GSN, GSTP1 und YWHAZ an der Inhibition beteiligt.

Gelsolin (GSN) wurde bereits im Rahmen des Signalwegs „Actin Cytoskeleton Signaling“ thematisiert. Als Aktin-Modulator unterstützt Gelsolin die Regeneration von Epithelzellen und wirkt sich positiv auf die korneale Wundheilung aus. Passend zu unseren Ergebnissen konnte eine deutsche Studiengruppe bereits erhöhte GSN Level im Tränenfilm von Keratokonjunktivitis sicca Patienten detektieren [128]. Auch Perumal et al. konnten GSN in hoher Abundanz bei DRYaq und DRYaq/lip detektieren [120]. Nättinen et al. konnten eine Korrelation zwischen der erhöhten Abundanz von GSN im Tränenfilm und steigendem Alter feststellen [156]. Darüber hinaus konnten wir im Zusammenhang mit Gelsolin eine Inhibition der Synthese reaktiver Sauerstoffspezies und der Apoptose sowie eine Beteiligung bei der Funktion „Inflammatory Response“ nachgewiesen werden.

Die Glutathion-S-Transferase P (GSTP1) ist wichtiger Bestandteil der zellulären Stressantwort. Glutathion S Transferasen erfüllen vielfältige Funktionen im Körper. Unter anderem spielen sie eine wichtige Rolle bei Detoxifikationsprozessen (z.B. die Entgiftung von Xenobiotika). GSTP1 gilt als Regulator für die Apoptose. Über eine Interaktion mit TRAF2 kommt es zu einer verminderten Signaltransduktion von Rezeptoren des TNF-alpha und JNK Kinase Signalwegs. Diese Signale dienen der Aktivierung apoptotischer Vorgänge womit GSTP1 eine inhibierende Funktion ausübt [157]. Auch in dieser Studie konnten wir eine Inhibition der Apoptose und der Synthese reaktiver Sauerstoffspezies in Verbindung mit GSTP1 vermerken. Soria et al. untersuchten das Proteom des Epithels der Konjunktiva von Patienten mit Erkrankungen der Augenoberfläche. Dabei konnten sie bei Sicca Patienten unter anderem eine erhöhte Expression von GSTP1 und ALDH1A1 feststellen [158].

Die Proteine 14-3-3 zeta/delta (YWHAZ) und 14-3-3 beta/alpha (YWHAB) sind Teil der 14-3-3 Protein Familie. Sie wurden bereits im Zusammenhang mit dem identifizierten Signalweg „14-3-3 mediated signaling“ erwähnt. Wie bereits besprochen wirken sie

als Regulatoren intrazellulärer Signalwege und spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion, dem Zellzyklus und bei Apoptosevorgängen [129]. Zudem könnten sie an Reparaturvorgängen der Kornea und Konjunktiva beteiligt sein [130]. Nach Nättinen et al. zählt YWHAZ zu den Proteinen, die in Verbindung zur Anwendung antiglaukomatöser Augentropfen und entzündlichen Prozessen stehen [121]. In dieser Studie sind YWHAZ und YWHAB, wie viele andere oben genannte Proteine, in die Inhibition der Apoptose involviert. YWHAZ trägt zusätzlich zur Inhibition der Synthese reaktiver Sauerstoffspezies bei.

Auch UBA1 zählt zu den Apoptose-inhibierenden Proteinen. Das Ubiquitin-like modifier Enzym 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Progression des Zellzyklus und der Protein Homöostase [159]. Der Ubiquitin Signalweg ist unter anderem in zelluläre Stressreaktionen involviert, zum Beispiel beim gehäuften Auftreten von oxidativem Stress. UBA1 ist Teil von Signalwegen, die die zelluläre Stressreaktion regulieren und ist damit essenziell für das Überleben einer Zelle [160]. UBA1 konnte in Tränen von DRYaq/lip Patienten in erhöhter Abundanz nachgewiesen werden [36]. In dieser Studie konnten erhöhte Expressionsprofile in Tränen von GLM, GLM+DRYaq und DRYaq Patienten nachgewiesen werden.

In der GLM Gruppe außerdem höher reguliert vorkommende Proteine sind GPI, PEBP1, ALDH1A1, PFN1 und PRDX1. Diese 5 Proteine kommen auch in der GLM+DRYaq signifikant vermehrt abundant vor. In der DRYaq Gruppe konnten für diese Proteine keine signifikanten Veränderungen der Expressionsprofile im Vergleich zur CTRL Gruppe festgestellt werden.

Die Glucose-6-phosphat Isomerase (GPI) katalysiert die Umwandlung von Glucose-6-phosphat in Fructose-6-phosphat und im zweiten Abschnitt der Glykolyse und die entgegengesetzte Reaktion in der Gluconeogenese [161, 162]. Glykolyse und Gluconeogenese sind überlebenswichtige Prozesse. Sie dienen der Energieversorgung und -speicherung einer Zelle und stellen essenzielle Pfeiler für das Zellwachstum dar [123]. Zudem spielt die suffiziente Glucoseversorgung eine wichtige Rolle bei Wundheilungsprozessen in der Kornea [163, 164]. Die GPI kann darüber hinaus auch als Zytokin wirken. Sie ist in der Lage angiogenetische und neurotrophische Funktionen auszuüben sowie die Immunoglobulin-Sekretion zu stimulieren [165-167]. Zudem konnte ein hypoxie-bedingter Anstieg der GPI im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis, einer ebenfalls entzündlichen

Erkrankung, festgestellt werden [168]. Erhöhte Expressionsprofile der GPI können also in Zusammenhang gebracht werden mit dem verstärkten Ablauf metabolischer und inflammatorischer Prozesse.

Auch Profilin 1 (PFN1) ist involviert in Wundheilungsprozesse und Zytoskelett Remodelling der Korneazellen [169]. In dieser Studie besteht ein Zusammenhang mit der biologischen Funktion „Inflammatory Response“. Obwohl PEBP1 in dieser Studie in der Sicca Gruppe keine signifikanten Unterschiede zur CTRL Gruppe aufwies, konnten Perumal et al. erhöhte Expressionsprofile für PEBP1 in DRYaq und DRYaq/lip Patienten nachweisen. PEBP1 gilt unter anderem als Effektor für die Signaltransduktion Apoptose-modulierender Signalwege [120]. Daher konnte auch in dieser Studie eine Assoziation zur biologischen Funktion Apoptose hergestellt werden.

Ein weiteres Apoptose-assoziiertes Protein ist die Retinal Dehydrogenase (ALDH1A1). Sie trägt zum Schutz der Kornea gegen oxidativen Stress bei [150]. Neben metabolischen Funktionen vermutet man eine Funktion als Strukturelement in Linse und Kornea, mit Einfluss auf Refraktion und Transparenz [170]. Hier sprechen unsere Daten für eine Inhibition der Apoptose durch ALDH1A1. Pieragostino et al. konnten die Retinal Dehydrogenase 1 im Tränenfilm von Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom und Pseudoexfoliationsglaukom nachweisen [78]. Weiterhin konnten wir in der Literatur, im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Studie, eine verminderte Abundanz von ALDH1A1 in Tränen von Glaukompatienten finden. Die Ergebnisse wurden allerdings anders als in dieser Studie nicht validiert [94]. Wir konnten sowohl in der Discovery Phase als auch in AIMS erhöhte Expressionsprofile feststellen. Darüber hinaus wiesen Soria et al. erhöhte Expressionsprofile für ALDH1A1 und PRDX1 im Epithel der Konjunktiva von Keratokonjunktivitis sicca Patienten nach, was unsere Beobachtungen stützt [158].

Peroxiredoxin (PRDX1) ist ein antioxidatives Enzym. Man geht davon aus, dass PRDX1 in die zelluläre Reaktion gegen reaktive Sauerstoffspezies eingebunden ist und damit ebenfalls Teil der oxidativen Stressantwort ist [171]. Auch in dieser Studie standen erhöhte PRDX1 Level in Zusammenhang mit der Inhibition reaktiver Sauerstoffspezies. Interessanterweise konnten Pieragostino et al. PRDX1 in vermehrter Abundanz bei unbehandelten POAG Patienten nachweisen [6]. Jung et al. konnten erhöhte PRDX1 Level im Sekret der Tränendrüse von Sicca Patienten nachweisen [172].

Erhöhte Expressionsprofile vieler im letzten Abschnitt besprochenen Proteine deuten darauf hin, dass bei GLM Patienten durch die Anwendung konservierter IOD-senkender Augentropfen und die daraus resultierende Schwächung der epithelialen Barriere (repräsentiert durch die verminderte Abundanz von MSLN) der oxidative Stress innerhalb der Zellen der Augenoberflächenepithelien ansteigt. Daraufhin nehmen apoptotische Vorgänge zu, die in einer verstärkten Abundanz apoptoseinhibierender Proteine resultieren. Die Zellen sind in Alarmbereitschaft und bekämpfen das Eindringen schädigender Substanzen in tieferliegende Strukturen. In Tränen von GLM Patienten konnten wir Proteine, die vor allem durch die Tränendrüsen sezerniert werden, in verminderter Abundanz vorfinden. Dies umfasst die Proteine Lacritin (LACRT), ZG16B, Mammaglobin B (SCGB2A1) und Lipophilin A (SCGB1D1). Diese 4 Proteine konnten in allen 3 Gruppen (GLM, GLM+DRYaq, DRYaq) in verminderter Abundanz nachgewiesen werden. Vergleicht man die Werte (Log2 Differenzen) der Proteine für die einzelnen Gruppen, stellt man fest, dass für die Sicca Gruppen (GLM+DRYaq und DRYaq) insgesamt höhere Differenzen erreicht werden als in der GLM Gruppe. Das deutet daraufhin, dass sich die Verminderung dieser Proteine im Tränenfilm im Laufe der Entwicklung einer Sicca Symptomatik verstärkt.

Lacritin (LACRT) ist ein Protein, welches zum Großteil von der Haupttränendrüse exprimiert wird, es konnte allerdings auch in Meibom- und Wolfring-Drüsen nachgewiesen werden. Lacritin ist eines der Proteine, die unter Sicca Konditionen selektiv vermindert abundant vorkommen und wird daher als Marker für ein trockenes Auge angesehen. Lacritin erfüllt wichtige Funktionen bei der Gesunderhaltung der Augenoberfläche. Als prosekretorisches Mitogen fördert Lacritin unter anderem den basalen Tränenfluss und stimuliert korneale Epithelzellen [36, 146]. Lacritin ist in der Lage die Tränensekretion zu regulieren und spielt eine wichtige Rolle bei der Erneuerung der Augenoberflächenepithelien. Die verminderte Abundanz von LACRT steht demnach in Zusammenhang mit der Entwicklung oder dem Voranschreiten einer Sicca Symptomatik [36]. Eine weitere Studie unserer Studiengruppe konnte verminderte Lacritin Level auch in Tränen von Glaukom Patienten unter IOD senkender Lokalmedikation nachweisen [94].

Auch Mammaglobin B (SCGB2A1) zeigte in dieser Studie eine verminderte Expression bei GLM Patienten, was sich mit den Ergebnissen unserer aktuellen Studie deckt [94]. Im Gegensatz dazu fanden Wong et al. SCGB2A1 in verstärkter Abundanz bei Glaukom Patienten unter Medikation. Des Weiteren konnte Mammaglobin B in einigen

Studien zum trockenen Auge in Tränen von Sicca Patienten in verringerter Abundanz nachgewiesen werden [120, 122, 173]. Welche Funktion SCGB2A1 im Tränenfilm zukommt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Zusammen mit Lipophilin A (SCGB1D1) bildet Mammanglobin B Heterodimere in Tränen. SCGB2A1 wird in den sekretorischen Endstücken und Ausführungsgängen der Tränendrüse exprimiert und konnte in Moll- und Meibom-Drüsen nachgewiesen werden. Man vermutet, dass SCGB2A1 eine Rolle bei der Reduktion der Oberflächenspannung des Tränenfilms einnimmt [174].

