

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

**Charakterisierung von Glykoproteinen im humanen Tränenfilm und die Anwendung von
synthetischen Antikörper-Peptiden als neue Therapieform bei der Glaukom-Erkrankung**

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

Vorgelegt von

Alina Brück
aus Gerolstein

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 12. Juli 2022

Für Pidli

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG / ZIEL DER DISSERTATION	1
2 LITERATURDISKUSSION.....	2
2.1 Dry Eye-Syndrom	2
2.1.1 Definition und Epidemiologie	2
2.1.2 Ätiologie und Einteilung	2
2.1.2.1 Verdunstung des Tränenfilms (EDE)	3
2.1.2.2 Defizit der wässrigen Phase des Tränenfilms (ADDE)	3
2.1.3 Risikofaktoren	3
2.1.4 Symptome	4
2.1.5 Diagnostik	4
2.1.6 Therapie	5
2.1.7 Das Tränenorgan und die <i>Lacrimal functional unit</i>	6
2.1.7.1 Der Tränenfilm.....	6
2.1.8 Das Tränenproteom	8
2.1.9 Glykosylierung von Proteinen	9
2.2 Glaukom	11
2.2.1 Die Retina und retinale Ganglienzellen	11
2.2.2 Definition und Epidemiologie	12
2.2.3 Klassifikation, Pathogenese und Klinik	13
2.2.3.1 Primäres Offenwinkelglaukom (POWG).....	13
2.2.3.2 Primäres Geschlossenwinkelglaukom (PGWG)	14
2.2.3.3 Normaldruckglaukom (NDG).....	15
2.2.3.4 Okulare Hypertension (OHT)	15
2.2.4 Risikofaktoren und Ursachen	15
2.2.5 Diagnose	15
2.2.6 Therapie	16
2.2.7 Aufbau von Antikörpern	17
2.2.8 Glaukom und Autoimmunität	17
2.2.9 Synthetische CDR-Peptide	19
3 MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1 Materialien Dry Eye-Syndrom	21
3.2 Methoden Dry Eye-Syndrom	24

3.2.1	Angaben zu den Studienproben	25
3.2.2	Probenentnahme	25
3.2.3	Proteinbestimmung	26
3.2.4	Herstellung der Tränenpools	26
3.2.5	Anreicherung mittels Lektin-Affinitätschromatographie	26
3.2.6	Probenvorbereitung für die Anreicherung auf Proteinebene	27
3.2.6.1	PNGase F-Verdau von Glykoproteinen.....	27
3.2.6.2	Reduzierte Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
3.2.6.3	Coomassie- und Glykoprotein-Färbung	28
3.2.7	Probenvorbereitung für die Anreicherung auf Peptidebene	29
3.2.7.1	In-Lösung Trypsin-Verdau	29
3.2.7.2	Peptidaufreinigung.....	29
3.2.7.3	Peptidbestimmung.....	29
3.2.7.4	PNGase F-Verdau von Glykopeptiden.....	30
3.2.7.5	Massenspektrometrie	30
3.2.7.6	Identifikation von N-Glykosylierungsstellen.....	31
3.3	Materialien Glaukom	32
3.4	Methoden Glaukom	35
3.4.1	Retina Organkultur und immunhistologische Färbung	35
3.4.1.1	Synthetische CDR-Peptide	35
3.4.1.2	Herstellung von Organkulturmedium.....	35
3.4.1.3	Herstellung der Explantate.....	35
3.4.1.4	Immunhistologische Färbung.....	36
3.4.2	Proteomik	36
3.4.2.1	Probenvorbereitung	36
3.4.2.2	Peptidaufreinigung.....	37
3.4.2.3	Massenspektrometrie	37
3.4.2.4	Proteinidentifikation und Quantifizierung.....	38
3.4.2.5	Datenanalyse und Statistik	38
3.4.2.6	Funktionale Signalwegsanalyse.....	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	Dry Eye-Syndrom	39
4.1.1	Etablierung einer Methode zur Anreicherung von Glykoproteinen und Glykopeptiden	39
4.1.1.1	Anreicherung von Glykoproteinen.....	40
4.1.1.2	Anreicherung von Glykopeptiden	44
4.2	Glaukom	51
4.2.1	CDR-induzierte Effekte im <i>in vitro</i> Glaukommodell	51

4.2.1.1	Ergebnisse der immunohistologischen Färbung	51
4.2.1.2	Ergebnisse der MS-basierten proteomischen Analyse.....	53
4.2.1.3	Signalwegsanalyse	55
5	DISKUSSION	57
5.1	Dry Eye-Syndrom	57
5.1.1	Etablierung einer Methode zur Anreicherung von Glykoproteinen	58
5.1.2	MS-basierte Identifizierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden	60
5.2	Glaukom	64
5.2.1	CDR-induzierte Effekte im <i>in vitro</i> Glaukommodell	64
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
7	LITERATURVERZEICHNIS	71
8	DANKSAGUNG	VIII
9	TABELLARISCHER LEBENSLAUF	IX

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAK	Autoantikörper
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
ADDE	<i>Aqueous-Deficient Dry Eye</i>
Ak	Antikörper
ANP32A	Leucin-reiches Kernphosphoprotein 32A
AS	Ameisensäure
AS-OCT	Optische Kohärenztomographie (<i>anterior segment optical coherence tomography</i>)
BAK	Benzalkoniumchlorid
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	Wachstumsfaktor (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BEH	behandelte Gruppe
Brn3a	<i>Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A</i>
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region (<i>complementarity determining region</i>)
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision-induced dissociation</i>)
ConA	Concanavalin A
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DES	Dry Eye-Syndrom
DF	Durchflussfraktion
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDE	<i>Evaporative Dry Eye</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Essigsäure
EtOH	Ethanol
Fab	Antigenbindendes Fragment (<i>fragment antigen binding</i>)
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FDR	Falscherkennungsrate (<i>false discovery rate</i>)
FKS	Fetales Kälberserum
FR	Gerüstregion (<i>framework region</i>)
HCD	<i>Higher-energy collisional dissociation</i>
IA	Iodoacetamid
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1
INHAT	Inhibitor der Acetyltransferase
IOD	Intraokulärer Druck
JAC	Jacalin
KTRL	Kontrollgruppe
LASIK	Lasер <i>in situ</i> Keratomileusis

LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LFU	<i>Lacrimal functional unit</i>
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
NDG	Normaldruckglaukom
NF	Neurofilament
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
OHT	Okuläre Hypertension
OSDI	<i>Ocular Surface Disease Index</i>
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGWG	Primäres Geschlossenwinkelglaukom
PNGase F	Peptide-N-Glycosidase F
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
PTM	Posttranslationale Modifikation
RGZ	Retinale Ganglienzellen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPE	Retinales Pigmentepithel
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
TFA	Trifluoressigsäure
TFBUT	<i>Tear film break-up time</i>
TFOS	<i>Tear film & ocular surface society</i>
TGF- α	Transformierender Wachstumsfaktor α
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRITC	Tetramethylrhodamine
UEA I	<i>Ulex Europaeus Agglutinin I</i>
VE	vollentsalzt
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die Ätiologie und die Formen des DES	2
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Tränenfilms.....	8
Abbildung 3: Aufbau der Retina	12
Abbildung 4: Die verschiedenen Formen des Glaukoms	13
Abbildung 5: Physiologischer und pathologischer Abfluss des Kammerwassers	14
Abbildung 6: Struktur eines Immunglobulins G	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Probenvorbereitungsprotokolls zur Anreicherung und Analyse der Glykoproteine und -peptide aus dem Tränenfilm von gesunden Studienteilnehmern	24
Abbildung 8: Probenentnahme der Tränenflüssigkeit mithilfe eines Schirmer-Streifens.....	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Probenvorbereitungsprotokolls zur Anreicherung von Glykoproteinen bzw. Glykopeptiden aus dem Tränenfilm.....	39
Abbildung 10: 1D-Gelelektrophorese zur Darstellung der isolierten Glykoproteine durch die Lektin-Affinitätschromatographie	41
Abbildung 11: Massenverschiebung der Proteine LTF (≈ 62 kDa) und IGHA1 (≈ 49 kDa) durch die Behandlung mit der Endoglykosidase PNGase F.....	42
Abbildung 12: 1D-Gelelektrophorese zur Darstellung der angereicherten Glykoproteine....	43
Abbildung 13: Das Glykoprotein Laktotransferrin (LTF) und dessen detektierte N-Glykosylierungsstellen.....	46
Abbildung 14: Das Glykoprotein Polymerer Immunglobulin Rezeptor (PIGR) und dessen detektierte N-Glykosylierungsstellen.....	48
Abbildung 15: Wirkung des synthetischen CDR-Peptids auf die Viabilität der RGZ	52
Abbildung 16: Heatmap zur Darstellung der signifikant veränderten Proteinexpressionsmuster	54
Abbildung 17: Protein-Interaktionsnetzwerk der signifikant veränderten Proteine	56

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Einteilung der Risikofaktoren in drei Evidenzlevel	4
Tabelle 2: Medikamente zur Senkung des IOD und deren Wirkung	16
Tabelle 3: Angaben zu den Studienproben	25
Tabelle 4: Lektine und ihre Spezifität für Zucker	27
Tabelle 5: Parameter für die MS-Messung der angereicherten Glykopeptide +- PNGase F.	30
Tabelle 6: Parameter für die massenspektrometrischen Messungen.	37
Tabelle 7: Resultate der photometrischen Proteinbestimmung der Eluatsfraktionen	40
Tabelle 8: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von Glykoproteinen im Tränenfilm von gesunden Studienteilnehmern.....	49
Tabelle 9: Ergebnisse der Signalwegsanalyse mittels der IPA Software	55

1 EINLEITUNG / ZIEL DER DISSERTATION

Die Diagnostik des Dry Eye-Syndroms (DES) stellt aufgrund seiner heterogenen Ätiologie sowie den Differenzen zwischen subjektivem Empfinden der Patienten als auch der objektiven Symptome eine Herausforderung in der klinischen Ophthalmologie dar. In Zukunft könnte die Identifizierung und Charakterisierung neuer Biomarker im Tränenfilm die Diagnostik des DES deutlich erleichtern. Ein Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Glykoproteine des Tränenfilms von gesunden Studienteilnehmern mittels Festphasenextraktion anzureichern und anschließend mithilfe der Massenspektrometrie (MS) zu analysieren. Aus diesem Grund wurde die Methodik zur Anreicherung zunächst auf Glykoprotein-Ebene etabliert und anschließend auf Glykopeptid-Ebene angewendet. Die Anreicherung erfolgte auf dem Prinzip der Lektin-Affinitätschromatographie, welche mit verschiedenen Agarose-gebundenen Lektinen durchgeführt wurde. Dabei wurden sowohl Ein-Lektin-Säulen ConA, JAC und WGA als auch Multi-Lektin-Säulen, welche aus drei Lektinen (ConA, JAC, WGA) bzw. vier Lektinen (ConA, JAC, WGA, UEA I) bestanden, hinsichtlich der Anreicherungs-effizienz überprüft. Die Beurteilung der Performance der verschiedenen Lektin-Säulen wurde mittels 1D-Gelelektrophoresen sowie spezifischen Proteinfärbungen auf Glykoprotein-Ebene durchgeführt. Nach erfolgreicher Etablierung des Anreicherungsverfahrens wurde die Methodik auf Glykopeptid-Ebene angewendet, um deren N-Glykosylierungsstellen mittels MS umfangreich zu charakterisieren. Die spezifischen N-Glykosylierungsstellen konnten mittels einer Glykosidase (PNGase F)-induzierten Modifikation (Deamidierung) in der Peptidstruktur markiert werden, welche aufgrund einer charakteristischen Massenverschiebung mithilfe des MS detektiert werden konnte. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit dienen als Grundlage, um den Einfluss und die Funktion von Glykoproteinen beim DES in zukünftigen Studien intensiv zu erforschen.

Das Glaukom ist eine progressive, neurodegenerative Augenerkrankung und ist vor allem durch einen Verlust der retinalen Ganglienzellen (RGZ) gekennzeichnet. Seit einigen Jahren wird vermutet, dass vor allem Autoimmunprozesse (insbesondere Autoantikörper) bei der Pathogenese dieser Erkrankung eine wichtige Rolle spielen. Daher wurden in der vorliegenden Doktorarbeit die potenziellen neuroprotektiven Eigenschaften eines synthetischen Antikörper-Peptids mit der Sequenz SCTGTSSDVGGYNYVSWYQ auf die Viabilität von RGZ in einem *in vitro* Glaukommodell untersucht. Die Neurodegeneration der RGZ wurde in diesem *in vitro* Modell durch die mechanische Durchtrennung des Sehnervs induziert. Um die durch das Antikörper-Peptid potenziell induzierte Neuroprotektion nachzuweisen, wurden die retinalen Explantate mit verschiedenen Mengen des synthetischen Peptids (25 µg und 50 µg) behandelt oder dienten als unbehandelte Kontrollgruppe. Mittels spezifischer immunohistologischer Färbungen der retinalen Explantate ± Behandlung, konnte die Anzahl der RGZ quantitativ bestimmt werden und erlaubten eine Aussage über die neuroprotektiven Eigenschaften des synthetischen Antikörper-Peptids. Im Anschluss wurde eine MS-basierte proteomische Analyse der retinalen Explantate ± Behandlung durchgeführt, um den molekularen Mechanismus der Peptid-induzierten Neuroprotektion auf RGZ aufzuklären und um spezifische Signal- und Interaktionsnetzwerke zu identifizieren. Anhand der Resultate dieser vorliegenden Doktorarbeit soll beurteilt werden, inwiefern synthetische Antikörper-Peptide in der Glaukom-Therapie angewendet werden können und möglicherweise zukünftig als Grundlage für eine synergistische Kombinationstherapie dienen.

2 LITERATURDISKUSSION

2.1 Dry Eye-Syndrom

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Dry Eye-Syndrom (DES) wurde auf dem *Dry Eye Workshop II* der TFOS (*Tear film & ocular surface society*) als multifaktorielle Erkrankung der Augenoberfläche definiert, welche durch einen Verlust der Homöostase des Tränenfilms charakterisiert ist. Diese geht mit einer Instabilität und Hyperosmolarität des Tränenfilms, sowie möglicherweise Entzündungen und Schäden der Augenoberfläche einher (1).

Die globale Prävalenz des DES liegt zwischen 5 und 50 % (2). Diese große Spannweite ist vor allem durch die Diversität der Definitionen, durch die verschiedenen diagnostischen Methoden, sowie durch die hohe Variabilität der auftretenden Symptome zu erklären (3, 4). Die Prävalenz steigt mit steigendem Alter signifikant an, wobei Frauen generell häufiger am DES leiden als Männer (2, 3). Die Pathophysiologie des DES ist bis heute nicht eindeutig geklärt (5).

2.1.2 Ätiologie und Einteilung

Ätiologisch kann das DES in zwei große Hauptkategorien eingeteilt werden: Zum einen kann eine verminderte Produktion der wässrigen Phase des Tränenfilms (engl. *aqueous-deficient dry eye*, ADDE) ursächlich sein. Zum anderen kann eine gesteigerte Verdunstung des Tränenfilms (engl. *evaporative dry eye*, EDE) auftreten, wobei die zweite Variante deutlich häufiger vorkommt. Außerdem kann bei Patienten auch eine Mischform beider Varianten auftreten (1, 3, 6, 7). Die Abbildung 1 stellt die Ätiologie und Formen des DES dar.

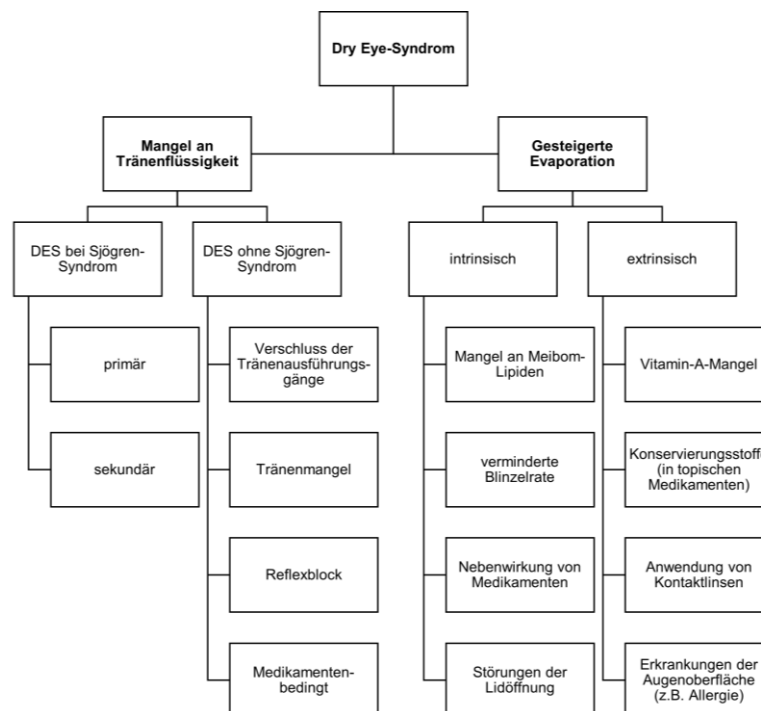


Abbildung 1: Die Ätiologie und die Formen des DES. Beim DES unterscheidet man zwischen einem Mangel an Tränenflüssigkeit (ADDE) und einer gesteigerten Verdunstungsrate (EDE) des Tränenfilms. Das ADDE kann weiter in eine durch das Sjögren-Syndrom verursachte Form und eine nicht sekundär

ausgelöste Erkrankung unterteilt werden. Das EDE kann intrinsisch, z.B. durch einen Mangel an Meibom-Lipiden, oder extrinsisch, z.B. durch einen Vitamin-A-Mangel verursacht werden (1).

2.1.2.1 Verdunstung des Tränenfilms (EDE)

Diese Form des DES tritt häufiger auf und wird meist durch eine Dysfunktion oder Obstruktion der Meibomdrüsen hervorgerufen (2, 3, 7). Bei dieser Form verdunstet die wässrige Phase aufgrund der veränderten Lipidschicht folglich deutlich schneller. Außerdem kann EDE im Zusammenhang mit Hauterkrankungen wie Rosacea, Atopischer Dermatitis und Psoriasis auftreten (6, 8). Jede Situation oder Gegebenheit, welche die Häufigkeit des Lidschlusses vermindert, stellt einen Risikofaktor für eine gesteigerte Verdunstung des Tränenfilms dar. Als Beispiele seien an dieser Stelle prolongierte Bildschirmexposition (z.B. gegenüber Computerbildschirmen (2, 9)), sowie die Parkinsonerkrankung zu nennen (10). Es konnte gezeigt werden, dass beim Lesen und Arbeiten an Bildschirmen die Häufigkeit des Lidschlusses signifikant reduziert war, was die Verdunstung des Tränenfilms begünstigt (3). Weitere Gründe für diese Form des DES sind das Tragen von Kontaktlinsen und verschiedene Umweltbedingungen, wie z.B. niedrige Luftfeuchtigkeit (1, 2).

2.1.2.2 Defizit der wässrigen Phase des Tränenfilms (ADDE)

Ein Defizit der wässrigen Phase des Tränenfilms tritt in ca. 10 % der Fälle auf (3). Diese Form manifestiert sich in einem reduzierten Tränenvolumen, welches meist durch eine reduzierte Funktion der Tränendrüse hervorgerufen wird (6, 8). Diese Variante des DES tritt außerdem in Verbindung mit dem Sjögren-Syndrom auf. Das Sjögren-Syndrom ist mit einer Prävalenz von 0,6 % aber eher selten ein Auslöser. Es handelt sich dabei um eine autoimmune Exokrinopathie, bei der es neben trockenen Augen auch zu Xerostomie der Mundschleimhaut kommen kann (2, 9). Eine weitere häufige Form stellt das altersbedingte DES dar. Die Inzidenz für diese Form nimmt ab dem 50. Lebensjahr deutlich zu. Ab dem 40. Lebensjahr kommt es zu einer vermehrten Einwanderung von T-Zellen in die Tränendrüsen, wodurch es zu einer kontinuierlichen Destruktion des Drüsengewebes kommen kann. Diese mit dem Alter voranschreitende Destruktion der Tränendrüse ist möglicherweise durch oxidativen Stress (z.B. durch die Bildung von Superoxid und Hydrogenperoxid) erklärbar (6).

2.1.3 Risikofaktoren

Das Risiko an einem DES zu erkranken nimmt mit steigendem Alter signifikant zu. Des Weiteren spielt auch das Geschlecht eine entscheidende Rolle, wobei Frauen statistisch deutlich häufiger betroffen sind (2). Ein weiterer Risikofaktor ist das Tragen von Kontaktlinsen. In Studien konnte belegt werden, dass 43 % der Kontaktlinsenträger Symptome des DES aufwiesen (4). Umweltgebundene Risiken sind eine niedrige Luftfeuchtigkeit, sowie windige Umgebungen. Auch das Rauchen, längere Perioden des Lesens oder des Autofahrens, sowie langfristige Bildschirmexposition, wie etwa das Arbeiten am Computer können die Pathogenese des DES begünstigen (2, 3). Außerdem können auch chronische Erkrankungen (z.B. Rheumatoide Arthritis) zur Entstehung dieser Augenerkrankung beitragen (9). Des Weiteren ist das Sjögren-Syndrom zu nennen, welches bei etwa 11 % der Patienten mit DES vorliegt. Ein weiterer Risikofaktor, der die Ausbildung des DES begünstigen kann, stellt die Refraktionschirurgie dar und gilt als eine der häufigsten Komplikationen. Es konnte gezeigt werden, dass durch Laseroperationen die Dichte und Anzahl der Goblet-Zellen auf der Augenoberfläche vermindert war (2, 4, 11). Toda *et al.* (2001) (12) belegten zudem, dass LASIK-Patienten (Laser *in situ* Keratomileusis)-Patienten

eine deutlich verminderte Lidschlusshäufigkeit aufweisen. Außerdem kann auch eine Dysfunktion der Meibomdrüsen als Risikofaktor zur Entwicklung des DES beitragen. Diese manifestiert sich unter anderem in einer Verstopfung der Ausführungsgänge, einer veränderten Lipidschicht des Tränenfilms, sowie in Entzündungen der Augenlider. Aufgrund dieser pathogenen Veränderungen verdunstet die wässrige Phase des Tränenfilms rapide (13). Auch die Einnahme verschiedener Medikamente, wie z.B. Antihistaminika, Antipsychotika oder Anticholinergika kann die Entwicklung des DES begünstigen (9). In Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass eine regelmäßige und wiederholte Anwendung von Augentropfen die Pathogenese des DES fördern kann (2, 14). In Tabelle 1 sind die Risikofaktoren in drei Evidenzlevel aufgelistet.

Tabelle 1: Einteilung der Risikofaktoren in drei Evidenzlevel. Die Risikofaktoren zur Entstehung des DES können in ein hohes Risiko (z.B. fortgeschrittenes Alter), ein mittleres Risiko (z.B. Medikationen) und ein niedriges Risiko (z.B. Rauchen) eingeteilt werden (3).

hohes Risiko	mittleres Risiko	niedriges Risiko
<ul style="list-style-type: none"> - Alter - weibliches Geschlecht - postmenopausale Östrogentherapie - Medikation mit Antihistaminika - Refraktionschirurgie 	<ul style="list-style-type: none"> - Medikation mit trizyklischen Antidepressiva, Diuretika, β-Blockern - Diabetes - niedrige Luftfeuchte - Sarkoidose 	<ul style="list-style-type: none"> - Rauchen - Anticholinergika (z.B. Antipsychotika, Anxiolytika) - Alkohol - Menopause - Orale Kontrazeptiva - Gravidität

2.1.4 Symptome

Häufig treten in Verbindung mit dem DES unspezifische Symptome, wie Rötung der Augen, Brennen, Fremdkörpergefühl, Juckreiz und Photophobie auf. Oftmals sind die aufgezeigten objektiven Krankheitszeichen bei der Diagnostik und die durch den Patienten empfundenen Beschwerden sehr variabel (3, 8). Diese Diskrepanz lässt sich durch die unterschiedlichen diagnostischen Analyseverfahren, die hohe Variabilität der auftretenden Symptome sowie durch das subjektive Schmerzempfinden der jeweiligen Patienten erklären. Einige Patienten zeigen einen asymptomatischen Verlauf der Erkrankung, sodass eine alleinige Diagnosestellung über die auftretenden Symptome als insuffizient gilt (3, 4). Durch vorhandene Symptome kann es zu einer Einschränkung der Lebensqualität der Patienten kommen, z.B. durch eine Beeinträchtigung beim Lesen, Schreiben oder Arbeiten an Monitoren (2, 3, 8). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Lesegeschwindigkeit bei Patienten mit DES deutlich herabgesetzt ist (15). Des Weiteren konnte durch Analysen mittels eines Fahrsimulators eine verminderte Reaktionsgeschwindigkeit bei DES-Patienten nachgewiesen werden (16). Zudem berichten Patienten über Schmerzen, welche durch Wind und Licht induziert wurden. Visuelle Symptome, wie schwankendes und unscharfes Sehvermögen, sind ebenfalls dokumentiert (9).

2.1.5 Diagnostik

Das subjektive Empfinden der Patienten und die objektive Diagnostik durch den Arzt sind häufig sehr unterschiedlich und die Symptome der einzelnen DES-Subtypen überlappend. Dies erschwert die Diagnostik enorm. Die Relevanz objektiver Analyseverfahren wird insbesondere durch die häufig auftretende Asymptomatik hervorgehoben, jedoch sind auch

die subjektiven Anzeichen des DES unerlässlich, um eine für den Patienten adäquate Therapie einzuleiten (4, 8, 17, 18). Für die Diagnose des DES stehen zahlreiche Evaluationsbögen in Form von validierten Fragebögen zur Verfügung, welche die subjektiv empfundenen Symptome der Patienten bewerten (4, 17). Der am häufigsten verwendete Evaluationsbogen ist der *Ocular Surface Disease Index* (OSDI), der neben der Häufigkeit der Symptome auch Umweltfaktoren und unterschiedliche Alltagsbedingungen abfragt (17). Ein alleiniger Test ist nicht ausreichend, um eine suffiziente Diagnose des DES zu stellen. Zudem ist es wichtig, eine diagnostische Differenzierung hinsichtlich der Subtypen des DES zu treffen, um eine geeignete und zielgerichtete Therapie einleiten zu können (8, 18). Zur Untersuchung der Augenlider gehört eine Evaluation der Lidschlusshäufigkeit, sowie eine Untersuchung hinsichtlich möglicher Inkongruenzen beim Lidschluss (3, 17). Für Patienten mit DES sind ein inkompletter Lidschluss sowie eine verminderte Blinzelhäufigkeit charakteristisch (17). Mit dem Schirmer-Test kann die Sekretion der Tränenflüssigkeit durch die Tränendrüse untersucht werden. Dazu wird ein Filterpapier in das untere Augenlid im temporalen Drittel eingehängt, welches für fünf Minuten dort verweilt. Anschließend wurde mithilfe des Streifens die Lauflänge der Tränenflüssigkeit dokumentiert. Die Lauflänge der Tränenflüssigkeit beträgt in der Regel > 10 mm, wobei Lauflängen unter < 5 mm als pathologisch interpretiert werden können. Bei einem Defizit der wässrigen Phase des Tränenfilms ist der Wert möglicherweise reduziert (3, 17, 19). Nichols *et al.* (2004) (20) konnten zeigen, dass bereits minimale Veränderungen von Licht, Luftfeuchtigkeit und Temperatur das Schirmer-Testverfahren stark beeinflussen können. Mithilfe der *Tear film break-up time* (TFBUT) kann die Stabilität des Tränenfilms untersucht werden. Dazu wird nach Einbringen von Fluoreszein-Tropfen in die Augen des Patienten die Zeit zwischen Blinzeln und dem Aufreißen des Tränenfilms gemessen. Dies kann mithilfe einer Spaltlampe visualisiert werden, wobei Messwerte unter < 10 s als pathologisch gelten. Normwerte von gesunden Probanden liegen in der Regel zwischen 20-30 s (3). Die Messung der Osmolarität der Träne gilt ebenfalls als suffiziente Untersuchungsmethode und zeigt zudem die höchste Korrelation der klinischen Diagnostikverfahren zum Schweregrad der Erkrankung. Osmolaritäten ≥ 308 mOsm/l korrelieren dabei mit einer frühen bis milden Form, wohingegen Werte ≥ 312 mOsm/l mit einer moderaten bis schweren Form des DES assoziiert sind (8, 17).

2.1.6 Therapie

Aufgrund des multifaktoriellen Charakters der Erkrankung ist die Therapie des DES komplex. Bei den Therapien handelt es sich um symptomatische Therapien, welche die Symptome verbessern und die Progression der Erkrankung verlangsamen sollen (18, 21). Die Behandlung des DES sollte schrittweise und abgestimmt auf Schweregrad und mögliche assoziierte Erkrankungen erfolgen. Das Vermeiden möglicher Triggerfaktoren des DES, wie beispielsweise trockene Umgebungen und Zigarettenrauch, gilt dabei als wichtiger Teil der Behandlung. Bei allen Schweregraden des DES gilt der Einsatz von Tränenersatzmitteln als Standard (3). Die Tränenersatzmittel unterscheiden sich hierbei hinsichtlich ihrer Osmolarität, Viskosität und ihres pH-Wertes, sind jedoch alle wasserbasiert. Des Weiteren können lipidhaltige Tränenersatzmittel eingesetzt werden, die einer Verdunstung des Tränenfilms vorbeugen. Um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden, enthalten viele Tränenersatzmittel Konservierungsstoffe, wie z.B. Benzalkoniumchlorid (BAK). In Studien konnte belegt werden, dass BAK zu einem Verlust an Goblet-Zellen, sowie zu einer Schädigung des kornealen und konjunktivalen Epithels führen kann (18, 22). In vielen topischen Glaukom-Medikamenten ist ebenfalls BAK enthalten, sodass das Risiko zur

Entwicklung des DES als sekundäre Erkrankungsform erhöht ist (23). Außerdem kann eine Antibiotikatherapie zur Behandlung des DES veranlasst werden, welche entweder topisch oder *per os* erfolgt (18). Für die Therapie stehen vor allem Tetrazykline und Makrolide zur Verfügung, die beide einen zusätzlichen antiinflammatorischen Effekt aufweisen (3, 18). Zudem kann eine operative punktuelle Okklusion durchgeführt werden. Dabei stellt das Kauterisieren eine häufig angewendete Methode dar. Es stehen auch spezielle Kontaktlinsen für die Therapie des DES zur Verfügung. Sklerallinsen sind Gas-permeabel und werden bei moderaten bis schweren DES-Fällen angewandt (18). Diese liegen, anders als bei herkömmlichen Kontaktlinsen, nicht an der Kornea, sondern an der Sklera und Konjunktiva des Auges an. Sie können ein Tränenreservoir unter der Linse bilden und die Augenoberfläche schützen (8). Außerdem kann auch eine Therapie mittels Sekretagoga erfolgen. Diese können sowohl topisch als auch oral verabreicht werden. Cholinergika, wie z.B. Pilocarpin, aktivieren muskarinische Acetylcholinrezeptoren der Speichel- und Tränendrüsen und wirken dadurch sekretionsstimulierend (8, 18).

2.1.7 Das Tränenorgan und die *Lacrimal functional unit*

Das System der *Lacrimal functional unit* (LFU) wird unter anderem im *TFOS DEWS II pathophysiology report* beschrieben und dient der Aufrechterhaltung der Homoöostase des Tränenfilms. Dieses System besteht aus Kornea, Konjunktiva, Tränen- und Meibomdrüsen, Tränenabflusswegen und Augenlidern. Ein komplexes motorisches und sensibles Nervensystem verknüpft die einzelnen Komponenten untereinander. Die LFU sorgt für eine Aufrechterhaltung der Homöostase des Tränenfilms. Die drei Komponenten des Tränenfilms (Muzine, Lipide und die Bestandteile der wässrigen Phase) werden dazu jeweils aufeinander abgestimmt sezerniert. Wenn eine Komponente dieses Systems nicht adäquat funktioniert, kann dies zur Entstehung eines DES beitragen (6, 24–26).

Bei den Tränendrüsen handelt es sich um serös-exokrine Drüsen (6, 27). Die Haupt-Tränendrüse ist in der *Fossa lacrimalis* (oberer äußerer Bereich der Orbita) lokalisiert und wird in einen palpebralen und einen orbitalen Anteil untergliedert. Diese beiden Bereiche werden durch die Sehne des *Musculus levator palpebrae* unterteilt, wobei der orbitale Anteil deutlich größer ist (6, 25, 27). Die akzessorischen Tränendrüsen sind in die Krause- und Wolfring'schen Drüsen unterteilt. In den Umschlagfalten der oberen und unteren Bindehaut befinden sich etwa 40 Wolfring'sche- bzw. 6 bis 8 Krause-Drüsen. Die Wolfring'schen Drüsen sind ebenfalls in der Bindehaut lokalisiert, jedoch deutlich größer (6). Der Großteil des Tränenfilms wird von den Haupt-Tränendrüsen sezerniert. Das Tränenvolumen wird in der Literatur mit etwa 7 μ l angegeben. Die Sekretionsrate der Tränendrüse wird mit $1,03 \pm 0,39 \mu$ l/min beschrieben (6, 25).

