

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

Longitudinale Analyse von Antikörpern im Kammerwasser
von Glaukomapatienten durch Microarray

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

Vorgelegt von

Jill Jacqueline Brögmann
aus Moers

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
2	Abbildungsverzeichnis.....	VI
3	Tabellenverzeichnis.....	VI
1	Einleitung.....	1
2	Literaturdiskussion.....	3
2.1	Das Auge.....	3
2.2	Das Glaukom.....	5
2.2.1	Definition	5
2.2.2	Pathogenese und Risikofaktoren	5
2.2.3	Glaukomformen und Einteilung.....	6
2.2.3.1	primäre Glaukome	8
2.2.3.2	sekundäre Glaukome.....	9
2.2.4	Diagnose.....	11
2.2.4.1	Tonometrie.....	11
2.2.4.2	Gonioskopie.....	12
2.2.4.3	Ophthalmoskopie	12
2.2.4.4	Gesichtsfelduntersuchung (Perimetrie).....	12
2.2.5	Therapie	16
2.2.5.1	Medikamentöse Therapie	16
2.2.5.2	Operative Therapie	18
2.3	Das Kammerwasser	20
2.3.1	Funktion	20
2.3.2	Bildung und Zirkulation.....	20
2.3.3	Zusammensetzung und Bestandteile.....	21
2.4	Immunsystem.....	22
2.4.1	Allgemein	22

2.4.2	Komplementsystem im Rahmen der Glaukompathogenese	23
2.4.3	Antikörper Aufbau und Funktion.....	26
2.4.3.1	Antikörperklassen	27
2.4.4	Autoantikörper.....	29
2.4.5	Einfluss auf das Glaukom	30
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Material.....	33
3.2	Methode	34
3.2.1	Kammerwasserentnahme	34
3.2.2	Patientenauswahl.....	34
3.2.3	Versuchsdurchführung mit Protein-Microarray.....	35
3.2.4	Statistische Auswertung.....	42
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Analyse der klinischen Daten	45
4.1.1	Patientenkollektiv	45
4.1.2	Korrelation der klinischen Daten und der Microarraydaten	48
4.2	Analyse der Progression des Gesichtsfelddefekts vor der Operation	52
4.2.1	Patientenkollektiv	52
4.2.2	Korrelation der Progression des MD Wertes vor der Operation und der Microarraydaten.....	52
4.3	Analyse der Probenentnahmen von mindestens zwei Operationen an einem Patienten.....	58
4.3.1	Patientenkollektiv	58
4.3.2	Korrelationsanalyse Antikörperlevel und der Zeit.....	59
5	Diskussion	61
5.1	Korrelation der Antikörperlevel mit den klinischen Daten.....	62
5.2	Korrelation der longitudinalen Proben und des Antikörperlevels.....	67
5.3	Bedeutung und Entstehung der Antikörper beim Glaukom	74
5.4	Ausschluss von Fehlern und limitierenden Faktoren.....	75

5.5	Fazit und Ausblick	79
6	Zusammenfassung	81
7	Literaturverzeichnis	82
8	Anhang	89

1 Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
α	Alpha
μ	My
ε	Epsilon
δ	Delta
κ	Kappa
λ	Lambda
γ	Gamma
ADP	Adenosindiphosphat
ADRB2	Beta 2 Adenozeptor
AG	Antigen
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
ca.	circa
CALD1	Caldesmon
CALR	Calreticuli
CCD	Charge coupled device
CLU	Clusterin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GF	Gesichtsfeld
HFA	Humphrey Field Analyzer
HSPD1	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IOD	Intraokulardruck/Augeninnendruck
kDA	Kilodalton
KW	Kammerwasser

LV	Loos Variance
M	Mol
MAP Kinase	mitogen activated protein kinase
MD	Mittlerer Defekt
mg%	Milligramm Prozent
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NTG	Normaldruckglaukom
pl	Pikoliter
PEX	Pseudoexfoliationsglaukom
POAG	Primäres Offenwinkelglaukom
PSD	Pattern Standard Deviation
SNCG	Gamma-Synuklein
TIFF	tagged image file format
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
YAG	Yttrium Aluminium Granat Laser
z.B.	zum Beispiel