Ein weiteres relevantes Protein im Hinblick auf die Sekretion der Tränendrüse ist ZG16B. ZG16B konnte im Zusammenhang mit einer Keratokonjunktivitis sicca in verminderter Abundanz nachgewiesen werden [120, 122]. Interessant ist also, dass verminderte Level von ZG16B in dieser Studie bereits bei Glaukumpatienten unter IOD-senkender Medikation ohne diagnostizierte Sicca Symptomatik nachgewiesen werden konnten. Die Funktion von ZG16B ist weitestgehend unbekannt. In Zellen des Gastrointestinaltraktes vermutet man, dass ZG16B an der Stimulation der Degranulation von Becher- und Drüsenzellen beteiligt ist. Weiterhin konnten Perumal et al. einen Zusammenhang zwischen der verminderten Abundanz von ZG16B und PRR4 feststellen und stellten die Hypothese auf, dass die Reduktion von ZG16B und PRR4 im Tränenfilm von DE Patienten auf eine Beteiligung gestörter neurologischer Prozesse in der Tränendrüse schließen lässt [120]. In dieser Studie konnten wir PRR4 in signifikant verringerter Abundanz erst bei GLM+DRYaq und DRYaq nachweisen. Die GLM Gruppe zeigte noch keine verringerten PRR4 Level.

Eine verminderte Abundanz der Proteine LACRT, SCGB2A1, SCGB1D1 und ZG16B bei GLM Patienten lässt auf eine erste Beeinträchtigung der Sekretion der Tränendrüse schließen. Es gibt Hinweise, dass die meisten Glaukommedikamente die basale Tränensekretion der wässrigen Phase und damit das Volumen der wässrigen Phase reduzieren [10]. Darüber hinaus konnte im Zusammenhang mit der lokalen Anwendung von Betablockern eine Hyposensibilisierung der Kornea festgestellt werden [12]. Kommt es zu einer verminderten Sensibilität der Nervenendigungen in der Kornea, kann dies in einer Fehlregulation der Tränenproduktion resultieren. Die Nervenendigungen auf der Augenoberfläche stehen über den lakrimalen Reflexbogen in Verbindung mit der Tränendrüse. Sie stellen den afferenten Zweig des Reflexbogens dar und leiten die aufgenommenen Stimuli auf Kornea und Konjunktiva zunächst an Regulationszentren im ZNS weiter, wo sie verarbeitet und analysiert werden. Anschließend wird anhand der Intensität/ Stärke des Inputs festgelegt,

inwieweit die Tränensekretion (Zusammensetzung und Volumen) angepasst werden muss [32]. Passt der weitergeleitete Stimulus aufgrund der medikamentös induzierten Desensibilisierung der Nervenfasern nicht zum tatsächlichen Stimulus, führt dies über die efferenten vorwiegend parasympathischen Fasern zu einer Weitergabe von Fehlinformationen an die Tränendrüse. Darüber hinaus können die sensorischen Nerven der Augenoberfläche zudem die Sekretionsprodukte konjunktivaler Becher- und Epithelzellen sowie kornealer Epithelzellen regulieren [32]. Auch hier würde eine Hyposensibilisierung in einer Fehlregulation resultieren, was die Ausbildung einer Glaukom-assoziierten Sicca Symptomatik weiter fördern würde. Die Fehlregulation der Sekretion wichtiger Tränenfilmkomponenten und eine Verminderung des lakrimalen Tränenflusses würde letztlich in einer Hypersomolarität des Tränenfilms resultieren. Ein hypersomolarer Tränenfilm gilt als zentraler Faktor bei der Pathogenese der Keratokonjunktivitis sicca [33]. Dieser mögliche pathophysiologische Prozess wurde in **Abbildung 27** skizziert.

Die 16 in Zusammenhang mit GLM besprochenen Proteine könnten anhand ihrer Expressionsprofile als erste Initiatoren gelten und Hinweise auf die Entwicklung einer Sicca Symptomatik liefern. Kommt es zum Ausbruch einer Glaukom-assoziierten Sicca Symptomatik folgt eine verstärkte Fehlregulation, der bereits bei GLM betroffenen Proteine und es kommt zur Fehlregulation weiterer wichtiger Proteine.

Ein Beispiel dafür ist das Prolin-reiche Protein 4 (PRR4). Das lakrimale PRR4 ist ein komplexes Protein, welches in den Azinuszellen der Tränendrüse synthetisiert wird [84]. Sehr häufig konnte PRR4 im Zusammenhang mit dem trockenen Auge vermindert abundant nachgewiesen werden. Seine Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, man geht jedoch davon aus, dass PRR4 wichtig für die physiologische Funktion der Tränendrüse ist [120]. Darüber hinaus wird PRR4 eine Rolle bei der Stabilisierung des Tränenfilms und dem Schutz der Augenoberfläche zugeschrieben [84]. Wir konnten PRR4 in Tränen von DRYaq und GLM+DRYaq Patienten in verminderter Abundanz detektieren. Interessanterweise konnten Pieragostino et al. bei unbehandelten Glaukompatienten erhöhte und bei medikamentös behandelten Glaukompatienten erniedrigte PRR4 Level feststellen [6]. Auch in einer Studie von Wong et al. zeigte PRR4 in Tränen von medikamentös behandelten Glaukompatienten ein erniedrigtes Expressionsprofil [70]. Zusätzlich konnten unsere Ergebnisse durch eine vorherige Studie unserer Studiengruppe bestätigt werden, die bei GLM+DRY Patienten ebenfalls erniedrigte PRR4 Level feststellen konnten [94]. Dies stützt unsere Vermutung, dass

die Sekretion von PRR4 durch die lokale Anwendung von BAK-haltigen Glaukommedikamenten beeinträchtigt wird und damit zur Entstehung bzw. dem Fortschreiten einer Glaukom-assoziierten Sicca Symptomatik beiträgt.

In der GLM+DRYaq Gruppe konnten wir die mit Abstand größte Anzahl unterschiedlich abundanter Proteine im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Neben den bereits besprochenen Proteinen waren dies Opiorphin (PROL1), das Hitzeschockprotein HSPB1, die Cystatine CST1 und CST4 sowie Transcobalamin 1 (TCN1) in verminderter Abundanz und Annexin A2 (ANXA2), Peroxiredoxin-5 (PRDX5), Cystatin B (CSTB), die alpha-Enolase (ENO1), Apolipoprotein-B-mRNA-Editing-Enzym, katalytisches Polypeptid-ähnliches 3A (APOBEC3A), Caspase 14 (CASP14), Alpha-Actinin4 (ACTN4), Rab-GDP-Dissoziationsinhibitor Beta (GDI2), 14-3-3 Protein sigma (SFN), Selenbindendes Protein 1 (SELENBP1), Transketolase (TKT), Hämopexin (HPX), die Superoxiddismutase (SOD2), die Mitglieder der S100 Protein Familie S100P und S100A9, Ubiquitin-60S ribosomales Protein L40 (UBA52), Alpha-1-Antichymotrypsin (SERPINA3), Calreticulin (CALR), Komplement C3, Thioredoxin (TXN) und Tropomyosin-Alpha-4-Kette (TPM4) in verstärkter Abundanz. Darunter konnten CST4, PRR4, TCN1, HPX, S100P, GDI2, SFN, SELENBP1, ACTN4, CASP14, APOBEC3A, SOD2 und TKT in dieser Studie auch in der DRYaq Gruppe mit ähnlichen Expressionsprofilen nachgewiesen werden.

Mit PROL1, HSPB1, TCN1, CST1 und CST4 sind neben PRR4 weitere DE-assoziierte Proteine betroffen. Das Prolin-reiche Protein 1 konnte unter anderem durch Perumal et al. in verminderter Abundanz beim trockenen Auge detektiert werden. PROL1 wird von der Tränendrüse sezerniert und erfüllt vermutlich homöostatische Funktionen in Bezug auf die Tränensekretion. Zudem konnten sie HSPB1 in verminderter Abundanz bei DE Patienten feststellen [120]. Srinivasan et al. wiesen TCN1 in Tränen von DRY Patienten in verminderter Abundanz nach [122]. Ebenso konnten CST1 und CST4 in Verbindung mit dem trockenen Auge in verminderter Abundanz nachgewiesen werden [122, 173]. Auch sie werden von der Tränendrüse sezerniert [175]. Aber auch im Zusammenhang mit GLM+DRY wurden bereits verminderte Level von PROL1, TCN1, CST1 und CST4 im Tränenfilm festgestellt [94, 121]. In einer Studie von Nättinen et al. wurden die Proteinprofile von Glaukompatienten vor und nach dem Wechsel zu konservierungsmittelfreien Glaukommedikamenten (Prostaglandinanaloga) untersucht. In der Gruppe, die am meisten vom Medikamentenwechsel profitierten, konnten zu Beginn unter anderem verminderte Level von CST1, CST4 und PROL1

nachgewiesen werden [121]. Eine Studie unserer Studiengruppe konnten PROL1, CST1 und TCN1 bei GLM+DRY Patienten ebenfalls in verminderter Abundanz detektieren. HSPB1 wurde in dieser Studie bei therapierten Glaukomentpatienten vermindert nachgewiesen [94]. Darüber hinaus fanden Pieragostino et al. in ihrer Vergleichsstudie zwischen unbehandelten und behandelten Glaukomentpatienten unter anderem CST4 und HSPB1 in verstärkter Abundanz bei unbehandelten Glaukomentpatienten und CST4 dann wiederum in verminderter Abundanz bei medikamentös behandelten Glaukomentpatienten [6]. Da es sich bei diesen Proteinen überwiegend um von der Tränendrüse sezernierte Proteine handelt, weist dies auf eine zusätzliche Verminderung der lakrimalen Tränensekretion nach Ausbruch der Glaukom-assoziierten Sicca Symptomatik hin. Einige dieser Proteine haben vermutlich wichtige regulierende Funktionen auf die Tränendrüse, somit beginnt der Teufelskreis. Neben einer Verminderung des lakrimalen Tränenflusses verstärken sich somit Entzündungsvorgänge auf der Augenoberfläche, was sich in der verstärkten Abundanz vieler entzündungs- oder DE-assoziiierter Proteine widerspiegelt. Dies sind unter anderem die Protein S100A9, ENO1 und C3 die mehrfach im Zusammenhang mit dem trockenen Auge oder medikamentös behandelten Glaukomentpatienten in verstärkter Abundanz nachgewiesen werden konnten [70, 120, 122, 176]. Weiterhin konnten eine Vielzahl der höher regulierten die Proteine den biologischen Funktionen „Apoptose“ (ANXA2, PRDX5, ENO1, SOD2, TXN, UBA52, SERPINA3), „Synthese reaktiver Sauerstoffspezies“ (ANXA2, CSTB, SOD2, SERPINA3), „Entzündungsreaktion“ (ANXA2, PRDX5, S100A9, TXN, SERPINA3) und der „Akute Phase Reaktion“ (SOD2, SERPINA3) zugeordnet werden.