2.1.7.1 Der Tränenfilm

Der Tränenfilm bedeckt sowohl die Kornea, als auch die Konjunktiva (4). Er stellt die erste lichtbrechende Oberfläche des visuellen Systems dar. Daher gilt ein stabiler Tränenfilm auch als Kennzeichen einer gesunden okulären Oberfläche. In der Literatur wird die physiologische Dicke des Tränenfilms mit 2,5-5 μ m beschrieben (Messung mittels Interferometrie). Der Tränenfilm enthält außerdem einige antimikrobielle Peptide und Proteine, sowie lösliche Immunglobuline. Damit schützt der Tränenfilm vor einer Infektion der Augenoberfläche (25, 26). Das Blinzeln spielt für die Stabilität des Tränenfilms eine entscheidende Rolle, da es durch das Verteilen der Träne dem Austrocknen der Augenoberfläche entgegenwirkt. Außerdem wird durch das Blinzeln auch Debris von der Augenoberfläche entfernt. Jeder Mensch blinzelt in etwa 15- bis 20-mal pro Minute. Dieser

Wert kann durch verschiedene Umweltfaktoren, mentale Verfassung und durch verschiedene Aktivitäten beeinflusst werden. Ein reflexartiger Anstieg der Häufigkeit des Blinzeln wird z.B. in windigen Umgebungen oder auch bei Kälte beobachtet, sowie auch bei Irritationen der Augenoberfläche. Es wird angenommen, dass Patienten die unter dem DES leiden ebenfalls häufiger Blinzeln, um die Trockenheit des Auges zu kompensieren (4). Der Tränenfilm setzt sich aus drei Schichten zusammen. Die Äußere stellt die Lipidschicht dar, gefolgt von der mittleren wässrigen Schicht und einer inneren Muzinschicht (25). In Abbildung 2 sind die drei Schichten des Tränenfilms schematisch dargestellt.

Die Lipidphase

Die Lipide des Tränenfilms werden durch die Meibomdrüsen gebildet und mit jedem Blinzeln auf der Augenoberfläche verteilt. Die mittlere Dicke der Lipidschicht wird in der Literatur mit 42 nm angegeben (28). Die Lipidphase hat vor allem stabilisierende Funktionen. Man geht zudem davon aus, dass sie eine Rolle bei der Evaporation der Träne spielt. Krankheits-assoziierte Veränderungen in der Lipidphase sind mit gesteigerten Evaporationsraten des Tränenfilms assoziiert (4, 25, 26). Die Lipidphase kann wiederum als zweiphasige Schicht angesehen werden. Die Innere enthält polare Lipide, hauptsächlich Phospholipide. Dessen Polarität gewährleistet eine Interaktion mit der unter der Lipidphase gelegenen wässrigen Phase des Tränenfilms. Des Weiteren setzt die polare Schicht die Oberflächenspannung des Tränenfilms herab. Die äußere unpolare Schicht wird hauptsächlich durch Wachse, Cholesterin und Triglyzeride gebildet. Es wird angenommen, dass diese Schicht der Evaporation der Träne vorbeugt. Wesentlich für die Stabilität des Tränenfilms ist die Interaktion von Lipiden mit Proteinen wie Lipocalin, Lysozym und Laktotransferrin. Durch diese wird eine Interaktion hydrophober Moleküle mit der wässrigen Phase gewährleistet (26, 29).

Die wässrige Phase

Die wässrige Phase des Tränenfilms beinhaltet vor allem Elektrolyte und Proteine und wird durch die Haupt-Tränendrüse und die akzessorischen Tränendrüsen gebildet. Diese Phase macht den größten Anteil des Tränenfilms aus. Die Hauptaufgabe besteht in der Versorgung der Kornea mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die wässrige Phase enthält außerdem Wachstumsfaktoren, wie den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) als auch Transformierenden Wachstumsfaktor α (TGF- α). Unter anderem sind auch Proteine, wie Laktotransferrin, Lysozym und Immunglobuline enthalten. Es wird vermutet, dass der Anteil dieser Proteine bei DES-Patienten reduziert ist und möglicherweise mit einem erhöhten Infektionsrisiko der Augen verbunden ist (4, 25).

Die Muzinphase

Die Muzinphase ist die innere Schicht des Tränenfilms. Bei den Muzinen des Tränenfilms handelt es sich um Glykoproteine. Sie haben vor allem protektive Aufgaben und sorgen für eine ausreichende Hydratation und Schmierung der Augenoberfläche. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass bei DES-Patienten weniger Muzin vorhanden ist (25, 26). Bei DES-Patienten konnten außerdem mittels Impressionszytologie eine reduzierte Anzahl, sowie auch leere Goblet-Zellen nachgewiesen werden (30). Auf die Muzine des Tränenfilms wird im Kapitel des Tränenproteoms näher eingegangen.

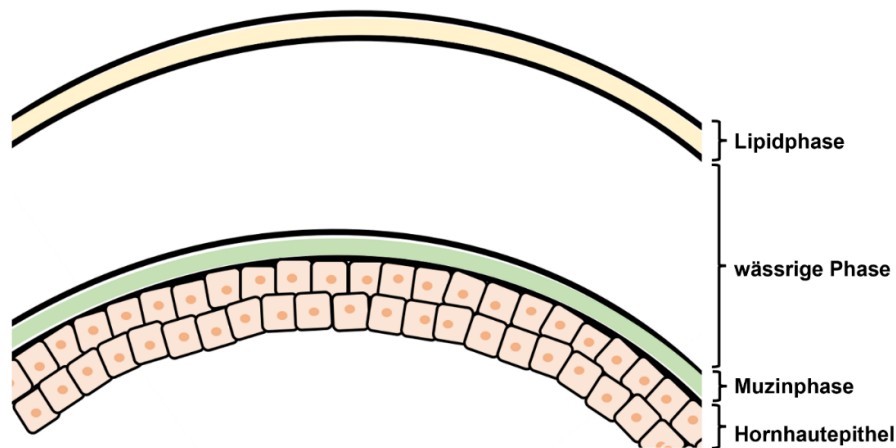


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Tränenfilms. Der Tränenfilm besteht aus drei Phasen, der Lipidphase, der wässrigen Phase und der Muzinphase (25).

2.1.8 Das Tränenproteom

Sowohl die wässrige als auch die Muzinphase des Tränenfilms enthalten zahlreiche Proteine. Derzeit sind fast 1800 Proteine des humanen Tränenproteoms bekannt (26). Die qualitative als auch quantitative Charakterisierung des Tränenproteoms stellt daher eine aussichtsreiche Methode dar, um neue Biomarker für das DES zu identifizieren. Die Biomarker ermöglichen eine Diagnosefindung und eine Risikoeinschätzung für eine mögliche Krankheitsentstehung (26). Durch die Analyse des Tränenproteoms ist es außerdem möglich, neue Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese von Augenerkrankungen zu erhalten (31). Die verschiedenen Proteine unterscheiden sich in ihrer Konzentration. Die Gesamtkonzentration der Proteine in der Tränenflüssigkeit wird in der Literatur mit 6 mg/ml bis 10 mg/ml angegeben (32, 33).

Der Großteil des Tränenproteoms wird durch die abundanten Proteine Laktotransferrin, Lysozym und Lipocalin repräsentiert. Es wird vermutet, dass diese 70-80 % aller Proteine in der Tränenflüssigkeit ausmachen (34). Des Weiteren konnten auch erhöhte Konzentrationen an Lipophilin, Transferrin, Serum Albumin und sekretorischem Immunglobulin A nachgewiesen werden (35). Laktotransferrin hat eine antibakterielle, antivirale und antiparasitäre Wirkung. Zudem kann es auch immunmodulierend wirken (36). Des Weiteren sind in der Tränenflüssigkeit auch Prolin-reiche Proteine identifiziert worden, deren Aufgabe bis dato nicht eindeutig geklärt ist. Es wird vermutet, dass sie eine protektive Wirkung haben könnten (37).

Ein weiterer Vertreter des Tränenproteoms sind die Glykoproteine (Muzine). Außer im Tränenfilm kommen Muzine auch im Respirations- und Gastrointestinaltrakt vor. Die Muzine können in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet hierbei die sekretorischen von den transmembranen Muzinen. Die transmembranen Muzine (MUC1, MUC4, MUC16) werden von den kornealen und den konjunktivalen Epithelzellen gebildet. Sie sind ein wichtiger Bestandteil der epithelialen Barriere, der sogenannten Glykokalix. Die sekretorischen Muzine werden des Weiteren in Gel-bildende Muzine und lösliche Muzine eingeteilt. Gel-bildende Muzine (z.B. MUC5AC) werden größtenteils von den Goblet-Zellen der Konjunktiva gebildet. Einige Studien konnten belegen, dass MUC5AC vermindert im Tränenfilm von DES-Patienten vorlag (26, 38, 39). Im Allgemeinen haben Muzine des Tränenfilms protektive Eigenschaften. Außerdem dienen sie einerseits der Haftung des

Tränenfilms an der Augenoberfläche und bilden andererseits eine Schutzbarriere vor pathogenen Keimen (26).

Ein weiterer Bestandteil des Tränenfilms sind Immunglobuline und Komplementfaktoren. Des Weiteren konnten Zytokine nachgewiesen werden, welche häufig mit entzündlichen Reaktionen in Verbindung gebracht werden. Ein Anstieg dieser Zytokin-Marker (z.B. Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)) konnte im Zusammenhang mit dem DES gezeigt werden (33).

Im Rahmen der Forschungsarbeit unserer Arbeitsgruppe konnte umfassend belegt werden, dass es qualitative als auch quantitative Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zwischen Basal- als auch Reflextränen gibt. Es wurde demonstriert, dass in der Reflexträne unter anderem Prolin-reiches Protein 4, sowie Serum Albumin vermehrt exprimiert vorlagen. Im Gegenzug waren die Proteine Polymerer Immunglobulinrezeptor und Mammaglobin B erniedrigt abundant in der Reflexträne vertreten (40). Darüber hinaus konnten auch proteomische Veränderungen zwischen geschlossenem und geöffnetem Auge identifiziert werden. Außerdem ist in der Literatur dokumentiert, dass die Reflexsekretion der Träne bei geschlossenem Auge stark vermindert ist (41).

2.1.9 Glykosylierung von Proteinen

Bei der Glykosylierung von Proteinen handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation (PTM), welche die Funktion und die Stabilität des Proteins maßgeblich beeinflussen kann (42, 43). Glykane können zelluläre Mechanismen, wie z.B. die Faltung des Proteins, Zelladhäsion, Signaltransduktion und die Aktivierung von Rezeptoren beeinflussen und regulieren (44). Glykosylierungen können die Eigenschaften eines Proteins determinieren und dieses z.B. vor Proteolyse schützen, sowie die Orientierung der Proteine auf Zelloberflächen verändern. Des Weiteren können Glykane intra- und intermolekulare Interaktionen beeinflussen (45). Bei der Glykosylierung handelt es sich um eine häufig auftretende Proteinmodifikation. Es wird vermutet, dass mehr als die Hälfte aller Proteine in einer Zelle glykosyliert vorliegen (46). Generell unterscheidet man N-Glykosylierungen, welche über eine kovalente Bindung des Glykans an die Aminogruppe von Asparagin (N) entstehen, von O-Glykosylierungen. Bei diesen ist das Glykan über eine kovalente Bindung an die Hydroxylgruppe der Seitenkette von Serin (S) oder Threonin (T) gebunden (42, 45, 46). Zur Analyse von N-Glykanen und zur Identifikation von N-Glykosylierungsstellen kann eine enzymatische Abspaltung der Glykanstrukturen erfolgen. Dazu wird häufig die Endoglykosidase PNGase F verwendet. Dieses Enzym spaltet die N-glykosidische Bindung zwischen dem Asparagin (N) des Peptids und dem endständigen N-Acetylglucosamin der Glykanstruktur. Durch die daraus resultierende Freisetzung der N-Glykane kommt es zu einer Deamidierung von Asparagin (N) zur Asparaginsäure (D). Diese strukturelle Veränderung des Moleküls führt zu einer Massenverschiebung, die mittels des MS nachgewiesen werden kann. Auf diese Weise können die N-Glykosylierungsstellen lokalisiert und detektiert werden (47–51). Eine enzymatische Abspaltung von O-Glykanen ist hingegen nicht möglich. Ein mögliches Verfahren zur Deglykosylierung von O-Glykoproteinen ist die β -Elimination. Der Nachteil dieser Methode ist die sogenannte „*Peeling*“-Reaktion, bei der es zur Abspaltung eines Monosaccharids und folglich zur chemischen Modifikation der Glykanstruktur selbst kommt (49, 51, 52).

Die Glykosylierung von Proteinen kann bei der Pathogenese von Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen. Aberrante Glykosylierungsmuster konnten z.B. bereits bei

Diabetes mellitus nachgewiesen werden. Durch die Beeinflussung von Aktivität und Funktion des entsprechenden Proteins können diese als potenzielle Erkrankungsmarker angesehen werden (42, 44). Daher könnten auch abweichende Proteinglykosylierungen in der Tränenflüssigkeit eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des DES spielen. Wie bereits in Kapitel 2.1.7 beschrieben, sind Glykoproteine ein wichtiger Bestandteil des Tränenfilms. Die Muzine des Tränenfilms haben z.B. eine stabilisierende Wirkung auf diesen, indem sie aufgrund der Polarität ihrer Glykostrukturen vermehrt Wasser binden können (26). Darüber hinaus weist Haptoglobin beispielsweise eine immunmodulatorische Wirkung auf und aberrante Glykosylierungsmuster dieses Proteins konnten bereits mit inflammatorischen Erkrankungen und Krebs in Verbindung gebracht werden (26, 53). Dem Extrazellulären Glykoprotein Lacritin wird eine antibakterizide Wirkung zugeschrieben (54). Des Weiteren können auch Lipid-Protein-Interaktionen und Protein-Protein-Interaktionen durch aberrante Proteinglykosylierungen beeinflusst werden. Diese haben einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität des Tränenfilms (26). Es wird vermutet, dass Glykoproteine mit der Lipidschicht des Tränenfilms interagieren und diese stabilisieren können (4). Als Beispiel sei an dieser Stelle Laktotransferrin zu nennen. Dieses Protein gilt als Interaktionspartner der Lipide im Tränenfilm (26, 29). Zusammenfassend ist die Analyse und die Charakterisierung von Glykoproteinen im Tränenfilm entscheidend für das bessere Verständnis der biologischen Prozesse und unabdingbar, um den Pathomechanismus zahlreicher Augenerkrankungen aufzuklären (47).

2.2 Glaukom

2.2.1 Die Retina und retinale Ganglienzellen

Beim menschlichen Auge handelt es sich um ein inverses Auge. Die Retina stellt einen wichtigen Bestandteil des Auges dar und dient der Photorezeption, also der Umwandlung von Lichtreizen in ein elektrisches Signal. Sie kann als Teil des zentralen Nervensystems (ZNS) betrachtet werden, mit dem sie über den Sehnerv (*N. opticus*) verbunden ist (19, 55, 56). Die Retina ist eine ca. 0,1-0,5 mm dicke, durchsichtige Schicht, die das Auge von Innen auskleidet. Im histologischen Schnitt weist sie einen gut erkennbaren Schichtenaufbau auf. Der Aufbau der Retina ist in Abbildung 3 anschaulich dargestellt. Die erste Schicht ist das retinale Pigmentepithel (RPE). Die Zellen des RPE sind nicht direkt für die Transformation und Transduktion von Informationen verantwortlich, haben aber andere wichtige Funktionen, wie z.B. die Erneuerung der Außensegmente und die Absorption von Streulicht. Der Mensch besitzt etwa 120 Millionen Stäbchen und 6 Millionen Zapfen. Sie bestehen aus erneuerungsfähigen Außensegmenten und permanenten Innensegmenten (19, 56). Die Zellkerne dieser Photorezeptoren befinden sich in der sogenannten äußeren Körnerschicht und deren Axone in der äußeren plexiformen Schicht. In der äußeren plexiformen Schicht befinden sich Synapsen der Photorezeptorzellen mit den Horizontal- und Bipolarzellen. Die innere Körnerschicht enthält die Zellkerne der Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen. Hier befinden sich zudem auch die Zellkerne der Müller-Stützzellen. In der darauffolgenden inneren plexiformen Schicht findet die Impulsweiterleitung zwischen Bipolarzellen und den retinalen Ganglienzellen (RGZ) statt. In der nächsten Schicht, der Ganglienzellschicht, befinden sich die Zellkörper der RGZ. Die Dendriten der RGZ reichen bis in die innere plexiforme Schicht. Die Axone der RGZ erstrecken sich in Richtung Nervenfaserschicht und bilden zusammen den Sehnerv (*N. opticus*) (19, 56).

RGZ sind die Ausgangsneurone der Netzhaut. Sie repräsentieren weniger als 1 % der gesamten retinalen Zellpopulation und sind für die Weiterleitung visueller Informationen verantwortlich (57, 58). Die Verteilung der RGZ in der menschlichen Retina ist inhomogen. Im Bereich der Fovea sind die Zellen konzentrierter und die Dichte nimmt nach peripher ab (59). RGZ werden häufig zur Untersuchung und Analyse neurodegenerativer Prozesse in Glaukom-Modellsystemen herangezogen. Darüber hinaus lässt sich durch quantitative Untersuchung von RGZ auch eine Aussage über die Wirksamkeit einer neuroprotektiven Therapie machen (57, 60, 61). Dies kann beispielsweise durch immunhistochemische Färbungen und anschließender Quantifizierung der RGZ erfolgen (60, 61). Brn3a (engl. *Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A*) ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der unter anderem eine Rolle bei der Differenzierung und Axonelongation während der Entwicklung der RGZ spielt. Brn3a wird spezifisch in RGZ exprimiert und eignet sich daher als adäquater Marker zur Identifizierung und Quantifizierung von RGZ in verschiedenen Glaukom-Modellsystemen (57). RGZ haben lange Axone mit einer vergleichsweise hohen Mitochondriendichte. Dadurch sind sie anfällig für Energiemangel und oxidativen Stress und folglich auch für Neurodegeneration (62, 63).

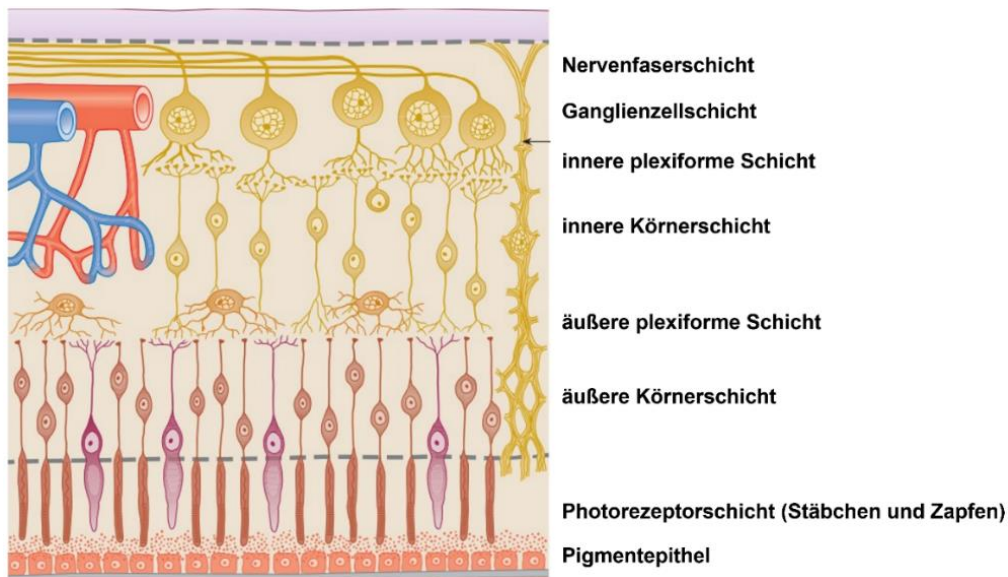


Abbildung 3: Aufbau der Retina. Die Retina weist im histologischen Schnitt eine gut abgrenzbare Unterteilung in verschiedene Schichten auf. Die Impulsweiterleitung zwischen den Bipolarzellen und den RGZ findet in der inneren plexiformen Schicht statt (19, 56). Modifiziert nach Sachsenweger et al. (2003) (19).

Zudem enthält die Retina fünf verschiedene Neuronentypen. Die ersten drei Neurone sind für die vertikale Transmission von Informationen verantwortlich. Die Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen) sind lichtempfindliche Sinneszellen. Sie wandeln Lichtsignale in elektrische Signale um (Phototransduktion). Bipolare Zellen enthalten Signale von den Photorezeptoren und leiten diese an die RGZ weiter. Die Axone der RGZ vereinigen sich zum Sehnerv (*N. opticus*) und ziehen in Richtung des *Corpus geniculatum laterale*, welches das vierte Neuron der Sehbahn darstellt. Darüber hinaus bilden Horizontalzellen und Amakrinzellen laterale Verknüpfungen. Diese sind üblicherweise mit mehr als einem Photorezeptor verbunden, sodass die nachfolgenden Bipolarzellen Signale von mehr als einem Photorezeptor erhalten. Dies dient dem Zweck der Kontrasterhöhung. Die genaue Funktion von Amakrinzellen ist bis dato nicht geklärt. Man vermutet, dass sie ebenfalls an der Kontrasterhöhung beteiligt sind (19, 56).

2.2.2 Definition und Epidemiologie

Der Begriff Glaukom umfasst eine Gruppe optischer Neuropathien, die durch einen Verlust der RGZ, Schädigungen des optischen Sehnervs, sowie durch fortschreitende Einschränkungen des Gesichtsfeldes charakterisiert sind. Der genaue Pathomechanismus, der dem Glaukom zugrunde liegt, ist bis dato nicht eindeutig geklärt (64, 65). Weltweit sind mehr als 70 Millionen Menschen am Glaukom erkrankt. Man geht davon aus, dass die Zahl bis 2040 infolge der stetig älter werdenden Bevölkerung auf ca. 112 Millionen ansteigen wird. Man schätzt, dass ca. 10 % aller Patienten bilateral erblindet sind, womit das Glaukom als eine der Hauptgründe für irreversible Erblindung gilt. Aufgrund des zunächst asymptomatischen Verlaufs der Erkrankung wird vermutet, dass die tatsächliche Zahl der Glaukom-Erkrankungen deutlich höher liegt (64, 66).

2.2.3 Klassifikation, Pathogenese und Klinik

Beim Glaukom können grundsätzlich zwei Hauptformen, nämlich das primäre und das sekundäre Glaukom unterschieden werden. Diese beiden Gruppen können weiterhin bezüglich der zugrundeliegenden Pathophysiologie in zwei weitere Subgruppen eingeteilt werden. Es handelt sich dabei entweder um ein Offenwinkelglaukom oder ein Geschlossenwinkelglaukom (66). Beide Formen können als primäre Erkrankung auftreten. Das sekundäre Glaukom kann infolge von Traumata, Medikationen, Entzündungen, Tumoren, sowie Pseudoexfoliation auftreten (64). Das Glaukom schreitet zunächst meist asymptomatisch voran. Symptome treten häufig erst in fortgeschritteneren Stadien der Erkrankung auf. Die Erkrankung führt zu verminderter Sehkraft, wodurch es bei vielen Betroffenen auch zu Einschränkungen der Lebensqualität kommt. Dementsprechend ist eine frühzeitige Intervention essenziell, um die Progression der Erkrankung zu verlangsamen. Der Verlust von RGZ führt zu progressiven Gesichtsfeldausfällen. Diese Verschlechterung beginnt in der Regel mittelperipher und breitet sich anschließend nach zentral aus (64). In Abbildung 4 sind die Subgruppen des Glaukoms anschaulich dargestellt.

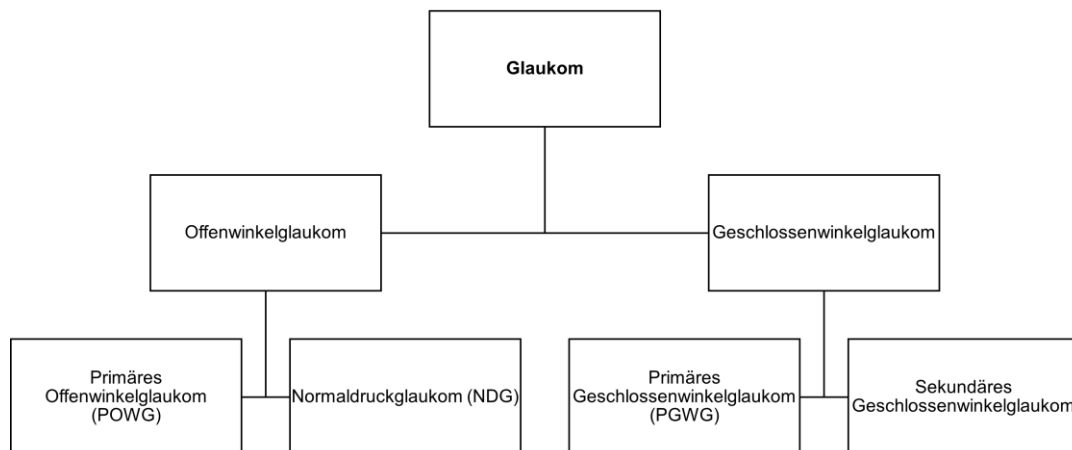


Abbildung 4: Die verschiedenen Formen des Glaukoms, modifiziert nach Allison et al. (2020) (66) Man unterscheidet zwei große Hauptformen des Glaukoms, das Offenwinkel- und das Geschlossenwinkelglaukom.

2.2.3.1 Primäres Offenwinkelglaukom (POWG)

Das primäre Offenwinkelglaukom (POWG) ist die häufigste Form der Glaukom-Erkrankung und ist mit einem erhöhten Augeninnendruck assoziiert (IOD > 21 mmHg). Dieser ist gleichzeitig der bedeutendste Risikofaktor (19, 64). Das POWG ist durch eine langsame Progression gekennzeichnet und tritt meist bilateral auf (65). Bei Patienten mit einem POWG ist der Kammerwinkel zwar offen, es kommt jedoch zu einem erhöhten Abflusswiderstand im Bereich des Trabekelmaschenwerks (64). Der daraus resultierende Anstieg des intraokulären Drucks (IOD) führt zu einer mechanischen Belastung der posterioren Strukturen des Auges (64, 67). Durch den gesteigerten IOD kann es zu einer Kompression der *Lamina cribrosa* kommen, was in einer Axonschädigung und Unterbrechung des axonalen Transports resultieren kann. Letztlich führt dies zu einer verminderten retrograden Abgabe trophischer Faktoren an die RGZ, welche essenziell für deren Überleben sind (65,

68, 69). Ein erhöhter IOD wird demnach mit dem Absterben von RGZ in Verbindung gebracht (64, 65).

2.2.3.2 Primäres Geschlossenwinkelglaukom (PGWG)

Das primäre Geschlossenwinkelglaukom (PGWG) zeichnet sich durch einen Verschluss des Kammerwinkels aus, sodass es zu einer Behinderung des Kammerwasserabflusses kommt. Dies hat einen gesteigerten IOD zur Folge. Genau wie das POWG ist auch das PGWG zunächst asymptomatisch, sodass sich Patienten der Erkrankung anfangs nicht bewusst sind (64, 65, 70). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu progressiven Einschränkungen des Gesichtsfelds. Im Vergleich zum POWG kommt es beim PGWG etwa doppelt so häufig zu einem Verlust der Sehkraft, sodass ca. die Hälfte der durch ein Glaukom erblindeten Patienten an einem PGWG leiden (65). In 90 % der Fälle ist ein Pupillarblock der Hauptgrund für den Winkelverschluss. Es kommt dabei zur Apposition der Iris an die Linse, wodurch die physiologische Drainage des Kammerwassers durch das Trabekelmaschenwerk eingeschränkt ist (65, 71). Zu den Symptomen des PGWG gehören Verschwommensehen und Schmerzen, aber auch vegetative Symptome, wie Übelkeit und Erbrechen (64).

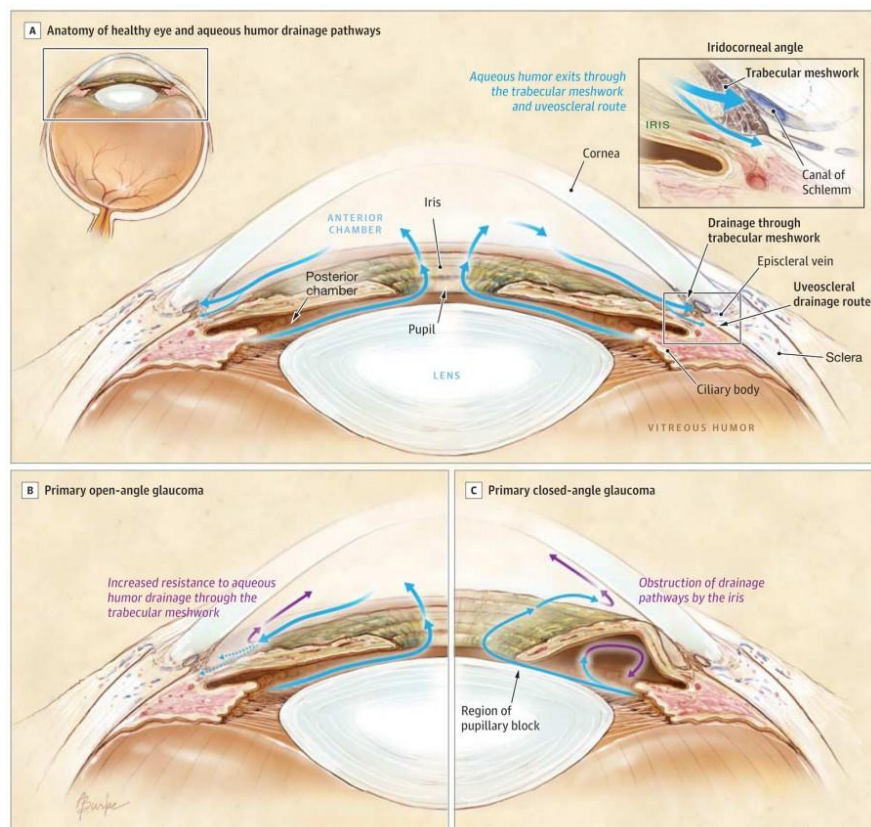


Abbildung 5: Physiologischer und pathologischer Abfluss des Kammerwassers. Physiologischer Abfluss des Kammerwassers (A) und ein gestörter Abfluss des Kammerwassers beim Glaukom (B und C). **B)** Offenwinkelglaukom: Der Kammerwinkel ist zwar offen, der Abfluss ist jedoch durch das Trabekelwerk behindert. **C)** Geschlossenwinkelglaukom: Der Kammerwinkel ist durch die Iris verschlossen (64).

2.2.3.3 Normaldruckglaukom (NDG)

Ein erhöhter Augeninnendruck zählt zwar zu den bedeutendsten Risikofaktoren zur Entstehung eines Glaukoms, muss jedoch nicht zwingend gegeben sein. Ist der Augeninnendruck in Verbindung mit der Erkrankung in einem physiologischen Bereich (< 21 mmHg) messbar, spricht man von einem sogenannten Normaldruckglaukom (NDG) (64, 65, 72). Bis dato ist nicht eindeutig geklärt, welcher Mechanismus dabei zur Entstehung der charakteristischen Erscheinungen und Symptome der Glaukom-Erkrankung führt (73).

2.2.3.4 Okulare Hypertension (OHT)

Wenn der IOD zwischen 22 und 25 mmHg liegt, spricht man von einer okulären Hypertension (OHT). Ein erhöhter IOD führt allerdings nicht zu einer glaukomatösen Atrophie (19). Dementsprechend kommt es nicht zu strukturellen, pathogenen Veränderungen. Die OHT gilt als Risikofaktor zur Entstehung eines Glaukoms. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass die Mehrheit der Patienten mit OHT kein Glaukom entwickeln (74).

2.2.4 Risikofaktoren und Ursachen

Risikofaktoren zur Entstehung eines POWG sind ein erhöhter IOD, die ethnische Zugehörigkeit, zentrale Hornhautdicke, Myopie, sowie eine positive Familienanamnese. Ein weiterer Risikofaktor ist das Alter. Die Erkrankung tritt selten unter dem 40. Lebensjahr auf. Man geht davon aus, dass das Risiko zur Entwicklung eines Glaukoms ab dem 60. Lebensjahr um das Doppelte zunimmt (64, 75).

Zu den Risikofaktoren zur Entstehung eines PGWG gehören das weibliche Geschlecht, sowie eine asiatische Ethnizität (64). Des Weiteren gehört auch eine positive Familienanamnese zu den Risikofaktoren. Wie bei der Pathogenese des POWG vermutet man auch beim PGWG eine genetische Komponente. Es konnte festgestellt werden, dass Verwandte ersten Grades ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines PGWG aufweisen (76). Außerdem sind Augen mit einer kurzen axialen Länge und einer dickeren und weiter anterior positionierten Linse prädisponiert. Weitere anatomische Risikofaktoren sind eine verkürzte vordere Augenkammer ($< 2,5$ mm), sowie Iriden mit größeren Krümmungen (70, 71). Zudem steigt das Risiko zur Entstehung des PWGW mit zunehmendem Alter an, da sich die Linse im Alter verdickt und sich folglich die vordere Augenkammer verkleinert (71).

2.2.5 Diagnose

Eine frühzeitige Diagnose des Glaukoms ist unerlässlich, um irreversible Schäden an den neuroretinalen Geweben zu verhindern und permanenten Gesichtsfeldeinschränkungen vorzubeugen (77). Weltweit bleibt das Glaukom jedoch in neun von zehn Fällen undiagnostiziert (65). Da es in der Glaukom-Diagnostik keine optimalen standardisierten Verfahren gibt, kann eine frühzeitige Diagnose schwierig sein (64).

Wichtig in der Glaukom-Diagnostik ist die ophthalmologische Untersuchung des Sehnervenkopfes hinsichtlich der charakteristischen Veränderungen, die bei der Erkrankung auftreten. Der Verlust von RGZ führt zu Gesichtsfeldeinschränkungen. Diese beginnen normalerweise mittelperipher und breiten sich dann progressiv nach zentral aus (64, 67). Mithilfe der Perimetrie (Gesichtsfelduntersuchung) können Verlaufskontrollen, eine Früherkennung, sowie die Progredienz der Erkrankung erfasst werden (19). Der Messung des IOD (Tonometrie) kommt in der Glaukom-Diagnostik eine bedeutende Rolle zu. Ein gesteigerter IOD gilt als wichtiger Risikofaktor für die Entstehung eines Glaukoms, ebenso für die Progression der Erkrankung. Da die Senkung eines erhöhten IODs als Goldstandard in der Therapie gilt, ist deren Messung sowohl für die Diagnose, als auch für die

Verlaufskontrolle während der Therapie bedeutend (78, 79). Der Verdacht auf ein Glaukom besteht bei Werten zwischen 22 und 26 mmHg (19). Ein Verfahren zur Untersuchung eines Geschlossenwinkelglaukoms ist die Gonioskopie. Bei diesem Verfahren wird der Kammerwinkel untersucht. Die Gonioskopie ist jedoch ein recht subjektives Verfahren mit einer geringen Reproduzierbarkeit. Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Gonioskopie je nach Lichtstärke, sowie mechanischer Kompression des Auges variieren können (64). Per AS-OCT (engl. *anterior segment optical coherence tomography*) können Querschnittsaufnahmen der vorderen Augenkammer aufgenommen werden. Mithilfe der Ultraschall-Biomikroskopie kann man spezifisch Ursachen eines Winkelverschlusses detektieren (64, 80).