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Das Auge im Sagitalschnitt mit Beschriftung	3
Abbildung 2 Risikofaktoren an einem Glaukom zu erkranken	6
Abbildung 3 Gesichtsfeldberg	13
Abbildung 4 medikamentöse Therapie	17
Abbildung 5 operative Therapie.....	19
Abbildung 6 Komplementsystem	24
Abbildung 7 Grundstruktur eines IgG Antikörpers	27
Abbildung 8 Slides mit gespotteten Proteinen	37
Abbildung 9 Schritte der Inkubation.....	40
Abbildung 10 Scan eines Slids	41
Abbildung 11 Patientenverteilung nach Geschlecht	46
Abbildung 12 Streudiagramm-Progression des MD Werts/Zeit.....	53
Abbildung 13 Streudiagramm-Progression der MD-Wert Progression/ NTF3 Intensität	55

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung der Glaukomformen	7
Tabelle 2 MD korrelierte Gruppeneinteilung der Gesichtsfelddefekte	15
Tabelle 3 schematische Anordnung aller Antigene auf einem Subarray	37
Tabelle 4 Stammdaten der Studiengruppe 1	46
Tabelle 5 Anzahl der erhobenen klinischen Daten	47
Tabelle 6 klinische Daten der POAG Patienten in Korrelation mit den Antikörpern ..	49
Tabelle 7 klinische Daten der NTG Patienten in Korrelation mit den Antikörpern	50
Tabelle 8 klinische Daten der PEX Patienten in Korrelation mit den Antikörpern.....	51
Tabelle 9 Stammdaten der Studiengruppe 2.....	52
Tabelle 10 Progressionsrate.....	54
Tabelle 11 Korrelation der Progression	56
Tabelle 12 Stammdaten der Studiengruppe 3	58
Tabelle 13 MD-Werte der Patienten, die zweimal an einem Auge operiert wurden ..	59
Tabelle 14 Korrelationsanalyse	60

1 Einleitung

Das Glaukom ist weltweit die häufigste Augenerkrankung, die unbehandelt zu einer Sehverschlechterung und weiter noch zur irreversiblen Erblindung führen kann. Die Pathogenese des Glaukoms ist bis zum heutigen Zeitpunkt immer noch nicht vollständig geklärt.

Der Überbegriff Glaukom fasst eine heterogene Gruppe von Augenerkrankungen zusammen, die sich alle durch eine fortschreitende Sehnervschädigung definieren. Diagnostisch führt dieser pathologische Prozess zu einem entsprechenden Papillenbefund und einem charakteristischen Gesichtsfeldausfall (Cordula Dahlmann, 2017). Eine frühzeitige Diagnose ist entscheidend, um einen Sehvermögensverlust zu verhindern. Da der Prozess der neurodegenerativen Erkrankung eher schleichend voranschreitet und die Patienten lange keine Verschlechterung des Sehvermögens feststellen, sollte ein einfacher Test für die Kliniker entwickelt werden, durch den die Erkrankung frühzeitig diagnostiziert werden kann.

Unter anderem an der Mainzer Uniklinik erhebt man die Hypothese, dass immunologische Prozesse eine große Bedeutung bei der Glaukomerkrankung zugeschrieben werden könnte (Bell, Funke, & Grus, 2019).

Demnach kann die Erkrankung Glaukom nicht mehr „nur“ als Augenerkrankung klassifiziert, sondern sollte außerdem als systemische Erkrankung eingestuft werden (Pache & Flammer, 2006).

Es ist bereits bekannt, dass eine endotheliale Dysfunktion als systemische Erkrankung auch auf das Glaukom zurückzuführen ist (Henry, Newby, Webb, Hadoke, & O'Brien, 2006; Resch, Garhofer, Fuchsjäger-Mayrl, Hommer, & Schmetterer, 2009).