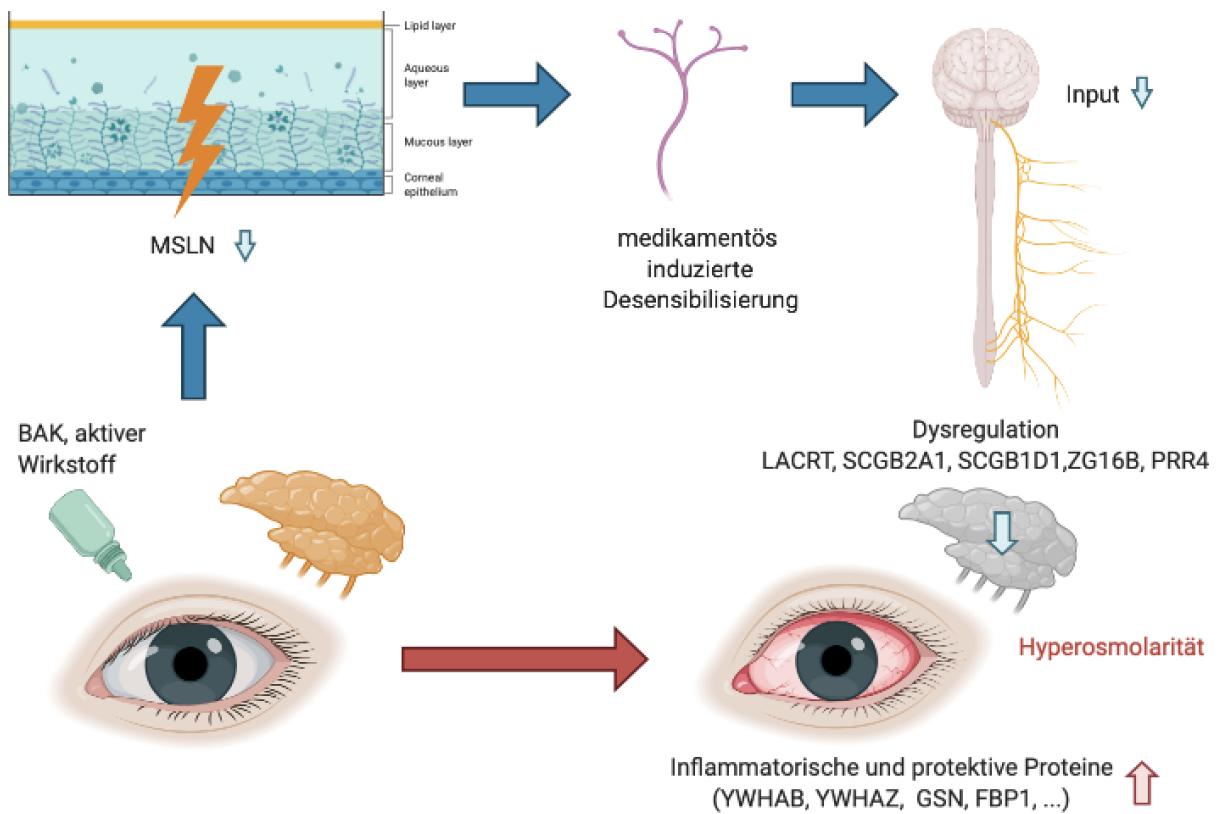


Abbildung 27: Möglicher pathophysiologischer Mechanismus bei der Entstehung eines Glaukommedikamenten-assoziierten trockenen Auges.

Diese Abbildung wurde unter Verwendung von BioRender.com gestaltet.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, die pathophysiologischen Grundlagen bei der Ausbildung eines Glaukommedikamenten-assoziierten trockenen Auges näher zu beleuchten. Alles in allem ist es uns gelungen mithilfe optimierter Methoden neue Erkenntnisse im Hinblick auf den Entstehungsprozess einer Glaukom-assoziierten Sicca Symptomatik zu gewinnen. Im ersten Versuchsteil (Discovery Phase I + II) konnten wir die bisher größte Anzahl unterschiedlich abundanter Proteine zwischen Glaukom-Sicca und einer Kontrollgruppe identifizieren. Dies ermöglichte uns eine umfangreiche Analyse involvierter Signalwege und biologischer Funktionen, mit denen die unterschiedlich regulierten Proteine in Verbindung stehen. Im zweiten Versuchsteil (AIMS) konnten wir eine große Anzahl der unterschiedlich exprimierten Proteine validieren und zu Vergleichszwecken auch die Proteinprofile und damit verbundenen Signalwege und biologischen Funktionen von Glaukom Patienten unter Medikation ohne Sicca Symptomatik und Keratokonjunktivitis sicca Patienten ohne Glaukomerkrankung und Medikation beurteilen. Die umfangreiche Funktionsanalyse lieferte folgende Erkenntnisse: Sowohl bei der Keratokonjunktivitis sicca als auch bei einem Glaukom-assoziierten trockenen Auge laufen entzündliche Prozesse ab. Einige Studien hatten bereits vermutet, dass die Augenoberfläche bei Glaukom-Sicca Patienten stärker von entzündlichen Prozessen geprägt sei [70, 94]. In dieser Studie konnten wir sehr deutlich herausstellen, dass entzündliche Prozesse bei GLM+DRYaq wesentlich stärker abliefen als bei DRYaq und diese auch näher charakterisieren. Interessanterweise konnte im Vergleich zu DRYaq ein massiv verstärkter Ablauf metabolischer Prozesse wie der Glykolyse und Gluconeogenese demonstriert werden. Darüber hinaus lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Zellen unter Glaukom-Sicca Bedingungen wesentlich mehr oxidativem Stress ausgesetzt sind als bei DRYaq. Insbesondere die Proteine der 14-3-3 Familie und demnach 14-3-3 vermittelte Signalwege so wie unspezifische Immunreaktionen wie die Akute Phase Reaktion scheinen eine große Rolle bei GLM+DRYaq zu spielen. Die meisten biologischen Funktionen und Signalwege konnten im Zusammenhang mit GLM+DRYaq identifiziert werden. Zudem waren nahezu alle mit entzündlich-apoptischen Prozessen vergesellschaftet, was auf eine wesentlich ausgeprägtere Gewebeschädigung schließen lässt als dies unter Glaukom-unabhängigen Sicca Bedingungen der Fall ist. Dies wird vor allem der Anwendung konservierungsmittelhaltiger Glaukommedikamente zugeschrieben [9]. Anhand

unserer Ergebnisse im zweiten Versuchsteil gelang es uns ein neues Konzept im Hinblick auf die Pathophysiologie einer Glaukom-assoziierten Sicca Symptomatik zu erarbeiten. Beim Vergleich der Proteinprofile von GLM, GLM+DRYaq und DRYaq Patienten gelang es uns Unterschiede zur Pathophysiologie von DE herauszustellen. Unsere Hypothese stützt sich unter anderem auf die verminderte Abundanz von Mesothelin als Marker für eine gestörte Epithelbarrierefunktion bei GLM. Eine Schwächung der Epithelbarriere konnte bereits im Zusammenhang mit der Verwendung BAK-haltiger Präparate demonstriert werden und steht damit höchstwahrscheinlich in Verbindung mit dem Konservierungsmittel [9, 10]. Unsere Daten liefern wichtige Hinweise dafür, dass allein durch die Anwendung konservierungsmittelhaltiger Glaukommedikamente bereits eine Funktionsstörung der Tränendrüse ausgelöst werden könnte. Durch die gestörte Barrierefunktion könnten topisch applizierte Substanzen in tiefere Gewebeschichten eindringen und somit eine Schädigung sensorischer Nervenendigungen des afferenten Zweigs des lakrimalen Reflexbogens verursachen. Infolgedessen käme es zu einer Fehlregulation der Tränendrüsensekretion und zu einer Veränderung des Tränensekrets in Qualität und Menge, bis zu einer vollständigen Dekompensation, die sich in einer Hyperosmolarität des Tränenfilms niederschlägt und den Ausbruch einer Glaukommedikamenten-assoziierten Sicca Symptomatik markiert. Die Folge wäre eine Verstärkung der Entzündung und die Dysregulation weiterer wichtiger homöostatischer Proteine. Der Sicca-Teufelskreis beginnt. Diese Theorie könnte eine Erklärung dafür liefern warum GLM+DRYaq wesentlich entzündlichere Eigenschaften als DRYaq aufweist und eine größere Anzahl an Proteinen fehlreguliert ist. Folglich könnten Maßnahmen zum Schutz der Epithelbarriere in frühen Stadien vor einem Ausbruch helfen. Daraus resultiert eine Empfehlung zum kompletten Verzicht konservierungsmittelhaltiger Augentropfen oder die Verwendung alternativer Konservierungsmittel bei Patienten für die konservierungsmittelfreie Formulierungen keine Alternative darstellt. Es ist allerdings nicht ausreichend geklärt, ob tatsächlich nur BAK oder auch alternative Konservierungsmittel oder die aktive Komponente zur Schwächung der Epithelbarriere beitragen. Wenige klinische Studien zu alternativen Konservierungsmitteln sind bereits vorhanden, sie liefern vielversprechende Ergebnisse, jedoch sind Langzeitstudien zwingend notwendig [9, 177, 178]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die proteomische Beurteilung alternativer Verfahren wie Laserbehandlungen zur IOD Senkung, die aktuell ein immer größer werdendes Thema darstellen [18]. Auch in diesem Bereich ist

unklar, ob langfristig Schäden wichtiger Strukturen der Augenoberfläche davongetragen werden können, die zur Ausbildung einer Sicca Symptomatik führen.

Die Ergebnisse dieser Studie eröffnen somit neue wichtige Perspektiven im Hinblick auf zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen, die näher erforscht werden sollten. Insgesamt gilt es zu klären welche Rolle die aktiven Komponenten bei der Entstehung einer Glaukommedikamenten-assoziierten Sicca Symptomatik einnehmen und welche Auswirkungen alternative Konservierungsmittel auf das Tränenproteom und die Augenoberfläche haben können. Zur näheren Differenzierung empfehlen sich klinisch/experimentelle Studien, die im Gegensatz zu dieser Studie eine größere Anzahl individueller Proben untersucht, eine unbehandelte/konservierungsmittelfreie Glaukomgruppe einschließt und eine Subklassifizierung der Sicca Gruppen vornimmt.

Literaturverzeichnis

1. Pfau N, Kern AO, Wolfram C, Kalcklösch M, Prütz F: Blindheit und Sehbehinderung. 2017.
2. Dietlein TS, Hermann MM, Jordan JF: The medical and surgical treatment of glaucoma. *Deutsches Aerzteblatt International* 2009, 106(37):597.
3. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK, Wilson MR, Gordon MO: The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Archives of ophthalmology* 2002, 120(6):701-713.
4. Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Crowston JG, Goldberg I: Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. *Clinical & experimental ophthalmology* 2012, 40(4):341-349.
5. Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, Johnson GJ: The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *British journal of ophthalmology* 2002, 86(2):238-242.
6. Pieragostino D, Agnifili L, Fasanella V, D'Aguanno S, Mastropasqua R, Di Ilio C, Sacchetta P, Urbani A, Del Boccio P: Shotgun proteomics reveals specific modulated protein patterns in tears of patients with primary open angle glaucoma I to therapy. *Mol Biosyst* 2013, 9(6):1108-1116.
7. Harwerth RS, Crawford ML, Frishman LJ, Viswanathan S, Smith EL, 3rd, Carter-Dawson L: Visual field defects and neural losses from experimental glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2002, 21(1):91-125.
8. Erb C, Gast U, Schremmer D: German register for glaucoma patients with dry eye. I. Basic outcome with respect to dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008, 246(11):1593-1601.
9. Baudouin C, Labbe A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F: Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res* 2010, 29(4):312-334.
10. Mastropasqua R, Agnifili L, Mastropasqua L: Structural and Molecular Tear Film Changes in Glaucoma. *Curr Med Chem* 2019, 26(22):4225-4240.
11. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui AB, Tajara EH: Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2012, 58(3):366-375.
12. Grehn F: Augenheilkunde, 31. Auflage edn. Berlin Heidelberg: Springer; 2012.
13. Cook C, Foster P: Epidemiology of glaucoma: what's new? *Canadian Journal of Ophthalmology* 2012, 47(3):223-226.
14. Quigley HA, Broman AT: The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British journal of ophthalmology* 2006, 90(3):262-267.
15. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY: Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014, 121(11):2081-2090.