2.2.6 Therapie

Das Hauptziel der Glaukom-Therapie besteht darin die Progression der Erkrankung zu verlangsamen und eine Verbesserung der Lebensqualität des Patienten zu erreichen. Daher ist eine frühzeitige Diagnose und Intervention entscheidend (64). Die Therapie des Glaukoms basiert auf einer Senkung des erhöhten IODs. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Senkung des IODs im Vergleich zu einer nicht-behandelten Kontrollgruppe zu einer Verlangsamung der Krankheitsprogression führt (64, 65, 81, 82). Die Wahl der Therapie und der angestrebte IOD sind abhängig vom Ausgangsdruck, der Ausgangslage der vorliegenden neuronalen Schäden, dem Alter des Patienten und dem Schweregrad der Erkrankung. Des Weiteren wird dabei auch das Risiko der Krankheitsprogression, sowie das Risiko für auftretende Nebenwirkungen berücksichtigt. Dabei wird der IOD therapeutisch umso mehr gesenkt, je größer das Risiko für eine Verschlechterung des Zustands und je größer die Initialschäden sind (65). Dabei werden verschiedene Arzneimittelgruppen unterschieden, welche in Tabelle 3 inklusive ihrer Wirkungsweisen aufgelistet sind. Die Therapie beginnt in den meisten Fällen mit einer topischen Medikation. Zunächst wird meist eine Monotherapie mit Prostaglandin-Analoga oder β -Blockern durchgeführt (83).

Tabelle 2: Medikamente zur Senkung des IOD und deren Wirkung, aus Sachsenweger et al. (2003) (19)

Medikament	Wirkung	Beispiel Wirkstoff
Prostaglandin-Analoga	Verstärkung des uveoskleralen Abfluss	Latanoprost
β -Blocker	Senkung der Kammerwassersekretion	Carteolol
Karboanhydrasehemmer	Hemmung der für die Kammerwasserbildung notwendigen Karboanhydrase	Dorzolamid
Parasympathomimetika	Verbesserung des trabekulären Abflusses	Pilocarpin
α -2-Agonisten	Senkung der Kammerwassersekretion	Clonidin

Eine Lasertherapie bzw. chirurgische Intervention wird bei unzureichender medikamentöser Drucksenkung durchgeführt. Des Weiteren kann eine chirurgische Intervention oder Lasertherapie in schweren Krankheitsfällen die Therapie der Wahl sein (64, 65).

Lymphozytenentwicklung entstehen physiologischerweise einige Lymphozyten, die eine Affinität für körpereigene Antigene aufweisen. Normalerweise werden diese durch verschiedene Mechanismen entweder eliminiert oder aber auch kontrolliert. Dadurch entsteht die sogenannte Selbst-Toleranz, wodurch das Immunsystem körpereigene Strukturen nicht angreift. Sind diese Toleranzmechanismen gestört oder versagen, kann es zur Autoimmunität kommen (87).

Darüber hinaus werden natürlichen Autoantikörpern (AAK) einige wichtige Funktionen im gesunden Immunsystem zugeschrieben. Komplexe Profile natürlicher AAK liegen im Serum eines jeden gesunden Individuums vor. Normalerweise haben diese keine pathogenen Eigenschaften (89, 90). Nagele *et al.* (2013) (89) konnten im Serum von gesunden Probanden abundante IgG-AAK gegen körpereigene Proteine nachweisen. Diese werden von Geburt an gebildet und können eine wichtige Rolle bei der Homöostase verschiedener Zelltypen haben, sowie einige nützliche physiologische Funktionen übernehmen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von bestimmten IgG-AAK eine axonale Regeneration nach einer Nervverletzung verhindert wurde (91). Diese Beobachtungen unterstreichen die bedeutende Funktion natürlicher Antikörper im gesunden Immunsystem (87, 89–91). Boes *et al.* (2000) (92) postulierten, dass die natürlichen AAK ohne spezifische Antigenstimulation vorhanden und größtenteils polyreaktiv sind. Daher weisen sie breite Spezifitäten sowohl für Autoantigene, als auch Fremdstrukturen auf (Kreuzreaktivität). Darüber hinaus ist auch die Molekulare Mimikry ein bedeutender Mechanismus der zur Autoimmunität führen kann. Dieser tritt auf, wenn eine Homologie zwischen den Epitopen körpereigener Strukturen und Fremdstrukturen besteht und dadurch eine Immunreaktion ausgelöst werden kann (93). Die natürlichen AAK können auch zur Aktivierung des Komplementsystems führen. Infolgedessen kann es zur Bildung von pathogenen Immunkomplexen kommen, insofern sich die Affinität für das jeweilige Antigen erhöht, die AAK vermehrt exprimiert werden oder selbst-reaktiv sind. Darüber hinaus wird spekuliert, dass neurodegenerative Prozesse möglicherweise durch ein Ungleichgewicht und den Verlust der protektiven Funktionen der natürlichen AAK begünstigt sein könnten (94).

Neben den bereits genannten Risikofaktoren, die zu der Entstehung eines Glaukoms beitragen können, wird vermutet, dass ebenfalls autoimmune Prozesse an der Pathogenese dieser Augenerkrankung beteiligt sind (64, 85, 95). In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Studien belegt werden, dass die Pathogenese und die Progression des Glaukoms mit einigen autoimmunen Komponenten assoziiert sind. Bis heute ist nicht geklärt, ob die autoimmunen Prozesse als Konsequenz der Erkrankung auftreten oder kausativ für diese sind (94, 96).

In zahlreichen Studien unserer Arbeitsgruppe konnten veränderte AAK-Profile gegen retinale und neuronale Antigene im Serum und Kammerwasser von Glaukom-Patienten nachgewiesen werden (95, 97, 98). Die AAK-Profile sind spezifisch für die verschiedenen Glaukom-Subgruppen (POWG und NDG) als auch Risikogruppen (OHT) (97) und könnten folglich als potenzielle Biomarker verwendet werden, um eine frühzeitige Diagnostik des Glaukoms zu ermöglichen. Darüber hinaus könnten sie möglicherweise auch zur Subklassifizierung der unterschiedlichen Glaukomarten dienen (95, 99).

Bis heute konnten bereits zahlreiche Glaukom-assoziierte AAK gegen verschiedene retinale und neuronale Antigene, wie z.B. gegen α -Fodrin (99), Glykosaminoglykane (100), Glutathion S-Transferase (101), das Myelin-Basisprotein (98), sowie Hitzeschockproteine (HSP) (102–105) identifiziert werden. Tezel *et al.* (2000) (106) konnten belegen, dass der

rekombinante Anti-HSP27 Ak, welcher vermehrt exprimiert im Serum von Glaukom-Patienten vorlag, zur Apoptose von RGZ führte und eine proinflammatorische Wirkung aufwies. Durch exogene Applikation des rekombinanten Anti-HSP27 Ak auf retinales Gewebe konnte eine gesteigerte Apoptoserate der RGZ *in vitro* induziert werden. In einer anderen Studie konnte belegt werden, dass eine aktive Immunisierung von Ratten mit verschiedenen okulären Antigenen zu einem immun-vermittelten Verlust von RGZ führt und dies mit einer erhöhten Expression von AAK-Molekülen im Serum gegen diese okulären Strukturen einhergeht (107). Demgegenüber konnten in Studien auch niedrig abundante AAK-Moleküle in den Glaukom-Subgruppen als auch Risikogruppen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden nachgewiesen werden. Als Beispiele seien an dieser Stelle Antikörper gegen Stress-assoziierte Proteine, wie Saures Gliafaserprotein (GFAP), Vimentin, sowie γ -Synuclein zu nennen. Die erniedrigte Expression dieser AAK-Moleküle spiegelt möglicherweise den Verlust derer protektiven Eigenschaften wieder (94).

Neben der potenziell neurodegenerativen Wirkung von AAK konnten in vielen Studien jedoch auch neuroprotektive Effekte von niedrig abundanten, rekombinanten AAK-Molekülen auf RGZ *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (60, 61, 85, 108–110). Teister *et al.* (2017) (109) konnten durch die intravitreale Applikation des rekombinanten Anti- α -Synuclein Ak Neuroprotektion auf RGZ *in vivo* induzieren. Des Weiteren konnte in Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die exogene Applikation von rekombinanten Antikörpern gegen γ -Synuclein, sowie GFAP einen antiapoptotischen Effekt auf die RGZ *in vitro* ausüben können (61, 108). Darüber hinaus betonen Shoenfeld *et al.* (2005) (90), dass viele AAK-Moleküle neben pathologischen, nachteiligen Effekten auch physiologische und regulatorische Funktionen vermitteln können. Die Autoren unterstreichen zudem das bedeutende therapeutische Potenzial von protektiven AAK zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen.

Abgesehen davon, ob AAK kausativ für die Glaukom-Erkrankung sind oder nur ein Epiphänomen darstellen, besitzen sie ein bedeutendes diagnostisches als auch therapeutisches Potenzial. So könnten beispielsweise spezifische AAK-Profile in Zukunft als diagnostische Biomarker für die Glaukom-Erkrankung bzw. Subklassifizierung verwendet werden und künftig eine Früherkennung dieser schweren Augenerkrankung ermöglichen (90, 94, 111).

2.2.9 Synthetische CDR-Peptide

Die CDR-Regionen eines Antikörpers sind, wie bereits zuvor beschrieben, hypervariable Sequenzregionen des Antikörpers, welche die Antigenbindungsstelle determinieren und folglich für die Spezifität des Antikörpers verantwortlich sind (84, 85, 87).

Synthetische CDR-Peptide besitzen als bioaktive Moleküle einige Vorteile. Sie weisen eine geringe Immunogenität auf, sowie eine hohe Spezifität, sodass das Risiko einer systemischen Toxizität stark reduziert ist. Darüber hinaus besitzen sie aufgrund ihrer geringen Größe hervorragende Gewebspenetrations-eigenschaften (112–114). In einigen Studien wurden bereits sowohl immunmodulatorische und immunregulatorische Funktionen als auch antivirale, antibakterielle und antitumorale Eigenschaften synthetischer CDR-Peptide beschrieben. Interessanterweise waren die Effektorfunktionen der synthetischen CDR-Peptide unabhängig von der Antigen-spezifität der ursprünglichen Antikörper-Moleküle. In malignen Melanomzellen konnte beispielsweise eine CDR-vermittelte Apoptose induziert

werden (112, 115–117). Diese Beobachtungen unterstreichen das vielversprechende therapeutische Potenzial dieser Antikörper-Peptide (116, 117).

Auch für die Glaukom-Therapie könnten synthetische CDR-Peptide einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen (60, 85). In MS-basierten Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnten zahlreiche CDR-Regionen der variablen IgG-Domäne als potenzielle Biomarker beim POWG identifiziert werden. Dabei wurden signifikante Unterschiede dieser Peptide hinsichtlich der Expression in der IgG-Struktur im Serum von POWG-Patienten detektiert, welche möglicherweise mit der Pathogenese des Glaukoms assoziiert sind (85). Darüber hinaus konnten in weiteren Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits spezifische Interaktionspartner von Glaukom-spezifischen CDR-Peptiden in der Retina identifiziert werden. In einem MS-basierten Verfahren konnte beispielsweise das Protein *High Temperature Protein A2* (HTRA2) als spezifischer Interaktionspartner eines CDR-Peptids identifiziert werden. Des Weiteren zeigte das synthetische CDR-Peptid einen neuroprotektiven Effekt auf RGZ in einem *in vitro* Glaukommodell, ausgelöst durch Inhibierung der mitochondrialen Dysfunktion und der zellulären Stressantwort (60).

In weiteren MS-basierten Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte in der Retina ein neuer hochaffiner Interaktionspartner des CDR-Peptids (SCTGTSSDVGGYNYVSWYQ) identifiziert werden. Dabei zeigte das synthetische CDR-Peptid eine hohe Affinität für das Leucin-reiche Kernphosphoprotein 32A (ANP32A). Das Phosphoprotein ANP32A ist an der Modulation und Regulation einiger zellulärer Prozesse beteiligt. Als Beispiele seien an dieser Stelle Chromatin-Modifikationen und die Modulation von Caspasen zu nennen (118). Außerdem ist ANP32A als Teil des Inhibitor der Acetyltransferase (INHAT)-Komplexes an der Regulation der Histonacetylierung beteiligt (119, 120). ANP32A konnte darüber hinaus bereits mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer assoziiert werden, in welcher das Protein in verschiedenen Gehirnregionen (z.B. im Hippocampus) erhöht exprimiert vorlag (121). Ungeachtet dessen ist die genaue Rolle von ANP32A an der Pathogenese des Glaukoms noch weitestgehend unbekannt und stellt daher eine interessante Zielstruktur für die Glaukomforschung dar. Daher soll in der vorliegenden Doktorarbeit der potenziell neuroprotektive Effekt des Glaukom-assoziierten CDR-Peptids auf RGZ im *in vitro* Glaukommodell untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien Dry Eye-Syndrom

Protein- und Peptidbestimmung

Bezeichnung	Bezugsquelle
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Greiner-CELLSTAR-96-Well-Platten	Merck, Darmstadt, Deutschland
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Brutschrank	Thermo Life Sciences, Egelbach, Deutschland
Multiskan Ascent	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA

Trypsin-Verdau

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Iodoacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Acetonitril (ACN)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Promega Corporation, Madison, USA

Lektin-Affinitätschromatographie

Bezeichnung	Bezugsquelle
Jacalin (JAC), Agarose-gebunden	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
Concanavalin (ConA), Agarose-gebunden	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA I), Agarose-gebunden	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
Wheat Germ Agglutinin (WGA), Agarose-gebunden	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
Neutralisationspuffer	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Pierce™ Centrifuge Columns	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland

PNGase F-Verdau

Bezeichnung	Bezugsquelle
N-Glycosidase F	Roche, Mannheim, Deutschland
Nonidet P40 (NP-40)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim,

10x PBS	Deutschland
Sodium-Dodecyl-Sulfate Ultrapure (SDS)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA MP Biomedicals, Santa Ana, USA

Gelelektrophorese

Bezeichnung	Bezugsquelle
Invitrogen™ Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage™ LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
20x NuPage™ Laufpuffer MOPS	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage™ Novex Bis-Tris Mini Gels	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage™ Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage™ Antioxidans	Invitrogen, Carlsbad, USA
Seebblue™ Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Invitrogen XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophorese System	Invitrogen, Carlsbad, USA
P25 Standard Power Pack	Analytic Jena AG, Jena, Deutschland
Pierce™ Glycoprotein Staining Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Massenspektrometrie

Bezeichnung	Bezugsquelle
LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
EASY-nLC 1200	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Acclaim™ PepMap RSLC-Säule (75 µm x 150 mm)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Sonstiges

Bezeichnung	Bezugsquelle
LC-MS Wasser	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Fisher Chemical, Geel, Belgien
DPBS	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96 %	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Falcontubes	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	Fisher Chemical, Geel, Belgium
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schirmer-Streifen	Ophtechnics Unlimited, DLF City, Gurgaon, India
SOLAµ™ HRP 2mg/1mL 96 Well Plate	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Parafilm	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters 3K	Merck, Darmstadt, Deutschland
Intelli-Mixer	LTF Labortechnik, Wasserburg am Bodensee, Deutschland

Eppendorf Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HLC Kühl-Thermo-Mixer KTM 100 RP	HLCBioTech, Bovenden, Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co, Berlin, Deutschland
Paramix III	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Epson Perfection V600 Photo Scanner	Epson Deutschland GmbH, Meerbusch, Deutschland

Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
PEAKS Studio Version 10	Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Kanada

3.2 Methoden Dry Eye-Syndrom

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Anreicherung von Glykoproteinen und -peptiden aus dem Tränenfilm von gesunden Studienteilnehmern zu etablieren. Diese wurde zunächst auf Glykoprotein-Ebene hinsichtlich ihrer Performance als auch Effizienz beurteilt und nach erfolgreicher Etablierung auf Glykopeptid-Ebene angewendet. Im Anschluss wurden die spezifischen N-Glykosylierungsstellen der Glykopeptide mittels MS analysiert. In Abbildung 7 ist eine graphische Darstellung des Probenvorbereitungsprotokolls zu sehen.

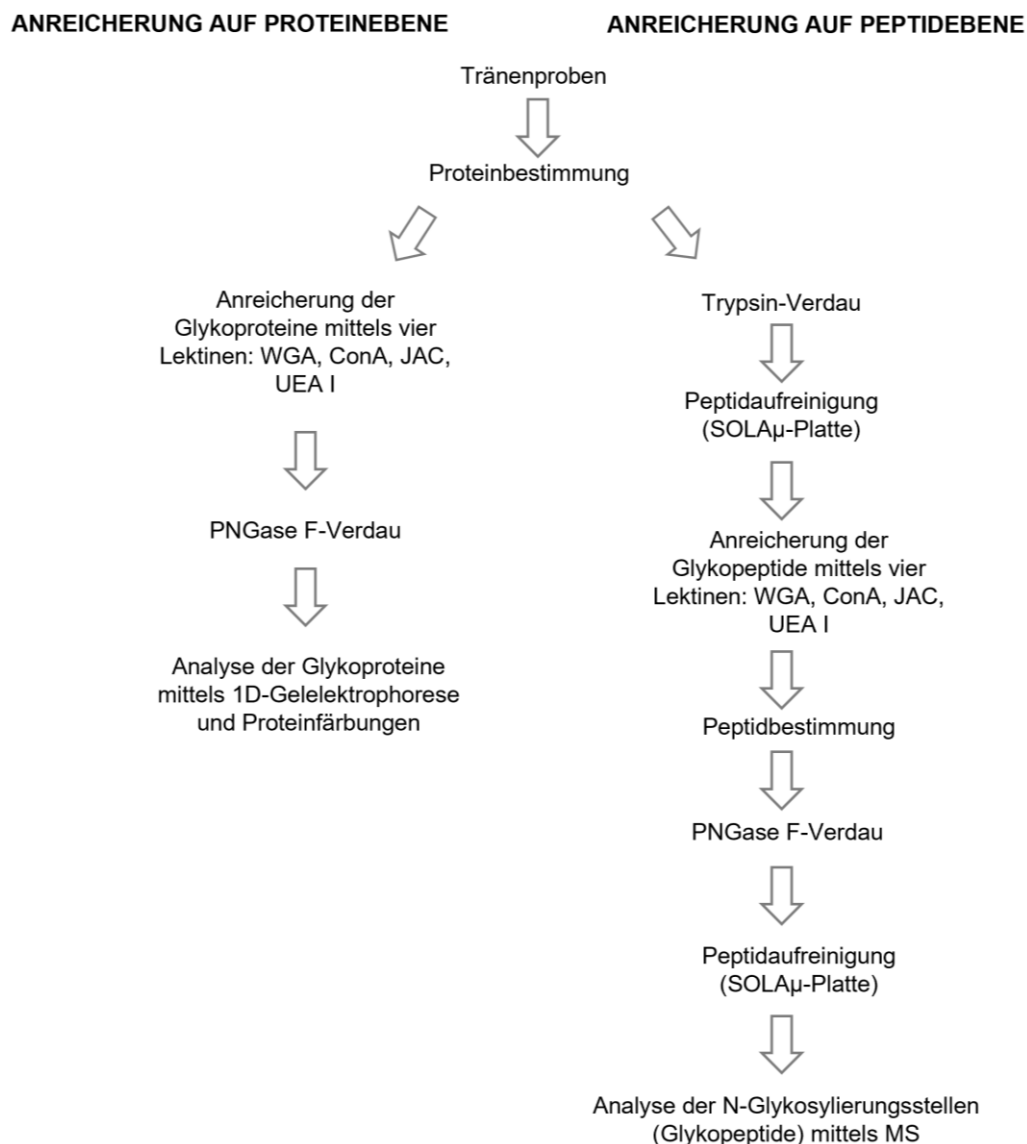


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Probenvorbereitungsprotokolls zur Anreicherung und Analyse der Glykoproteine und -peptide aus dem Tränenfilm von gesunden Studienteilnehmern. Die Entwicklung der Anreicherungsmethode erfolgte zunächst auf Glykoprotein-Ebene. Anschließend wurde die Methodik auf Glykopeptid-Ebene angewendet, um die N-Glykosylierungsstellen der Glykopeptide umfangreich mithilfe der MS zu charakterisieren.

3.2.1 Angaben zu den Studienproben

Die Etablierung einer Anreicherungs­methode der Glykoproteine und -peptide aus dem Tränenfilm erfolgte zunächst auf Proteinebene. Für die Entwicklung der Methode wurden gepoolte Proben von zwei gesunden Spendern (männlich und weiblich, Durchschnittsalter 30 ± 5 Jahre) verwendet. Des Weiteren wurde eine schriftliche Einverständniserklärung der Studienteilnehmer eingeholt.

Für die Detektion der N-Glykosylierungsstellen auf Peptidebene wurden drei biologische Replikate (R1-3) von insgesamt zwölf gesunden Spendern verwendet. Die Proben der Studienteilnehmer wurden mit deren schriftlichen Einverständniserklärung entnommen. Für die Analyse wurden ausschließlich die Proben von Studienteilnehmern berücksichtigt, bei denen die Lauflänge des Schirmer-Streifens > 10 mm war. Um geschlechtsspezifische Unterschiede innerhalb der Analyse zu vermeiden, wurden jeweils die Proben zweier männlicher und zweier weiblicher Probanden zu einem biologischen Replikat gepoolt. In Tabelle 3 sind das Alter sowie die durchschnittlichen Lauflängen der Schirmer-Streifen aller Studienteilnehmer gelistet.

Tabelle 3: Angaben zu den Studienproben. Für die Anreicherung auf Glykopeptid-Ebene wurden drei biologische Replikate von insgesamt 12 Studienteilnehmern verwendet. Die Tabelle zeigt das Durchschnittsalter der Spender, sowie die mittlere Lauflänge [mm] der Schirmer-Streifen.

	R1	R2	R3
Durchschnittsalter [Jahre]	$29,5\pm 3,9$	$29\pm 2,4$	$32\pm 7,6$
Mittelwert Lauflänge [mm]	$26,5\pm 4,8$	$17,9\pm 8,2$	$19,1\pm 7,1$

3.2.2 Probenentnahme

Die Tränenproben wurden mittels Schirmer-Streifen entnommen. Dazu wurden diese für 5 min in das untere Augenlid in Kontakt zur Augenoberfläche platziert (siehe Abbildung 8). Eine Lauflänge der Tränenflüssigkeit > 10 mm gilt als physiologisch, wobei Lauflängen < 5 mm als pathologisch interpretiert werden (z.B. DES-Syndrom) (3, 19). Die Schirmer-Streifen wurden anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Je nach Bedarf wurden die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde jedes Reaktionsgefäß mit 300 μl DPBS (engl. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) befüllt und üN (ca. 18 h) bei 4°C mithilfe eines Schüttlers inkubiert. Dies wurde durchgeführt, um die Proteine des Tränenfilms aus dem Schirmer-Streifen zu lösen. Am nächsten Tag wurden die Reaktionsgefäße bei 1,000 g für 1 min zentrifugiert. Der Schirmer-Streifen wurde verworfen und die in DPBS-gelösten Proteine für eine anschließende photometrische Proteinbestimmung verwendet.



Abbildung 8: Probenentnahme der Tränenflüssigkeit mithilfe eines Schirmer-Streifens. Eine Lauflänge der Tränenflüssigkeit > 10 mm gilt als physiologisch (3, 19).

3.2.3 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet. Als Proteinstandard wurde Albumin in der Konzentration 2 mg/ml verwendet. Es wurde zunächst eine Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde der Albumin-Standard in den Konzentrationen 2,0 / 1,5 / 1,0 / 0,75 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,025 mg/ml in DPBS gelöst, um eine Kalibrierlösung herzustellen. Anschließend wurden zunächst jeweils 10 µl des Kalibrierstandards sowie der jeweiligen Probe in eine 96-Loch Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend mit 190 µl Färbereagenz (BCA Reagenzien A und B im Verhältnis 1:50) befüllt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Proben für 30 min bei 37°C. Die Absorptionswerte der Proben wurden mithilfe des Multiskan Ascent Photometers (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Mithilfe des Proteinstandards konnte eine Kalibriergerade erstellt werden, um die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben zu ermitteln.

3.2.4 Herstellung der Tränenpools

Zur Anreicherung und Analyse der Glykoproteine wurden sowohl auf Protein- als auch auf Peptid-Ebene biologische Tränenpools mit einer Proteinmenge von insgesamt 100 µg verwendet. Die Angaben zu den Studienteilnehmern, welche zur Anfertigung der jeweiligen biologischen Tränenpools verwendet wurden, sind in Kapitel 3.2.1 gelistet. Zur Herstellung des Tränenpools wurden die einzelnen Proben zu gleichen Anteilen vermischt und auf ein Gesamtvolumen von 200 µl mit DPBS aufgefüllt.

3.2.5 Anreicherung mittels Lektin-Affinitätschromatographie

Im Rahmen der Methodenetablierung zur Anreicherung von Glykoproteinen und -peptiden aus dem Tränenfilm wurde die Lektin-Affinitätschromatographie mit verschiedenen Agarose-gebundenen Lektinen durchgeführt. Für die folgenden Analysen wurden die vier Lektine *Concanavalin* (ConA), *Wheat Germ Agglutinin* (WGA), *Jacalin* (JAC) und *Ulex Europaeus Agglutinin I* (UEA I) verwendet (siehe Tabelle 4). Für die Anreicherung wurden diese entweder als Ein-Lektin-Säule (außer UEA I) oder als Multi-Lektin-Säulen (3L-Säule: ConA/WGA/JAC und 4L-Säule: ConA/WGA/JAC/UEA I) verwendet. Für die Etablierung bzw. Beurteilung des Probenvorbereitungsprotokolls, wurden die Glykoproteine zunächst ohne vorherigen enzymatischen Verdau aus dem Tränenproteom angereichert. Die Auswertung

der Daten auf Glykoprotein-Ebene erfolgte sowohl durch 1D-Gelelektrophorese als auch durch spezifische Proteinfärbungen. Beide Evaluierungsmethoden wurden in den folgenden Kapiteln 3.2.6.2 und 3.2.6.3 detailliert beschrieben. Nach erfolgreicher Etablierung des Glykoprotein-Anreicherungsverfahrens, wurde die entwickelte Methodik auf vorher enzymatisch verdaute Proteinproben angewendet. Der In-Lösung Trypsin-Verdau der Tränenproteine wurde im Kapitel 3.2.7.1 näher beschrieben. Dies ermöglichte die direkte Anreicherung von Glykopeptiden, deren spezifische N-Glykosylierungsstellen mittels anschließender MS-Analyse nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 4: Lektine und ihre Spezifität für Zucker (122)

Lektin	Spezifität für Zucker
<i>Concanavalin (ConA)</i>	Mannose
<i>Wheat Germ Agglutinin (WGA)</i>	N-Acetylglucosamin
<i>Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA I)</i>	Fucose
<i>Jacalin (JAC)</i>	Galaktose

Zur Anreicherung der Glykoproteine bzw. -peptide wurden kommerzielle Zentrifugationsfiltereinheiten (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) verwendet. Diese Filtereinheiten wurden mit insgesamt 200 µl Agarose-gebundenen Lektinen gefüllt. Dabei wurden die Säulen entweder mit einem einzelnen Lektin (Ein-Lektin-Säule) oder mit mehreren Lektinen zu gleichen Anteilen befüllt (Multi-Lektin-Säule: 3L und 4L). Anschließend wurden die Säulen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und für 1 min bei 1,000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Lektinsäulen wurden im Anschluss je zweimal mit 200 µl DPBS gewaschen und anschließend mit der entsprechenden Tränenprobe befüllt. Für die Anreicherung auf Glykoprotein-Ebene wurden 100 µg unverdaute Tränenproteine hinzugefügt. Für die Anreicherung auf Glykopeptid-Ebene wurden 100 µg Tränenpeptide des aufgereinigten Trypsin-Verdaus (siehe Kapitel 3.2.7.2) hinzugegeben. Die Anreicherung der Glykoproteine bzw. -peptide erfolgte üN bei 4°C in einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde zunächst die Durchflussfraktion (DF) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen (1 min bei 1,000 g). Die Proben wurden anschließend dreimal mit je 200 µl DPBS gewaschen und der Durchfluss verworfen. Die Elution der Glykoproteine bzw. -peptide erfolgte zweimal durch Zugabe von 100 µl 1 % Trifluoressigsäure (TFA) und jeweils einer Inkubation von 10 min bei RT auf dem Schüttler. Anschließend wurden die Eluatsfraktionen in neuen 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen (1 min bei 1,000 g), welche zuvor mit 10 µl Neutralisationspuffer befüllt wurden.

3.2.6 Probenvorbereitung für die Anreicherung auf Proteinebene

3.2.6.1 PNGase F-Verdau von Glykoproteinen

Um die Glykanstrukturen von den Glykoproteinen abzuspalten, wurde ein enzymatischer Verdau mittels des Enzyms PNGase F durchgeführt. Dieser diente bei der Entwicklung der Anreicherungsmethode als zusätzliche Kontrolle. Dafür wurden die zuvor eingeeengten Tränenproben in 20 µl DPBS gelöst und für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Es wurden 20 µl 2 % SDS (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*) zu den gelösten Proteinen hinzugegeben und die Proben für 30 min bei 60°C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Für die Herstellung des PNGase F-Verdau-Puffers wurden 4 % Nonidet P40 (NP-40) in 5x PBS gelöst. Nach der Inkubation wurden zu jeder Probe 20 µl des PNGase F-Verdau-Puffers,

sowie 2 U der PNGase F (500 U/ml) hinzugegeben. Der enzymatische Verdau erfolgte ün bei 37°C.

3.2.6.2 *Reduzierte Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Um die Effizienz der Anreicherungsmethode auf Glykoprotein-Ebene zu beurteilen, wurde eine reduzierte 1D-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden zunächst die eingeeengten Proteinproben ± PNGase F in 5 µl NuPage™ LDS Sample Buffer (4x) gelöst und 2 µl NuPage™ Reducing Agent (10x) hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 13 µl LC-MS Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Alle Ansätze wurden im Anschluss für 10 min bei 70°C erhitzt, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Für die Herstellung des Laufpuffers wurden 50 ml 20x NuPage™ Laufpuffer MOPS mit 950 ml VE-Wasser vermischt. Von diesem Gemisch wurden 200 ml für die innere Kammer abgenommen und mit 500 µl NuPage™ Antioxidans versetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 %-ige BisTris-Gele und das Invitrogen XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophorese System verwendet. Zunächst wurde die innere Kammer mit 200 ml Laufpuffer befüllt und anschließend die äußere Gelkammer mit den restlichen 800 ml des Laufpuffers. Anschließend wurde die erste Tasche des Gels mit 5 µl des Protein-Markers SeeBlue™ Plus 2 befüllt und die anderen Taschen mit den vorbereiteten Proben (Gesamtvolumen: 20 µl) beladen. Daraufhin wurden die Proteingemische für 2 h bei 4°C und 150 V aufgetrennt.

3.2.6.3 *Coomassie- und Glykoprotein-Färbung*

Mittels der Coomassie-Färbung wurden alle Proteine auf dem Gel visualisiert, indem der Farbstoff die basischen Seitenketten der Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenz anfärbt. Dafür wurde das Gel nach erfolgter 1D-Gelelektrophorese zunächst für 10 min bei RT in Fixierlösung (40 ml Wasser, 50 ml Methanol (MeOH) und 10 ml Essigsäure (ES)) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit VE-Wasser wurde das Gel mit der Färbelösung des Invitrogen™ Colloidal Blue Staining Kits (55 ml Wasser, 20 ml MeOH, 20 ml Färbereagenz A) für weitere 10 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 5 ml des Färbereagenz B des Kits zu dem Gemisch hinzugegeben und das Gel ün bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde das gefärbte Gel mehrmals mit VE-Wasser gewaschen und entfärbt und anschließend mit einer Auflösung von 300 dpi gescannt. Im Anschluss wurde das Gel befeuchtet bei 4°C gelagert.

Zum Nachweis der angereicherten Glykoproteine wurde eine Glykoprotein-Färbung mithilfe des Pierce™ Glycoprotein Staining Kit durchgeführt. Im Allgemeinen werden bei der Glykoprotein-Färbung die Zuckereinheiten der Glykoproteine angefärbt. Die Färbung beruht auf der *Periodic Acid-Schiff-(PAS)*-Reaktion. Durch die Behandlung des Gels mit einer Periodat-Lösung kommt es zur Oxidation der Glykole der Glykoproteine zu reaktiven Aldehydgruppen. Durch Reaktion der reaktiven Aldehydgruppen mit dem Färbereagenz (Schiff-Reagenz) werden magentafarbene Banden auf dem Gel sichtbar, welche spezifisch die Glykoproteine markieren. Als Positivkontrolle wurde ein glykosylierter Proteinstandard (Meerrettichperoxidase) und als Negativkontrolle ein nicht-glykosylierter Proteinstandard (Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor) verwendet. Für die Färbung wurde das Gel zunächst für 30 min in 100 ml 50 % MeOH fixiert. Anschließend wurde das Gel je zweimal in 50 ml 3 % ES für 10 min gewaschen. Im Anschluss wurde das Gel in die Oxidationslösung des Kits, welche zuvor in 150 ml ES gelöst wurde, überführt und für 15 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach erfolgter Oxidation wurde das Gel dreimal mit 50 ml 3 % ES für jeweils 5 min gewaschen. Daraufhin wurde das Gel in 25 ml der Glykoprotein-Färbung überführt und für

weitere 15 min auf dem Schüttler inkubiert. Die Färbelösung wurde verworfen und das Gel mit 25 ml der Reduktionslösung des Kits für 5 min bei RT behandelt. Abschließend wurde das angefärbte Gel dreimal mit 3 % ES und nochmals mit VE-Wasser gewaschen. Das Gel wurde mit einer Auflösung von 300 dpi gescannt und im Anschluss in 3 % ES bei 4°C gelagert.