Vor allem das Normaldruckglaukom wurde bereits in der Vergangenheit mit Erkrankungen wie Alzheimer oder Migräne in Verbindung gesetzt (Fan, Wang, Tang, & Liu, 2015).

Um eine systemische Erkrankung frühzeitig diagnostizieren zu können, soll in Zukunft ein serologischer Test zum Einsatz kommen, der zum Beispiel das Blutserum der Patienten auf zuvor festgelegte Autoantikörper untersucht. Um diese Autoantikörper genau und sicher benennen zu können, haben bereits einige Studien potenzielle Biomarker-Autoantikörper untersucht und festgestellt.

Die vorliegende Arbeit trägt zur Identifizierung weiterer Antikörper bei oder validiert bisherige Befunde einzelner Antikörper. Dazu wurde mittels Protein-Microarray-Verfahren eine Analyse des Kammerwassers, welches bei Operationen an der Uniklinik Mainz bereits am Glaukom erkrankten Patienten entnommen wurde, durchgeführt.

Insgesamt wurden drei statistische Analysen durchgeführt. Diese Analysen wurden als Überprüfung von bereits vorhandenen Kenntnissen aus vorhergehenden Studien herangezogen. Da die meisten dieser Studien auf Basis von Serumuntersuchungen stattfanden, soll diese Arbeit im Besonderen die Zusammenhänge des Antikörperlevels im Kammerwasser bei den Betrachtungen berücksichtigen.

In der ersten statistischen Studie wurde die Korrelation zwischen den klinischen Daten (Tensio, CD ratio und MD Wert) und dem Antikörperlevel untersucht. Diese Analyse wurde durchgeführt, da in einigen Studie bereits ein Zusammenhang zwischen dem Antikörperlevel unterschiedlicher Proteine im Serum und klinischen Daten erkennbar war (N. Auler, H. Tonner, N. Pfeiffer, & F. H. Grus, 2021).

In der zweiten statistischen Analyse wurde die Progression des MD Wertes vor der Operation gegen das Antikörperlevel korreliert. Diese wurde als zweite statistische Analyse herangezogen, um anhand der MD Werte eine mögliche Progression festzustellen und in Korrelation mit den Antikörpern setzen zu können. Der progressive Verlauf des MD Werts stellt in diesem Fall eine longitudinale Untersuchung dar.

Die dritte statistische Analyse korreliert das Antikörperlevel gegen die Zeit zwischen zwei Operationen. Mit dieser Analyse wurde der longitudinale Verlauf der Antikörperlevel untersucht, und stellt damit die Hauptanalyse der vorliegenden Arbeit dar. Damit soll eine Bestätigung der Erkenntnisse aus den beiden vorstehenden Analysen bezogen auf die zeitliche Komponente des Krankheitsverlaufs bei Glaukompatienten erreicht werden.

Bei allen drei Analysen fokussiert sich die Untersuchung auf die Kammerwasseranalyse der drei am häufigsten vorkommenden Glaukomformen. Nach derzeitiger Studienlage handelt es sich dabei um das primäre Offenwinkelglaukom, das Normaldruckglaukom und das Pseudoexfoliationsglaukom.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Auge

Das Auge ist eins der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen. Durch das Auge nimmt der Mensch nicht nur Farbe und Formen wahr, sondern auch Abstände, Bewegungen und Geschwindigkeiten lassen sich mit dem Auge erfassen. Es ist ein nahezu kreisrunder Körper (siehe Abbildung 1), der geschützt in der Augenhöhle (Orbita) des menschlichen Schädels liegt.