16. Höhn R, Nickels S, Schuster AK, Wild PS, Münzel T, Lackner KJ, Schmidtman I, Beutel M, Pfeiffer N: Prevalence of glaucoma in Germany: results from the Gutenberg Health Study. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 2018, 256(9):1695-1702.
17. Lang GK, Esser J, Gareis O, Lang GE, Lang SJ, Recker D, Spraul CW, Wagner P: *Augenheilkunde*, 6. Auflage edn. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2019.
18. Bowling B: *KANSKIs Klinische Ophthalmologie. Ein systemischer Ansatz*, 8. Auflage edn: Elsevier; 2017.
19. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA: The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *Jama* 2014, 311(18):1901-1911.
20. Winkler NS, Fautsch MP: Effects of prostaglandin analogues on aqueous humor outflow pathways. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014, 30(2-3):102-109.
21. Easty D, Nemeth-Wasmer G, Vounatsos J, Girard B, Besnainou N, Pouliquen P, Delval L, Rouland J: Comparison of a non-preserved 0.1% T-Gel eye gel (single dose unit) with a preserved 0.1% T-Gel eye gel (multidose) in ocular hypertension and glaucomatous patients. *British journal of ophthalmology* 2006, 90(5):574-578.
22. Steven DW, Alagband P, Lim KS: Preservatives in glaucoma medication. *British Journal of Ophthalmology* 2018, 102(11):1497-1503.
23. Garcia-Feijoo J, Sampaolesi JR: A multicenter evaluation of ocular surface disease prevalence in patients with glaucoma. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* 2012, 6:441.
24. Stewart WC, Stewart JA, Nelson LA: Ocular surface disease in patients with ocular hypertension and glaucoma. *Curr Eye Res* 2011, 36(5):391-398.
25. Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, Dong PN, Geerling G, Hida RY, Liu Y: TFOS DEWS II management and therapy report. *The ocular surface* 2017, 15(3):575-628.
26. Gomes JAP, Azar DT, Baudouin C, Efron N, Hirayama M, Horwath-Winter J, Kim T, Mehta JS, Messmer EM, Pepose JS: TFOS DEWS II iatrogenic report. *The ocular surface* 2017, 15(3):511-538.
27. Rossi GCM, Tinelli C, Pasinetti GM, Milano G, Bianchi PE: Dry eye syndrome-related quality of life in glaucoma patients. *European journal of ophthalmology* 2009, 19(4):572-579.
28. Zhang X, Vadoothker S, Munir WM, Saeedi O: Ocular Surface Disease and Glaucoma Medications: A Clinical Approach. *Eye Contact Lens* 2019, 45(1):11-18.
29. Gipson IK: The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007, 48(10):4390; 4391-4398.
30. Gipson IK: The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007, 48(10):4391-4398.
31. Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, Chen L, Vaz C, Tanavde V, Li XR, Beuerman RW: In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics* 2012, 75(13):3877-3885.
32. Dartt DA: Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retin Eye Res* 2009, 28(3):155-177.

33. Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, Knop E, Markoulli M, Ogawa Y, Perez V *et al*: TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf* 2017, 15(3):438-510.
34. Willcox MDP, Argueso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, Papas EB, Rolland JP, Schmidt TA, Stahl U *et al*: TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf* 2017, 15(3):366-403.
35. Portal C, Gouyer V, Gottrand F, Desseyen JL: Ocular mucins in dry eye disease. *Exp Eye Res* 2019, 186:107724.
36. Perumal N: Characterization of human tear proteome in dry eye syndrome. 2016.
37. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, Liu Z, Nelson JD, Nichols JJ, Tsubota K *et al*: TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf* 2017, 15(3):276-283.
38. Leitlinie von BVA und DOG Trockenes Auge [https://www.dog.org/wp-content/uploads/2019/05/Leitlinie_Sicca_2019.pdf]
39. Nelson JD, Craig JP, Akpek EK, Azar DT, Belmonte C, Bron AJ, Clayton JA, Dogru M, Dua HS, Foulks GN *et al*: TFOS DEWS II Introduction. *Ocul Surf* 2017, 15(3):269-275.
40. Sullivan DA, Rocha EM, Aragona P, Clayton JA, Ding J, Golebiowski B, Hampel U, McDermott AM, Schaumberg DA, Srinivasan S: TFOS DEWS II sex, gender, and hormones report. *The ocular surface* 2017, 15(3):284-333.
41. Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, Na K-S, Schaumberg D, Uchino M, Vehof J: Tfos dews ii epidemiology report. *The ocular surface* 2017, 15(3):334-365.
42. Tomlinson A, Bron AJ, Korb DR, Amano S, Paugh JR, Pearce EI, Yee R, Yokoi N, Arita R, Dogru M: The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the diagnosis subcommittee. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011, 52(4):2006-2049.
43. Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, Djalilian A, Dogru M, Dumbleton K, Gupta PK, Karpecki P, Lazreg S, Pult H: TFOS DEWS II diagnostic methodology report. *The ocular surface* 2017, 15(3):539-574.
44. Leung EW, Medeiros FA, Weinreb RN: Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients. *Journal of glaucoma* 2008, 17(5):350-355.
45. Lee HJ, Jun RM, Cho MS, Choi K-R: Comparison of the ocular surface changes following the use of two different prostaglandin F2 α analogues containing benzalkonium chloride or polyquad in rabbit eyes. *Cutaneous and ocular toxicology* 2015, 34(3):195-202.
46. Denoyer A, Godefroy D, Celerier I, Frugier J, Riancho L, Baudouin F, Rostene W, Baudouin C: CX3CL1 expression in the conjunctiva is involved in immune cell trafficking during toxic ocular surface inflammation. *Mucosal immunology* 2012, 5(6):702.
47. Göbbels M, Spitznas M: Corneal epithelial permeability of dry eyes before and after treatment with artificial tears. *Ophthalmology* 1992, 99(6):873-878.
48. Chung S-H, Lee SK, Cristol SM, Lee ES, Lee DW, Seo KY, Kim EK: Impact of short-term exposure of commercial eyedrops preserved with benzalkonium chloride on precorneal mucin. 2006.

49. Kahook MY, Noecker R: Quantitative analysis of conjunctival goblet cells after chronic application of topical drops. *Advances in therapy* 2008, 25(8):743.
50. Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, De Saint Jean M, Bechettille A: Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs: human and animal studies. *Ophthalmology* 1999, 106(3):556-563.
51. Baudouin C: Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmol* 2008, 86(7):716-726.
52. Ciancaglini M, Carpineto P, Agnifili L, Nubile M, Fasanella V, Lanzini M, Calienno R, Mastropasqua L: An in vivo confocal microscopy and impression cytology analysis of preserved and unpreserved levobunolol-induced conjunctival changes. *Eur J Ophthalmol* 2008, 18(3):400-407.
53. Mastropasqua L, Agnifili L, Fasanella V, Curcio C, Ciabattini C, Mastropasqua R, Toto L, Ciancaglini M: Conjunctival goblet cells density and preservative-free tafluprost therapy for glaucoma: an in vivo confocal microscopy and impression cytology study. *Acta Ophthalmol* 2013, 91(5):e397-405.
54. Mastropasqua L, Agnifili L, Mastropasqua R, Fasanella V, Nubile M, Toto L, Carpineto P, Ciancaglini M: In vivo laser scanning confocal microscopy of the ocular surface in glaucoma. *Microsc Microanal* 2014, 20(3):879-894.
55. Moreno M, Villena A, Cabarga C, Sanchez-Font E, Garcia-Campos J: Impression cytology of the conjunctival epithelium after antiglaucomatous treatment with latanoprost. *Eur J Ophthalmol* 2003, 13(6):553-559.
56. Chung WC, Ryu SH, Sun H, Zeldin DC, Koo JS: CREB mediates prostaglandin F2alpha-induced MUC5AC overexpression. *J Immunol* 2009, 182(4):2349-2356.
57. Terai N, Muller-Holz M, Spoerl E, Pillunat LE: Short-term effect of topical antiglaucoma medication on tear-film stability, tear secretion, and corneal sensitivity in healthy subjects. *Clin Ophthalmol* 2011, 5:517-525.
58. Anwar Z, Wellik SR, Galor A: Glaucoma therapy and ocular surface disease: current literature and recommendations. *Current opinion in ophthalmology* 2013, 24(2):136-143.
59. Di Zazzo A, Micera A, De Piano M, Cortes M, Bonini S: Tears and ocular surface disorders: Usefulness of biomarkers. *Journal of cellular physiology* 2019, 234(7):9982-9993.
60. Group F-NBW: BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) resource. 2016.
61. Califf RM: Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine* 2018, 243(3):213-221.
62. Wright PC, Noirel J, Ow SY, Fazeli A: A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology* 2012, 77(4):738-765.e752.
63. Hanash S: Disease proteomics. *Nature* 2003, 422(6928):226.
64. Aebersold R, Mann M: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003, 422(6928):198.
65. Mann M: Origins of mass spectrometry-based proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016, 17(11):678.

66. Ge X, Kee C-L, Zeng Y, Low M-Y: Identification of Sildenafil Designer Analogues Found in Dietary Supplements. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. vol. 71: Elsevier; 2016: 155-197.
67. Rifai N, Gillette MA, Carr SA: Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 2006, 24(8):971-983.
68. Parker CE, Borchers CH: Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation—quality assurance and control of protein biomarker assays. *Molecular oncology* 2014, 8(4):840-858.
69. Quantitative Proteomics [<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/quantitative-proteomics.html>]
70. Wong TT, Zhou L, Li J, Tong L, Zhao SZ, Li XR, Yu SJ, Koh SK, Beuerman RW: Proteomic profiling of inflammatory signaling molecules in the tears of patients on chronic glaucoma medication. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011, 52(10):7385-7391.
71. Picotti P, Bodenmiller B, Aebersold R: Proteomics meets the scientific method. *Nature methods* 2013, 10(1):24.
72. Jaffe JD, Keshishian H, Chang B, Addona TA, Gillette MA, Carr SA: Accurate inclusion mass screening: a bridge from unbiased discovery to targeted assay development for biomarker verification. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008, 7(10):1952-1962.
73. Zhao Y, Brasier AR: Qualification and Verification of Protein Biomarker Candidates. *Adv Exp Med Biol* 2016, 919:493-514.
74. Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, Chen L, Vaz C, Tanavde V, Li XR, Beuerman RW: In-depth analysis of the human tear proteome. *Journal of proteomics* 2012, 75(13):3877-3885.
75. Zhou L, Beuerman RW, Chan CM, Zhao SZ, Li XR, Yang H, Tong L, Liu S, Stern ME, Tan D: Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *Journal of proteome research* 2009, 8(11):4889-4905.
76. Boehm N, Funke S, Wiegand M, Wehrwein N, Pfeiffer N, Grus FH: Alterations in the tear proteome of dry eye patients—a matter of the clinical phenotype. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013, 54(3):2385-2392.
77. Grus F, Boehm N, Berneiser S, Lamparter J, Wiegand M, Wiegel N, Pfeiffer N: Analysis of tear protein profiles in dry-eye patients by mass spectrometry. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2009, 50(13):2546-2546.
78. Pieragostino D, Bucci S, Agnifili L, Fasanella V, D'Aguanno S, Mastropasqua A, Ciancaglini M, Mastropasqua L, Di Ilio C, Sacchetta P: Differential protein expression in tears of patients with primary open angle and pseudoexfoliative glaucoma. *Molecular BioSystems* 2012, 8(4):1017-1028.
79. Grus F, Boehm N, Beck S, Schlich M, Lossbrandt U, Pfeiffer N: Autoantibody profiles in tear fluid as a diagnostic tool in glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010, 51(13):6110-6110.