3.2.7 Probenvorbereitung für die Anreicherung auf Peptidebene

3.2.7.1 In-Lösung Trypsin-Verdau

Für die Anreicherung auf Glykopeptid-Ebene wurde ein In-Lösung Trypsin-Verdau durchgeführt. Dazu wurden zunächst die gepoolten Tränenproben (Gesamtmenge: 100 µg, siehe Kapitel 3.2.4) im Rotationsvakuumkonzentrator bei 45°C bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurden die Proben jeweils in 100 µl 10 mM Ammoniumbicarbonat (ABC) gelöst und für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurden zu jeder Probe je 30 µl 20 mM Dithiothreitol (DTT) in 10 mM ABC gegeben und für 30 min bei 56°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben kurz auf RT abgekühlt und je 30 µl 40 mM Iodoacetamid (IAA) in 10 mM ABC hinzugegeben. Diese wurden anschließend für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden 50 µl Trypsin-Lösung (0,1 µg/µl) in 10 mM ABC 10 % Acetonitril (ACN) hinzugegeben. Der Proteinverdau erfolgte im Verhältnis Protein-Enzym 20:1. Alle Ansätze wurden anschließend bei 37°C üN inkubiert und am nächsten Tag bei 45°C im Rotationsvakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt.

3.2.7.2 Peptidaufreinigung

Die Peptidaufreinigung mittels der SOLAµ™-Platten (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) wurde jeweils nach dem tryptischen Verdau (siehe Kapitel 3.2.7.1) sowie vor der massenspektrometrischen Analyse (siehe Kapitel 3.2.7.5) der angereicherten Glykopeptide durchgeführt. Die eingengten Proben wurden zunächst in 100 µl 0,1 % Ameisensäure (AS) gelöst und für 10 min im Ultraschallbad auf Eis behandelt. Die Membranen der SOLAµ™-Platte wurden zunächst mit 100 µl ACN aktiviert und für 1 min bei 4000 g abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde in einer 96-Loch Mikrotiterplatte aufgefangen und anschließend verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte eine Äquilibrierung der Membranen mittels 100 µl 0,1 % AS. Der Durchfluss der Membranen wurde erneut verworfen. Anschließend wurden die Membranen mit 100 µl der gelösten Proben beladen und der Durchfluss in einer neuen 96-Loch Mikrotiterplatte aufgefangen. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt, um eine maximale Peptidausbeute für die MS-Analyse zu gewährleisten. Die beladenen Membranen wurden anschließend je fünfmal mit 0,1 % AS gewaschen und der Durchfluss jeweils verworfen. Die gebundenen und aufgereinigten Peptide wurden daraufhin je zweimal mit 100 µl Elutionspuffer (0,1 % AS in 50 % ACN) eluiert. Beide Eluatsfraktionen wurden in neuen Reaktionsgefäßen vereinigt und bei 45°C im Rotationsvakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt.

3.2.7.3 Peptidbestimmung

Nach der Anreicherung der Glykopeptide mittels Lektin-Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 3.2.5) wurde eine photometrische Peptidbestimmung durchgeführt, um die Glykopeptid-Konzentrationen der angereicherten Proben zu ermitteln. Diese wurde mit dem Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay Kit durchgeführt. Als Standard wurde der Peptide Digest Assay Standard in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Dafür wurde zunächst eine Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde die Stocklösung des Peptidstandards in den Konzentrationen (mg/ml) 1,0 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,0625 / 0,0313 / 0,0156 / 0 in LC-MS Wasser gelöst, um eine Kalibrierlösung zu erhalten. Im Anschluss

wurden jeweils 10 µl des Peptidstandards sowie der Proben in eine 96-Loch Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 190 µl Färbelösung versetzt. Die Färbelösung bestand im Verhältnis 50:48:2 aus den Kit-spezifischen Reagenzien A, B und C. Die Inkubation der Proben erfolgte für 15 min bei 37°C. Die Absorptionen der Proben wurden bei einer Wellenlänge von 480 nm mithilfe des Multiskan Ascent Photometers gemessen. Anhand der Absorptionen des Peptidstandards konnte eine Kalibriergerade erstellt werden, um die Peptidkonzentrationen der einzelnen Proben zu ermitteln.

3.2.7.4 PNGase F-Verdau von Glykopeptiden

Um eine Abspaltung der Glykanstrukturen von den Glykopeptiden zu gewährleisten und folglich einen Nachweis der N-Glykosylierungsstellen per MS zu ermöglichen, wurde nach der erfolgreichen Anreicherung (siehe Kapitel 3.2.5) ein enzymatischer Verdau der Proben mittels PNGase F durchgeführt. Die angereicherten und eingeeengten Glykopeptide wurden in 200 µl 5 x PBS gelöst und anschließend für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Zugabe von 0,75 U PNGase F (500 U/ml) erfolgte eine Inkubation der Proben ÜN bei 37°C.

3.2.7.5 Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse der Glykosylierungsstellen der zuvor angereicherten Glykopeptide ± PNGase F (siehe Kapitel 3.2.5) wurde das LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) verwendet, welches online mit einem EASY-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) -System verbunden war. Die angereicherten und aufgereinigten Glykopeptide ± PNGase F wurden in 0,1 % AS (Peptidkonzentration: 0,5 µg/µl) gelöst und anschließend je 2 µl pro Analyse in das System injiziert. Die chromatographische Auftrennung der Peptide erfolgte durch das C18-Säulen-System mit einer Acclaim™ PepMap RSLC-Säule (75 µm x 150 mm) bei einer Flussrate von 300 nl/min. Der Laufpuffer A bestand aus 0,1 % AS in Wasser und Laufpuffer B aus 0,1 % AS in 80 % ACN. Die Proben wurden innerhalb eines 90 min Lösungsmittelgradienten eluiert: 5-30 % B (0-60 min), 30-100 % B (60-80 min), 100 % B (80-90 min). Jede Probe wurde insgesamt sieben Mal mit verschiedenen MS-Parametern gemessen, welche in Tabelle 5 zusammengefasst sind.

Tabelle 5: Parameter für die MS-Messung der angereicherten Glykopeptide +- PNGase F. Jede Probe wurde insgesamt siebenmal mit unterschiedlichen MS-Settings gemessen.

MS-Setting	Fragmentierungsmethode	Dynamic exclusion enabled	Repeat count	Repeat duration [s]	Exclusion size list	Exclusion duration [s]	Automatic gain control (AGC)
1	CID	ja	1	30	100	180	1 x 10 ⁶
2	CID	ja	1	30	100	180	5 x 10 ⁵
3	CID	ja	1	30	50	180	1 x 10 ⁶
4	CID	ja	1	30	100	180	1 x 10 ⁶
5	CID	ja	1	30	100	300	1 x 10 ⁶
6	CID	ja	1	30	100	90	1 x 10 ⁶
7	HCD	nein	-	-	-	-	1 x 10 ⁶

3.2.7.6 Identifikation von N-Glykosylierungsstellen

Zur Identifikation der Glykoproteine und deren N-Glykosylierungsstellen wurde die Software PEAKS Studio Version 10 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Kanada) verwendet. Für die Identifizierung der Glykopeptide wurde zunächst ein Software-spezifischer *De novo*-Sequenzierungsalgorithmus durchgeführt, um die Anzahl der Peptid- bzw. Proteinidentifikationen zu maximieren. Die Datenbank-gestützte Proteinidentifikation wurde mit der SwissProt-Datenbank und der Taxonomie *Homo Sapiens* durchgeführt. Folgende Software-spezifischen Einstellungen wurden für die Datenbanksuche verwendet: Peptidionen-Massentoleranz von ± 30 ppm, Fragmentionen-Massentoleranz von $\pm 0,5$ Da, tryptischer Verdau, maximal zwei fehlende Spaltmotive, Carbamidomethylierung als feste Modifikation und Acetylierung (Protein N-terminal), Oxidation und Deamidierung (N) als variable Modifikationen. Durch die Abspaltung der Glykane von den Glykopeptiden entstand eine spezifische Modifikation (Deamidierung) an der Aminosäure Asparagin (N), welche per MS nachgewiesen werden konnte. Dadurch konnten die N-Glykosylierungsstellen der Glykoproteine markiert und lokalisiert werden. Alle identifizierten Proteine/Peptide wurden mit einer FDR < 1 % (engl. *false discovery rate*) gefiltert, um ausschließlich signifikante und robuste Messergebnisse zu erhalten. Bei der Analyse der Daten wurden ausschließlich N-Glykosylierungsstellen (Deamidierungsstellen) berücksichtigt, die mindestens mit einer Ionenintensität > 5 % in einem MS-Scan nachgewiesen werden konnten. Da Deamidierungen sowohl als natürliche PTM vorliegen als auch chemisch induziert sein können, wurden ebenfalls angereicherte, unbehandelte Glykopeptide (Kontrollgruppe) per MS gemessen und in die Analyse miteinbezogen. Eine entsprechende Deamidierungsstelle wurde nur als wahre N-Glykosylierungsstelle (enzymatisch-bedingt durch PNGase F) anerkannt, sofern diese nicht in der Kontrollgruppe auftrat.

3.3 Materialien Glaukom

Retina Organkultur

Bezeichnung	Bezugsquelle
Schweineaugen	Schlachthof der Landmetzgerei Harth, Stackeden-Elsheim
Synthetisches CDR-Peptid	Synpeptide Co. Ltd., Shanghai, China
Sicherheitswerkbank	Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Präparierbesteck	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad WBT 12	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Brutschrank (Forma Scientific CO ₂ -Incubator)	Thermo Fischer Scientific, Egelsbach, Deutschland
24-Loch Mikrotiterplatte und Einsätze	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Filterpapier	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK
Skalpell	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Petrischale	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Neurobasal Medium A	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
B27 Supplement	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
N2 Supplement	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
L-Alanin-L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin Lösung	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Sterilfilter (50 mm Filter Unit)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
DPBS	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Immunohistologische Färbung

Bezeichnung	Bezugsquelle
Axio Observer Z1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Alufolie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland

Deckgläschen	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Brn3a-C20- Antikörper	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
Alexa Flour 568 Donky anti-goat (2 mg/ml)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA) (4 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DPBS	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS) (10 %)	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Triton-X-100	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland

Proteomik

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Iodoacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Acetonitril (ACN)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Promega Corporation, Madison, USA
Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co, Berlin, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Greiner-CELLSTAR-96-Well-Platten	Merck, Darmstadt, Deutschland
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Brutschrank	Thermo Life Sciences, Egelbach, Deutschland
Multiskan Ascent	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
LC-MS Wasser	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SOLAμ™ HRP 2mg/1mL 96 Well Plate	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters 3K	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	Fisher Chemical, Geel, Belgium
Precellys 24 (Lyse & Homogenisierung)	Bertin Technologies, Montigny-le- Bretonneux, Frankreich
T-PER Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Halt Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-frei (100x)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Eppendorf Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Massenspektrometrie

Bezeichnung	Bezugsquelle
LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
EASY-nLC 1200	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Acclaim™ PepMap RSLC-Säule (75 µm x 500 mm)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
ZEN 2.3 pro	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Image J	Nationales Institut für Gesundheit, Maryland, USA
MaxQuant (Version 1.6.17.0)	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland
Perseus (Version 1.6.15.0)	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland
Statistica 13	Statsoft, Tulsa, USA
Ingenuity Pathway Analysis (IPA)	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

3.4 Methoden Glaukom

3.4.1 Retina Organkultur und immunohistologische Färbung

3.4.1.1 Synthetische CDR-Peptide

Das synthetische CDR-Peptid für diesen Versuch wurde in Kooperation mit der Firma Synpeptide Co., Ltd. (Shanghai, China) hergestellt. Das CDR-Peptid wurde mit einer Reinheit von > 90 % synthetisch hergestellt und codiert die Aminosäuresequenz SCTGTSSDVGGYNYVSWYQ. Das Peptid wurde ohne Modifikationen synthetisiert.

3.4.1.2 Herstellung von Organkulturmedium

Für die Herstellung des Organkulturmediums wurden zunächst 40 ml Neurobasal A Medium 1 x in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 0,1 % Penicillin/Streptomycin, 2 % B27 Supplement 50x, 1 % N2-Supplement 100x und 0,4 % L-Alanin-L-Glutamin (200 mM mit 0,85 % ATCC) hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte die Filtration des Gemisches durch einen Sterilfilter. Das Medium wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert und vor jeder Anwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

3.4.1.3 Herstellung der Explantate

Für die Retina-Organokultur wurden Schweineaugen des Hausschweins (*Sus scrofa domestica* Linnaeus) verwendet. Die Schweineaugen wurden von einem lokalen Metzgereibetrieb (Landmetzgerei Harth, Stackeden-Elsheim, Deutschland) bezogen. Sie wurden direkt nach der Schlachtung abgeholt und für die Transportzeit in DPBS bei 4°C im Dunkeln gelagert. Jedes Auge wurde zunächst vor der Präparation für 30 s in 70 % Ethanol (EtOH) desinfiziert. Anschließend wurde dieses in eine Petrischale überführt und mithilfe einer Schere das umliegende Muskel- und Fettgewebe, sowie der Sehnerv entfernt. Im Anschluss wurde mithilfe eines Skalpells zwischen der *Pars plana* und der *Ora serrata* ein Einstich vorgenommen und das Auge vorsichtig in zwei Hälften unterteilt. Der anteriore Teil des Auges wurde mitsamt dem Glaskörper verworfen. Der posteriore, größere Teil des Auges wurde in eine Glasschale mit sterilem DPBS überführt. Die Retina wurde anschließend mittels eines weichen Pinsels vorsichtig vom RPE gelöst und mit einem Skalpell vom Sehnerv getrennt. Danach wurde der verbleibende posteriore Teil des Augapfels umgestülpt und das RPE mithilfe eines Skalpells vorsichtig von der Sklera gelöst. Das RPE wurde auf einem Filterpapier ausgerichtet und die Retina in *in vivo* Orientierung des Auges (von basal nach apikal: Aderhaut – Bruch-Membran – RPE – Retina) auf dem RPE-Gewebe platziert. Dabei wurden die RGZ nach Oben und die Photorezeptorschicht in Richtung des RPEs ausgerichtet. Anschließend wurden aus dem Retina-RPE-Komplex vier 5 x 5 mm große retinale Explantate mithilfe einer Schere präpariert und in dafür vorgesehene Zellkultureinsätze überführt. Diese wurden anschließend in eine 24-Loch Mikrotiterplatte eingesetzt, in welcher zuvor die entsprechenden Näpfe mit 485 µl Organkulturmedium (siehe Kapitel 3.4.1.2) befüllt wurden. Die retinalen Explantate blieben entweder unbehandelt oder wurden jeweils mit 25 µg und 50 µg des synthetischen CDR-Peptids (siehe Kapitel 3.4.1.1) behandelt. Die Explantate wurden anschließend für 24 h bei 37°C kultiviert. Aufgrund der Trennung des Sehnervs während der Schlachtung kommt es zu einem reproduzierbaren und signifikanten Verlust an RGZ während der 24 h-igen Kultivierung, weshalb sich die Retina-Organokultur als ideales *in vitro* Glaukommodell eignet (60, 61).

3.4.1.4 Immunohistologische Färbung

Nach der Kultivierung der retinalen Explantate wurden diese für jeweils 10 min mit 500 µl DPBS gewaschen und anschließend wurden die Retinae vorsichtig vom RPE und dem anhängenden Filterpapier gelöst. Das RPE und das Filterpapier wurden verworfen. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Retinae für 20 min in 300 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA). Danach wurden die Explantate erneut zweimal für jeweils 10 min mit 500 µl DPBS gewaschen und danach erfolgte die Inkubation in 200 µl Blockpuffer für 2 h bei RT. Der Blockpuffer bestand aus 10 % Fetalem Kälberserum (FKS) und 0,4 % Triton-X-100 in DPBS. Nach Entfernung des Blockpuffers wurden 100 µl der primären Antikörperlösung Brn3a-C20 (1:250 in 10 % FKS DPBS) hinzugegeben und üN bei 4°C für 16-18 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Explantate erneut für jeweils 10 min mit 500 µl DPBS gewaschen und anschließend für 30 min mit dem bereits beschriebenen Blockpuffer behandelt. Der sekundäre Antikörper Alexa Flour 568 donky anti-goat TRITC wurde in einer Verdünnung von 1:400 in 10 % FKS DPBS angesetzt und anschließend 100 µl zu den entsprechenden Proben hinzugegeben. Danach wurden die Explantate für 2 h bei RT gefärbt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden im Dunklen durchgeführt, um ein Ausbleichen des fluoreszierenden Farbstoffes zu vermeiden. Zunächst wurden die Explantate erneut dreimal für 5 min mit jeweils 500 µl DPBS gewaschen. Die Explantate wurden daraufhin auf einen zuvor mit einem Tropfen DPBS befeuchteten Objektträger überführt und flach ausgerichtet. Danach wurden die Präparate mit 2-3 Tropfen Vectashield Mounting Medium mit DAPI behandelt und anschließend mit einem Deckgläschen bedeckt und versiegelt. Die vorbereiteten Häutchenpräparate wurden bei 4°C bis zur weiteren mikroskopischen Analyse gelagert. Die Analyse der immunohistologischen Präparate wurde mithilfe des Fluoreszenz-Mikroskops Axio Observer Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Es wurden von jedem Explantat elf hochauflösende Bilder im TRITC-Kanal an verschiedenen Positionen mit zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen und ausgewertet. Freundlicherweise durfte für die Analyse der Präparate und die Aufnahme der Bilder das Mikroskop aus dem Forschungslabor der Klinik für Urologie und Kinderurologie unter der Leitung von PD Dr. Jüngel verwendet werden.

Zur Auswertung wurden die Fluoreszenzbilder der Explantate zunächst randomisiert, um eine objektive Auszählung zu gewährleisten. Bei den im TRITC-Kanal aufgenommenen Bildern wurde mithilfe des Programms Image J (Nationales Institut für Gesundheit, Maryland, USA) die Helligkeit und der Kontrast jedes einzelnen Bildes angepasst, um das manuelle Zählen der Brn3a⁺-Zellen (RGZ) zu erleichtern. Die Zählung und Auswertung der Daten wurde unter Aufsicht erfahrener Labormitarbeiter durchgeführt. Die durchschnittliche Anzahl der RGZ (Brn3a⁺-Zellen) pro Explantat wurde in RGZ/mm² angegeben. Mithilfe des Programms Statistica Version 13 wurde ein parametrischer *t*-test durchgeführt, um signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe (KTRL) und den CDR-behandelten Explantaten (BEH) zu ermitteln.

3.4.2 Proteomik

3.4.2.1 Probenvorbereitung

Für die proteomische Analyse wurde die retinale Organkultur *in vitro*, wie bereits ausführlich in Kapitel 3.4.1 beschrieben, durchgeführt. Insgesamt wurden jeweils sechs retinale Explantate mit 50 µg des CDR-Peptids behandelt (BEH), wohingegen sechs retinale Explantate unbehandelt als Kontrollen (KTRL) dienen. Nach der Kultivierung wurden je zwei retinale Explantate der gleichen Gruppe (KTRL und BEH) in einem 2 ml Schraubdeckelgefäß

gepoolt. Für die MS-Analyse wurden folglich drei biologische Replikate für beide Gruppen (KTRL und BEH) verwendet. Zu jeder Probe wurden jeweils fünf 2,8 mm große Keramikugeln sowie 400 µl des T-PER Extraktionspuffers gegeben. Dieser wurde zuvor mit einem Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail in einer Verdünnung von 1:100 angesetzt. Die vorbereiteten Ansätze wurden anschließend mittels des Precellys® 24 Homogenisators dreimal für jeweils 45 s bei 5,000 rpm homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 12 min bei 12,000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Protein-enthaltende Überstand wurde mittels der Amicon Ultra 3kD Filtereinheiten nach Angaben des Herstellers in etwa 200 µl LC-MS Wasser umgepuffert und aufkonzentriert. Im Anschluss wurde die Proteinmenge aller Ansätze mittels Proteinbestimmung (siehe Kapitel 3.2.3) ermittelt und anschließend 10 µg Protein von jeder Probe bei 45°C im Rotationsvakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt. Die Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Für den In-Lösung Trypsin-Verdau wurden die eingengten Proben in 20 µl 10 mM ABC gelöst und für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Im Anschluss wurden zu jeder Probe 3 µl 20 mM DTT in 10 mM ABC gegeben. Die Proben wurden daraufhin für 30 min bei 56°C inkubiert. Danach wurde zu jeder Probe 3 µl 40 mM IAA in 10 mM ABC gegeben und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Zu jeder Probe wurden 0,1 µg/µl Trypsin in 10 mM ABC 10 % ACN gegeben. Der tryptische Verdau wurde im Verhältnis Protein-Enzym 10:1 vorgenommen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben üN bei 37°C. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 45°C im Rotationsvakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt.

3.4.2.2 Peptidaufreinigung

Die Peptidaufreinigung wurde analog zum im Kapitel 3.2.7.2 beschriebenen Vorgang durchgeführt.

3.4.2.3 Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse wurde das LTQ Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) verwendet. Dieses war online mit einem EASY-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) -System verbunden. Die aufgereinigten Peptide wurden in 0,1 % AS (0,125 µg/µl) gelöst und anschließend wurden 2 µl der jeweiligen Probe in das System injiziert. Die chromatographische Auftrennung der Peptide erfolgte durch das C18-Säulen-System mit einer Acclaim™ PepMap RSLC-Säule (75 µm x 500 mm) bei einer Flussrate von 300 nl/min. Der Laufpuffer A bestand aus 0,1 % AS in Wasser und der Laufpuffer B aus 0,1 % AS in 80 % ACN. Die Proben wurden innerhalb eines 200 min Lösungsmittelgradienten eluiert: 5-30 % B (0-160 min), 30-100 % B (160-180 min), 100 % B (180-200 min). Die Parameter für die massenspektrometrische Messung sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Parameter für die massenspektrometrischen Messungen.

<i>Repeat counts</i>	1
<i>Repeat duration [s]</i>	30
<i>Exclusion list size</i>	100
<i>Exclusion duration [s]</i>	300
<i>Automatic gain control</i>	1 x 10 ⁶

3.4.2.4 Proteinidentifikation und Quantifizierung

Die Daten wurden mittels der Software MaxQuant Version 1.6.17.0 (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) ausgewertet. Die MS-Daten wurden mittels der SwissProt-Datenbank mit den Taxonomien des Hausschweins (*Sus scrofa domesticus*, Sequenzen: 1,439 Datum: 13.04.2021)) und des Menschen (*Homo sapiens*, Sequenzen: 20,408 Datum: 13.04.2021) analysiert. Für die Identifizierung und Quantifizierung der Proteine wurden folgende Software-spezifische Parameter verwendet: Peptidionen-Massentoleranz ± 30 ppm, Fragmentionen-Massentoleranz 0,5 Da, tryptische Spaltung, maximal zwei fehlende Spaltnotive, Carbamidomethylierung als feste Modifikation, Acetylierung (Protein N-terminal) sowie Oxidation als variable Modifikationen. Die Proteine wurden außerdem mit einem FDR $< 1\%$ gefiltert.

3.4.2.5 Datenanalyse und Statistik

Die statistische Analyse der Daten wurden mittels der Software Perseus Version 1.6.15.0 (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurden potenzielle Kontaminanten und falsch zugeordnete Proteinidentifikationen aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden die Intensitäten der detektierten Proteine logarithmiert. Um ausschließlich wirkliche Proteintreffer zu erhalten, musste jedes identifizierte Protein in allen drei biologischen Replikaten einer Gruppe (KTRL oder BEH) vorhanden sein. Fehlende Intensitätswerte wurden mithilfe der Normalverteilung der proteomischen Daten imputiert (Streuungsbreite: 0,3, Erniedrigungsfaktor: 1,8). Im Anschluss wurde ein parametrischer *t*-Test durchgeführt, um signifikant veränderte Proteinexpressionen zwischen BEH und KTRL zu identifizieren ($p < 0,05$). Die logarithmierten Intensitäten der Proteine wurden mittels des Z-Scores standardisiert und anschließend basierend auf dem Euklidischen Abstandsmaß in einer Heatmap mithilfe der Perseus Software dargestellt.

3.4.2.6 Funktionale Signalwegsanalyse

Die funktionalen Signalwegsanalysen der signifikant veränderten Proteine wurde mit der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) durchgeführt. Das funktionelle Netzwerk der Proteininteraktionen wurde mit der biologischen Datenbank STRING 11.5 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) erstellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Dry Eye-Syndrom

4.1.1 Etablierung einer Methode zur Anreicherung von Glykoproteinen und Glykopeptiden

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Methode zur Anreicherung von Glykoproteinen bzw. von Glykopeptiden aus dem Tränenfilm von gesunden Studienteilnehmern etabliert. Die Anreicherung der glykosylierten Proteine bzw. Peptide erfolgte auf dem Prinzip der Lektin-Affinitätschromatographie (siehe Abbildung 9). Dazu wurden verschiedene Varianten der Lektin-Affinitätschromatographie verwendet und diese zunächst hinsichtlich ihrer Eignung zur Anreicherung von Glykoproteinen beurteilt. Um die Effizienz der Anreicherungsmethode auf Glykoprotein-Ebene zu beurteilen, wurde eine 1D-Gelelektrophorese der Proben sowie anschließende unterschiedliche Proteinfärbungen (Glykoprotein- und Coomassie-Färbung) durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.6.2 und 3.2.6.3). Nach der erfolgreichen Anreicherung der Glykoproteine aus dem Tränenfilm wurde die bereits etablierte Methodik auf Glykopeptid-Ebene angewendet. Dafür wurden die jeweiligen Tränenproben zunächst enzymatisch verdaut (siehe Kapitel 3.2.7.1) und die Glykopeptide mittels etablierter Lektin-Affinitätschromatographie angereichert. Im Anschluss wurden die angereicherten Glykopeptide und deren dazugehörigen N-Glykosylierungsstellen mittels hochauflösender Massenspektrometrie (MS) identifiziert.

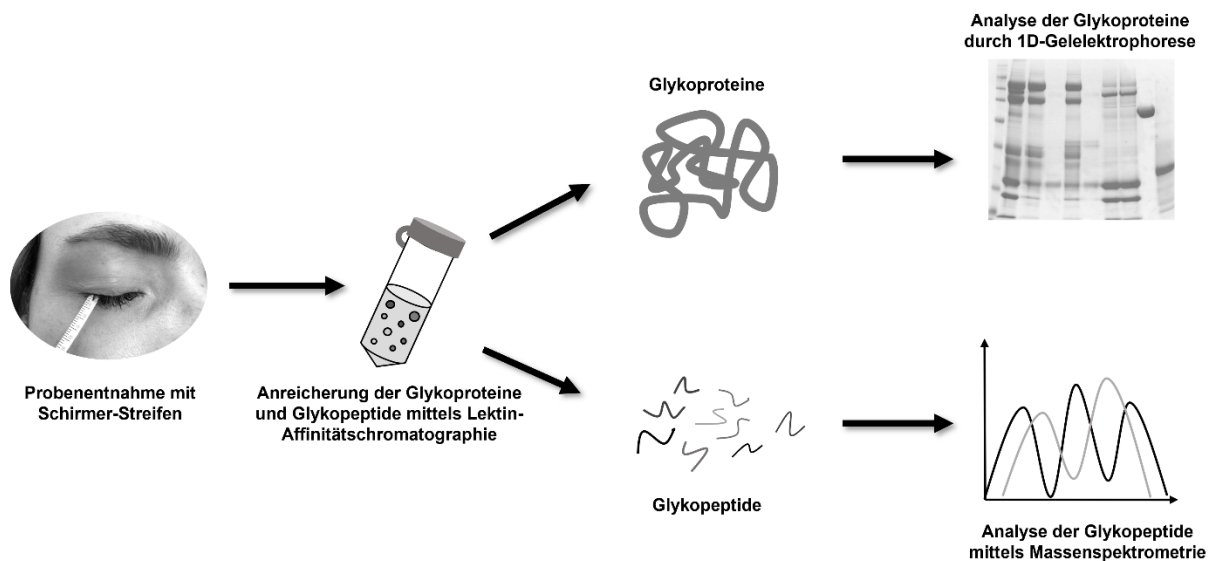


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Probenvorbereitungsprotokolls zur Anreicherung von Glykoproteinen bzw. Glykopeptiden aus dem Tränenfilm. Die Tränenproben wurden mittels Schirmer-Streifen von den gesunden Studienteilnehmern entnommen und die Proteine anschließend in DPBS eluiert. Die Anreicherung der Glykoproteine bzw. Glykopeptide erfolgte mittels Lektin-Affinitätschromatographie. Die Effizienz des Anreicherungsprotokolls auf Glykoprotein-Ebene wurde zunächst mittels 1D-Gelelektrophorese und anschließenden Proteinfärbungen evaluiert. Im Anschluss wurde die bereits etablierte Anreicherungs-methode auf Glykopeptid-Ebene angewendet und die angereicherten Glykopeptide mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert.

4.1.1.1 Anreicherung von Glykoproteinen

Die Anreicherung der Glykoproteine aus dem Tränenfilm erfolgte durch eine Lektin-Affinitätschromatographie. Diese beruht auf der Spezifität der Lektine für verschiedene Zuckerreste, sodass die Lektine an die Glykanstrukturen der Glykoproteine binden können. Diese spezifische Bindung ist die Grundlage für die Isolierung der Glykoproteine. Das Lektin ConA besitzt eine Spezifität für Mannose, WGA weist eine Spezifität für N-Acetylglucosamin auf und UEA I eine Affinität für Fucose. JAC besitzt dagegen eine Spezifität für Galaktose (122). Im Rahmen der Methodenetablierung auf Glykoprotein-Ebene wurde die Lektin-Affinitätschromatographie zunächst mit Ein-Lektin-Säulen (ConA, JAC oder WGA), sowie mit einer Kombination aus mehreren Lektinen (ConA, JAC und WGA, Multi-Lektin-Säule) durchgeführt. Unter anderem wurde die Effizienz des Anreicherungsverfahrens mithilfe photometrischer Proteinbestimmungen beurteilt. Hierzu wurden die Proteinkonzentrationen der Eluatsfraktionen der Ein-Lektin-Aufreinigungen sowie der Multi-Lektin-Säule bestimmt (siehe Tabelle 7). Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass sowohl mit der Ein-Lektin-Säule WGA (0,3 µg/µl) als auch der Multi-Lektin-Säule (0,24 µg/µl) die meisten potenziellen Glykoproteine aus dem Tränenfilm angereichert werden konnten. Die Ein-Lektin-Säulen ConA und JAC erreichten hingegen nur eine Anreicherungs-effizienz von 17 % (0,05 µg/µl bzw. 40 % (0,12 µg/µl) im Vergleich zur maximalen Proteinausbeute (0,3 µg/µl) mit der Ein-Lektin-Säule WGA.

Tabelle 7: Resultate der photometrischen Proteinbestimmung der Eluatsfraktionen.

Lektin	Proteinkonzentration Eluat [µg/µl]	Gesamtproteinmenge Eluat [µg]
ConA	0,12	24
Jac	0,05	10
WGA	0,30	60
Multi-Lektin	0,24	48

Die Graphik der 1D-Gelelektrophorese (siehe Abbildung 10) zeigt die Proteine der Eluatsfraktionen (angereicherte Glykoproteine), welche mittels der Ein-Lektin-Säulen (ConA, JAC oder WGA) sowie mittels der Multi-Lektin-Säule (Kombination aus ConA, JAC und WGA) angereichert wurden. Mittels der 1D-Gelelektrophorese wurden die Proteine der Eluatsfraktionen nach Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend durch eine Coomassie-Proteinfärbung auf dem Gel visualisiert. Der Farbstoff Coomassie lagert sich an den basischen Seitenketten der Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenz an und wird standardmäßig zum Anfärben von Proteinen verwendet. Es wurde zusätzlich eine unbehandelte Tränenprobe auf dem Gel aufgetragen, um das spezifische Proteinbandenprofil der Eluatsfraktionen mit dieser abzugleichen. Darüber hinaus wurden die abundantesten Vertreter des Tränenproteoms im jeweiligen Massenbereich von Abbildung 10 aufgelistet (z.B. Ig α -1 C-Kette bei 49 kDa), welche bereits in vorherigen Studien umfangreich charakterisiert wurden (40).

Anhand der spezifischen Proteinbandenmuster der Eluatsfraktionen lässt sich erkennen, dass sowohl mit den Ein-Lektin-Säulen (ConA, JAC oder WGA) als auch der Multi-Lektin-Säule (ConA, JAC und WGA) zahlreiche Proteine aus dem Tränenfilm erfolgreich angereichert werden konnten. Mit allen drei Lektinen ConA, JAC und WGA konnten die im Tränenfilm abundant vorliegenden Proteine Laktotransferrin (LTF) und Ig α -1 C-Kette

(IGHA1) erfolgreich angereichert werden. Diese beiden Proteine wurden vor allem vermehrt durch das Lektin ConA angereichert, in dessen Eluatsfraktionen die Proteinbanden besonders stark ausgeprägt waren im Vergleich zu den Ein-Lektin-Säulen JAC und WGA. Andere abundante Vertreter aus dem Tränenproteom wie Albumin (ALB) als auch Lysozym C (LYZ) / Cystatin-S (CST4) wurden hingegen deutlich weniger bis gar nicht durch die drei Lektine (ConA, JAC oder WGA) angereichert. Das Zink- α -2-Glykoprotein (AZGP1) wurde hingegen spezifisch in der Eluatsfraktion von ConA nachgewiesen und lässt sich auch als deutliche Proteinbande im Eluat der Multi-Lektin-Säule erkennen.