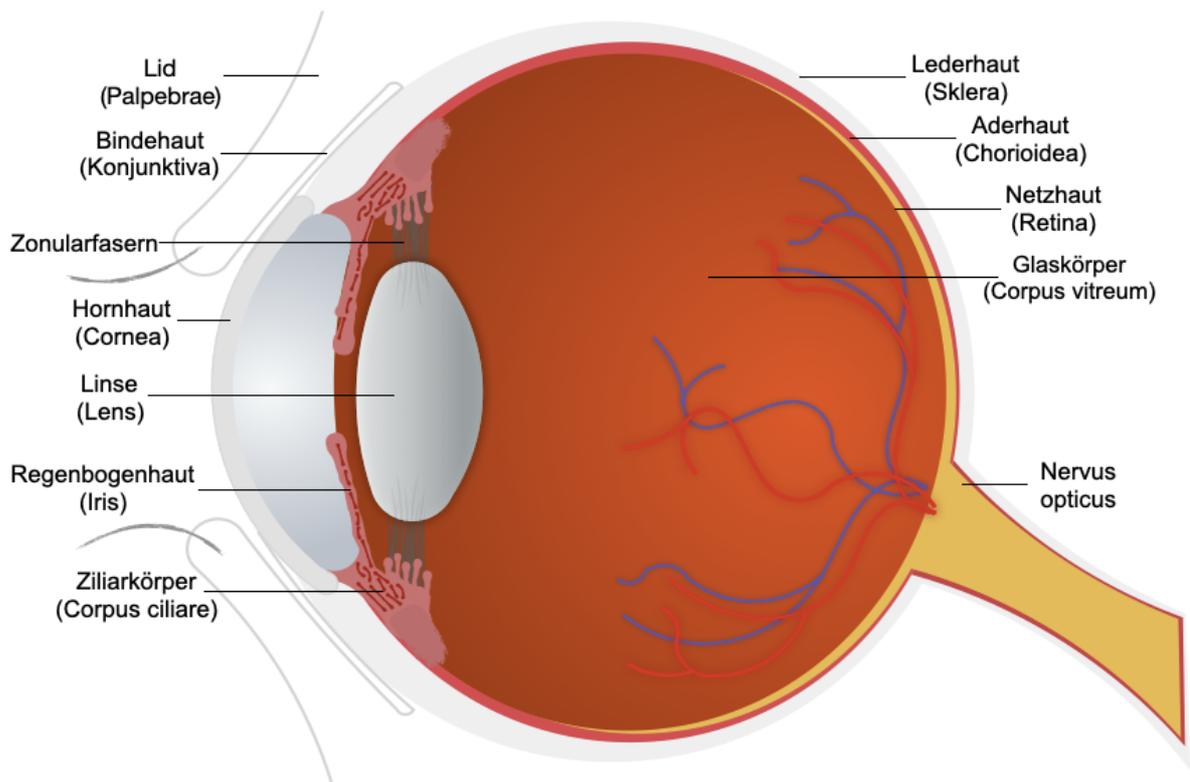


Abbildung 1 Das Auge im Sagittalschnitt mit Beschriftung

(Grafik Jill Brögmann)

Die Lider (Palpebrae) dienen dem Schutz vor mechanischer Einwirkung und befeuchten das Auge. Dabei wird die Tränenflüssigkeit, die in dem Raum zwischen Augapfel und Lid sezerniert wird, über die Hornhaut (Cornea) des Auges gelegt. Dies ist notwendig, da die Hornhaut avaskulär ist und deshalb notwendige Nährstoffe aus der Tränenflüssigkeit ziehen muss.

Von Innen sind die Lider mit der sogenannten Bindehaut (Konjunktiva) überzogen. Im vorderen Teil des Auges geht diese in die Hornhaut über. Im hinteren Anteil des Auges ist die äußerste Schicht die sogenannte Lederhaut (Sklera). Die Sklera ist im Vergleich

zur Hornhaut, auf Grund einer anderen Kollagenanordnung, undurchlässig. Durch die Sklera treten von posterior der Nervus opticus und Blutgefäße in den Augapfel ein.

Zwischen der Lederhaut und der Netzhaut (Retina) liegt die Aderhaut (Chorioidea). Über das starke Gefäßgeflecht in der Chorioidea werden die Photorezeptoren auf der Netzhaut mit Nährstoffen versorgt. Die Netzhaut setzt sich aus mehreren Nervenschichten zusammen, die das einfallende Licht in Nervenimpulse übertragen und diese über den Nervus opticus als Reiz an das Gehirn weiterleiten.