80. Tomosugi N, Kitagawa K, Takahashi N, Sugai S, Ishikawa I: Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjögren's syndrome. *Journal of proteome research* 2005, 4(3):820-825.
81. Lema I, Brea D, Rodríguez-González R, Díez-Feijoo E, Sobrino T: Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus. *Molecular vision* 2010, 16:2055.
82. Ng V, Cho P, Mak S, Lee A: Variability of tear protein levels in normal young adults: between-day variation. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology* 2000, 238(11):892-899.
83. und Hohenstein-Blaul NvT, Funke S, Grus FH: Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Experimental eye research* 2013, 117:126-137.
84. Perumal N, Funke S, Pfeiffer N, Grus FH: Characterization of lacrimal proline-rich protein 4 (PRR 4) in human tear proteome. *Proteomics* 2014, 14(13-14):1698-1709.
85. Boehm N, Funke S, Wiegand M, Wehrwein N, Pfeiffer N, Grus FH: Alterations in the tear proteome of dry eye patients--a matter of the clinical phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, 54(3):2385-2392.
86. Grus FH, Podust VN, Bruns K, Lackner K, Fu S, Dalmaso EA, Wirthlin A, Pfeiffer N: SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005, 46(3):863-876.
87. Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH: Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011, 52(10):7725-7730.
88. Malvitte L, Montange T, Vejux A, Baudouin C, Bron A, Creuzot-Garcher C, Lizard G: Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *British journal of ophthalmology* 2007, 91(1):29-32.
89. Chong RS, Jiang YZ, Boey PY, Yu SJ, Htoon HM, Aung T, Khaw PT, Wong TT: Tear cytokine profile in medicated glaucoma patients: effect of monocyte chemoattractant protein 1 on early posttrabeculectomy outcome. *Ophthalmology* 2010, 117(12):2353-2358.
90. Manni G, Centofanti M, Oddone F, Parravano M, Bucci MG: Interleukin-1 β tear concentration in glaucomatous and ocular hypertensive patients treated with preservative-free nonselective beta-blockers. *American journal of ophthalmology* 2005, 139(1):72-77.
91. Park H-YL, Kim JH, Lee KM, Park CK: Effect of prostaglandin analogues on tear proteomics and expression of cytokines and matrix metalloproteinases in the conjunctiva and cornea. *Experimental eye research* 2012, 94(1):13-21.
92. Ghaffariyeh A, Honarpisheh N, Shakiba Y, Puyan S, Chamacham T, Zahedi F, Zarrineghbal M: Brain-derived neurotrophic factor in patients with normal-tension glaucoma. *Optometry-Journal of the American Optometric Association* 2009, 80(11):635-638.
93. Sahay P, Rao A, Padhy D, Sarangi S, Das G, Reddy MM, Modak R: Functional activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in tears of patients with glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science* 2017, 58(6):BIO106-BIO113.

94. Scieranski MJ: Identifizierung von Biomarkern aus Tränen von Sicca- und Glaukompatienten mit der gezielten Massenspektrometrie. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität, Augenklinik und Poliklinik; 2017.
95. Bron AJ: Diagnosis of dry eye. *Survey of ophthalmology* 2001, 45:S221-S226.
96. Perumal N, Funke S, Wolters D, Pfeiffer N, Grus FH: Characterization of human reflex tear proteome reveals high expression of lacrimal proline-rich protein 4 (PRR4). *Proteomics* 2015, 15(19):3370-3381.
97. Walker JM: The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In: *The protein protocols handbook*. Springer; 2009: 11-15.
98. Overview of Protein Electrophoresis [<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-electrophoresis.html>]
99. Tyanova S, Temu T, Cox J: The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols* 2016, 11(12):2301.
100. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J: The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. *Nature methods* 2016, 13(9):731-740.
101. QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN IPA) [<https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-ipa/>]
102. Consortium GO: The gene ontology resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic acids research* 2019, 47(D1):D330-D338.
103. Kim J, Lee JE, Heynen-Genel S, Suyama E, Ono K, Lee K, Ideker T, Aza-Blanc P, Gleeson JG: Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature* 2010, 464(7291):1048-1051.
104. Laing NG, Dye DE, Wallgren-Pettersson C, Richard G, Monnier N, Lillis S, Winder TL, Lochmüller H, Graziano C, Mitrani-Rosenbaum S: Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle α -actin gene (ACTA1). *Human mutation* 2009, 30(9):1267-1277.
105. Prum BE, Rosenberg LF, Gedde SJ, Mansberger SL, Stein JD, Moroi SE, Herndon LW, Lim MC, Williams RD: Primary open-angle glaucoma preferred practice pattern® guidelines. *Ophthalmology* 2016, 123(1):P41-P111.
106. Dog˘ an AL, Orhan M, Söylemezog˘ lu F, İrkeç M, Bozkurt B: Effects of topical antiglaucoma drugs on apoptosis rates of conjunctival epithelial cells in glaucoma patients. *Clinical & experimental ophthalmology* 2004, 32(1):62-66.
107. Pisella P-J, Debbasch C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignole F, Baudouin C: Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study. *Investigative ophthalmology & visual science* 2004, 45(5):1360-1368.
108. Kozobolis VP, Detorakis ET, Maskaleris G, Koukoula SC, Fountoulakis N, Chrysochoou F, Konstas AG: Corneal sensitivity changes following the instillation of latanoprost, bimatoprost, and travoprost eyedrops. *American journal of ophthalmology* 2005, 139(4):742-743.

109. Freeman PD, Kahook MY: Preservatives in topical ophthalmic medications: historical and clinical perspectives. *Expert Review of Ophthalmology* 2009, 4(1):59-64.
110. Jaenen N, Baudouin C, Pouliquen P, Manni G, Figueiredo A, Zeyen T: Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *European journal of ophthalmology* 2007, 17(3):341-349.
111. Ciancaglini M, Carpineto P, Agnifili L, Nubile M, Fasanella V, Lanzini M, Calienno R, Mastropasqua L: An in vivo confocal microscopy and impression cytology analysis of preserved and unpreserved levobunolol-induced conjunctival changes. *European journal of ophthalmology* 2008, 18(3):400-407.
112. Mastropasqua L, Agnifili L, Mastropasqua R, Fasanella V: Conjunctival modifications induced by medical and surgical therapies in patients with glaucoma. *Current Opinion in Pharmacology* 2013, 13(1):56-64.
113. Frezzotti P, Fogagnolo P, Haka G, Motolese I, Lester M, Bagaglia SA, Mittica P, Menicacci C, Rossetti L, Motolese E: In vivo confocal microscopy of conjunctiva in preservative-free timolol 0.1% gel formulation therapy for glaucoma. *Acta ophthalmologica* 2014, 92(2):e133-e140.
114. Baudouin C, Liang H, Hamard P, Riancho L, Creuzot-Garcher C, Warnet J-M, Brignole-Baudouin F: The ocular surface of glaucoma patients treated over the long term expresses inflammatory markers related to both T-helper 1 and T-helper 2 pathways. *Ophthalmology* 2008, 115(1):109-115.
115. Baudouin C, Hamard P, Liang H, Creuzot-Garcher C, Bensoussan L, Brignole F: Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Ophthalmology* 2004, 111(12):2186-2192.
116. Broadway D, Hitchings R, Grierson I: Topical antiglaucomatous therapy: adverse effects on the conjunctiva and implications for filtration surgery. *Journal of Glaucoma* 1995, 4(2):136.
117. Johnson DH, Yoshikawa K, Brubaker RF, Hodge DO: The effect of long-term medical therapy on the outcome of filtration surgery. *American journal of ophthalmology* 1994, 117(2):139-148.
118. Schork NJ: Personalized medicine: time for one-person trials. *Nature* 2015, 520(7549):609-611.
119. Rödl JB, Bleich S, Schlötzer-Schrehardt U, Von Ahsen N, Kornhuber J, Naumann GO, Kruse FE, Jünemann AG: Increased homocysteine levels in tear fluid of patients with primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Research* 2008, 40(5):249-256.
120. Perumal N, Funke S, Pfeiffer N, Grus FH: Proteomics analysis of human tears from aqueous-deficient and evaporative dry eye patients. *Scientific reports* 2016, 6(1):1-12.
121. Nättinen J, Jylhä A, Aapola U, Parkkari M, Mikhailova A, Beuerman RW, Uusitalo H: Patient stratification in clinical glaucoma trials using the individual tear proteome. *Scientific reports* 2018, 8(1):1-11.

122. Srinivasan S, Thangavelu M, Zhang L, Green KB, Nichols KK: iTRAQ quantitative proteomics in the analysis of tears in dry eye patients. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012, 53(8):5052-5059.
123. Hers H, Hue L: Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annual review of biochemistry* 1983, 52(1):617-653.
124. Baumann H, Gauldie J: The acute phase response. *Immunology today* 1994, 15(2):74-80.
125. Kushner I: The acute phase response: an overview. *Methods Enzymol* 1988 1988.
126. Schmidt A, Hall MN: Signaling to the actin cytoskeleton. *Annual review of cell and developmental biology* 1998, 14(1):305-338.
127. Mills JC, Stone NL, Pittman RN: Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. *The Journal of cell biology* 1999, 146(4):703-708.
128. Wittmann J, Dieckow J, Schröder H, Hampel U, Garreis F, Jacobi C, Milczarek A, Hsieh K, Pulli B, Chen J: Plasma gelsolin promotes re-epithelialization. *Scientific reports* 2018, 8(1):1-10.
129. Aghazadeh Y, Papadopoulos V: The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. *Drug discovery today* 2016, 21(2):278-287.
130. Shankardas J, Senchyna M, Dimitrijevic SD: Presence and distribution of 14-3-3 proteins in human ocular surface tissues. *Molecular vision* 2008, 14:2604.
131. Cejka C, Cejkova J: Oxidative stress to the cornea, changes in corneal optical properties, and advances in treatment of corneal oxidative injuries. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015, 2015.
132. Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X: Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2017, 1863(2):585-597.
133. Abadie V, Jabri B: IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunological reviews* 2014, 260(1):221-234.
134. Chen Q: The expression of interleukin-15 and interleukin-17 in tears and orbital tissues of Graves ophthalmopathy patients. *Journal of cellular biochemistry* 2019, 120(4):6299-6303.
135. Jabri B, Abadie V: IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nature Reviews Immunology* 2015, 15(12):771-783.
136. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM: Growing roles for the mTOR pathway. *Current opinion in cell biology* 2005, 17(6):596-603.
137. Laurence A, O'Shea JJ, Watford WT: Interleukin-22: a sheep in wolf's clothing. *Nature medicine* 2008, 14(3):247-249.
138. Chung Y, Yang X, Chang SH, Ma L, Tian Q, Dong C: Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4⁺ T lymphocytes. *Cell research* 2006, 16(11):902-907.
139. Ueta M, Kinoshita S: Innate immunity of the ocular surface. *Brain research bulletin* 2010, 81(2-3):219-228.
140. Yoon K-C, Jeong I-Y, Park Y-G, Yang S-Y: Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea* 2007, 26(4):431-437.