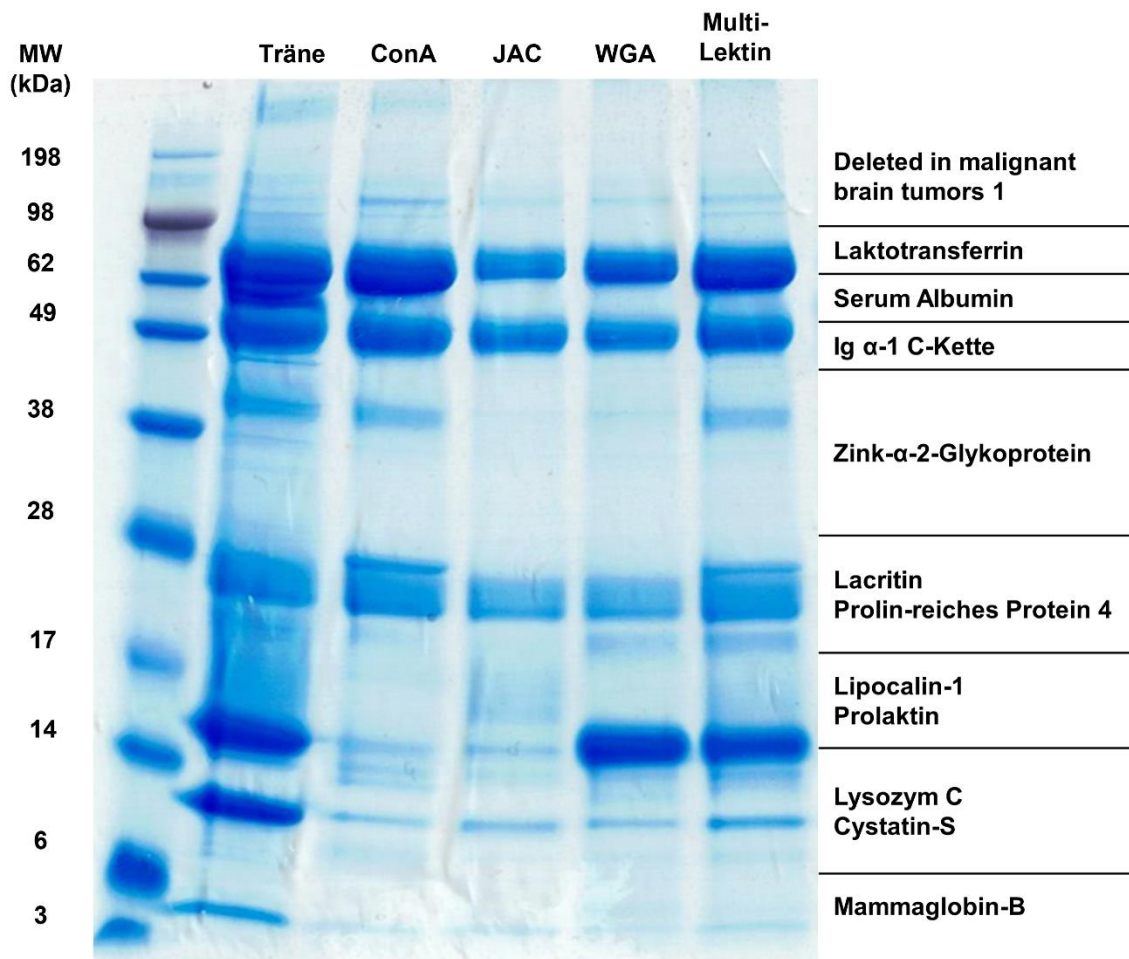


Abbildung 10: 1D-Gelelektrophorese zur Darstellung der isolierten Glykoproteine durch die Lektin-Affinitätschromatographie. Im Rahmen der Methodenetablierung wurde die Lektin-Affinitätschromatographie mit Ein-Lektin-Säulen (ConA, JAC oder WGA) sowie mit einer Kombination aus mehreren Lektinen (Multi-Lektin-Säule) durchgeführt. Die abundantesten Proteine wurden im jeweiligen Massenbereich gelistet und wurden bereits in vorherigen Publikationen beschrieben (40).

Mithilfe des Lektins WGA konnten vor allem spezifisch die abundanten Proteine Lipocalin 1 (LCN1) und Prolaktin (PRL) angereichert werden, wohingegen die Intensität der Proteinbande in den Eluaten von ConA und JAC deutlich geringer war. Die beiden Proteine Lacritin (LACRT) und Prolin-reiches Protein 4 (PRP4), welche beide im Massenbereich

zwischen 28-17 kDa liegen, konnten durch alle drei Lektine (ConA, JAC und WGA) erfolgreich angereichert werden. Nichtsdestotrotz war die Proteinbande bei 28 kDa besonders stark in der Eluatsfraktion des Lektins ConA ausgeprägt. Die Eluatsfraktion der Multi-Lektin-Säule wies ein kongruentes Proteinbandenprofil im Vergleich zu allen Ein-Lektin-Säulen (ConA, JAC und WGA) auf und scheint eine spezifische als auch effiziente Anreicherung aller Glykoproteine aus dem Tränenfilm zu ermöglichen. Des Weiteren erlaubt die Multi-Lektin-Säule alle Glykoproteine aus dem Tränenfilm in einem einzelnen Arbeitsschritt anzureichern und zeigt daher eine deutlich bessere Performance als die Handhabung der Ein-Lektin-Säulen (ConA, JAC oder WGA). Aus diesen Gründen wurde in den folgenden Versuchsreihen ausschließlich die Multi-Lektin-Säule für die Glykoprotein-Anreicherung verwendet. In Abbildung 11 ist der erfolgreiche PNGase F-Verdau des Tränenproteoms dargestellt und zeigt exemplarisch die abundanten Proteine LTF und IGHA1. Aufgrund der spezifischen Abspaltung der N-Glykane durch die Endoglykosidase PNGase F entsteht eine charakteristische Massenverschiebung (1-3 kDa) im 1D-Gel im Vergleich zur unbehandelten Tränenprobe.

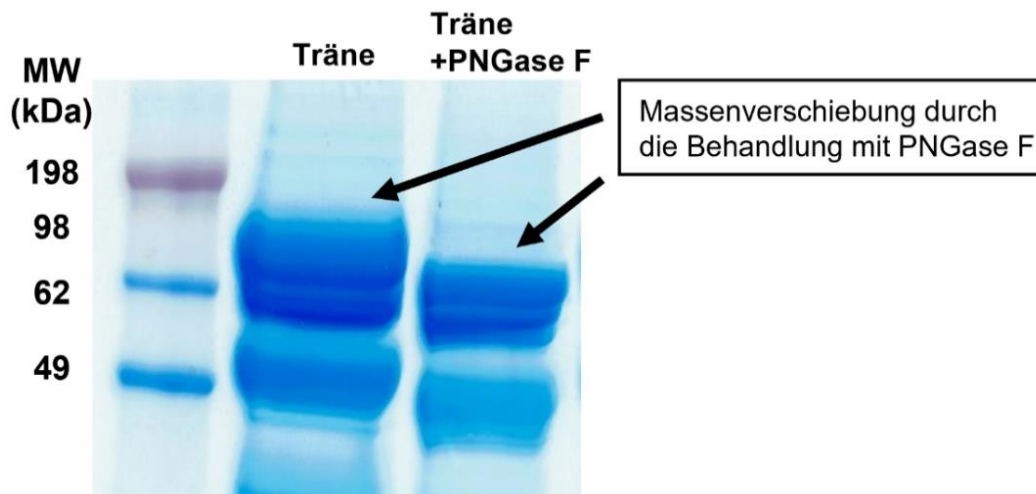


Abbildung 11: Massenverschiebung der Proteine LTF (≈ 62 kDa) und IGHA1 (≈ 49 kDa) durch die Behandlung mit der Endoglykosidase PNGase F. Die 1D-Gelelektrophorese zeigt eine durch PNGase F-induzierte Massenverschiebung zwischen 62 und 49 kDa der Proteine LTF und IGHA1.

Im weiteren Rahmen der Methodenetablierung wurde nun überprüft, ob es sich bei den Lektin-spezifisch angereicherten Proteinspezies wirklich um Glykoproteine handelt oder ob diese eine unerwünschte Kontamination innerhalb der Eluatsfraktion darstellen (siehe Abbildung 12). Aus diesem Grund wurde die Anreicherung der Glykoproteine erneut mit der Multi-Lektin-Säule, welche aus den drei Lektinen ConA, JAC und WGA bestand (3L-Säule), durchgeführt und mittels 1D-Gelelektrophorese und anschließender Proteinfärbungen (Glykoprotein- und Coomassie-Färbung) evaluiert. Im gleichen Schritt wurde für die Glykoprotein-Aufreinigung aus dem Tränenfilm eine weitere Multi-Lektin-Säule verwendet, welche aus den vier Lektinen ConA, JAC, WGA und UEA I (4L-Säule) bestand. Das Lektin UEA I hat eine hohe Affinität für das Monosaccharid Fucose und sollte daher entscheidend die Effizienz des bisherigen Glykoprotein-Anreicherungsverfahrens (3L-Säule) steigern

können (122). Zusätzlich wurden vor der Lektin-Affinitätschromatographie (mit 3L- und 4L-Säule) zwei weitere Tränenproben mit der Endoglykosidase PNGase F behandelt, um die spezifischen N-Glykosylierungen der Glykoproteine abzuspalten.

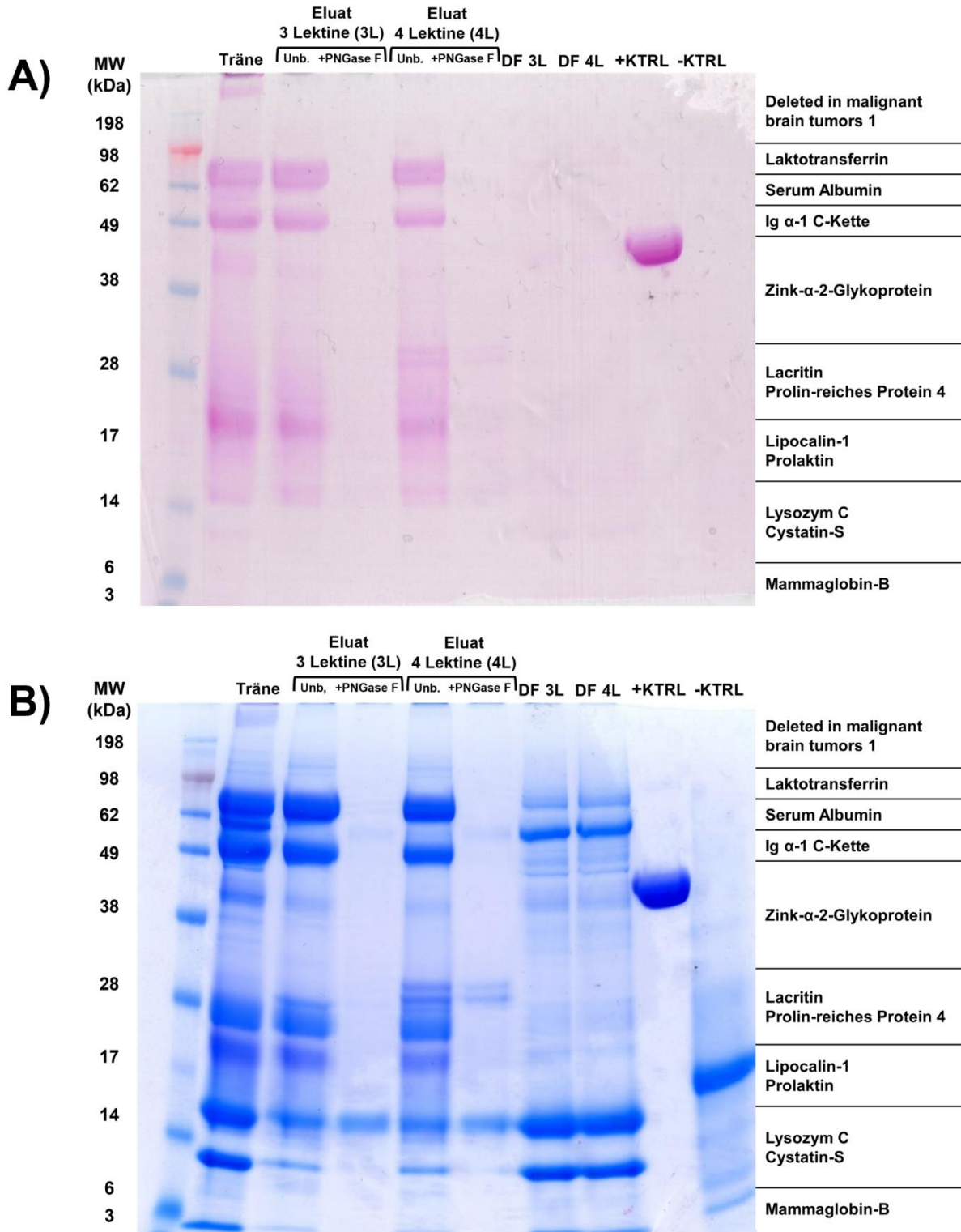


Abbildung 12: 1D-Gelelektrophorese zur Darstellung der angereicherten Glykoproteine. Zusätzlich zur Anreicherung der Glykoproteine mittels der 3L-Säule wurde die Anreicherung mit einer 4L-Säule

durchgeführt und die Effizienz beider Anreicherungssysteme miteinander verglichen. Zusätzlich wurden vor der Glykoprotein-Anreicherung zwei weitere Tränenproben mit dem Enzym PNGase F behandelt, um die spezifischen Glykanstrukturen der Glykoproteine abzuspalten. Dies wurde durchgeführt, um die Spezifität der Glykoprotein-Anreicherung zu beurteilen. Des Weiteren wurden die Durchflussfraktionen (DF) der 3L- und 4L-Säule sowie ein glykosylierter (+KTRL) als auch nicht glykosylierter (-KTRL) Proteinstandard auf dem 1D-Gel aufgetragen. **A)** Spezifische Glykoprotein-Färbung des 1D-Gels. Die Glykoproteine werden spezifisch über deren Glykanstrukturen angefärbt, welche als magentafarbene Proteinbanden erscheinen. **B)** Coomassie-Proteinfärbung des 1D-Gels, um alle Proteine zu visualisieren. Die abundantesten Proteine wurden im jeweiligen Massenbereich gelistet und wurden bereits in vorherigen Publikationen beschrieben (40).

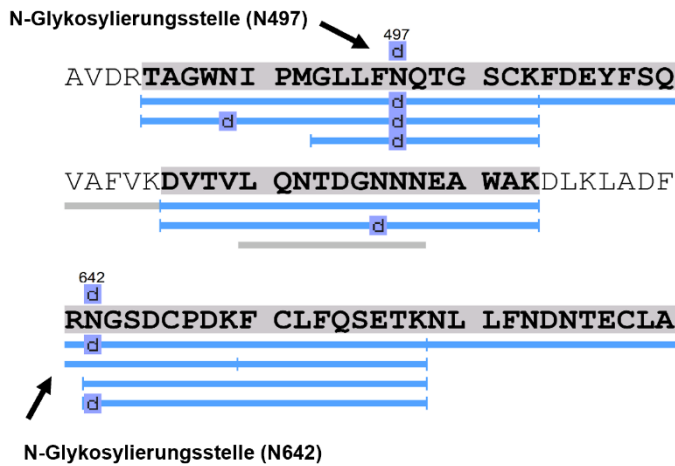
Anhand der spezifischen Glykoprotein-Färbung (siehe Abbildung 12A) ist zu erkennen, dass mittels der Multi-Lektin-Säulen 3L und 4L erfolgreich zahlreiche Glykoproteine (magentafarbene Proteinbanden) aus dem Tränenfilm angereichert werden konnten. Dies wird auch nochmals durch den glykosylierten Proteinstandard (Meerrettichperoxidase, +KTRL) bestätigt, der als eindeutige magentafarbene Proteinbande auf dem Gel zu vernehmen ist und die Spezifität der Glykoprotein-Färbung verdeutlicht. Insbesondere durch die 4L-Säule wurden spezifisch zwei Glykoprotein-Banden im Massenbereich von 28 kDa (LACRT) angereichert, welche im Eluat der 3L-Säule nicht vorzufinden waren. Außerdem ist zu sehen, dass durch eine vorherige Abspaltung der N-Glykane durch das Enzym PNGase F eine Anreicherung der Glykoproteine mittels der Lektine nicht möglich war (siehe Abbildung 12A). Dies lässt darauf schließen, dass die Glykoprotein-Anreicherung, basierend auf dem Prinzip der Lektin-Affinitätschromatographie, spezifisch über deren N-Glykanstrukturen erfolgte. Dies ist im Einklang mit der Beobachtung, dass in den Durchflussfraktionen (DF) der Multi-Lektin-Säulen 3L und 4L kein Glykoprotein nachgewiesen werden konnte und daher folglich zuvor durch die Lektine gebunden und erfolgreich isoliert worden war. Im Anschluss wurde das Gel nochmals mittels des Farbstoffs Coomassie angefärbt (siehe Abbildung 12B), um alle Proteine zu visualisieren und mögliche unerwünschte Kontaminanten zu identifizieren. In beiden PNGase F-behandelten Eluatsfraktionen (3L+PNGase F und 4L+PNGase F) ist eine leichte Proteinbande im Massenbereich 17-14 kDa (Lysozym C, LYZ) zu erkennen, welche zuvor nicht mittels der Glykoproteinfärbung detektiert werden konnte. Daher ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um kein Glykoprotein handelt und demzufolge eine unspezifische Bindung an die Lektin-Säulen (3L und 4L) darstellt. Dennoch wurde diese leichte Kontamination im weiteren methodischen Vorgehen toleriert. Da die 4L-Säule im Vergleich zur 3L-Säule zur Anreicherung eines breiteren Glykoproteinspektrums führte, wurde diese als etablierte Methodik auf Glykopeptid-Ebene angewendet.

4.1.1.2 Anreicherung von Glykopeptiden

Nach der erfolgreichen Etablierung und Beurteilung der Lektin-Affinitätschromatographie auf Glykoprotein-Ebene, wurde die entwickelte Anreicherungsmethodik auf Glykopeptid-Ebene angewendet. Aus diesem Grund wurden die Proteine des Tränenfilms zunächst mittels des Enzyms Trypsin verdaut und anschließend für die Lektin-basierte Anreicherung mittels der 4L-Säule vorbereitet. Dieses methodische Vorgehen hat unter anderem den Vorteil, nicht-modifizierte Peptide der Glykoproteine bei der Aufreinigung zu vernachlässigen und spezifisch nur glykosylierte Peptide anzureichern. Zudem konnten die angereicherten Glykopeptide direkt im Anschluss mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert werden. Dafür wurden die angereicherten Glykopeptide zuvor zusätzlich mit dem Enzym PNGase F behandelt, um eine Abspaltung der N-Glykane von deren Peptidrückgrat zu ermöglichen.

Infolgedessen kommt es zu einer enzymatisch-induzierten Deamidierung von Asparagin (N) zur Asparaginsäure (D), welche die ursprüngliche N-Glykosylierungsstelle im Peptidrückgrat markiert. Diese enzymatisch-induzierte Modifikation konnte als Massenverschiebung von 0,984 Da per MS detektiert werden, sodass die Glykoproteine und deren N-Glykosylierungsstellen im Tränenfilm gesunder Studienteilnehmer umfangreich charakterisiert werden konnten ($n=3$ gepoolte biologische Replikate). Deamidierungen können jedoch nicht nur enzymatisch induziert werden, sondern auch als natürliche PTMs sowie als chemisch-induzierte Deamidierung vorliegen. Letzteres kann beispielsweise spontan während der Durchführung des Probenvorbereitungsprotokolls auftreten (50). Aus diesem Grund wurde in dieser Analyse eine zusätzliche Kontrollgruppe in Form einer nicht PNGase F-behandelten Tränenprobe berücksichtigt, um ausschließlich wahre und enzymatisch-induzierte N-Glykosylierungsstellen zu identifizieren. Des Weiteren wurden nur N-Glykosylierungsstellen (Deamidierungsstellen) als wahr anerkannt, welche mindestens mit einer Ionenintensität $\geq 5\%$ in einem MS/MS-Scan identifiziert wurden und jeweils mindestens in einem biologischen Replikat nachgewiesen werden konnten. Im Rahmen dieser vorliegenden Doktorarbeit wurden insgesamt 14 Glykoproteine im Tränenfilm von gesunden Studienteilnehmern identifiziert und in Summe 33 N-Glykosylierungsstellen nachgewiesen (siehe Tabelle 8). Von diesen 33 N-Glykosylierungsstellen wurden bereits 23 in der Literatur beschrieben, was die Zuverlässigkeit der durchgeführten Analyse belegt. Im Folgenden wird exemplarisch auf die identifizierten N-Glykosylierungsstellen der Glykoproteine LTF und PIGR näher eingegangen (siehe Abbildung 13 und 14).

A) Laktotransferrin – PNGase F-Verdau



B) Laktotransferrin – unbehandelt

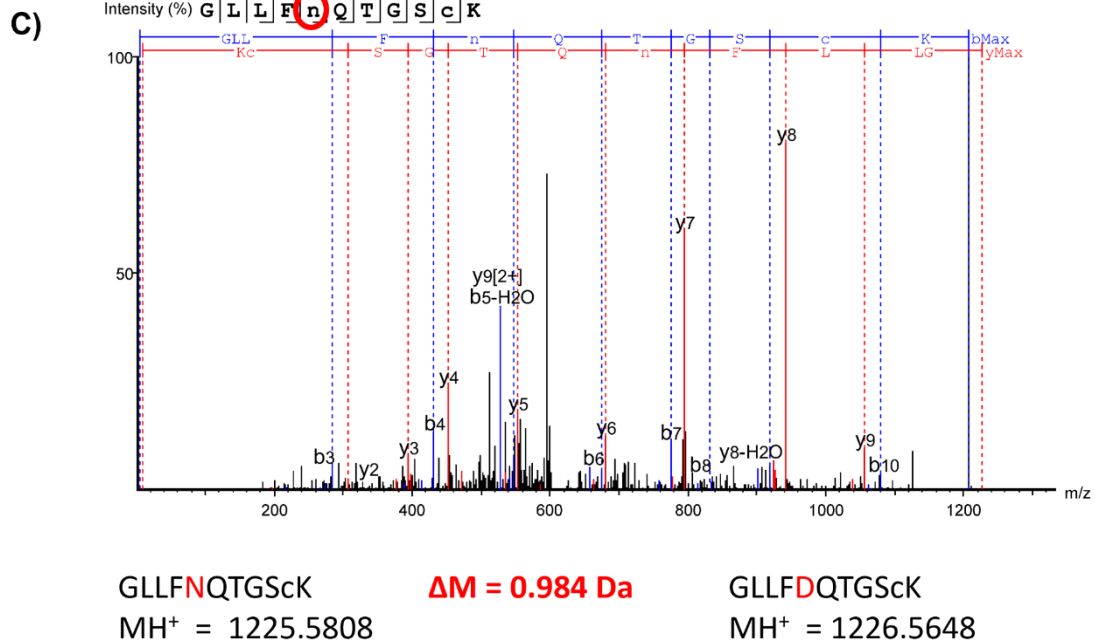
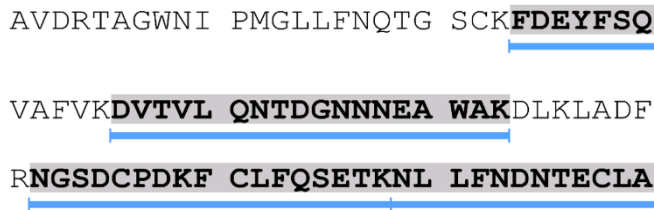


Abbildung 13: Das Glykoprotein Laktotransferrin (LTF) und dessen detektierte N-Glykosylierungsstellen. **A)** Das aus dem Tränenfilm angereicherte Glykoprotein LTF wurde mit dem Enzym PNGase F-behandelt. Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt von LTF, in welchem die enzymatisch-induzierten N-Glykosylierungsstellen N497 und N642 markiert wurden. **B)** Angereichertes LTF aus einer unbehandelten Tränenprobe. Der abgebildete Sequenzbereich von LTF weist keine enzymatisch-induzierten N-Glykosylierungsstellen auf. **C)** MS/MS-Spektrum eines N-Glykopeptids von LTF (N497). Die rot markierte Aminosäure zeigt die N-Glykosylierungsstelle, welche

durch die enzymatische Abspaltung des Glykanrests von Asparagin (N) zur Asparaginsäure (D) deamidiert wurde. Die Abspaltung der Glykanstruktur resultiert in einer Massenverschiebung von 0,984 Da, welche mit dem MS detektiert werden konnte.

Insgesamt konnten beim Glykoprotein LTF zwei N-Glykosylierungsstellen (N497, N642) detektiert werden, welche jeweils von der Aminosäure Asparagin (N) abgespalten wurden (siehe Abbildung 13A). Diese identifizierten N-Glykosylierungsstellen wurden bereits in der Literatur beschrieben und wurden in diesem Experiment in jeweils drei biologischen Replikaten von gesunden Studienteilnehmern nachgewiesen (siehe Tabelle 8). Im Gegensatz dazu konnten die enzymatisch-induzierten N-Glykosylierungsstellen in den unbehandelten Tränenproben nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13B). Das MS/MS-Spektrum des PNGase F-behandelten Glykopeptids zeigt die N-Glykosylierungsstelle (N497), welche durch die Abspaltung des Glykanrests von Asparagin (N) zur Asparaginsäure (D) deamidiert wurde. Dies führte zu einer Massenverschiebung von 0,984 Da, welche per MS nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 13C). Das Protein Polymerer Immunglobulin Rezeptor (PIGR) gilt als abundanter Vertreter des Tränenproteoms und konnte ebenfalls als Glykoprotein mittels der MS-Analyse identifiziert werden (siehe Abbildung 14A und B). Dabei konnten insgesamt sieben N-Glykosylierungsstellen (N90, N96, N135, N184, N186, N421 und N469) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 8), von denen fünf bereits in der Literatur beschrieben wurden. Keine dieser N-Glykosylierungsstellen konnte in der unbehandelten Tränenprobe (Kontrollgruppe) nachgewiesen werden. Außerdem ist in Abbildung 14C das MS/MS-Fragmentierungsspektrum des Glykopeptids N469 von PIGR dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von Glykoproteinen im Tränenfilm von gesunden Studienteilnehmern. Es wurden ausschließlich N-Glykosylierungsstellen miteinbezogen, die in mindestens einem biologischen Replikate signifikant (Ionenintensität $\geq 5\%$) vorhanden waren.

Protein-ID	Protein Name	Gen Name	Glykosylierungsstellen	vorhanden in R1	vorhanden in R2	vorhanden in R3	in unbehandelter Kontrollgruppe vorhanden	in der Literatur bekannt	Ionenintensität [%]
P02788	Laktotransferrin	LTF	N497	√	√	√	-	√	38
			N642	√	√	√	-	√	6
P01833	Polymerer Immunglobulinrezeptor	PIGR	N90	√	√	√	-	√	16
			N96	√	√	√	-	-	19
			N135	√	√	√	-	√	10
			N184	√	(√)	(√)	-	-	12
			N186	√	√	√	-	√	36
			N421	√	(√)	-	-	√	6
			N469	√	√	√	-	√	11
P0DOX2	Immunglobulin α -2 schwere Kette	N/A	N162	√	√	√	-	√	10
			N207	-	√	-	-	√	18
			N246	√	√	√	-	√	48
P01877	Ig α -2 C-Kette	IGHA2	N47	√	√	√	-	√	10
			N92	-	√	-	-	√	18
			N131	√	√	√	-	√	48
P01876	Ig α -1 C-Kette	IGHA1	N144	√	√	√	-	√	48
			N340	√	√	√	-	√	41
P25311	Zink- α -2-Glykoprotein	AZGP1	N109	√	√	√	-	√	68
			N112	√	(√)	(√)	-	√	47
			N128	√	√	√	-	√	10
Q9GZZ8	Extrazelluläres Glykoprotein Lacritin	LACRT	N119	√	√	√	√	√	31

Protein-ID	Protein Name	Gen Name	Glykosylierungsstellen	vorhanden in R1	vorhanden in R2	vorhanden in R3	in unbehandelter Kontrollgruppe vorhanden	in der Literatur bekannt	Ionenintensität [%]
P00738	Haptoglobin	HP	N207	n.d.	√	n.d.	-	√	68
			N211	n.d.	√	n.d.	-	√	23
			N241	n.d.	√	n.d.	-	√	8
P01009	α-1-Antitrypsin	SERPINA1	N271	n.d.	√	n.d.	-	√	5
P01591	Immunglobulin J-Kette	JCHAIN	N67	(√)	√	(√)	-	-	5
P31025	Lipocalin 1	LCN1	N66	(√)	√	-	-	-	6
			N141	√	(√)	(√)	-	-	6
P02787	Serotransferrin	TF	N235	n.d.	-	√	-	-	5
P02768	Serum Albumin	ALB	N291	-	√	√	√	-	7
			N319	(√)	√	(√)	-	-	6
P61626	Lysozym C	LYZ	N78	√	(√)	√	-	-	10
			N106	(√)	√	(√)	√	-	7

√: vorhanden und signifikant (Ionenintensität ≥ 5); (√): vorhanden und nicht signifikant (Ionenintensität < 5); -: Glykosylierungsstelle nicht vorhanden; **n.d.**: Protein nicht detektierbar

4.2 Glaukom

4.2.1 CDR-induzierte Effekte im *in vitro* Glaukommodell

4.2.1.1 Ergebnisse der immunohistologischen Färbung

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde die neuroprotektive Wirkung des synthetischen CDR-Peptids mit dem Sequenzmotiv SCTGTSSDVGGYNYVSWYQ auf die Viabilität von RGZ im *in vitro* Glaukommodell überprüft. Das *in vitro* Glaukommodell wurde anhand von Netzhaut-Explantaten, welche aus der Retina-Organkultur des Hausschweins (*Sus scrofa domestica*) gewonnen wurden, durchgeführt. In diesem *in vitro* Glaukommodell wurde die Neurodegeneration der RGZ durch die mechanische Durchtrennung des Sehnervs von der Retina während des Schlachtprozesses induziert. Die anschließende Kultivierung der präparierten Netzhaut-Explantate für 24 h unter physiologischen Bedingungen führte zu einem signifikanten und reproduzierbaren Verlust an RGZ *in vitro* (60, 61). Im Anschluss an die Kultivierung wurde eine immunohistologische Färbung der RGZ in den Netzhaut-Explantaten durchgeführt, welche mithilfe des molekularen Markers Brn3a nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 15A und B) (57, 60, 61). Die hochauflösenden Fluoreszenzbilder wurden quantitativ ausgewertet und erlaubten eine statistische Analyse hinsichtlich der Viabilität der RGZ zwischen den CDR-behandelten Netzhaut-Explantaten (BEH) und der unbehandelten Kontrollgruppe (KTRL).

Die porzinen Netzhaut-Explantate wurden jeweils mit 25 µg als auch 50 µg des synthetischen CDR-Peptids (Sequenzmotiv: SCTGTSSDVGGYNYVSWYQ) behandelt und anschließend für 24 h unter physiologischen Bedingungen kultiviert ($n=6$). Des Weiteren wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe in die Analyse miteinbezogen ($n=6$). Die quantitative Analyse (siehe Abbildung 15C) ergab, dass eine Behandlung mit 25 µg des synthetischen CDR-Peptids eine signifikant gesteigerte Viabilität der Brn3a⁺-Zellen (408 ± 97 RGZ/mm², $p=0,037$) induzierte im Vergleich zur unbehandelten KTRL-Gruppe (290 ± 52 RGZ/mm²). Durch eine Behandlung der Netzhaut-Explantate mit 50 µg des synthetischen CDR-Peptids konnte die Signifikanz des neuroprotektiven Effekts auf die Brn3a⁺-Zellen (377 ± 51 RGZ/mm², $p=0,003$) nochmals deutlich in der BEH-Gruppe verstärkt werden im Vergleich zur unbehandelten KTRL-Gruppe (258 ± 47 RGZ/mm²).