141. Acera A, Rocha G, Vecino E, Lema I, Durán JA: Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic research* 2008, 40(6):315-321.
142. Schultz CL, Kunert KS: Interleukin-6 levels in tears of contact lens wearers. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2000, 20(3):309-310.
143. Degranulation [<https://www.pschyrembel.de/Degranulation/A0VUB>]
144. Leonardi A: The central role of conjunctival mast cells in the pathogenesis of ocular allergy. *Current allergy and asthma reports* 2002, 2(4):325-331.
145. Lacy P: Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2006, 2(3):98.
146. Karnati R, Laurie DE, Laurie GW: Lacritin and the tear proteome as natural replacement therapy for dry eye. *Experimental eye research* 2013, 117:39-52.
147. Wang N, Zimmerman K, Raab RW, McKown RL, Hutnik CM, Talla V, Tyler MF, Lee JK, Laurie GW: Lacritin rescues stressed epithelia via rapid forkhead box O3 (FOXO3)-associated autophagy that restores metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 2013, 288(25):18146-18161.
148. McKown RL, Frazier EVC, Zadrozny KK, Deleault AM, Raab RW, Ryan DS, Sia RK, Lee JK, Laurie GW: A cleavage-potentiated fragment of tear lacritin is bactericidal. *Journal of Biological Chemistry* 2014, 289(32):22172-22182.
149. Gao J, Gelber-Schwalb TA, Addeo JV, Stern ME: Apoptosis in the lacrimal gland and conjunctiva of dry eye dogs. In: *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 2*. Springer; 1998: 453-460.
150. Chen Y, Mehta G, Vasiliou V: Antioxidant defenses in the ocular surface. *The ocular surface* 2009, 7(4):176-185.
151. Estey T, Piatigorsky J, Lassen N, Vasiliou V: ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. *Experimental eye research* 2007, 84(1):3-12.
152. Jirsova K, Neuwirth A, Kalasova S, Vesela V, Merjava S: Mesothelial proteins are expressed in the human cornea. *Experimental eye research* 2010, 91(5):623-629.
153. Dogru M, Matsumoto Y, Okada N, Igarashi A, Fukagawa K, Shimazaki J, Tsubota K, Fujishima H: Alterations of the ocular surface epithelial MUC16 and goblet cell MUC5AC in patients with atopic keratoconjunctivitis. *Allergy* 2008, 63(10):1324-1334.
154. Kebede M, Favalaro J, Gunton JE, Laybutt DR, Shaw M, Wong N, Fam BC, Aston-Mourney K, Rantza C, Zulli A *et al*: Fructose-1,6-bisphosphatase overexpression in pancreatic beta-cells results in reduced insulin secretion: a new mechanism for fat-induced impairment of beta-cell function. *Diabetes* 2008, 57(7):1887-1895.
155. Mamczur P, Mazurek J, Rakus D: Ubiquitous presence of gluconeogenic regulatory enzyme, fructose-1, 6-bisphosphatase, within layers of rat retina. *Cell and tissue research* 2010, 341(2):213-221.
156. Nättinen J, Jylhä A, Aapola U, Mäkinen P, Beuerman R, Pietilä J, Vaajanen A, Uusitalo H: Age-associated changes in human tear proteome. *Clinical proteomics* 2019, 16(1):1-11.
157. Checa-Rojas A, Delgadillo-Silva LF, del Castillo Velasco-Herrera M, Andrade-Domínguez A, Gil J, Santillán O, Lozano L, Toledo-Leyva A, Ramírez-Torres A,

- Talamas-Rohana P: GSTM3 and GSTP1: novel players driving tumor progression in cervical cancer. *Oncotarget* 2018, 9(31):21696.
158. Soria J, Acera A, Durán JA, Boto-de-Los-Bueis A, Del-Hierro-Zarzuolo A, González N, Reigada R, Suárez T: The analysis of human conjunctival epithelium proteome in ocular surface diseases using impression cytology and 2D-DIGE. *Experimental eye research* 2018, 167:31-43.
159. Groen EJ, Gillingwater TH: UBA1: at the crossroads of ubiquitin homeostasis and neurodegeneration. *Trends in molecular medicine* 2015, 21(10):622-632.
160. Leidecker O, Matic I, Mahata B, Pion E, Xirodimas DP: The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions. *Cell cycle* 2012, 11(6):1142-1150.
161. Mojzíkova R, Koralkova P, Holub D, Saxova Z, Pospisilova D, Prochazkova D, Dzubak P, Horvathova M, Divoky V: Two novel mutations (p.(Ser160Pro) and p.(Arg472Cys)) causing glucose-6-phosphate isomerase deficiency are associated with erythroid dysplasia and inappropriately suppressed hepcidin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2018, 69:23-29.
162. Fermo E, Vercellati C, Marcello AP, Zaninoni A, Aytac S, Cetin M, Capolsini I, Casale M, Paci S, Zanella A: Clinical and molecular spectrum of glucose-6-phosphate isomerase deficiency. Report of 12 new cases. *Frontiers in physiology* 2019, 10:467.
163. Karamichos D, Zieske J, Sejersen H, Sarker-Nag A, Asara JM, Hjortdal J: Tear metabolite changes in keratoconus. *Experimental eye research* 2015, 132:1-8.
164. Manicam C, Perumal N, Wasielica-Poslednik J, Ngongkole YC, Tschäbunin A, Sievers M, Lisch W, Pfeiffer N, Grus FH, Gericke A: Proteomics unravels the regulatory mechanisms in human tears following acute renouncement of contact lens use: a comparison between hard and soft lenses. *Scientific reports* 2018, 8(1):1-15.
165. Faik P, Walker JI, Redmill AA, Morgan MJ: Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature* 1988, 332(6163):455-456.
166. Funasaka T, Haga A, Raz A, Nagase H: Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochemical and biophysical research communications* 2001, 284(5):1116-1125.
167. Haga A, Niinaka Y, Raz A: Phosphohexose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 2000, 1480(1-2):235-244.
168. Naughton D: Hypoxia-induced upregulation of the glycolytic enzyme glucose-6-phosphate isomerase perpetuates rheumatoid arthritis. *Medical Hypotheses* 2003, 60(3):332-334.
169. Tomasello L, Coppola A, Pitrone M, Failla V, Cillino S, Pizzolanti G, Giordano C: PFN1 and integrin- β 1/mTOR axis involvement in cornea differentiation of fibroblast limbal stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 2019, 23(11):7210-7221.

170. Chen Y, Koppaka V, Thompson DC, Vasiliou V: ALDH1A1: from lens and corneal crystallin to stem cell marker. *Experimental eye research* 2012, 102:105.
171. Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson RT, Fujiwara Y, Orkin SH, Van Etten RA: Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 2003, 424(6948):561-565.
172. Jung JH, Ji YW, Hwang HS, Oh JW, Kim HC, Lee HK, Kim KP: Proteomic analysis of human lacrimal and tear fluid in dry eye disease. *Scientific reports* 2017, 7(1):1-11.
173. Soria J, Durán JA, Etxebarria J, Merayo J, González N, Reigada R, García I, Acera A, Suárez T: Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamer panel for tear film characterization in dry eye and meibomian gland dysfunction. *Journal of proteomics* 2013, 78:94-112.
174. Stoeckelhuber M, Messmer EM, Schmidt C, Xiao F, Schubert C, Klug J: Immunohistochemical analysis of secretoglobin SCGB 2A1 expression in human ocular glands and tissues. *Histochemistry and cell biology* 2006, 126(1):103-109.
175. Barka T, Asbell PA, van der Noen H, Prasad A: Cystatins in human tear fluid. *Current eye research* 1991, 10(1):25-34.
176. Funke S, Azimi D, Wolters D, Grus FH, Pfeiffer N: Longitudinal analysis of taurine induced effects on the tear proteome of contact lens wearers and dry eye patients using a RP-RP-Capillary-HPLC–MALDI TOF/TOF MS approach. *Journal of proteomics* 2012, 75(11):3177-3190.
177. Ryan G, Fain JM, Lovelace C, Gelotte KM: Effectiveness of ophthalmic solution preservatives: a comparison of latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride and travoprost with the sofZia preservative system. *BMC ophthalmology* 2011, 11(1):8.
178. Ammar DA, Noecker RJ, Kahook MY: Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Advances in therapy* 2010, 27(11):837-845.

Anhang

Tabelle 7: AIMS Peptidliste

Genname	Sequenz	Length	m/z(2+)	Charge(+)	m/z (+)	Score
A2M	AIGYLNTGYQR	11	628,32	2	1254,6	157
ACTN4	LSGSNPYTTVTPQIINSK	18	960,50	2	1919,0	170
AGR2	GWGDQLIWTQTYEEALYK	18	1101,02	2	2200,0	267
AKR1A1	GLVQALGLSNFNSR	14	738,39	2	1474,8	145
ALB	VPQVSTPTLVEVSR	14	756,42	2	1510,8	153
ALDH1A1	IFVEESIYDEFVR	13	823,40	2	1644,8	241
ALDH3A1	SLEEAIQFINQR	12	724,37	2	1446,7	208
ANXA1	GLGTDEDTLIEILASR	16	851,94	2	1701,9	191
ANXA2	AEDGSVIDYELIDQDAR	17	954,94	2	1907,9	183
ANXA3	GAGTNEDALIEILTTR	16	837,43	2	1672,9	153
ANXA5	GTVTDFPGFDER	12	670,80	2	1339,6	96
ANXA5	SEIDLFNIR	9	553,79	2	1105,6	136
APOA1	VSFLSALEEYTK	12	693,85	2	1385,7	189
APOBEC3A	IYDYDPLYK	9	595,29	2	1188,6	148
APOD	NILTSNNIDVK	11	615,83	2	1229,7	13
AZGP1	YSLTYIYTGLSK	12	704,86	2	1407,7	210
C3	IPIEDGSGEVVLSR	14	735,89	2	1469,8	224
CALR	FYALSASFEPFSNK	14	804,38	2	1606,8	173
CASP14	LENLFEALNNK	11	652,84	2	1303,7	240
CLU	LFSDSPITVTVPEVSR	17	937,49	2	1873,0	228
CMPK1	SVDEVFDEVVQIFDK	15	884,93	2	1767,9	216
CNDP2	LPDGSEIPLPPILLGR	16	843,99	2	1686,0	123
CP	GAYPLSIEPIGVR	13	686,38	2	1370,8	146
CST1	QQTVGGVNYFFDVEVGR	17	957,96	2	1913,9	181
CST3	ALDFAVGEYNK	11	613,80	2	1225,6	199
CST4	EQTFGGVNYFFDVEVGR	17	982,46	2	1962,9	203
CSTA	SLPGQNEDLVLTGYQVDK	18	988,49	2	1975,0	43
CSTB	SQVVAGTNYFIK	12	663,85	2	1325,7	225
CTSB	NGPVEGAFSVYSDFLLYK	18	1003,49	2	2005,0	130
CTSD	YSQAVPAVTEGPIPEVLK	18	949,51	2	1897,0	115
DMBT1	FGQSGPIVLDDVR	14	730,37	2	1458,7	260
EEF1A1	LPLQDVYK	8	488,27	2	974,5	154
EEF1A1	IGGIGTVPVGR	11	513,30	2	1024,6	162
ENO1	GNPTVEVDLFTSK	13	703,85	2	1405,7	212
EZR	FYPEDVAEELIQDITQK	17	1019,50	2	2037,0	274

Genname	Sequenz	Length	m/z(2+)	Charge(+)	m/z (+)	Score
FBP1	APVILGSPDDVLEFLK	16	856,97	2	1711,9	193
GDI2	DLGTESQIFISR	12	683,35	2	1364,7	221
GPI	TLAQLNPESLFIASK	17	916,50	2	1831,0	193
GSN	QTQVSVLPEGGETPLFK	17	915,48	2	1829,0	244
GSTP1	FQDGLTLTLYQSNTILR	16	942,47	2	1882,9	362
HEBP2	NQEQLLTLASILR	13	749,93	2	1497,9	255
HP	VTSIQDWVQK	10	602,31	2	1202,6	186
HPX	NFPSPVDAEFR	11	610,80	2	1219,6	131
HSPA8	SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK	23	1130,57	2	2259,1	188
HSPB1	LFDQAFGLPR	10	582,31	2	1162,6	194
HSPG2	LEGDTLIIPR	10	563,82	2	1125,6	162
IGHA1	DASGVTFTWTPSSGK	15	770,86	2	1539,7	186
IGHM	QVGSGVTTDQVQAEAK	16	809,40	2	1616,8	299
IGJ	SSEDPNEDIVER	12	695,30	2	1388,6	149
IGKC	DSTYLSSTLTLSK	14	751,88	2	1501,8	184
IGLC3	YAASSYLSLTPEQWK	15	872,43	2	1742,9	206
ITIH2	IQPSGGTNINEALLR	15	791,92	2	1581,8	82
LACRT	SILLTEQALAK	11	593,85	2	1185,7	190
LCN1	NNLEALEDFEK	11	661,31	2	1320,6	256
LCN2	VPLQQNFQDNQFQGK	15	895,94	2	1789,9	273
LDHA	DLADELALVDVIEDK	15	829,42	2	1656,8	260
LGALS3	GNDVAFHFNPR	11	637,30	2	1272,6	173
LGALS3BP	SDLAVPSELALLK	13	678,39	2	1354,8	32
LTF	DVTVLQNTDGNNNEAWAK	18	994,96	2	1987,9	342
LYZ	STDYGIFQINSR	12	700,84	2	1399,7	218
MSLN	GLLPVLGQPIIR	12	638,40	2	1274,8	134
NUCB1	LPEVEVPQHL	10	580,81	2	1159,6	112
NUCB2	LVTLEEFK	9	546,31	2	1090,6	53
P4HB	ILEFFGLK	8	483,78	2	965,6	133
PEBP1	GNDISSGTVLSDYVVGSGPPK	20	975,47	2	1948,9	271
PFN1	TFVNITPAEVGVLVGK	16	822,46	2	1642,9	197
PIGR	DGSFSVVITGLR	12	625,83	2	1249,7	171
PIP	TVQIAAVVDVIR	12	642,38	2	1282,8	199
PKM	DPVQEAWAEDVDLR	14	821,88	2	1641,8	213
PPIA	FEDENFILK	9	577,78	2	1153,6	240
PRDX1	TIAQDYGVK	10	554,30	2	1106,6	198
PRDX5	THLPGFVEQAEALK	14	770,40	2	1538,8	114
PRDX6	LPFPIIDDR	9	543,30	2	1084,6	166
PROL1	FSQAVILSQLFPLESIR	17	974,54	2	1947,1	254