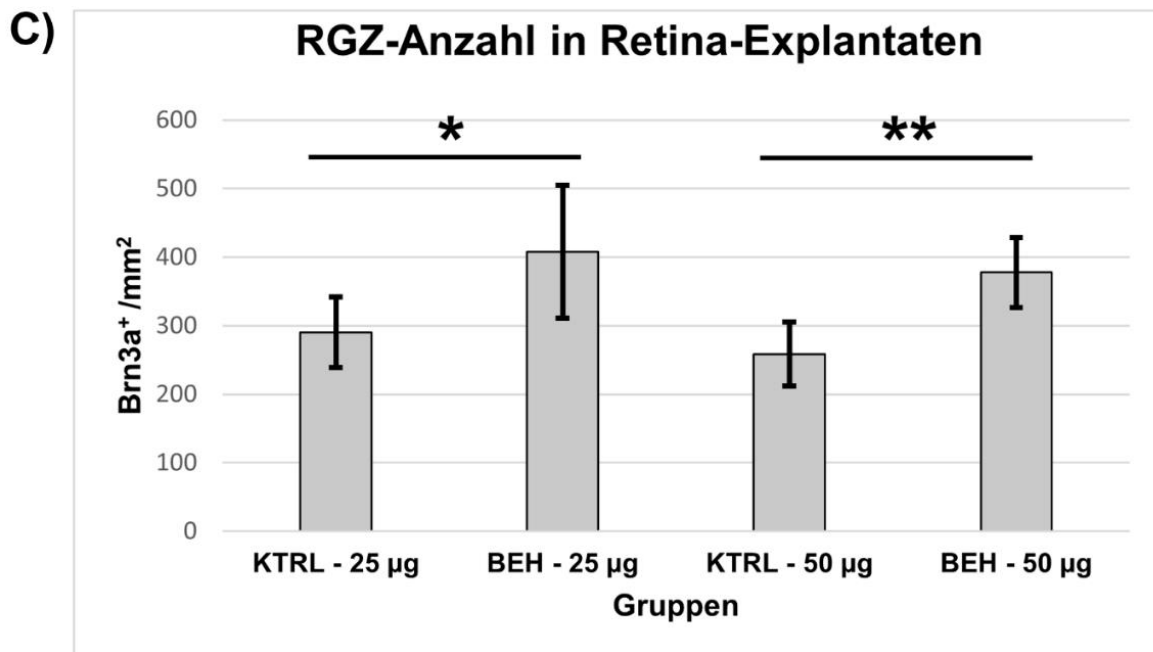
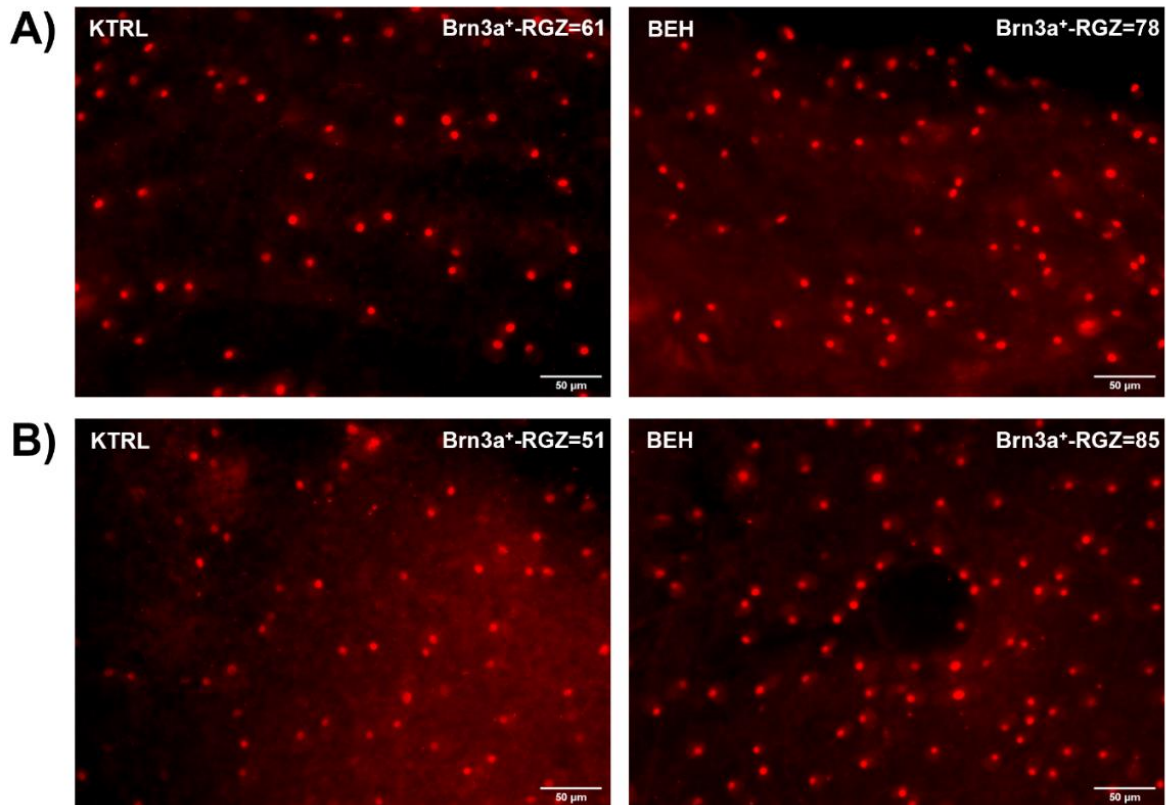


Abbildung 15: Wirkung des synthetischen CDR-Peptids auf die Viabilität der RGZ. **A)** und **B)** Hochauflösende Fluoreszenzbilder in 20-facher Vergrößerung der Netzhaut-Explantate. **A)** Fluoreszenzbilder von Netzhaut-Explantaten, welche mit 25 µg des synthetischen CDR-Peptids (BEH) behandelt wurden sowie der entsprechenden unbehandelten Kontrolle (KTRL). **B)** Brn3a-Färbung eines mit 50 µg CDR-behandelten Netzhaut-Explantats (BEH) sowie der entsprechenden unbehandelten Kontrolle (KTRL). **C)** Anhand der quantitativen Analyse konnte belegt werden, dass eine Behandlung mit 25 µg des CDR-Peptids zu einer signifikant (*) gesteigerten Viabilität der RGZ im

Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Eine Behandlung mit 50 µg des CDR-Peptids konnte die Signifikanz (**) des neuroprotektiven Effekts zwischen beiden Gruppen nochmals verstärken (BEH und KTRL). (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, $n=6$).

4.2.1.2 Ergebnisse der MS-basierten proteomischen Analyse

Um signifikante Veränderungen innerhalb der Proteinexpressionen zwischen der BEH- und KTRL-Gruppe zu identifizieren, wurde eine MS-basierte proteomische Analyse der Netzhaut-Explantate ± Behandlung durchgeführt. Die Netzhaut-Explantate wurden jeweils mit 50 µg des synthetischen CDR-Peptids behandelt oder dienten als unbehandelte Kontrollgruppe ($n=3$). Für die Aufklärung der molekularen Wirkungsweise wurde eine Behandlung von 50 µg des CDR-Peptids verwendet, da aufgrund der höheren Wirkstoffkonzentration die Signifikanz des neuroprotektiven Effekts deutlich verstärkt werden konnte. Mithilfe der proteomischen Analyse wurden insgesamt 974 Proteine innerhalb beider Gruppen identifiziert (FDR < 1 %), von denen 17 Proteine signifikant verändert ($p < 0,05$) zwischen der BEH- und KTRL-Gruppe vorlagen (siehe Abbildung 16). Von diesen waren 7 Proteine niedrig abundant in der BEH-Gruppe vertreten im Vergleich zur KTRL-Gruppe. Dazu zählen unter anderem die Proteine Reticulocalbin-1 (RCN1), Nukleosiddiphosphatkinase A (NME1), Caveolin-1 (CAV1) und das leichte Neurofilament-Polypeptid (NEFL). In der BEH-Gruppe waren hingegen 10 Proteine hoch abundant vertreten im Vergleich zur KTRL-Gruppe. Diese wurden unter anderem durch die Proteine Pyruvatdehydrogenase E1 α (PDHA1), Hämoglobin-Untereinheit α (HBA), Zellteilungskontrollprotein 42 Homolog (CDC42) und Vesikel-assoziiertes Membranprotein 2 (VAMP2) repräsentiert.

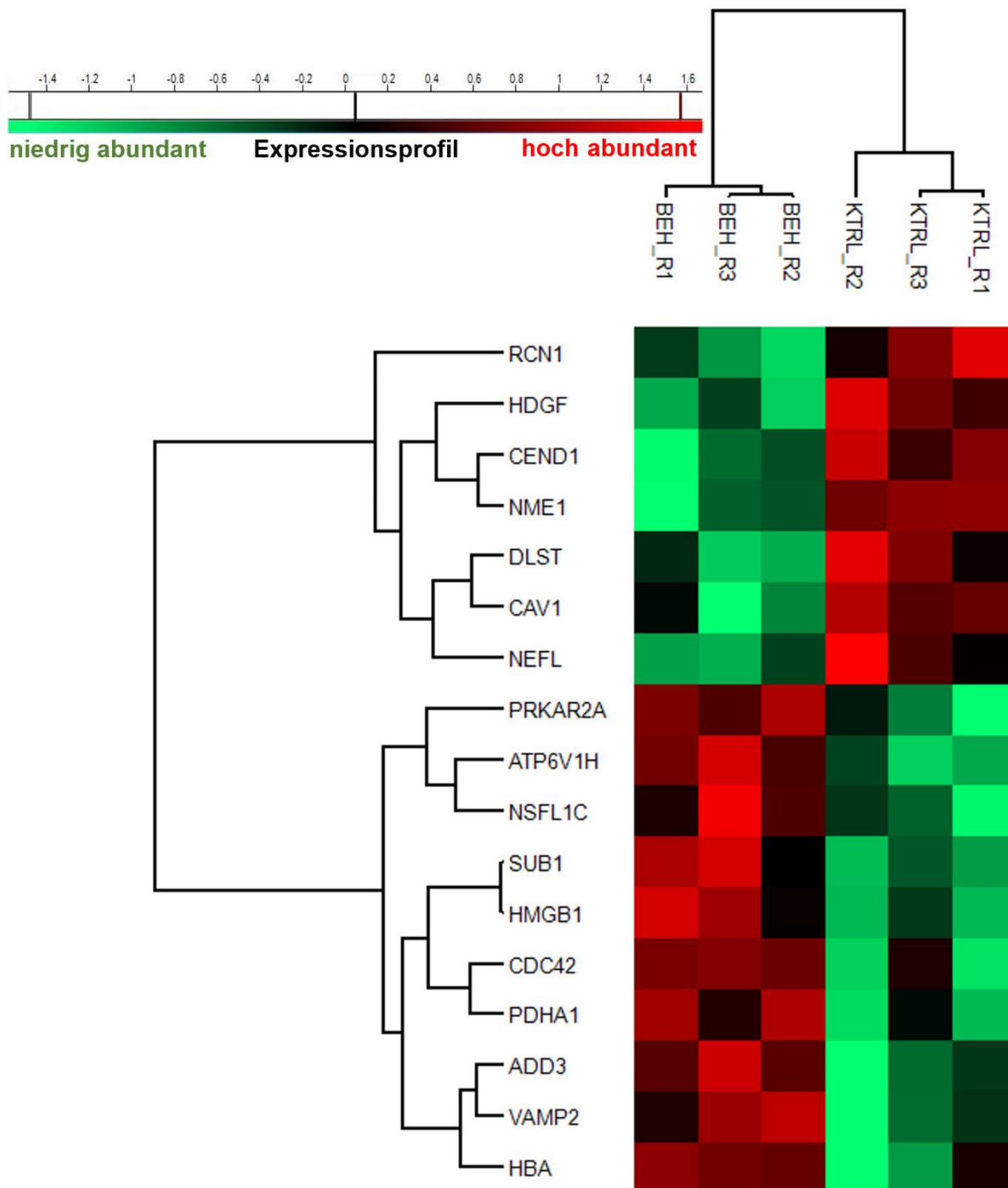


Abbildung 16: Heatmap zur Darstellung der signifikant veränderten Proteinexpressionsmuster. Die Heatmap illustriert die signifikanten proteomischen Veränderungen ($p < 0,05$) zwischen BEH und KTRL ($n=3$ pro Gruppe). Die Netzhaut-Explantate der BEH-Gruppe wurde mit $50 \mu\text{g}$ des synthetischen CDR-Peptids behandelt. Insgesamt unterschieden sich 17 Proteine signifikant hinsichtlich des Expressionsmusters zwischen BEH und KTRL. Von diesen waren 7 Proteinmarker niedrig abundant vertreten in BEH im Vergleich zu KTRL, wohingegen 10 dieser Marker hoch abundant in BEH exprimiert waren.

4.2.1.3 Signalwegsanalyse

Um den molekularen Mechanismus der CDR-induzierten Neuroprotektion aufzuklären, wurde eine Signalwegsanalyse mit den signifikant veränderten Proteinen zwischen BEH und KTRL durchgeführt. Für diese Analysen wurden die Online-Datenbanken IPA und STRING (siehe Kapitel 3.4.2.6) verwendet. Die molekulare Signalwegsanalyse mittels IPA determinierte die Beta Gamma Signaltransduktion, die *Tight Junction* Signaltransduktion, den Insulinsekretions-Signalweg, den Synaptogenese-Signalweg und den Pyroptose-Signalweg als die am signifikantesten vertretenden Signalwege in den CDR-behandelten Netzhaut-Explantaten. Die CDR-induzierten molekularen Signalwege sowie die entsprechenden *p*-Werte als auch die beteiligten Proteine sind in Tabelle 9 gelistet.

Tabelle 9: Ergebnisse der Signalwegsanalyse mittels der IPA Software. Diese determinierte die Beta Gamma Signalübertragung, sowie die *Tight Junction* Signalübertragung als die am signifikantesten vertretenden Signalwege in den CDR-behandelten Netzhaut-Explantaten.

kanonische Signalwege	-log (<i>p</i> -Werte)	Moleküle
Beta Gamma Signaltransduktion	4	<i>CAV1, CDC42, PRKAR2A</i>
<i>Tight Junction</i> Signaltransduktion	3,58	<i>CDC42, PRKAR2A, VAMP2</i>
Insulinsekretions-Signalweg	3,05	<i>PDHA1, PRKAR2A, VAMP2</i>
Synaptogenese-Signalweg	2,87	<i>CDC42, PRKAR2A, VAMP2</i>
Pyroptose-Signalweg	2,7	<i>HMGB1, PRKAR2A</i>

Um weitere Interaktionsnetzwerke zwischen den signifikant veränderten Proteinen zu identifizieren, wurden die Daten nochmals mittels der Online-Datenbank STRING analysiert (siehe Abbildung 17). In diesem Interaktionsnetzwerk wurde vor allem das Protein CDC42 als zentrales Schlüsselprotein identifiziert und scheint jeweils mit den Proteinen NME1, VAMP2, HMGB1 und CAV1 zu interagieren. Wie bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, wurde das Protein ANP32A als hochaffiner Interaktionspartner des synthetischen CDR-Peptids (Sequenzmotiv SCTGTSSDVGGYNYVSWYQ) identifiziert. Interessanterweise scheint dieses Zielmolekül auch, durch molekulare Interaktion mit dem Protein NME1, einen Einfluss auf das CDR-induzierte Proteinnetzwerk zu haben. Darüber hinaus interagieren PDHA1 und DLST miteinander.

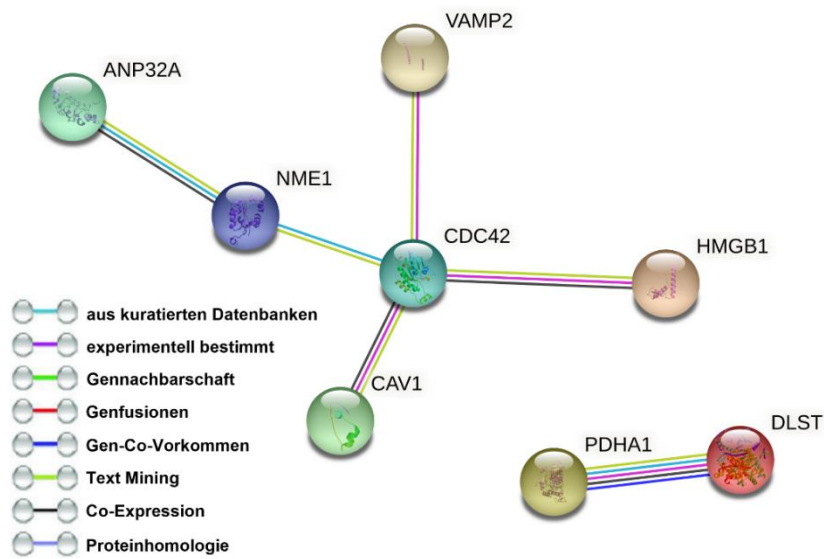


Abbildung 17: Protein-Interaktionsnetzwerk der signifikant veränderten Proteine, welches mittels der Online-Datenbank STRING ermittelt wurde. Gezeigt werden die signifikant veränderten Proteine, welche an den CDR-induzierten Signalwegen beteiligt sind. CDC42 wurde als zentrales Schlüsselprotein identifiziert und interagiert mit den Proteinen NME1, VAMP2, HMGB1 und CAV1. Auch das CDR-spezifische Zielprotein ANP32A, welches in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe identifiziert wurde, zeigt eine hypothetische Beteiligung am Interaktionsnetzwerk.

5 DISKUSSION

5.1 Dry Eye-Syndrom

Das multifaktorielle und komplexe Erscheinungsbild des DES stellt sowohl für die Therapie als auch für die Diagnostik eine besondere Herausforderung in der Ophthalmologie dar. Die Diagnostik des DES wird insbesondere aufgrund der häufig auftretenden Asymptomatik und mangelnder objektiver diagnostischer Methoden erschwert (4, 8, 123). Die Charakterisierung neuer Krankheits-assoziiertes Biomarker, z.B. in Form von Glykoproteinen im Tränenfilm, könnte daher in Zukunft eine zuverlässigere und aussagekräftigere Diagnostik ermöglichen. Zudem ist der genaue Pathomechanismus, welcher der Erkrankung zugrunde liegt, bis heute noch weitestgehend ungeklärt (5). Eine entscheidende Rolle könnten dabei aberrante Proteinglykosylierungsmuster spielen. Glykosylierungen von Proteinen können deren Funktion als auch Aktivität beeinflussen. Dadurch könnten diese als potenzielle Erkrankungsmarker genutzt werden (44). Bereits bei der Erkrankung *Diabetes mellitus* konnten veränderte Glykosylierungsmuster nachgewiesen werden. Bei der Typ-2-Diabetes konnten beispielsweise aberrante N-Glykosylierungen des Glukose-Transporters Glut-2 identifiziert werden, welche letztendlich zu einer Beeinträchtigung der Insulin-Sekretion führten (124). Die proteomische Analyse von Körperflüssigkeiten durch massenspektrometrische (MS) Verfahren gilt als vielversprechend hinsichtlich der Identifizierung neuer Krankheits-assoziiertes Biomarker (125). Die Tränenflüssigkeit ist eine komplexe Mischung aus Proteinen, Lipiden, Muzinen, Wasser und Salzen, in welcher bis dato zahlreiche Proteine in vielen proteomischen Studien nachgewiesen werden konnten (26, 126). Aufgrund der guten Zugänglichkeit der Träne sowie der Möglichkeit der nicht-invasiven Probenentnahme stellt die Tränenflüssigkeit eine vielversprechende Quelle für die Analyse von Biomarkern bei zahlreichen Augenerkrankungen dar (126). Insbesondere die Diagnostik des DES ist durch die heterogene Ätiologie und die Diskrepanz zwischen subjektivem Empfinden des Patienten und den objektiven Krankheitsanzeichen erschwert (127). Daher ist eine zukünftige Etablierung neuer objektiver diagnostischer Methoden unerlässlich (126).

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es eine Methodik zu entwickeln, um Glykoproteine aus dem Tränenfilm anzureichern und anschließend mittels MS-basierter Analysemethoden umfangreich zu charakterisieren. Aus diesem Grund wurde die Lektin-basierte Anreicherungsmethode zunächst auf Glykoprotein-Ebene etabliert als auch evaluiert und im Anschluss zur Anreicherung auf Glykopeptid-Ebene angewendet. Diese Vorgehensweise ermöglichte die direkte MS-basierte Identifizierung der angereicherten Glykoproteine als auch deren N-Glykosylierungsstellen und wurde zunächst im Rahmen dieser Methodenetablierung auf Tränenproben von klinisch gesunden Studienteilnehmern angewendet. Die entwickelte Methodik soll es zukünftig ermöglichen, qualitative als auch quantitative Unterschiede hinsichtlich der Proteinglykosylierungen zwischen DES-Patienten und gesunden Kontrollprobanden zu identifizieren und als mögliche Biomarker zu charakterisieren. Die Resultate dieses Projekts könnten zukünftig vor allem die Diagnostik des DES erleichtern und möglicherweise sogar zur Differenzierung von DES-Subgruppen verwendet werden. Darüber hinaus werden diese Erkenntnisse zum besseren Verständnis der komplexen Pathophysiologie des DES beitragen und möglicherweise neue therapeutische Ansatzpunkte für zukünftige Studien liefern.

5.1.1 Etablierung einer Methode zur Anreicherung von Glykoproteinen

Zur Anreicherung der Glykoproteine aus dem Tränenfilm wurde die Lektin-Affinitätschromatographie verwendet. Für die Aufreinigung der Glykoproteine wurden sowohl Ein-Lektin-Säulen (ConA, WGA oder JAC), sowie eine Multi-Lektin-Säule, welche aus allen drei Lektinen bestand, verwendet. Die Lektine wurden hierfür zuvor anhand ihrer Spezifitäten und Kongruenzen zu den in eukaryotischen Zellen vorkommenden Glykanstrukturen (N-Acetylglucosamin, Mannose, Glukose, Fucose und Galaktose (45)) ausgewählt. Durch die Analyse der Lektin-Eluatsfraktionen mittels 1D-Gelelektrophorese und anschließender Proteinfärbung wurde bestätigt, dass die Multi-Lektin-Säule (3L-Säule) für eine effiziente Isolierung und Aufreinigung zahlreicher Glykoproteine geeignet ist und gegenüber den Ein-Lektin-Säulen die Anreicherung diverser Glykoproteinspezies gewährleistet (siehe Abbildung 10). Beispielsweise war die Anreicherung der abundanten Proteine PRL und LCN1 mittels des Lektins WGA sehr effizient, wohingegen die Affinität der Ein-Lektin-Säulen ConA und JAC für diese Proteine sehr gering war. Das Lektin WGA hat eine hohe Affinität für N-Acetylglucosamin, welches ein in eukaryotischen Glykanstrukturen häufig vorkommendes Monosaccharid darstellt (122, 128). Möglicherweise trägt ein hoher Gehalt an N-Acetylglucosamin in den Glykanstrukturen der Proteine PRL und LCN1 zur effizienten Anreicherung dieser durch das Lektin WGA bei. Nichtsdestotrotz konnten mittels der Ein-Lektin-Säule ConA ebenfalls zahlreiche Glykoproteine, besonders die spezifische Proteinbande bei 28 kDa (LACRT, siehe Abbildung 10), aus dem Tränenfilm angereichert werden. ConA besitzt eine Affinität für das Monosaccharid Mannose, welches ebenfalls in den meisten eukaryotischen Glykanstrukturen vertreten ist (122, 129). Dies würde ebenfalls die effiziente Anreicherung von Glykoproteinen durch ConA erklären. Im Gegensatz dazu erbrachte die Ein-Lektin-Säule JAC eine vergleichsweise geringe Ausbeute an Glykoproteinen (siehe Tabelle 7), was sich möglicherweise durch die Affinität des Lektins für Galaktose erklären lässt. Nguyen-Khuong *et al.* (2015) (128) konnten in einer Studie 50 N-Glykane des Tränenfilms identifizieren, von denen lediglich 3 Glykanstrukturen eine Galaktose-Einheit aufwiesen. Daher scheint das Monosaccharid Galaktose deutlich weniger in den Glykoproteinen des Tränenfilms verbaut zu sein als die bereits beschriebenen Kohlenhydratstrukturen und würde daher die geringere Anreicherungs-effizienz der Ein-Lektin-Säule JAC erklären. Die Multi-Lektin-Säule führte zu einer vergleichbaren Anreicherungs-effizienz der Glykoproteine wie WGA. Darüber hinaus konnte mittels der Multi-Lektin-Säule das Protein Zink- α -2-Glykoprotein (AZGP1, ConA-spezifisch) isoliert werden, welches durch das Lektin WGA nicht angereichert werden konnte. Die Multi-Lektin-Säule stellt daher eine optimale Anreicherungsmethode dar, um diverse Glykoproteinspezies in einem Arbeitsschritt aus dem Tränenfilm zu isolieren. Das Prinzip der Lektin-Affinitätschromatographie beruht auf der Spezifität der Lektine für diverse Zuckerreste (Glykane). Dementsprechend werden bei Verwendung der Ein-Lektin-Säulen nur Glykoproteine angereichert, für deren Glykanrest das jeweilige Lektin spezifisch ist. Demnach ist die Verwendung von mehreren Lektinen (Multi-Lektin-Affinitätschromatographie) eine durchaus vielversprechende Methode, um ein breites Spektrum an Glykoproteinen zu isolieren (47, 129). Yang *et al.* (2004) (129) gelang es beispielsweise, mit einer Multi-Lektin-Affinitätschromatographie insgesamt 50 Glykoproteine des humanen Serums erfolgreich zu isolieren als auch zu charakterisieren. Zur Anreicherung der Glykoproteine verwendeten die Autoren ebenfalls Multi-Lektin-Säulen bestehend aus den Lektinen ConA, WGA und JAC und bestätigten, dass dieses Verfahren ein breiteres Spektrum an Glykoproteinen erfasst im Vergleich zur Aufreinigung mit Ein-Lektin-Säulen.

Im weiteren Rahmen der Methodenetablierung zur Anreicherung von Glykoproteinen wurde eine weitere Multi-Lektin-Säule, bestehend aus den vier Lektinen ConA, WGA, JAC und UEA I (4L-Säule) verwendet und hinsichtlich der Effizienz mit dem vorherigen Anreicherungssystem (3L-Säule) verglichen. UEA I besitzt eine hohe Affinität für das Kohlenhydrat Fucose (122) und dieses Monosaccharid ist ebenfalls häufig in eukaryotischen Glykanstrukturen vertreten (128). Daher sollte die Einbindung eines weiteren Lektins die Anreicherungseffizienz des bisherigen Systems nochmals deutlich steigern können. Mittels spezifischer Proteinfärbungen der Eluatsfraktionen wurde letztendlich überprüft, ob es sich bei den angereicherten Proteinspezies (3L- und 4L-Säule) um wirkliche Glykoproteine handelt (siehe Abbildung 12A). Im Rahmen dieses Experiments wurde bestätigt, dass mittels der 4L-Säule zusätzliche Glykoproteine im Bereich von 28 kDa angereichert werden konnten (im Vergleich zur 3L-Säule). Dieser Massenbereich wird vor allem durch das abundante Tränenprotein LACRT repräsentiert und scheint mithilfe des Lektins UEA I vermehrt angereichert worden zu sein. Durch die Berücksichtigung eines weiteren Lektins mit einer zusätzlichen Spezifität konnte demnach ein noch breiteres Spektrum an Glykoproteinen isoliert und charakterisiert werden. Aus diesem Grund wurde die 4L-Säule für die weiteren Analysen auf Glykopeptid-Ebene angewendet. Angesichts der meist heterogenen Glykosylierung eines Glykoproteins sind die Glykoprotein-Banden auf Gelen meist recht breit, sodass eine komplette Separation dieser durch 1D-Gelelektrophorese sehr diffizil ist. Des Weiteren werden die meisten Glykoproteine aufgrund des hohen Kohlenhydratanteils häufig nur schwach durch konventionelle Proteinfärbungen (z.B. durch Coomassie) visualisiert (130). Aus diesem Grund wurden in diesem Projekt die Proteine im Anschluss an die 1D-Gelelektrophorese zusätzlich mit einer spezifischen Glykoprotein-Färbung sichtbar gemacht. Um die Freisetzung der Glykanstrukturen von den Glykoproteinen zu induzieren, wurde ein enzymatischer Verdau mit der Endoglykosidase PNGase F durchgeführt. Da nach der vorherigen enzymatischen Abspaltung der N-Glykanstrukturen von den Glykoproteinen aus der Tränenflüssigkeit keine Isolation mittels der Lektine mehr möglich war, wurde bewiesen, dass die Anreicherung der Glykoproteine spezifisch über deren N-Glykanstrukturen erfolgte. Dies konnte ebenfalls durch die Durchflussfraktionen der 3L- und 4L-Säule belegt werden (siehe Abbildung 12), in denen kein Glykoprotein nachzuweisen war. Um unerwünschte Kontaminanten zu identifizieren, wurde das Gel im Anschluss an die spezifische Glykoprotein-Färbung zusätzlich mit dem Farbstoff Coomassie angefärbt. In den PNGase F-behandelten Eluatsfraktionen war jeweils eine leichte Kontamination im Bereich von 17-14 kDa zu erkennen (siehe Abbildung 12B), welche zuvor nicht als Glykoprotein visualisiert wurde. In einer Studie von Yang *et al.* (2004) (129), in der ebenfalls Agarose-gebundene Lektine für die Lektin-Affinitätschromatographie verwendet wurden, wurde unglykosyliertes Albumin in geringen Mengen in den Eluatsfraktionen nachgewiesen. Möglicherweise ist die vorliegende Kontamination ebenfalls durch das Auftreten von unspezifischen Bindungen bei der Lektin-Affinitätschromatographie erklärbar. So wäre es denkbar, dass diese Proteine unspezifisch mit der Festphase (Agarose) interagieren und folglich als Kontaminanten in den Eluatsfraktionen vorzufinden sind (131). Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass es sich bei den potenziellen Kontaminanten im Bereich von 17-14 kDa um Interaktionspartner der Glykoproteine handelt und daher indirekt über die Bindung an die angereicherten Glykoproteine unspezifisch co-eluiert (Co-Immunopräzipitation) wurden (132). Demnach könnten diese in der Analyse als falsch-positive Glykoproteine identifiziert werden.

5.1.2 MS-basierte Identifizierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden

Nach der erfolgreichen Etablierung des Lektin-Affinitätschromatographie-Verfahrens auf Glykoprotein-Ebene, wurde die entwickelte Methodik auf Glykopeptid-Ebene angewendet. Im Anschluss an die Probenvorbereitung konnten die Glykopeptide direkt per MS analysiert werden. Die Charakterisierung von Glykopeptiden per MS gestaltet sich in der Regel als schwierig aufgrund der Unterdrückung von Glykopeptid-MS-Signalen durch nicht-modifizierte Peptide sowie der Heterogenität der Glykanstrukturen. Zudem ist der Anteil glykosylierter Peptide deutlich geringer gegenüber nicht-modifizierten Peptiden (47, 130, 131). Durch die vorherige Lektin-Affinitätschromatographie war es jedoch möglich, die Komplexität der Probe zu reduzieren, indem ausschließlich glykosylierte Peptide angereichert wurden. Dieses Aufreinigungsverfahren erlaubte den Ausschluss nicht-modifizierter Peptide vor der eigentlichen MS-Analyse der Glykopeptide. Zur Freisetzung der N-Glykanstrukturen von den Glykopeptiden wurden die Proben zusätzlich mit dem Enzym PNGase F behandelt. Infolge der enzymatischen Abspaltung der Glykanstrukturen von der ursprünglichen Glykosylierungsstelle wird Asparagin (N) zur Asparaginsäure (D) umgewandelt (47–50). Die daraus resultierende enzymatisch-induzierte Modifikation (Deamidierung) konnte als Massenverschiebung (0,984 Da) per MS nachgewiesen werden. Dies ermöglichte eine umfangreiche Charakterisierung aller Glykoproteine des Tränenfilms und deren N-Glykosylierungsstellen. Eine Deamidierung kann jedoch auch eine natürlich vorkommende PTM sein oder auch spontan während der Probenvorbereitung in Form einer chemischen Deamidierung auftreten. Bei der chemischen Deamidierung handelt es sich um eine reversible Reaktion, die vor allem bei pH-Werten > 5 auftreten kann. Die Reaktion wird neben dem pH-Wert auch von den physikochemischen Eigenschaften der Reaktionslösung, der Sequenz des Proteins und der Temperatur beeinflusst. Spontane chemische Deamidierungen konnten vor allem an Asparagin-Resten (N) gefolgt von Glycin (G) oder Serin (S) als benachbarte Aminosäuren nachgewiesen werden, da die hydrophilen Seitenketten eine mögliche Reaktion begünstigen. Diese unerwünschten Modifikationen können allerdings zur Identifikation von falsch-positiven N-Glykosylierungsstellen führen (47, 50). Aus diesem Grund wurde in die Analyse in dieser Arbeit eine unbehandelte Kontrollgruppe miteinbezogen. Diese bestand aus einer nicht PNGase F-behandelten Tränenprobe, sodass im direkten Abgleich chemisch-induzierte Deamidierungen (falsch-positive N-Glykosylierungsstellen) aus der Analyse ausgeschlossen werden konnten. In einigen Studien wurde der PNGase F-Verdau mit schwerem Wasser ($H_2^{18}O$) durchgeführt. Dabei kommt es durch die Abspaltung der N-Glykanstrukturen zum Einbau von ^{18}O an die jeweilige Glykosylierungsstelle, was zu einer Massenverschiebung von ca. 3 Da führt. (47, 50). Der Vorteil dieser Methode besteht in der eindeutigen Markierung der N-Glykosylierungsstellen, sodass keine Kontrollgruppe zum Abgleich benötigt wird und ausschließlich wahre, enzymatisch-induzierte N-Glykosylierungsstellen (^{18}O -markiert) identifiziert werden. Diese Methode könnte ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe für die zukünftige Analyse der Glykoproteine der verschiedenen DES-Subgruppen Anwendung finden. Nichtsdestotrotz war es mittels des aktuellen experimentellen Vorgehens möglich, 14 N-Glykoproteine mit insgesamt 33 N-Glykosylierungsstellen (siehe Tabelle 8) im Tränenfilm von gesunden Probanden per MS nachzuweisen.

Neben dem bedeutenden diagnostischen Potenzial von Glykoproteinen, ist vor allem auch die Funktion der Proteine wesentlich, um ein Verständnis für die Pathogenese des DES zu erlangen. Im nächsten Abschnitt soll daher auf die Funktion der abundantesten Glykoproteine eingegangen werden und diese in einen möglichen Zusammenhang mit der

Pathogenese des DES gebracht werden. Aberrante Glykosylierungsmuster können die Funktion sowie die chemischen Eigenschaften von Proteinen beeinflussen, wie beispielsweise deren Polarität. Dies wiederum könnte einen entscheidenden Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen sowie Protein-Lipid-Interaktionen haben, welche bedeutend für die Stabilität des Tränenfilms sind und vor allem mit einer Dysfunktion beim DES assoziiert sind (26, 44, 45, 133).

Laktotransferrin (LTF) gilt als abundantes Protein des Tränenfilms (123). In der vorliegenden Arbeit konnte LTF als Glykoprotein in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden identifiziert werden sowie zwei N-Glykosylierungsstellen (N497, N642) charakterisiert werden. In einer Studie von Zhou *et al.* (2009) (134), in welcher Tränenproben von Patienten mit Keratopathie (CDK) mit Tränenproben von gesunden Kontrollprobanden verglichen wurden, konnten die beiden identischen N-Glykosylierungsstellen (N497, N642) nachgewiesen werden. In zahlreichen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von LTF in der Tränenflüssigkeit von DES-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant reduziert war (26, 135–137). Bei LTF handelt es sich um ein Glykoprotein, welches vor allem in sezernierten Körperflüssigkeiten (Träne und Speichel), aber auch in neutrophilen Granulozyten vorkommt. Seine Funktionen bestehen in der Förderung des Zellwachstums, der Eisenabsorption und der Inhibition des Bakterienwachstums. Durch seine immunmodulatorische, antiinflammatorische und antiinfektiöse Wirkung stellt LTF eine wichtige Komponente des Immunsystems dar (135). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es durch die exogene Applikation von LTF im DES-Tiermodell zu einer Reduktion der Inflammation der Kornea und der Tränendrüse kommt und oxidativer Stress reduziert wurde (26, 138). Des Weiteren gibt es einige Hinweise, dass die N-Glykanstrukturen von LTF eine wichtige Rolle bei der Adhäsion des Bakteriums *P. aeruginosa* spielen, welches unter anderem für die bakterielle Keratitis verantwortlich ist. Durch die verstärkte Adhäsion von LTF verliert das Bakterium die Fähigkeit in korneale Epithelzellen einzudringen und stellt daher einen wichtigen antibakteriellen Schutzmechanismus dar (139). Möglicherweise führt eine verminderte LTF-Expression bei DES-Patienten durch das Fehlen dieses Schutzmechanismus zu einer gesteigerten Anfälligkeit der Augenoberfläche für bakterielle Infektionen.

Darüber hinaus wurden durch die MS-Analyse einige Immunglobuline, vor allem Immunglobulin A (IgA) (IGHA1, IGHA2, Immunglobulin α -2 schwere Kette), sowie das Protein Polymerer Immunglobulin Rezeptor (PIGR) als Glykoproteine identifiziert. Immunglobuline sind im Allgemeinen Glykoproteine, deren Glykane die entsprechende Antikörper-Funktion beeinflussen können (84). Es wird vermutet, dass die Glykanstrukturen z.B. einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung des Antikörpers zum Antigen haben können (140). Aberrante Immunglobulin-Glykosylierungsmuster konnten bereits bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (84). Darüber hinaus können auch bei der IgA-Nephropathie aberrant glykosylierte IgA-Moleküle selbst Autoimmunreaktionen hervorrufen (141). Generell sind IgAs in mukosalen Sekreten, unter anderem in der Tränenflüssigkeit, vertreten und spielen, wie auch das Protein PIGR eine wichtige Rolle bei der mukosalen Immunabwehr. Einerseits fördert IgA das Überleben von endogenen Kommensalen der mukosalen Mikrobiota, andererseits bietet das Immunglobulin Schutz vor pathogenen Mikroorganismen. Damit IgAs ihre Zielantigene erreichen können, müssen sie per Transzytose durch die Epithelzellen transportiert werden, wobei der PIGR eine entscheidende Rolle spielt (87, 142). Der PIGR gilt ebenfalls als stark

glykosyliertes Protein, insbesondere die sekretorische Komponente (SC) des Rezeptors, der außerdem eine entscheidende Rolle bei der Inhibition der Bakterienadhäsion an die Epithelzellen zugeschrieben wird (140). Der PIGR wird auf der basolateralen Seite von Epithelzellen der Mukosa exprimiert und bindet den Fc-Teil der durch Plasmazellen synthetisierten polymeren Immunglobuline (dimeres IgA). Der Komplex aus PIGR und dem Immunglobulin passiert anschließend per Transzytose die Epithelzelle und wird auf der luminalen Seite sezerniert. Durch die darauffolgende Proteolyse des Rezeptors wird das IgA-Molekül zusammen mit dem SC-Teil des Rezeptors als sekretorisches Immunglobulin A (slgA) freigesetzt (87, 142). Der PIGR ist stark glykosyliert, jedoch sind die Funktionen der Glykane von PIGR noch weitestgehend unbekannt. Dennoch konnte bewiesen werden, dass die Glykane des Proteins eine wichtige Rolle in der antibakteriellen Protektion von mukosalen Oberflächen spielen (143, 144). Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass die Glykane des SC-Teils von slgA für eine effiziente Verankerung der slgA-Moleküle an die mukosale Oberfläche verantwortlich sind. Demgegenüber wurde demonstriert, dass nicht-glykosyliertes PIGR dennoch einen Komplex mit IgA bilden kann. Des Weiteren wurde postuliert, dass die Freisetzung von nicht-glykosyliertem PIGR im Vergleich zur Freisetzung von glykosyliertem PIGR mit einer geringeren Effizienz erfolgte. Folglich ist davon auszugehen, dass die Glykosylierung des PIGR selbst eine wichtige Rolle bei dessen Freisetzung spielt (143). In einer Studie von Srinivasan *et al.* (2012) (136) konnten bereits verminderte Expressionslevel von PIGR in der Tränenflüssigkeit von DES-Patienten belegt werden. Des Weiteren sind auch die schweren Ketten der IgA-Moleküle stark glykosyliert (140) und konnten auch in dieser Studie als Glykoproteine identifiziert werden. Raskova Kafkova *et al.* (2021) (140) untersuchten in einer Studie den protektiven Schutz von slgA gegenüber *E. coli* in einem *in vivo* Ferkel-Modell. Hierfür beurteilten die Autoren die protektiven Eigenschaften von slgA sowie von deglykosylierten slgA-Molekülen im Zusammenhang mit einer *E. coli*-Infektion in diesem Modell. Interessanterweise reduzierte die vorherige Abspaltung der N-Glykane von slgA den durch slgA-vermittelten protektiven Effekt gegenüber dem Bakterium. Diese Resultate demonstrieren die entscheidende Rolle der slgA-spezifischen N-Glykane bei der pathogenen Abwehr der Mukosa, indem slgA-N-Glykane die Bindung von Mikroorganismen an korrespondierende Rezeptoren effektiv inhibieren (140). Es wird vermutet, dass slgAs im Tränenfilm ebenfalls der Adhäsion von Mikroorganismen an die okuläre Oberfläche vorbeugen (145). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnten bereits verminderte Level von IGHA1 in der Tränenflüssigkeit von DES-Patienten belegt werden (5). Möglicherweise führen aberrante Glykosylierungsmuster des PIGR, insbesondere des SC-Teils, zu einer verminderten Freisetzung von slgA-Molekülen. Folglich könnte dies zur Beeinträchtigung der pathogenen Abwehr führen, welche wiederum in einer erhöhten Anfälligkeit der Augenoberfläche resultiert.

Das Glykoprotein Lacritin (LACRT) wird von der Haupttränendrüse, den akzessorischen Tränendrüsen und den Meibomdrüsen sezerniert und besitzt eine bakterizide Wirkung. Seine Expression ist im Wesentlichen auf die *Lacrimal Functional Unit* (LFU) beschränkt (54, 146). In der vorliegenden Arbeit wurde LACRT als Glykoprotein identifiziert und seine spezifische N-Glykosylierungsstelle (N119) bereits in einer Studie von Zhou *et al.* (2009) (134) beschrieben. Nichtsdesotrotz wurde diese spezifische N-Glykosylierungsstelle auch in der unbehandelten Tränenprobe detektiert (siehe Tabelle 8), was auf eine chemisch-induzierte Abspaltung des N-Glykans während der Probenvorbereitung hindeuten könnte. Im Tiermodell konnte durch die externe Applikation von LACRT eine Stimulation der Basalsekretion nachgewiesen werden. Der molekulare Mechanismus, der dabei zu einer

gesteigerten Basalsekretion führt, ist bis dato nicht geklärt. Jedoch wird unter anderem vermutet, dass LACRT die Proteinexpression der Membranmucose (z.B. MUC16) induzieren kann, welche bei der Befeuchtung der Augenoberfläche eine wichtige Rolle spielen. Eine andere Hypothese besagt, dass LACRT sensorische Neurone stimulieren kann und dadurch die Basalsekretion steigert (147). Die Autoren Vijmasi *et al.* (2014) (148) demonstrierten, dass eine topische Applikation von LACRT eine antiinflammatorische Wirkung in einem DES-Modell zeigte. Darüber hinaus induzierte LACRT in kornealen Epithelzellen unter Stressbedingungen autophagische Prozesse, um Stress-geschädigte Proteine als auch Organellen abzubauen und folglich deren zelluläre Homöostase zu bewahren (149). Der Mechanismus der Autophagie ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Funktionalität einer Zelle. Durch die Proteolyse der aggregierten Zellbestandteile in den Autophagosomen wurde außerdem der zelluläre Stoffwechsel aufrechterhalten (149). Wenn der Mechanismus der Autophagie gestört ist, kann es zu einer pathogenen Akkumulation beschädigter Proteine und Organellen kommen und dies folglich zu zellulärer Toxizität sowie Inflammation führen (54). Liu *et al.* (2020) (150) untersuchten in einem DES-Modell *in vitro* den Zusammenhang zwischen Inflammation und der Aktivierung von Autophagie. Die Autoren postulierten, dass Autophagie die okuläre Oberfläche vor Inflammation schützen kann. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnten bereits verminderte LACRT-Expressionslevel in der Tränenflüssigkeit von DES-Patienten per MS nachgewiesen werden (5) und wurde bereits auch in einer weiteren Studie bestätigt (136). Diese Beobachtungen verleiten zu der Annahme, dass die verminderten LACRT-Proteinlevel mit einer Dysfunktion der Autophagie beim DES assoziiert sind und dies letztendlich mit inflammatorischen Prozessen auf der Augenoberfläche einhergeht.

Bei dem Glykoprotein Lysozym C (LYZ) konnten mittels der MS-Analyse zwei N-Glykosylierungsstellen (N78, N106) identifiziert werden, welche jedoch nicht in der Literatur bekannt waren. Des Weiteren wurde eine N-Glykosylierungsstelle (N106) ebenfalls in der unbehandelten Kontrollgruppe detektiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine natürliche PTM oder eine chemische-induzierte Deamidierungsstelle handelt, welche spontan während der Probenvorbereitung auftreten kann. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass eine chemisch-induzierte Deamidierung von Asparagin (N) mit höherer Wahrscheinlichkeit auftreten kann, insofern die benachbarte C-terminale Aminosäure einen Glycin (G)- oder Serin (S)-Rest darstellt. Es wird vermutet, dass die chemische Deamidierung aufgrund der hydrophilen Seitenketten dieser Aminosäuren vermehrt auftritt (50). Neben der detektierten Glykosylierungsstelle N78 des Proteins LYZ befindet sich C-terminal ein Serin-Rest (S79), welche auf eine spontane, chemische Deamidierung hinweisen könnte. Daher könnte diese Deamidierungsstelle ein falsch-positives N-Glykopeptid darstellen. Um diese Fehlinterpretation der MS-Daten zu vermeiden, könnte in zukünftigen Studien, wie bereits beschrieben, der PNGase F-Verdau mit schwerem Wasser ($H_2^{18}O$) durchgeführt werden. Dies führt zu einer eindeutigen Markierung von wahren enzymatisch-induzierten Deamidierungsstellen (N-Glykosylierungsstellen), da der katalytische Einbau vom Sauerstoffisotop ^{18}O ins Peptidrückgrad zu einer charakteristischen Massenverschiebung von ca. 3 Da im MS führt (47, 50).

5.2 Glaukom

5.2.1 CDR-induzierte Effekte im *in vitro* Glaukommodell

Aufgrund der topographischen und anatomischen Ähnlichkeiten zwischen porziner und humaner Retina stellt die Retina-Organokultur des Hausschweins (*Sus scrofa domestica*) ein adäquates Glaukommodell dar (151–153). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die neuroprotektive Wirkung des CDR-Peptids mit dem Sequenzmotiv SCTGTSSDVGGYNYVSWYQ auf RGZ unter Stressbedingungen im *in vitro* Glaukommodell untersucht werden. In einigen Studien konnten bereits immunmodulatorische sowie immunregulatorische Eigenschaften von synthetischen CDR-Peptiden nachgewiesen werden und induzierten zahlreiche antitumorale, antivirale als auch antibakterielle Effekte *in vitro* und *in vivo* (112, 116). Des Weiteren wurde das *in vitro* Glaukommodell bereits erfolgreich in mehreren Studien unserer Arbeitsgruppe angewendet, um die neuroprotektiven Eigenschaften von Glaukom-assoziierten AAK-Molekülen sowie synthetischen CDR-Peptiden nachzuweisen (60, 61). Das im Rahmen dieser Doktorarbeit zu erforschende CDR-Peptid wurde in einer Studie unserer Arbeitsgruppe ursprünglich als potenzieller Biomarker im Serum von POWG identifiziert, welcher signifikant erniedrigt in der variablen IgG-Domäne vorzufinden war im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (85). Auch wurde in weiteren MS-basierten Vorversuchen das Protein ANP32A als signifikanter Interaktionspartner des synthetischen CDR-Peptids identifiziert. Darüber hinaus wurde diese Art der Antikörper-Peptide bereits erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe angewendet, um Neuroprotektion im *in vitro* Glaukommodell zu induzieren (60) und stellen daher einen attraktiven, neuen Therapieansatz für die Behandlung des Glaukoms dar. In der vorliegenden Arbeit konnte die neuroprotektive Wirkungsweise des Glaukom-assoziierten CDR-Peptids auf die RGZ bestätigt werden. Es konnten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) hinsichtlich der Viabilität der RGZ zwischen CDR-behandelten (BEH) als auch unbehandelten (KTRL) Netzhaut-Explantaten nachgewiesen werden. Des Weiteren war die Verteilung der RGZ/mm² innerhalb der porzinen Retina-Explantate mit vorherigen Studien vergleichbar und bestätigt die Reproduzierbarkeit des *in vitro* Glaukommodells (60, 151, 152). Die CDR-induzierte Neuroprotektion auf RGZ erfolgte hierbei in konzentrationsabhängiger Art und Weise, wobei diese Effekte bei einer Behandlung mit 50 µg des synthetischen CDR-Peptids mit einer robusteren statistischen Signifikanz belegt wurden im Vergleich zu einer Behandlung mit 25 µg. Möglicherweise wurde erst durch die Behandlung mit höheren Mengen des synthetischen CDR-Peptids ein gewisser Sättigungseffekt erreicht, welcher eine ordnungsgemäße physikalische Interaktion mit dem retinalen Zielprotein ANP32A ermöglichte und folglich Neuroprotektion induzierte. Vor allem die zelluläre Aufnahme von Peptiden über die Plasmamembran ist ein sehr komplexer und vielseitiger Prozess (154, 155) und könnte durch höhere extrazelluläre Ausgangskonzentrationen begünstigt sein.

Um signifikante Veränderungen hinsichtlich der Proteinexpressionsmuster zwischen beiden experimentellen Gruppen (BEH und KTRL) aufzuzeigen, wurde im Anschluss an die Organokultur *in vitro* eine MS-basierte proteomische Analyse der porzinen Netzhaut-Explantate durchgeführt. Bezüglich der quantitativen proteomischen Analyse wurden insgesamt 974 Proteine sowohl in BEH als auch KTRL identifiziert (FDR < 1 %). Die statistische Auswertung der quantitativen Daten ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) bei 17 Proteinen, welche unterschiedlich exprimiert zwischen beiden Gruppen (BEH und KTRL) vorlagen. Bis zu 10 dieser Proteinmarker waren hoch abundant in BEH vertreten im Vergleich zu KTRL, wohingegen die verbliebenen 7 Proteine erniedrigt in der BEH-Gruppe vorlagen (siehe Abbildung 16). Interessanterweise wurden in den CDR-behandelten

Explantaten vor allem Proteine mit antiapoptotischen Eigenschaften (z.B. Zellteilungskontrollprotein 42 Homolog (CDC42)) vermehrt exprimiert. Darüber hinaus kam es zu einer verstärkten Expression von Proteinen, die eine entscheidende Rolle beim zellulären Energiemetabolismus sowie der Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase und der Regulation der neuronalen Morphologie (z.B. Pyruvatdehydrogenase E1 α (PDHA1), und CDC42) aufwiesen. Demgegenüber wurden Proteine, welche mit neuronaler Schädigung (z.B. leichtes Neurofilament-Polypeptid (NEFL)) assoziiert waren, erniedrigt in CDR-behandelten Explantaten nachgewiesen.

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte bereits ein hochaffiner Interaktionspartner des synthetischen CDR-Peptids (Sequenzmotiv SCTGTSSDVGGYNYVSWYQ) identifiziert werden. Das CDR-Peptid wies eine hohe Affinität für das Leucin-reiche Kernphosphoprotein 32A (ANP32A) auf und scheint mit diesem zu interagieren. In der vorliegenden MS-Analyse wurde ANP32A ebenfalls in den Netzhaut-Explantaten identifiziert, jedoch konnte keine signifikante Veränderung der Proteinexpression zwischen beiden experimentellen Gruppen (BEH und KTRL) festgestellt werden. ANP32A spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. der Modulation von Caspasen, Chromatin-Modifikationen, Proteinphosphatase-Inhibition sowie beim intrazellulären Transport von Molekülen. Dementsprechend ist es an der Regulation der Zelldifferenzierung, Transkription, Apoptose und Zellzyklusprogression beteiligt (118, 120). Bei der Osteoarthritis wurde ANP32A eine protektive Rolle bei der Entstehung und Progression der Erkrankung zugeschrieben. ANP32A ist in der Lage die Transkription des ATM-Gens (engl. *Ataxia teleangiectasia mutated*) zu kontrollieren, welches ein wichtiger Regulator der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress darstellt. Diese regulatorischen Mechanismen, die ANP32A auf das Knorpelgewebe ausüben kann, konnten sowohl im Knochen als auch im Gehirn nachgewiesen werden (118). Demgegenüber ist ANP32A als Teil des Inhibitor der Acetyltransferase (INHAT)-Komplexes auch an der Regulation der Histonacetylierung beteiligt (119, 120). In Tiermodellen konnten bereits verminderte Histonacetylierungen mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer-Erkrankung, in Verbindung gebracht werden. Bei Alzheimer-Patienten wurde ANP32A verstärkt in Gehirnregionen exprimiert. In einem *in vivo* Alzheimer-Modell konnte durch die Inhibierung von ANP32A, und die folglich reduzierte Bildung des INHAT-Komplexes, die synaptische Plastizität sowie das Gedächtnisvermögen aufrechterhalten werden (121). Darüber hinaus wurde mittels der Online-Datenbank STRING eine potenzielle Interaktion zwischen ANP32A und dem Protein Nukleosiddiphosphatkinase A (NME1) bestätigt. Beide Proteine gehören dem sogenannten ER-assoziierten SET-Komplex (engl. *ER-associated oxidative stress response complex*) an, der als Reaktion auf oxidativen Stress in den Nukleus der Zelle transportiert wird. Der SET-Komplex besteht aus Nukleasen (z.B. NME1) sowie Chromatin-modifizierenden Proteinen (z.B. ANP32A) und einer DNA-bindenden Proteineinheit. Eine Funktion dieses Komplexes besteht in der Reparatur von DNA-Schäden, welche durch oxidativen Stress induziert wurden (156). Nichtsdestotrotz ist die genaue Rolle von ANP32A bei der Pathogenese des Glaukoms noch weitestgehend unbekannt.

Das in den CDR-Explantaten hoch abundant vorliegende Protein CDC42 spielt im Interaktionsnetzwerk (siehe Abbildung 17) als Schlüsselprotein eine zentrale Rolle und wurde bereits mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und *Morbus Parkinson* in Verbindung gebracht. CDC42 gehört zur Familie der Rho GTPasen. In ihrer aktiven Form können Rho GTPasen mit einer Vielzahl von Effektorproteinen (z.B. Proteinkinasen) interagieren, durch welche intrazelluläre Signalkaskaden induziert werden

können. Diese Effektorproteine können wiederum proapoptotische Signalmoleküle (z.B. Bad) über eine Phosphorylierung inaktivieren und folglich die Zellviabilität mittels Inhibition proapoptotischer Signalwege erhöhen (157, 158). Dies legt die Vermutung nahe, dass durch die gesteigerte Expression von CDC42 die Neurodegeneration der RGZ durch Inhibition des Apoptosemechanismus *in vitro* reduziert sein könnte. Darüber hinaus konnte in den letzten Jahren in einigen Studien gezeigt werden, dass Rho GTPasen an wichtigen zellulären Prozessen, wie beispielsweise der Gentranskription (159), Zell-Zell-Adhäsion und der Progression des Zellzyklus (160) beteiligt sind. Sie spielen zudem eine entscheidende Rolle in der Regulation der neuronalen Morphologie, z.B. regulieren sie dendritische Verzweigungen, neuronale Wachstumskegel, sowie die axonale Wegfindung (161). Heynen *et al.* (2013) (157) postulierten, dass es in *CDC42*-Knockout Mäusen zu einer gesteigerten Expression von proapoptotischen und proinflammatorischen Molekülen in den Retinae kommt und letztendlich zur Neurodegeneration führt. Neuronale Wachstumskegel sind essenziell für die Navigation aussprossender Axone zu deren Zielgebieten und sind unter anderem durch CDC42 reguliert. Das Erreichen des Axon-Targets wird mithilfe von wenigen Leitmolekülen gesteuert. Rho GTPasen sind an diesen Signalgebungen beteiligt. Rac1 und CDC42 fördern die Aktin-Polymerisation an der Vorderseite des Wachstumskegels, was in einer anschließenden Axonelongation resultiert (162). Die Synaptogenese wurde in der vorliegenden Arbeit mitunter als signifikanter CDR-induzierter Signalweg identifiziert. Die Formation von synaptischen Verbindungen zwischen Dendriten und Axonen ist entscheidend für die Bildung neuronaler Schaltkreise der Retina (163).

Ein weiteres wichtiges Protein, welches signifikant hoch abundant in BEH im Vergleich zu KTRL vorlag, ist die Pyruvatdehydrogenase E1 α (PDHA1) und spielt vor allem bei der neuronalen Homoöstase und dem zellulären Energiemetabolismus eine wichtige Rolle. PDHA1 ist eine Untereinheit des Enzymkomplexes Pyruvatdehydrogenase (PDH) und ist vor allem am zellulären Energiestoffwechsel beteiligt. Der Enzymkomplex ist für die oxidative Phosphorylierung von Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse, verantwortlich. Durch die oxidative Phosphorylierung von Pyruvat entsteht Acetyl-CoA, womit PDH die Verbindung zwischen der Glykolyse und dem Citratzyklus sicherstellt (164). Ein aberranter oder veränderter Pyruvatmetabolismus konnte bis dato bereits mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Alzheimer oder *Morbus Parkinson* in Verbindung gebracht werden (164). Bei Alzheimer-Patienten konnten reduzierte PDH-Aktivitäten festgestellt werden (164, 165). Jüngste Studien beschreiben gestörte Glukose- und Pyruvat-Metabolismen auch beim Glaukom. So konnte beispielsweise eine IOD-abhängige Suppression des Pyruvat-Gehalts in RGZ, einhergehend mit einem dysregulierten Glukose-Stoffwechsel nachgewiesen werden. Interessanterweise waren die Glukoselevel in der Retina um das 50-fache erhöht, die Glykolyse jedoch vermindert (166). Die Beobachtungen suggerieren, dass ein erhöhter IOD einen entscheidenden Einfluss auf den Energiemetabolismus einer Zelle haben kann, indem er die Energiehomöostase der neuronalen Zelle stört. Neben dem bedeutenden Einfluss von Pyruvat auf den Energiemetabolismus konnte zudem gezeigt werden, dass Pyruvat vor Neuroinflammation und oxidativem Stress schützt (166, 167). Des Weiteren konnte durch Pyruvat-Supplementation der Degeneration von RGZ *in vivo* vorgebeugt werden (166). Darüber hinaus erwies sich eine Inhibition der Pyruvatdehydrogenase Kinase (PDK) im Tiermodell als neuroprotektiv und steigerte den retinalen Energiemetabolismus (168). PDK führt durch Phosphorylierung von PDH zur Inhibition des Enzyms und scheint im Glaukommodell die Degeneration der RGZ zu begünstigen (164, 168). Daher könnte die gezielte Inhibition der

PDK eine interessante Zielstruktur zur Behandlung des Glaukoms darstellen. In diesem Zusammenhang wurde auch der CDR-induzierte Signalweg, die Insulinsekretion, identifiziert. In einigen Studien wurde impliziert, dass Insulin als neurotrophischer Faktor agiert und dementsprechend eine protektive Wirkung auf neuronale Zellen ausüben kann. In einer Studie konnte durch die Behandlung mit Insulin die Bildung von ROS (engl. *reactive oxygen species*) in neuronalen Zellen *in vitro* vermindert werden (169, 170). Zudem wird die PDK-Aktivität durch Insulin reguliert (171). Anhand der in der Literatur gezeigten Daten lässt sich vermuten, dass eine CDR-induzierte Expression von PDHA1 eine neuroprotektive Wirkung auf RGZ im *in vitro* Glaukommodell vermitteln könnte.

Caveolin-1 (CAV1) wurde als erniedrigt abundanter Marker in den CDR-behandelten Explantaten identifiziert im Vergleich zu KTRL und ist essenziell für die Bildung von Caveolae. In der Interaktionsnetzwerkanalyse (siehe Abbildung 17) konnte auch eine potenzielle indirekte Interaktion des Proteins mit ANP32A nachgewiesen werden. Darüber hinaus spielt CAV1 eine wichtige Rolle in einigen zellulären Prozessen, wie der Endozytose, der Signaltransduktion, der Apoptose und der zellulären Homöostase. Veränderte CAV1-Expressionen konnten bereits in einigen okulären Pathologien, wie beispielsweise der diabetischen Retinopathie beobachtet werden (172, 173). Die Expression von CAV1 wurde in retinalem Gewebe wie Photorezeptorzellen, Müller-Stützzellen, RGZ sowie den Zellen des Trabekelmaschenwerks nachgewiesen (172, 174, 175). Außerdem ist CAV1 an der Regulation des BDNF/TrkB-Signalwegs (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*/Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B) in RGZ beteiligt. Die Aktivierung des TrkB-Rezeptors, welcher auf RGZ exprimiert wird, spielt eine wichtige Rolle bei deren Zellviabilität. Die Bindung von BDNF an TrkB fördert die Aktivierung von Signalwegen, die die Überlebensrate von Zellen steigern können, wie beispielsweise der MAPK/Erk1/2- (engl. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*) und der PI3K/AKT- (Phosphatidylinositol-3 Kinase) Signalweg (172, 176, 177). In einer Studie von Gupta *et al.* (2012) (177) wurde belegt, dass es in gestressten retinalen Zellen zu einer verstärkten Bindung der Shp-2-Phosphatase an den TrkB-Rezeptor kommt, was zu einer Dephosphorylierung und damit verknüpften Inaktivierung des TrkB-Rezeptors führt. Dies wiederum resultiert in einem Verlust der neuroprotektiven Effekte, vermittelt durch neurotrophische Wachstumsfaktoren, wie z.B. BDNF. Dabei wurde vermutet, dass die verstärkte Bindung an den TrkB-Rezeptor durch CAV1 initiiert wird. CAV1 wird unter glaukomatösen Stressbedingungen hyperphosphoryliert und bindet vermehrt an die Shp-2-Phosphatase. Diese wird infolge dessen aktiviert und dephosphoryliert den TrkB-Rezeptor, was letztendlich zu einem Aktivitätsverlust des TrkB-Rezeptors führt. In einer weiteren Studie führte die Inhibition der Shp-2-Phosphatase zu einer Wiederherstellung der TrkB-Rezeptor-Aktivität und legt die Vermutung nahe, dass eine Blockade des TrkB-Rezeptors zur Degeneration von RGZ beim Glaukom beitragen könnte (177). Daher könnte man vermuten, dass sich die CDR-induzierte, erniedrigte Expression von CAV1 positiv auf die Viabilität der RGZ im *in vitro* Glaukommodell auswirkt.

Der Marker leichtes Neurofilament-Polypeptid (NEFL), welcher bereits mit neuronaler Schädigung assoziiert war, wurde ebenfalls erniedrigt exprimiert in BEH identifiziert. In den letzten Jahren wurde NEFL als optimaler Biomarker für einige neurodegenerative Erkrankungen charakterisiert. Loeffler *et al.* (2020) (178) konnten in einem *in vivo* Maus-Modell einen Anstieg der NEFL-Level im Plasma von Alzheimer-Patienten nachweisen. Dabei handelt es sich bei Neurofilamenten (NF) um zytoskelettale Intermediärfilamente von Nervenzellen. Sie werden in Zellkörpern gebildet und durch axonalen Transport befördert

(179). Es wird angenommen, dass das Verhalten der NF durch PTM, wie z.B. durch Phosphorylierungen, beeinflusst wird. Man geht davon aus, dass sowohl der Auf- als auch Abbau durch Phosphorylierungen der einzelnen Untereinheiten der NF reguliert wird (180). Abnormale Akkumulationen von NF konnten bis dato mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert werden (179). Wie genau es zu den Aggregationen kommt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass diesem Mechanismus Hyperphosphorylierungen zugrunde liegen (180). In Versuchen mit Knockout-Mutanten, die einer permanenten Phosphorylierungsrate ausgesetzt waren, kam es zu erniedrigten Transportraten und eine frühzeitige Phosphorylierung führte zur Absonderung von NF-Untereinheiten ins Zellsoma (179–182). Darüber hinaus wurde dokumentiert, dass es bei neuronaler Schädigung zur Freisetzung von NEFL aus geschädigten Zellen kommt (183). Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, inwiefern die Bildung der NF-Aggregate mit neurodegenerativen Prozessen zusammenhängt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der axonale Transport durch die Aggregate gestört wird (180). Bei den NF der RGZ konnten Glaukom-assoziierte Veränderungen festgestellt werden. Unter anderem wurde dokumentiert, dass der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat, dessen extrazelluläre Level beim Glaukom erhöht vorliegen, die Phosphorylierungsrate der NF verstärken kann. Durch Hyperphosphorylierungen wird die Aggregation der NF im Soma begünstigt und könnte somit bei der Degeneration der RGZ *in vitro* mitverantwortlich sein (179, 180, 184).

Aufgrund der vielseitigen Funktionen des CDR-spezifischen Interaktionspartners ANP32A könnte man vermuten, dass die neuroprotektiven proteomischen Veränderungen aus der direkten Interaktion zwischen ANP32A und dem CDR-Peptid resultieren. Die CDR-induzierte Inhibition der ANP32A-Funktion könnte sich beispielsweise auf die Aktivität des INHAT-Komplexes auswirken und dies wiederum einen Einfluss auf die Histonacetylierung haben. Daher könnte das synthetische CDR-Peptid indirekt die Genexpression verschiedener Zielproteine regulieren. Wie anhand der Literaturdiskussion zu vernehmen ist, waren viele molekulare Mechanismen bzw. Eigenschaften der signifikant veränderten Proteine mit der PTM Phosphorylierung assoziiert. Daher könnte man vermuten, dass ANP32A die Fähigkeit besitzt, den Phosphorylierungsgrad gewisser Zielproteine direkt oder indirekt zu kontrollieren. Die spezifische Interaktion von ANP32A und dem CDR-Peptid könnte folglich die Phosphorylierungsrate spezifischer Proteine beeinflussen und dadurch verschiedene neuroprotektive Effekte induzieren. Nichtsdestotrotz bleibt zu überprüfen, ob die CDR-induzierten Veränderungen der Proteinexpression aus der direkten Interaktion zwischen ANP32A und dem CDR-Peptid resultieren oder auf andere zellulären Mechanismen zurückzuführen sind.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Diagnostik des DES stellt aufgrund der heterogenen Ätiologie der Erkrankung sowie der häufig auftretenden Asymptomatik und mangelnden objektiven Diagnoseverfahren eine besondere Herausforderung dar. Eine Identifizierung neuer Krankheits-assoziiertes Biomarker, z.B. in Form von Glykoproteinen, ist daher für die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden von entscheidender Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit konnten erfolgreich Glykoproteine des Tränenfilms klinisch gesunder Probanden sowie deren N-Glykosylierungsstellen mithilfe massenspektrometrisch (MS)-basierter Verfahren identifiziert sowie charakterisiert werden. Die proteomische Analyse von Körperflüssigkeiten mittels MS gilt als vielversprechend und wurde bereits vielfach zur Charakterisierung neuer potenzieller Biomarker verwendet. Die Anreicherung der Glykoproteine erfolgte auf dem Prinzip der Lektin-Affinitätschromatographie, welche mit verschiedenen Agarose-gebundenen Lektinen durchgeführt wurde. Dazu wurden sowohl Ein-Lektin-Säulen (ConA, JAC oder WGA) sowie Multi-Lektin-Säulen, welche aus den drei Lektinen (ConA, JAC und WGA) bzw. vier Lektinen (ConA, JAC, WGA und UEA I) bestanden, verwendet. Die verschiedenen Lektin-Säulen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Anreicherungs-effizienz als auch Performance mittels 1D-Gelelektrophorese und spezifischen Proteinfärbungen beurteilt. Im Anschluss wurde die auf Glykoprotein-Ebene entwickelte und optimierte Methodik nach erfolgreicher Etablierung auf Glykopeptid-Ebene angewendet. Hierfür wurden die Tränenproteine zunächst vor Anwendung der Lektin-Affinitätschromatographie mittels des Enzyms Trypsin verdaut. Diese Vorgehensweise bot den Vorteil, dass ausschließlich Glykopeptide spezifisch angereichert wurden und nicht-modifizierte Peptide bei der Analyse vernachlässigt wurden. Die Freisetzung der N-Glykane erfolgte im Anschluss enzymatisch mittels der Endoglykosidase PNGase F und erlaubte die Lokalisation der spezifischen N-Glykosylierungsstellen der Glykoproteine. Insgesamt konnten mithilfe der entwickelten Methodik 14 Glykoproteine mit insgesamt 33 N-Glykosylierungsstellen im humanen Tränenfilm von gesunden Studienteilnehmern nachgewiesen werden. Dabei konnten unter anderem abundante Vertreter des Tränenproteoms wie Laktotransferrin, Lysozym und Polymerer Immunglobulin Rezeptor als Glykoproteine identifiziert und deren N-Glykosylierungsstellen charakterisiert werden. In Zukunft soll die entwickelte Methodik eine qualitative als auch quantitative Analyse des Glykoproteoms im Tränenfilm zwischen DES-Patienten und klinisch gesunden Kontrollprobanden erlauben. Die Resultate dieses Projekts sollen zur Identifizierung neuer Biomarker in Form von Glykoproteinen dienen, welche zukünftig die Diagnostik bzw. Subklassifizierung des DES ermöglichen und möglicherweise neue, innovative Therapieansätze zur Behandlung des DES liefern.