Genname	Sequenz	Length	m/z(2+)	Charge(+)	m/z (+)	Score
PRR4_N1	HPPPPPFQNNQRPPQR	16	960,99	2	1920,0	85
PRR4_N2	HPPPPPFQNNQRPPR	15	896,96	2	1791,9	94
PRR4_N3	FPSVSLQEASSFFQR	15	865,42	2	1728,8	218
PRR4_N4	FPSVSLQEASSFFR	14	801,39	2	1600,8	226
RBP4	YWGVASFLQK	10	599,81	2	1197,6	98
RNASE4	FNTFIHEDIWNIR	13	852,92	2	1703,8	10
S100A11	DGYNYTLSK	9	530,74	2	1059,5	181
S100A4	ELPSFLGK	8	445,75	2	889,5	84
S100A8	ALNSIIDVYHK	11	636,84	2	1271,7	205
S100A9	NIETIINTFHQYSVK	15	903,97	2	1805,9	292
S100P	ELPGFLQSGK	10	538,29	2	1074,6	108
SCGB1D1	APLEAVAAK	9	435,25	2	868,5	167
SCGB2A1	ELLQEFIDSDAAAEAMGK	18	969,45	2	1936,9	299
SELENBP1	NTGTEAPDYLATVDVDPK	18	953,45	2	1904,9	268
SERPINA1	ITPNLAEFASFSLYR	14	821,43	2	1640,9	155
SERPINA3	AVLDVFEEGTEASAATAVK	19	954,48	2	1907,0	213
SERPINB1	LGVQDLFNSSK	11	604,31	2	1206,6	110
SFN	YLAEVATGDDK	11	591,28	2	1180,6	194
SOD1	GDGPVQGIINFEQK	14	751,38	2	1500,8	196
SOD2	GDVTAQIALQPALK	14	712,90	2	1423,8	142
TAGLN2	DDGLFSGDPNWFPK	14	797,86	2	1593,7	142
TCN1	GTSAVNVVLSLK	12	594,35	2	1186,7	179
TGM2	TVEIPDPVEAGEEVK	15	806,40	2	1610,8	159
TKT	ILATPPQEDAPSVDIANIR	19	1010,53	2	2019,1	206
TPM4	IQALQQQADEAEDR	14	807,88	2	1613,8	225
TTR	YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK	22	1180,62	2	2359,2	97
TXN	TAFQEALDAAGDK	13	668,82	2	1335,6	255
UBA1	YDGQVAVFGSDLQEK	15	828,39	2	1654,8	202
UBA52	TITLEVEPSDTIENVK	16	894,46	2	1786,9	163
YWHAB	YLIPNATQPESK	12	680,85	2	1359,7	167
YWHAZ	GIVDQSQQAYQEAFEISK	18	1020,99	2	2040,0	347
ZG16B	YFSTTEDYDHEITGLR	16	973,93	2	1945,9	226

Tabelle 8: Darstellung der signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen GLM + DRYaq und CTRL.

Genname	Discovery proteomics I		Discovery proteomics II	
	p-Wert	Log ₂ Differenz	p-Wert	Log ₂ Differenz
ABRACL			3.36E-02	3.16
ACTA1	2.43E-03	3.43		
ACTB			3.85E-02	0.59
ACTG1	2.43E-02	0.67		
AKR1A1	1.74E-03	2.91		
ALDH1A1	1.60E-03	3.95		
ALDH3A1	5.67E-04	4.75		
ALDOA			2.86E-02	1.01
AMY1A			3.78E-02	-1.83
ANXA1	2.09E-02	-4.59		
ANXA3			3.22E-02	0.96
APOA1			1.54E-02	2.85
APOD	3.84E-04	4.74		
ARHGDIB			6.64E-03	1.18
AZGP1	8.80E-03	-0.51	2.73E-02	-1.58
B2M	4.32E-02	-0.86	1.13E-03	-3.74
BANF1			3.40E-02	2.24
C3			4.33E-02	0.57
C4B			4.68E-02	2.13
CALM3			9.32E-03	1.41
CALU			7.67E-03	-1.03
CAPN1			3.90E-02	0.46
CFB			4.09E-02	0.81
CHI3L2			7.84E-03	-1.97
CST1	7.05E-04	-1.40		
CST3			1.04E-02	-1.50
CST4	2.22E-03	-0.89	1.19E-02	-2.01
CSTA	2.29E-05	3.81		
CTSD			4.03E-02	-0.91
CTTN			1.62E-02	2.22
DCD			6.78E-03	-1.94
DEFA3	1.17E-04	3.85		
ENO1	2.34E-04	1.56		
FABP5	4.25E-02	1.42	3.39E-02	1.03
FBP1			1.64E-02	1.30
FGA			1.53E-03	1.60
FGG			2.67E-02	3.72
GC			6.39E-03	1.27
GDI2			7.33E-03	1.25
GPI	2.00E-02	2.03		
GSN	7.18E-03	2.04		
GSR			1.38E-02	2.53
GSTP1	1.08E-03	1.06		
HINT1			1.79E-03	4.31
HP	1.69E-02	-0.51	3.23E-02	0.92
HSP90AA1			3.67E-02	0.73
HSPA8			2.29E-02	0.60
HSPB1	5.57E-04	4.32	1.95E-03	0.73
HSPG2			6.86E-04	-2.16
IGHA1	1.02E-02	-0.43	1.19E-02	-1.35
IGHA2	1.25E-02	-1.02		
IGHG1	3.08E-03	4.42		
IGHG2	1.69E-02	4.32		
IGJ	2.11E-02	-0.88		

Genname	Discovery proteomics I		Discovery proteomics II	
	p-Wert	Log ₂ Differenz	p-Wert	Log ₂ Differenz
IGK	4.89E-04	-0.39	6.79E-04	-1.83
IGKV3-20	5.57E-03	-0.36		
IGLC6			4.63E-02	-1.24
IGLL5	2.53E-02	-0.34		
KRT1			2.27E-02	-1.71
KRT2			2.94E-02	-2.10
LACRT	2.97E-03	-1.55	3.18E-02	-1.49
LCN1			6.36E-03	-1.48
LDHA	7.54E-04	4.13		
LGALS3	4.03E-04	3.97		
LTF	4.70E-04	0.53	1.23E-02	-2.54
LYZ	2.01E-02	0.23	4.91E-04	-2.94
MDH1	3.57E-02	2.71		
MSLN	1.07E-04	-2.29	4.14E-02	-0.68
MYL6			1.16E-02	1.15
NUCB2			2.49E-03	-1.37
ORM1	1.29E-02	3.22		
P4HB			3.00E-02	0.63
PEBP1	5.21E-04	1.05		
PFN1			1.10E-02	0.64
PIGR	4.26E-04	-0.85	1.02E-04	-1.91
PIP			2.16E-03	-2.09
PKM	3.12E-02	3.95	1.76E-02	0.78
PLA2G2A	5.04E-05	-6.05		
PPA1			8.13E-03	0.93
PRDX1	5.77E-03	1.56		
PRDX2	1.06E-03	1.64		
PRDX6			6.93E-04	0.55
PROL1	1.05E-02	-3.48	2.95E-02	-4.42
PRR4	7.02E-05	-1.70	4.37E-02	-1.34
PSMA7			3.20E-02	1.00
S100A11			5.22E-03	1.69
S100A6			2.55E-04	1.23
S100A8	2.71E-04	1.80		
S100A9	1.90E-03	2.56	4.66E-03	2.74
SELENBP1	1.57E-02	1.75		
SERPINA1			7.31E-03	2.63
SERPINB1	1.38E-02	4.20	2.28E-02	0.74
SFN	4.89E-04	3.62		
SH3BGRL			4.09E-02	0.48
SMR3B			7.93E-05	-7.33
SPARCL1			1.16E-02	-1.59
TCN1	4.47E-03	-1.64	1.23E-02	-1.24
TF	6.40E-03	3.84		
TGM2			3.78E-02	0.41
TIMP1			2.14E-02	-1.82
TMSB10			4.42E-02	0.78
TPI1	8.23E-03	2.56	1.63E-02	0.77
UBA52	2.61E-03	4.92		
YWHAB	3.86E-03	2.02		
YWHAE	5.80E-03	2.99		
YWHAH			2.61E-02	1.95
YWHAZ	2.42E-04	3.69	2.15E-02	0.67
ZG16B			2.40E-03	-3.31

Tabelle 9: Ergebnisse statistische Auswertung

Zur Darstellung der Signifikanz der Angaben wurden der p-Wert und die log₂ Differenz herangezogen.

Gene names	ANOVA p-Wert	Student's T-Test											
		GLM vs. CTRL		GLM + DRYaq vs. CTRL		DRYaq vs. CTRL		GLM + DRYaq vs. GLM		DRYaq vs. GLM		DRYaq vs. GLM + DRYaq	
		p-Wert	Log ₂ Differenz	p-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz
ACTN4	2,36E-03			2,78E-04	1,31	7,62E-04	1,09						
ALDH1A1	2,41E-03	1,51E-02	1,31	1,51E-03	1,66								
ALDH3A1	2,92E-02							1,56E-02	1,42	1,55E-02	1,71		
ANXA2	3,19E-02			4,46E-02	0,54			1,38E-03	0,84			2,62E-02	-0,83
APOBEC3A	9,52E-03			2,17E-02	1,08	1,05E-02	1,78			2,51E-02	1,41		
C3	7,13E-03			1,69E-03	1,86							7,41E-03	-2,63
CALR	1,05E-02			8,14E-03	1,66			1,26E-02	1,29				
CASP14	2,87E-04			6,05E-05	1,31	4,26E-03	1,22	7,67E-03	0,82				
CST1	4,07E-02			1,39E-02	-1,57								
CST4	2,65E-02			5,08E-03	-1,07	3,07E-02	-1,13						
CSTB	2,92E-02			2,46E-02	1,48								
ENO1	8,25E-04			1,28E-05	1,49			2,48E-03	1,23				
FBP1	3,12E-05	4,29E-03	2,37	8,25E-07	3,75	2,93E-03	2,80	4,87E-02	1,38				
GDI2	1,36E-02			1,09E-02	1,57	4,63E-02	1,51	3,74E-02	0,91				
GPI	1,59E-03	3,83E-02	2,09	1,06E-04	3,77			4,28E-02	1,68				
GSN	1,54E-05	9,08E-04	0,78	4,39E-06	1,16	2,65E-03	0,73						
GSTP1	3,05E-05	9,38E-03	0,74	8,26E-06	1,39	2,59E-02	0,84	4,51E-03	0,65				
HPX	1,84E-03			2,47E-02	2,19	4,04E-03	2,85	9,90E-03	2,37	9,53E-04	3,03		

Tabelle 9: (Fortsetzung)