Das Glaukom ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung des Auges und ist vor allem durch den Verlust der retinalen Ganglienzellen (RGZ) charakterisiert. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde der potenzielle neuroprotektive Effekt des synthetischen Antikörper-Peptids (SCTGTSSDVGGYNYVSWYQ) auf die Viabilität der RGZ in einem *in vitro* Glaukommodell untersucht. Unter Verwendung spezifischer immunohistologischer Färbungen konnten konzentrationsabhängige signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) hinsichtlich der Viabilität der RGZ zwischen Peptid-behandelten (BEH) als auch unbehandelten (KTRL) retinalen Explantaten nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit 50 μg des synthetischen Antikörper-Peptids lieferte hierbei eine robustere statistische Signifikanz ($p < 0,01$) bezüglich des neuroprotektiven Effekts im Vergleich zu einer Behandlung mit 25 μg des Antikörper-Peptids ($p < 0,05$). Im Anschluss wurde eine quantitative proteomische Analyse der retinalen Explantate \pm Behandlung (50 μg Antikörper-Peptid, $n=3$ pro Gruppe) durchgeführt, um den

molekularen Mechanismus der Neuroprotektion auf RGZ aufzuklären. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden insgesamt 974 Proteine in beiden experimentellen Gruppen (BEH und KTRL) identifiziert, von denen 17 Proteine signifikant ($p < 0,05$, ↑: 10 Proteine ↓: 7 Proteine in BEH) verändert vorlagen. Interessanterweise wurden in den Peptid-behandelten Explantaten vermehrt Protein-Marker exprimiert, welche eine entscheidende Rolle im zellulären Energiemetabolismus (z.B. PDHA1) spielen sowie an der Regulation der neuronalen Morphologie (z.B. CDC42) beteiligt waren. Demgegenüber wurden Proteine, welche mit neuronaler Schädigung assoziiert waren (z.B. NEFL), erniedrigt in den Peptid-behandelten Explantaten nachgewiesen im Vergleich zu KTRL. Im Rahmen dieser vorliegenden Doktorarbeit konnte der neuroprotektive Effekt des synthetischen Glaukom-assoziierten Antikörper-Peptids sowie dessen molekulare Wirkungsweise umfangreich beschrieben werden. Diese Resultate verdeutlichen das bedeutsame therapeutische Potenzial dieser Antikörper-Peptide bei der Behandlung des Glaukoms und können möglicherweise als Grundlage für eine synergistische Immuntherapie in der Zukunft dienen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo C-K et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf* 2017; 15(3):276–83.
2. Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F et al. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul Surf* 2017; 15(3):334–65.
3. Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int* 2015; 112(5):71-81; quiz 82.
4. Bron AJ, Tomlinson A, Foulks GN, Pepose JS, Baudouin C, Geerling G et al. Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications. *Ocul Surf* 2014; 12(2 Suppl):S1-31.
5. Perumal N, Funke S, Pfeiffer N, Grus FH. Proteomics analysis of human tears from aqueous-deficient and evaporative dry eye patients. *Sci Rep* 2016; 6:29629.
6. Bron AJ, Paiva CS de, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf* 2017; 15(3):438–510.
7. Lemp MA, Crews LA, Bron AJ, Foulks GN, Sullivan BD. Distribution of aqueous-deficient and evaporative dry eye in a clinic-based patient cohort: a retrospective study. *Cornea* 2012; 31(5):472–8.
8. Milner MS, Beckman KA, Luchs JI, Allen QB, Awdeh RM, Berdahl J et al. Dysfunctional tear syndrome: dry eye disease and associated tear film disorders - new strategies for diagnosis and treatment. *Current Opinion in Ophthalmology* 2017; 27 Suppl 1(SUPPLEMENT 1):3–47.
9. Clayton JA. Dry Eye. *N Engl J Med* 2018; 378(23):2212–23.
10. Biousse V, Skibell BC, Watts RL, Loupe DN, Drews-Botsch C, Newman NJ. Ophthalmologic features of Parkinson's disease. *Neurology* 2004; 62(2):177–80.
11. Quinto GG, Camacho W, Behrens A. Postrefractive surgery dry eye. *Current Opinion in Ophthalmology* 2008; 19(4):335–41.
12. Toda I, Asano-Kato N, Komai-Hori Y, Tsubota K. Dry eye after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2001; 132(1):1–7.
13. Bron AJ, Tiffany JM. The Contribution of Meibomian Disease to Dry Eye. *Ocul Surf* 2004; 2(2):149–64.
14. Pisella PJ, Pouliquen P, Baudouin C. Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br J Ophthalmol* 2002; 86(4):418–23.
15. Ousler GW, Rodriguez JD, Smith LM, Lane KJ, Heckley C, Angjeli E et al. Optimizing Reading Tests for Dry Eye Disease. *Cornea* 2015; 34(8):917–21.
16. Deschamps N, Ricaud X, Rabut G, Labbé A, Baudouin C, Denoyer A. The impact of dry eye disease on visual performance while driving. *Am J Ophthalmol* 2013; 156(1):184-189.e3.
17. Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, Djalilian A, Dogru M, Dumbleton K et al. TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *Ocul Surf* 2017; 15(3):539–74.
18. Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX et al. TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul Surf* 2017; 15(3):575–628.
19. Sachsenweger M. *Augenheilkunde* 2003.
20. Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. The repeatability of clinical measurements of dry eye. *Cornea* 2004; 23(3):272–85.

21. Villatoro AJ, Fernández V, Claros S, Alcoholado C, Cifuentes M, Merayo-Llodes J et al. Regenerative Therapies in Dry Eye Disease: From Growth Factors to Cell Therapy. *Int J Mol Sci* 2017; 18(11).
22. Yu F, Liu X, Zhong Y, Guo X, Li M, Mao Z et al. Sodium hyaluronate decreases ocular surface toxicity induced by benzalkonium chloride-preserved latanoprost: an in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(5):3385–93.
23. 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):1593–601.
24. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Experimental Eye Research* 2004; 78(3):409–16.
25. Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Survey of Ophthalmology* 2001; 45 Suppl 2:S203-10.
26. Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf* 2017; 15(3):366–403.
27. Obata H. Anatomy and histopathology of the human lacrimal gland. *Cornea* 2006; 25(10 Suppl 1):S82-9.
28. King-Smith PE, Hinel EA, Nichols JJ. Application of a novel interferometric method to investigate the relation between lipid layer thickness and tear film thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(5):2418–23.
29. McCulley JP, Shine WE. The lipid layer of tears: dependent on meibomian gland function. *Experimental Eye Research* 2004; 78(3):361–5.
30. Moore JE, Vasey GT, Dartt DA, McGilligan VE, Atkinson SD, Grills C et al. Effect of tear hyperosmolarity and signs of clinical ocular surface pathology upon conjunctival goblet cell function in the human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(9):6174–80.
31. Semba RD, Enghild JJ, Venkatraman V, Dyrland TF, van Eyk JE. The Human Eye Proteome Project: perspectives on an emerging proteome. *Proteomics* 2013; 13(16):2500–11.
32. Baier G, Wollensak G, Mur E, Redl B, Stöffler G, Göttinger W. Analysis of human tear proteins by different high-performance liquid chromatographic techniques. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1990; 525:319–28.
33. Pflugfelder S, Bauerman R, Stern ME. *Dry Eye and Ocular Surface Disorders* 2004.
34. Azzarolo AM, Brew K, Kota S, Ponomareva O, Schwartz J, Zylberberg C. Presence of tear lipocalin and other major proteins in lacrimal fluid of rabbits. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004; 138(2):111–7.
35. Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, Zhang L, Nichols JJ. Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis* 2008; 14:456–70.
36. D'Souza S, Tong L. Practical issues concerning tear protein assays in dry eye. *Eye Vis (Lond)* 2014; 1:6.
37. Grus FH, Podust VN, Bruns K, Lackner K, Fu S, Dalmaso EA et al. SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(3):863–76.

38. Zhao H, Jumblatt JE, Wood TO, Jumblatt MM. Quantification of MUC5AC protein in human tears. *Cornea* 2001; 20(8):873–7.
39. Zhang J, Yan X, Li H. Analysis of the correlations of mucins, inflammatory markers, and clinical tests in dry eye. *Cornea* 2013; 32(7):928–32.
40. 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):3370–81.
41. Sack RA, Tan KO, Tan A. Diurnal tear cycle: evidence for a nocturnal inflammatory constitutive tear fluid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33(3):626–40.
42. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 2002; 12(4):43R–56R.
43. Furukawa K, Kobata A. Protein glycosylation. In: *Definitions*. Qeios; 2018. p. 554–9.
44. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006; 126(5):855–67.
45. Nagae M, Yamaguchi Y. Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int J Mol Sci* 2012; 13(7):8398–429.
46. Apweiler R. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1999; 1473(1):4–8.
47. Ongay S, Boichenko A, Govorukhina N, Bischoff R. Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *J Sep Sci* 2012; 35(18):2341–72.
48. Kohler JJ, Patrie SM. *Mass Spectrometry of Glycoproteins*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. (vol 951).
49. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
50. Palmisano G, Melo-Braga MN, Engholm-Keller K, Parker BL, Larsen MR. Chemical deamidation: a common pitfall in large-scale N-linked glycoproteomic mass spectrometry-based analyses. *J Proteome Res* 2012; 11(3):1949–57.
51. An HJ, Kronewitter SR, Leoz MLA de, Lebrilla CB. Glycomics and disease markers. *Curr Opin Chem Biol* 2009; 13(5-6):601–7.
52. Wilkinson H, Saldova R. Current Methods for the Characterization of O-Glycans. *J Proteome Res* 2020; 19(10):3890–905.
53. Oh MJ, Lee SH, Kim U, An HJ. In-depth investigation of altered glycosylation in human haptoglobin associated cancer by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2021.
54. Karnati R, Talla V, Peterson K, Laurie GW. Lacritin and other autophagy associated proteins in ocular surface health. *Experimental Eye Research* 2016; 144:4–13.
55. McCaa CS. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. *Environ Health Perspect* 1982; 44:1–8.
56. Litzinger TC, Del Rio-Tsonis K. *Eye Anatomy*. In: eLS. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
57. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative

- and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(8):3860–8.
58. Badea TC, Cahill H, Ecker J, Hattar S, Nathans J. Distinct roles of transcription factors *brn3a* and *brn3b* in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron* 2009; 61(6):852–64.
59. Curcio CA, Allen KA. Topography of ganglion cells in human retina. *J Comp Neurol* 1990; 300(1):5–25.
60. Schmelter C, Fomo KN, Perumal N, Manicam C, Bell K, Pfeiffer N et al. Synthetic Polyclonal-Derived CDR Peptides as an Innovative Strategy in Glaucoma Therapy. *J Clin Med* 2019; 8(8).
61. Bell K, Wilding C, Funke S, Perumal N, Beck S, Wolters D et al. Neuroprotective effects of antibodies on retinal ganglion cells in an adolescent retina organ culture. *J Neurochem* 2016; 139(2):256–69.
62. La Morgia C, Di Vito L, Carelli V, Carbonelli M. Patterns of Retinal Ganglion Cell Damage in Neurodegenerative Disorders: Parvocellular vs Magnocellular Degeneration in Optical Coherence Tomography Studies. *Front Neurol* 2017; 8:710.
63. Lin W, Kuang H. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells. *Autophagy* 2014; 10(10):1692–701.
64. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA* 2014; 311(18):1901–11.
65. Quigley HA. Glaucoma. *The Lancet* 2011; 377(9774):1367–77.
66. Allison K, Patel D, Alabi O. Epidemiology of Glaucoma: The Past, Present, and Predictions for the Future. *Cureus* 2020; 12(11):e11686.
67. Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol* 1981; 99(4):635–49.
68. Fechtner RD, Weinreb RN. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Survey of Ophthalmology* 1994; 39(1):23–42.
69. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF et al. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(11):3460–6.
70. Nongpiur ME, Ku JYF, Aung T. Angle closure glaucoma: a mechanistic review. *Current Opinion in Ophthalmology* 2011; 22(2):96–101.
71. Patel K, Patel S. Angle-closure glaucoma. *Dis Mon* 2014; 60(6):254–62.
72. Gutteridge IF. Normal tension glaucoma: diagnostic features and comparisons with primary open angle glaucoma. *Clin Exp Optom* 2000; 83(3):161–72.
73. Killer HE, Pircher A. Normal tension glaucoma: review of current understanding and mechanisms of the pathogenesis. *Eye (Lond)* 2018; 32(5):924–30.
74. Neustaeter A, Vehof J, Snieder H, Jansonius NM. Glaucoma in large-scale population-based epidemiology: a questionnaire-based proxy. *Eye (Lond)* 2021; 35(2):508–16.
75. Leske MC, Wu S-Y, Hennis A, Honkanen R, Nemesure B. Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology* 2008; 115(1):85–93.

76. Amerasinghe N, Zhang J, Thalamuthu A, He M, Vithana EN, Viswanathan A et al. The heritability and sibling risk of angle closure in Asians. *Ophthalmology* 2011; 118(3):480–5.
77. Sharma P, Sample PA, Zangwill LM, Schuman JS. Diagnostic tools for glaucoma detection and management. *Survey of Ophthalmology* 2008; 53 Suppl1:S17-32.
78. Okafor KC, Brandt JD. Measuring intraocular pressure. *Current Opinion in Ophthalmology* 2015; 26(2):103–9.
79. ElMallah MK, Asrani SG. New ways to measure intraocular pressure. *Current Opinion in Ophthalmology* 2008; 19(2):122–6.
80. Sakata LM, Lavanya R, Friedman DS, Aung HT, Gao H, Kumar RS et al. Comparison of gonioscopy and anterior segment ocular coherence tomography in detecting angle closure in different quadrants of the anterior chamber angle. *Ophthalmology* 2008; 115(5):769–74.
81. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(6):701-13; discussion 829-30.
82. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(10):1268–79.
83. Conlon R, Saheb H, Ahmed IIK. Glaucoma treatment trends: a review. *Can J Ophthalmol* 2017; 52(1):114–24.
84. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S41-52.
85. Schmelter C, Perumal N, Funke S, Bell K, Pfeiffer N, Grus FH. Peptides of the variable IgG domain as potential biomarker candidates in primary open-angle glaucoma (POAG). *Hum Mol Genet* 2017; 26(22):4451–64.
86. Houen G. Peptide Antibodies. New York, NY: Springer New York; 2015. (vol 1348).
87. Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
88. Xu JL, Davis MM. Diversity in the CDR3 Region of VH Is Sufficient for Most Antibody Specificities. *Immunity* 2000; 13(1):37–45.
89. Nagele EP, Han M, Acharya NK, DeMarshall C, Kosciuk MC, Nagele RG. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One* 2013; 8(4):e60726.
90. Shoenfeld Y, Toubi E. Protective autoantibodies: role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential. *Arthritis Rheum* 2005; 52(9):2599–606.
91. Vargas ME, Watanabe J, Singh SJ, Robinson WH, Barres BA. Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(26):11993–8.
92. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology* 2000; 37(18):1141–9.
93. Rojas M, Restrepo-Jiménez P, Monsalve DM, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Ramírez-Santana C et al. Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun* 2018; 95:100–23.

94. Gramlich OW, Bell K, Thun Und Hohenstein-Blaul N von, Wilding C, Beck S, Pfeiffer N et al. Autoimmune biomarkers in glaucoma patients. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13(1):90–7.
95. Grus FH, Joachim SC, Hoffmann EM, Pfeiffer N. Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma. *Mol Vis* 2004; 10:132–7.
96. Bell K, Gramlich OW, Thun Und Hohenstein-Blaul N von, Beck S, Funke S, Wilding C et al. Does autoimmunity play a part in the pathogenesis of glaucoma? *Prog Retin Eye Res* 2013; 36:199–216.
97. Joachim SC, Pfeiffer N, Grus FH. Autoantibodies in patients with glaucoma: a comparison of IgG serum antibodies against retinal, optic nerve, and optic nerve head antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243(8):817–23.
98. Joachim SC, Reichelt J, Berneiser S, Pfeiffer N, Grus FH. Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246(4):573–80.
99. Grus FH, Joachim SC, Bruns K, Lackner KJ, Pfeiffer N, Wax MB. Serum Autoantibodies to α -Fodrin Are Present in Glaucoma Patients from Germany and the United States. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006; 47(3):968.
100. Tezel G. Serum Autoantibodies to Optic Nerve Head Glycosaminoglycans in Patients With Glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1999; 117(7):917.
101. Yang J, Tezel G, Patil RV, Romano C, Wax MB. Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(6):1273–6.
102. Joachim SC, Wax MB, Seidel P, Pfeiffer N, Grus FH. Enhanced characterization of serum autoantibody reactivity following HSP 60 immunization in a rat model of experimental autoimmune glaucoma. *Curr Eye Res* 2010; 35(10):900–8.
103. Joachim SC, Grus FH, Kraft D, White-Farrar K, Barnes G, Barbeck M et al. Complex antibody profile changes in an experimental autoimmune glaucoma animal model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(10):4734–42.
104. Joachim SC, Wax MB, Boehm N, Dirk DR, Pfeiffer N, Grus FH. Upregulation of antibody response to heat shock proteins and tissue antigens in an ocular ischemia model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(6):3468–74.
105. Joachim SC, Bruns K, Lackner KJ, Pfeiffer N, Grus FH. Antibodies to alpha B-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal tension glaucoma and IgG antibody patterns against retinal antigen in aqueous humor. *Curr Eye Res* 2007; 32(6):501–9.
106. Tezel G, Wax MB. The Mechanisms of hsp27 Antibody-Mediated Apoptosis in Retinal Neuronal Cells. *J. Neurosci.* 2000; 20(10):3552–62.
107. Joachim SC, Gramlich OW, Laspas P, Schmid H, Beck S, Pein HD von et al. Retinal ganglion cell loss is accompanied by antibody depositions and increased levels of microglia after immunization with retinal antigens. *PLoS One* 2012; 7(7):e40616.
108. Wilding C, Bell K, Beck S, Funke S, Pfeiffer N, Grus FH. γ -Synuclein antibodies have neuroprotective potential on neuroretinal cells via proteins of the mitochondrial apoptosis pathway. *PLoS One* 2014; 9(3):e90737.

109. Teister J, Anders F, Beck S, Funke S, Pein H von, Prokosch V et al. Decelerated neurodegeneration after intravitreal injection of α -synuclein antibodies in a glaucoma animal model. *Sci Rep* 2017; 7(1).
110. Bell K, Wilding C, Funke S, Pfeiffer N, Grus FH. Protective effect of 14-3-3 antibodies on stressed neuroretinal cells via the mitochondrial apoptosis pathway. *BMC Ophthalmol* 2015; 15:64.
111. Thun Und Hohenstein-Blaul N von, Bell K, Pfeiffer N, Grus FH. Autoimmune aspects in glaucoma. *Eur J Pharmacol* 2016; 787:105–18.
112. Gabrielli E, Pericolini E, Cenci E, Ortelli F, Magliani W, Ciociola T et al. Antibody complementarity-determining regions (CDRs): a bridge between adaptive and innate immunity. *PLoS One* 2009; 4(12):e8187.
113. McGregor DP. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8(5):616–9.
114. Loffet A. Peptides as drugs: is there a market? *J Pept Sci* 2002; 8(1):1–7.
115. Dobroff AS, Rodrigues EG, Juliano MA, Friaça DM, Nakayasu ES, Almeida IC et al. Differential Antitumor Effects of IgG and IgM Monoclonal Antibodies and Their Synthetic Complementarity-Determining Regions Directed to New Targets of B16F10-Nex2 Melanoma Cells. *Transl Oncol* 2010; 3(4):204–17.
116. Figueiredo CR, Matsuo AL, Massaoka MH, Polonelli L, Travassos LR. Anti-tumor activities of peptides corresponding to conserved complementary determining regions from different immunoglobulins. *Peptides* 2014; 59:14–9.
117. Polonelli L, Pontón J, Elguezabal N, Moragues MD, Casoli C, Pilotti E et al. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS One* 2008; 3(6):e2371.
118. Cornelis FM, Monteagudo S, Hollander W den, Guns LA, Storms L, Peeters T et al. ANP32A regulates ATM expression and prevents oxidative stress in cartilage, brain and bone. *Osteoarthritis and Cartilage* 2018; 26:S21.
119. Schneider R, Bannister AJ, Weise C, Kouzarides T. Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *J Biol Chem* 2004; 279(23):23859–62.
120. Yang X, Lu B, Sun X, Han C, Fu C, Xu K et al. ANP32A regulates histone H3 acetylation and promotes leukemogenesis. *Leukemia* 2018; 32(7):1587–97.
121. Chai G-S, Feng Q, Wang Z-H, Hu Y, Sun D-S, Li X-G et al. Downregulating ANP32A rescues synapse and memory loss via chromatin remodeling in Alzheimer model. *Mol Neurodegener* 2017; 12(1):34.
122. Freeze HH. Lectin affinity chromatography. *Curr Protoc Protein Sci* 2001; Chapter 9:Unit 9.1.
123. Zhou L, Beuerman RW, Chan CM, Zhao SZ, Li XR, Yang H et al. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *J Proteome Res* 2009; 8(11):4889–905.
124. Rudman N, Gornik O, Lauc G. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Letters* 2019; 593(13):1598–615.
125. 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):2385–92.

126. Hagan S, Martin E, Enríquez-de-Salamanca A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J* 2016; 7:15.
127. Savini G, Prabhawasat P, Kojima T, Grueterich M, Espana E, Goto E. The challenge of dry eye diagnosis. *Clin Ophthalmol* 2008; 2(1):31–55.
128. Nguyen-Khuong T, Everest-Dass AV, Kautto L, Zhao Z, Willcox MDP, Packer NH. Glycomic characterization of basal tears and changes with diabetes and diabetic retinopathy. *Glycobiology* 2015; 25(3):269–83.
129. Yang Z, Hancock WS. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *Journal of Chromatography A* 2004; 1053(1-2):79–88.
130. Geyer H, Geyer R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764(12):1853–69.
131. Dai Z, Zhou J, Qiu S-J, Liu Y-K, Fan J. Lectin-based glycoproteomics to explore and analyze hepatocellular carcinoma-related glycoprotein markers. *Electrophoresis* 2009; 30(17):2957–66.
132. Jung K, Cho W, Regnier FE. Glycoproteomics of plasma based on narrow selectivity lectin affinity chromatography. *J Proteome Res* 2009; 8(2):643–50.
133. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001; 291(5512):2364–9.
134. Lei Z, Beuerman RW, Chew AP, Koh SK, Cafaro TA, Urrets-Zavalía EA et al. Quantitative analysis of N-linked glycoproteins in tear fluid of climatic droplet keratopathy by glycopeptide capture and iTRAQ. *J Proteome Res* 2009; 8(4):1992–2003.
135. Fujihara T, Nagano T, Nakamura M, Shirasawa E. Lactoferrin suppresses loss of corneal epithelial integrity in a rabbit short-term dry eye model. *J Ocul Pharmacol Ther* 1998; 14(2):99–107.
136. Srinivasan S, Thangavelu M, Zhang L, Green KB, Nichols KK. iTRAQ quantitative proteomics in the analysis of tears in dry eye patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(8):5052–9.
137. Ohashi Y, Ishida R, Kojima T, Goto E, Matsumoto Y, Watanabe K et al. Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 2003; 136(2):291–9.
138. Kawashima M, Kawakita T, Inaba T, Okada N, Ito M, Shimmura S et al. Dietary lactoferrin alleviates age-related lacrimal gland dysfunction in mice. *PLoS One* 2012; 7(3):e33148.
139. Kautto L, Nguyen-Khuong T, Everest-Dass A, Leong A, Zhao Z, Willcox MDP et al. Glycan involvement in the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to tears. *Experimental Eye Research* 2016; 145:278–88.
140. Raskova Kafkova L, Brokesova D, Krupka M, Stehlikova Z, Dvorak J, Coufal S et al. Secretory IgA N-glycans contribute to the protection against *E. coli* O55 infection of germ-free piglets. *Mucosal Immunol* 2021; 14(2):511–22.
141. Novak J, Barratt J, Julian BA, Renfrow MB. Aberrant Glycosylation of the IgA1 Molecule in IgA Nephropathy. *Semin Nephrol* 2018; 38(5):461–76.
142. Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 2005; 206:83–99.

143. Matsumoto N, Asano M, Ogura Y, Takenouchi-Ohkubo N, Chihaya H, Chung-Hsing W et al. Release of non-glycosylated polymeric immunoglobulin receptor protein. *Scand J Immunol* 2003; 58(4):471–6.
144. Giugliano LG, Ribeiro ST, Vainstein MH, Ulhoa CJ. Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1995; 42(1):3–9.
145. Willcox MDP, Lan J. Secretory immunoglobulin A in tears: functions and changes during contact lens wear. *Clin Exp Optom* 1999; 82(1):1–3.
146. McKown RL, Wang N, Raab RW, Karnati R, Zhang Y, Williams PB et al. Lacritin and other new proteins of the lacrimal functional unit. *Experimental Eye Research* 2009; 88(5):848–58.
147. Samudre S, Lattanzio FA, Lossen V, Hosseini A, Sheppard JD, McKown RL et al. Lacritin, a novel human tear glycoprotein, promotes sustained basal tearing and is well tolerated. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(9):6265–70.
148. Vijmasi T, Chen FYT, Balasubbu S, Gallup M, McKown RL, Laurie GW et al. Topical administration of lacritin is a novel therapy for aqueous-deficient dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(8):5401–9.
149. Wang N, Zimmerman K, Raab RW, McKown RL, Hutnik CML, Talla V et al. Lacritin rescues stressed epithelia via rapid forkhead box O3 (FOXO3)-associated autophagy that restores metabolism. *J Biol Chem* 2013; 288(25):18146–61.
150. Liu Z, Chen D, Chen X, Bian F, Gao N, Li J et al. Autophagy Activation Protects Ocular Surface from Inflammation in a Dry Eye Model In Vitro. *Int J Mol Sci* 2020; 21(23).
151. Ruiz-Ederra J, García M, Hernández M, Urcola H, Hernández-Barbáchano E, Araiz J et al. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Experimental Eye Research* 2005; 81(5):561–9.
152. García M, Ruiz-Ederra J, Hernández-Barbáchano H, Vecino E. Topography of pig retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 2005; 486(4):361–72.
153. Olsen TW, Sanderson S, Feng X, Hubbard WC. Porcine sclera: thickness and surface area. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(8):2529–32.
154. Palm-Apergi C, Lönn P, Dowdy SF. Do cell-penetrating peptides actually "penetrate" cellular membranes? *Mol Ther* 2012; 20(4):695–7.
155. Kosuge M, Takeuchi T, Nakase I, Jones AT, Futaki S. Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug Chem* 2008; 19(3):656–64.
156. Lieberman J. Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev* 2010; 235(1):93–104.
157. Heynen SR, Meneau I, Caprara C, Samardzija M, Imsand C, Levine EM et al. CDC42 is required for tissue lamination and cell survival in the mouse retina. *PLoS One* 2013; 8(1):e53806.
158. Schürmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC et al. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20(2):453–61.

159. Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1 and CDC42Hsregulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 1995; 81(7):1159–70.
160. Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 1995; 269(5228):1270–2.
161. Stankiewicz TR, Linseman DA. Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2014; 8:314.
162. Chen T-J, Gehler S, Shaw AE, Bamberg JR, Letourneau PC. Cdc42 participates in the regulation of ADF/cofilin and retinal growth cone filopodia by brain derived neurotrophic factor. *J Neurobiol* 2006; 66(2):103–14.
163. Fan W-J, Li X, Yao H-L, Deng J-X, Liu H-L, Cui Z-J et al. Neural differentiation and synaptogenesis in retinal development. *Neural Regen Res* 2016; 11(2):312–8.
164. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(14):2577–604.
165. Parnetti L, Gaiti A, Polidori MC, Brunetti M, Palumbo B, Chionne F et al. Increased cerebrospinal fluid pyruvate levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 1995; 199(3):231–3.
166. Harder JM, Guymier C, Wood JPM, Daskalaki E, Chidlow G, Zhang C et al. Disturbed glucose and pyruvate metabolism in glaucoma with neuroprotection by pyruvate or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117(52):33619–27.
167. Zilberter Y, Gubkina O, Ivanov AI. A unique array of neuroprotective effects of pyruvate in neuropathology. *Front Neurosci* 2015; 9:17.
168. Sato K, Mochida S, Tomimoto D, Konuma T, Kiyota N, Tsuda S et al. A pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor prevents retinal cell death and improves energy metabolism in rat retinas after ischemia/reperfusion injury. *Experimental Eye Research* 2020; 193:107997.
169. Al Hussein Al Awamih S, Wareham LK, Risner ML, Calkins DJ. Insulin Signaling as a Therapeutic Target in Glaucomatous Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2021; 22(9).
170. Zakharova IO, Sokolova TV, Bayunova LV, Zorina II, Rychkova MP, Shpakov AO et al. The Protective Effect of Insulin on Rat Cortical Neurons in Oxidative Stress and Its Dependence on the Modulation of Akt, GSK-3beta, ERK1/2, and AMPK Activities. *Int J Mol Sci* 2019; 20(15).
171. Jeong JY, Jeoung NH, Park K-G, Lee I-K. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes Metab J* 2012; 36(5):328–35.
172. Abbasi M, Gupta VK, Chitranshi N, Gupta VB, Mirzaei M, Dheer Y et al. Caveolin-1 Ablation Imparts Partial Protection Against Inner Retinal Injury in Experimental Glaucoma and Reduces Apoptotic Activation. *Mol Neurobiol* 2020; 57(9):3759–84.
173. Klaassen I, Hughes JM, Vogels IMC, Schalkwijk CG, van Noorden CJF, Schlingemann RO. Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Experimental Eye Research* 2009; 89(1):4–15.
174. Berta AI, Boesze-Battaglia K, Magyar A, Szél A, Kiss AL. Localization of caveolin-1 and c-src in mature and differentiating photoreceptors: raft proteins co-distribute with rhodopsin during development. *J Mol Histol* 2011; 42(6):523–33.
175. Berta AI, Kiss AL, Kemeny-Beke A, Lukats A, Szabó A, Szél A. Different caveolin isoforms in the retina of melanoma malignum affected human eye. *Mol Vis* 2007; 13:881–6.

176. Cellerino A, Kohler K. Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina. *J Comp Neurol* 1997; 386(1):149–60.
177. Gupta VK, You Y, Klistorner A, Graham SL. Shp-2 regulates the TrkB receptor activity in the retinal ganglion cells under glaucomatous stress. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(11):1643–9.
178. Loeffler T, Schilcher I, Flunkert S, Hutter-Paier B. Neurofilament-Light Chain as Biomarker of Neurodegenerative and Rare Diseases With High Translational Value. *Front Neurosci* 2020; 14:579.
179. Ackerley S, Grierson AJ, Brownlees J, Thornhill P, Anderton BH, Leigh PN et al. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J Cell Biol* 2000; 150(1):165–76.
180. Didonna A, Opal P. The role of neurofilament aggregation in neurodegeneration: lessons from rare inherited neurological disorders. *Mol Neurodegener* 2019; 14(1):19.
181. Shea TB, Yabe JT, Ortiz D, Pimenta A, Loomis P, Goldman RD et al. Cdk5 regulates axonal transport and phosphorylation of neurofilaments in cultured neurons. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 6):933–41.
182. Ackerley S, Thornhill P, Grierson AJ, Brownlees J, Anderton BH, Leigh PN et al. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *J Cell Biol* 2003; 161(3):489–95.
183. Dang Do AN, Sinaii N, Masvekar RR, Baker EH, Thurm AE, Soldatos AG et al. Neurofilament light chain levels correlate with clinical measures in CLN3 disease. *Genet Med* 2021; 23(4):751–7.
184. Gallego BI, Salazar JJ, Hoz R de, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation* 2012; 9:92.

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater bedanken, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation in der Experimentellen Ophthalmologie zu schreiben. Meine Promotion ermöglichte es mir einen Einblick in die wissenschaftliche Forschung zu erlangen und meinen Horizont dahingehend zu erweitern.

Ein besonderer Dank gilt meinem Postdoktorand für die hervorragende Anleitung der Laborarbeiten und für das stets offene Ohr, das er mir entgegenbrachte. Ich möchte ihm für seine Geduld, Hilfsbereitschaft und motivierenden Worte danken. Auch möchte ich ihm für die Korrekturen und Anregungen bei der Durchsicht dieser Arbeit danken.

Ich möchte mich außerdem beim gesamten Team der Experimentellen Ophthalmologie bedanken. Ich habe mich ab dem ersten Tag in der Gruppe aufgenommen gefühlt.

Ein weiterer Dank gilt meiner Schulfreundin, die mir als Biologin mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie fand während der gesamten Promotion immer die richtigen Worte, um mich aufzubauen.

Besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie, die bereits die Höhen und Tiefen des Zahnmedizinstudiums mit mir erlebt haben. Ich möchte meinen Eltern danken, dass sie mir ein weiteres arbeitsfreies Jahr ermöglicht haben, um meine Dissertation anzufertigen. Ich konnte mich immer auf die Unterstützung meiner Familie verlassen.

Gewidmet ist diese Arbeit meinem Onkel. Auch wenn er nicht mehr bei uns sein kann, ist er es dennoch. Er hat mich nicht nur in zahnmedizinischer Hinsicht, sondern vor allem auch als Mensch besonders mitgeprägt.

9 TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Alina Brück

geboren am 27.03.1996 in Gerolstein



Studium

seit 2021

Promotion an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

2015 bis 2020

Studium der Zahnmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Abschlussnote „sehr gut“

Prüfungen

Juli bis November 2020

Zahnärztliche Prüfung

Februar / März 2018

Zahnärztliche Vorprüfung

September / Oktober 2016

Naturwissenschaftliche Vorprüfung

Schulische Ausbildung

März 2015

Allgemeine Hochschulreife, Abschlussnote 1,5

2006 bis 2015

St. Matthias Gymnasium Gerolstein

2002 bis 2006

Grundschule Birresborn