		Student's T-Test											
		GLM vs. CTRL		GLM + DRYaq vs. CTRL		DRYaq vs. CTRL		GLM + DRYaq vs. GLM		DRYaq vs. GLM		DRYaq vs. GLM + DRYaq	
Gene names	ANOVA p-Wert	p-Wert	Log ₂ Differenz	p-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz
HSPB1	2,92E-02			1,13E-02	-1,54			2,15E-02	-1,31				
LACRT	9,89E-04	1,16E-02	-1,71	7,42E-06	-2,38	4,34E-04	-1,86						
LYZ	2,46E-02											5,55E-04	-7,27
MSLN	2,05E-03	1,91E-02	-1,29	3,81E-04	-1,57	2,24E-03	-1,72						
PEBP1	6,62E-05	1,20E-02	1,38	1,05E-04	2,11			8,53E-03	0,73			1,70E-03	-1,00
PFN1	7,83E-03	9,65E-03	0,76	1,51E-03	1,04								
PIP	3,73E-02							2,95E-04	-1,15	2,19E-03	-1,37		
PRDX1	1,49E-02	2,90E-02	0,70	1,23E-04	1,11							2,96E-02	-1,78
PRDX5	1,67E-02			9,20E-03	1,32								
PROL1	3,34E-02			2,95E-03	-3,50								
PRR4	2,61E-03			1,00E-02	-1,16	4,93E-02	-1,02	1,64E-03	-1,25	1,04E-02	-1,11		
S100A9	5,83E-03			6,44E-03	2,23			1,23E-02	1,04				
S100P	3,09E-05			1,93E-05	3,19	9,70E-05	3,61	1,58E-02	1,83	2,12E-02	2,25		
SCGB1D1	9,76E-05	6,61E-04	-1,85	1,44E-05	-3,21	1,62E-03	-2,87	4,24E-02	-1,36				
SCGB2A1	9,18E-05	9,80E-03	-1,35	7,51E-06	-2,94	2,41E-03	-2,56	1,07E-02	-1,59				
SELENBP1	1,48E-02			3,45E-06	1,83	2,55E-03	1,20	2,70E-02	1,92				
SERPINA3	3,19E-02			6,67E-03	1,61							3,53E-02	-1,25
SFN	2,03E-02			1,99E-02	1,82	4,43E-02	1,98	2,49E-02	1,56	4,58E-02	1,72		
SOD2	2,64E-03			6,70E-05	2,19	1,43E-03	1,87						

Tabelle 9: (Fortsetzung)

		Student's T-Test											
		GLM vs. CTRL		GLM + DRYaq vs. CTRL		DRYaq vs. CTRL		GLM + DRYaq vs. GLM		DRYaq vs. GLM		DRYaq vs. GLM + DRYaq	
Gene names	ANOVA p-Wert	p-Wert	Log ₂ Differenz	p-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz	P-Wert	Log ₂ Differenz
TCN1	2,39E-04			4,72E-03	-0,90	2,82E-03	-1,94	9,71E-03	-0,87	3,35E-03	-1,91		
TKT	1,14E-05			9,13E-07	2,16	4,64E-02	1,00	3,81E-04	1,44			1,59E-03	-1,15
TPM4	6,83E-06			1,32E-07	3,13			1,28E-05	2,80			1,48E-02	-1,92
TXN	3,71E-02			1,17E-02	2,41			6,24E-03	0,68				
UBA1	3,04E-03	4,27E-02	1,69	1,80E-03	2,35	4,73E-02	1,87						
UBA52	1,15E-03			5,51E-04	1,58			1,83E-03	0,85				
YWHAB	1,11E-04	1,16E-02	1,13	1,41E-04	1,66	5,43E-03	1,51						
YWHAZ	5,52E-06	1,04E-02	0,82	2,72E-06	1,66	3,68E-03	1,21	2,27E-03	0,84				
ZG16B	1,39E-08	8,80E-03	-1,12	2,30E-08	-2,82	2,29E-06	-2,52	4,01E-04	-1,70	1,13E-02	-1,39		

Tabelle 10: p-Werte Canonical Pathways

Canonical Pathways	Discovery		AIMS					
	Discovery I	Discovery II	GLM vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. CTRL	DRYaq vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM+DRYaq
Glycolysis I	3.57E-05	6.24E-05	4.04E-03	8.39E-04	6.63E-02	1.53E-04		
Gluconeogenesis I	5.91E-04	3.93E-02	4.04E-03	8.39E-04	6.63E-02	1.53E-04		
Acute Phase Response Signaling	3.14E-02	9.41E-06		3.32E-02	5.58E-02	2.11E-01	8.06E-02	6.75E-02
14-3-3-mediated Signaling	2.16E-03	1.88E-01	1.79E-02	1.80E-02	3.13E-03	5.12E-02	6.96E-02	
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	1.05E-03	2.87E-01	2.39E-02	7.65E-03	5.79E-02	6.00E-02		6.75E-02
Actin Cytoskeleton Signaling	4.31E-02	5.57E-02	2.47E-02	4.52E-02	6.06E-02			

Tabelle 11: p-Werte Upstream Regulators

Upstream Regulators	Discovery		AIMS					
	Discovery I	Discovery II	GLM vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. CTRL	DRYaq vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM+DRYaq
IL15	3.84E-04	2.53E-06	2.23E-02	4.45E-04	3.09E-02	1.19E-02		
IL1B	5.73E-04	1.00E-04						
IL22	4.63E-03	1.56E-04		6.92E-04		9.99E-02		1.26E-01
IL6	2.14E-03	6.81E-05		2.29E-01				9.41E-02
MTOR	1.25E-04	9.69E-03		6.91E-02				
TGFB1	5.07E-03	8.72E-08		8.33E-02	3.54E-01	1.41E-01		
TNF	4.76E-06	3.87E-08		1.38E-01		1.44E-01		

Tabelle 12: z-score Upstream Regulators

Upstream Regulators	Discovery		AIMS					
	Discovery I	Discovery II	GLM vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. CTRL	DRYaq vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM+DRYaq
IL15	2.24E+00	5.85E-01	N/A	1.19E+00	N/A	1.19E+00	N/A	N/A
IL1B	-9.67E-01	4.69E-01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
IL22	5.33E-01	1.67E+00	N/A	2.20E+00	N/A	N/A	N/A	N/A
IL6	4.09E-01	1.58E+00	N/A	1.93E+00	N/A	N/A	N/A	N/A
MTOR	2.59E+00	2.39E+00	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TGFB1	1.10E+00	5.57E-01	N/A	-2.51E-01	-1.98E+00	0.00E+00	N/A	N/A
TNF	-2.26E-01	1.29E-01	N/A	2.24E-01	N/A	-3.91E-01	N/A	N/A

Tabelle 13 p-Werte diseases and biological functions

Diseases and Bio Functions	Discovery		AIMS					
	Discovery I	Discovery II	GLM vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. CTRL	DRYaq vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM+DRYaq
Antimicrobial response	4.79E-10	3.44E-04		1.66E-02		5.32E-02		
Apoptosis	8.60E-07	3.11E-06	3.78E-03	7.00E-07	2.42E-02	6.93E-04		5.21E-02
Cell movement	4.97E-10	2.89E-13	3.68E-02	3.33E-04	4.64E-02	2.29E-03		5.25E-03
Classical complement pathway	8.30E-04	1.81E-02						
Degranulation of cells	1.99E-12	5.79E-21		4.29E-06	1.53E-02			
Dry eye	2.05E-03	3.62E-04			9.57E-02		5.83E-02	3.32E-02
Endocytosis	2.07E-06	1.56E-06	1.87E-02	4.65E-03	2.23E-02	2.02E-02		
Immune response of cells	3.15E-04	9.52E-06						
Inflammatory response	1.19E-05	3.46E-06		1.36E-02				1.71E-02
Metabolism of protein	4.95E-04	2.07E-11		3.26E-03	8.72E-02	1.22E-02		
Receptor-mediated endocytosis	1.64E-04	2.03E-06			8.16E-02	2.34E-02	3.42E-02	
Synthesis of reactive oxygen species	1.54E-06	1.23E-07	8.31E-03	8.27E-05	1.57E-02	1.35E-02		

Tabelle 14 z-Score diseases and biological functions

Diseases and Bio Functions	Discovery		AIMS					
	Discovery I	Discovery II	GLM vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. CTRL	DRYaq vs. CTRL	GLM+DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM	DRYaq vs. GLM+DRYaq
Antimicrobial response	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Apoptosis	-2.19E+00	-1.17E+00	-1.31E+00	-1.18E+00	-1.39E+00	9.40E-02	N/A	2.80E-01
Cell movement	1.53E+00	4.21E+00	2.84E-01	2.15E+00	1.38E+00	1.55E+00	N/A	5.05E-01
Classical complement pathway	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Degranulation of cells	8.32E-01	2.18E+00	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Dry eye	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Endocytosis	-7.20E-01	1.57E+00	0.00E+00	8.30E-01	1.52E-01	-4.10E-01	N/A	N/A
Immune response of cells	6.30E-02	1.95E-01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Inflammatory response	1.94E+00	1.40E+00	N/A	1.41E+00	N/A	N/A	N/A	N/A
Metabolism of protein	1.17E+00	7.11E-01	N/A	-5.64E-01	8.49E-01	-2.18E-01	N/A	N/A
Receptor-mediated endocytosis	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Synthesis of reactive oxygen species	-9.34E-01	1.73E+00	-1.33E+00	-1.37E+00	-1.35E+00	7.28E-01	N/A	N/A

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater bedanken. Er ermöglichte es mir, meine Dissertation unter seiner Leitung im Fachbereich der experimentellen Ophthalmologie schreiben zu dürfen und somit wertvolle Erfahrungen in der wissenschaftlichen Forschung zu sammeln.

Darüber hinaus danke ich ganz besonders bei meinem Betreuer für die außerordentlich gute Betreuung und Unterstützung sowie die motivierenden Worte und klugen Ratschläge in allen Lebenslagen. Außerdem möchte ich mich bei seiner Frau für ihre netten Worte, die Unterstützung und Anregungen während meiner Zeit im Labor bedanken sowie beim gesamten Team der experimentellen Ophthalmologie.

Der größte Dank aber gilt meiner Familie: Meiner Schwester, die immer ein offenes Ohr und einen klugen Ratschlag für mich hat und mich vor allem in der Endphase dieser Arbeit durch den fachlichen Austausch und die gewissenhafte Korrektur enorm unterstützt hat. Weiterhin möchte ich meinem Bruder danken, der mich erst dazu ermutigte, eine Forschungsarbeit im Bereich der Augenheilkunde zu beginnen. Außerdem meinen Großeltern für die großzügige Unterstützung während meines Studiums und in der Schreibphase. Ich danke meinem Vater, der mich vor allem im Laufe meiner akademischen Ausbildung mit aller Kraft unterstützt und mich stets ermutigt hat über mich hinaus zu wachsen und natürlich meiner Mutter, die mich mit ihren weisen Worten, ihrer unendlichen Liebe und ihrer aufopferungsvollen Art immer unterstützt hat. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Danke, dass ich zu jeder Zeit meines Lebens auf euch zählen kann.

Tabellarischer Lebenslauf

Laura Carolin Gronbach

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	03.07.1994, in Speyer.
Staatsangehörigkeit	deutsch.
Familienstand	ledig.

Beruf

Seit 06.2019	Assistenz Zahnärztin, Mainz.
--------------	------------------------------

Ausbildung

10.2013 – 11.2018	Zahnmedizinstudium, JGU Mainz.
11.2018	Zahnärztliche Prüfung (Note: sehr gut).
03.2016	Zahnärztliche Vorprüfung (Note: sehr gut).
09.2014	Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Note: sehr gut).
03.2013	Abitur, Friedrich-Magnus-Schwerd-Gymnasium, Speyer.

Sonstige Qualifikationen

Seit 2018	Dissertation Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
04.2015 – 10.2015	Studentische Hilfskraft Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Sprachkenntnisse

Muttersprache	Deutsch.
Fließend	Englisch.
Grundkenntnisse	Französisch. Spanisch.