Das Innere des Auges wird vom Glaskörper (Corpus vitreum) ausgefüllt. Dieser besteht zu 99% aus Wasser und gibt dem Auge seine Form. Am vorderen Anteil grenzt er an die Linse (Lens).

Die Linse ist bikonvex geformt, wobei die Hinterseite stärker gekrümmt ist als die Vorderseite. Die Aufgabe der Linse ist die Akkommodation, also das Scharfstellen des Auges auf naheliegende Objekte, welche durch ihre elastische Eigenschaft ermöglicht wird. Die Linse ist ringsherum durch die Zonularfasern am Ziliarkörper (Corpus ciliare) aufgehängt. Im Ziliarepithel wird das Kammerwasser gebildet, welches von der hinteren Augenkammer durch die Pupille in die vordere Augenkammer fließt. Von dort kann das Kammerwasser durch das Trabekelwerk des Kammerwinkels im Schlemmkanal wieder abfließen. Das Kammerwasser ist ein Ultrafiltrat des Blutes und versorgt die Hornhaut sowie die Linse mit allen notwendigen Ionen. Der Augeninnendruck wird durch die Produktion und den Abtransport des Kammerwasser bestimmt.

Die Iris (Regenbogenhaut), eine Verlängerung der Lederhaut, unterteilt den Bereich vor der Linse in die Vorder- und Hinterkammer.

In der Mitte der Iris ist eine Öffnung, die Pupille. Zwei Muskel, die in der Pupille angeordnet sind können über Kontraktion den Öffnungsdurchmesser variieren. So kann die in das Auge einfallende Lichtmenge reguliert werden. Die Augenfarbe wird durch die Anzahl der vorhanden Pigmentzellen in der Iris festgelegt (Cordula Dahlmann, 2017).

2.2 Das Glaukom

2.2.1 Definition

Das Krankheitsbild Glaukom, umgangssprachlich auch grüner Star genannt, fasst eine Gruppe von Augenkrankheiten zusammen, die immer eine unwiderrufliche, verschieden stark ausgeprägte Sehnervschädigung (Optikoneuropathie) zur Folge haben. Diese resultiert oft, aber nicht immer, aus einer Erhöhung des Augeninnendruckes (IOD). Der charakteristische Papillenbefund und Gesichtsfelddefekte ermöglichen eine klare Diagnose.

Zusammen mit der altersbedingten Makuladegeneration ist das Glaukom einer der häufigsten Gründe für eine Erblindung. Derzeit sind mehr als 70 Millionen Menschen weltweit durch ein Glaukom vollkommen erblindet (Weinreb, Aung, & Medeiros, 2014). Die Erhöhung des Augeninnendruckes ist meist schmerzfrei. Die Gesichtsfelddefekte fallen den Patienten erst im schweren Stadium auf, wodurch erfahrungsgemäß das Glaukom erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird (Cohen & Pasquale, 2014).

2.2.2 Pathogenese und Risikofaktoren

Die Pathogenese des Glaukoms war lange Zeit nur auf den Augeninnendruck fokussiert. Dies ist auch weiterhin noch ein relevanter Messwert für die Diagnose des Glaukoms. Studienergebnisse haben jedoch gezeigt, dass ein Glaukom auch bei normalem Augeninnendruck entstehen kann. Nur zirka zwei Drittel bis drei Viertel der Patienten mit Glaukom haben einen erhöhten Augeninnendruck (Bonomi, Marchini, Marraffa, & Morbio, 2001). Deswegen ist der Augeninnendruck nach aktueller Studienlage kein alleiniger Anhaltspunkt für die Diagnose eines Glaukoms.

Das bedeutet, nicht nur die mechanische Belastung auf den Sehnerv durch den Anstieg des Augeninnendruckes ist für die Pathogenese relevant, sondern auch die vaskuläre Reduktion, die den Sehnerv irreversibel schädigt. Dadurch kommt es zum Untergang der retinalen Ganglienzellen und deren Axone im Nervus opticus und somit zum Gesichtsfeldausfall (Quigley, 1999).

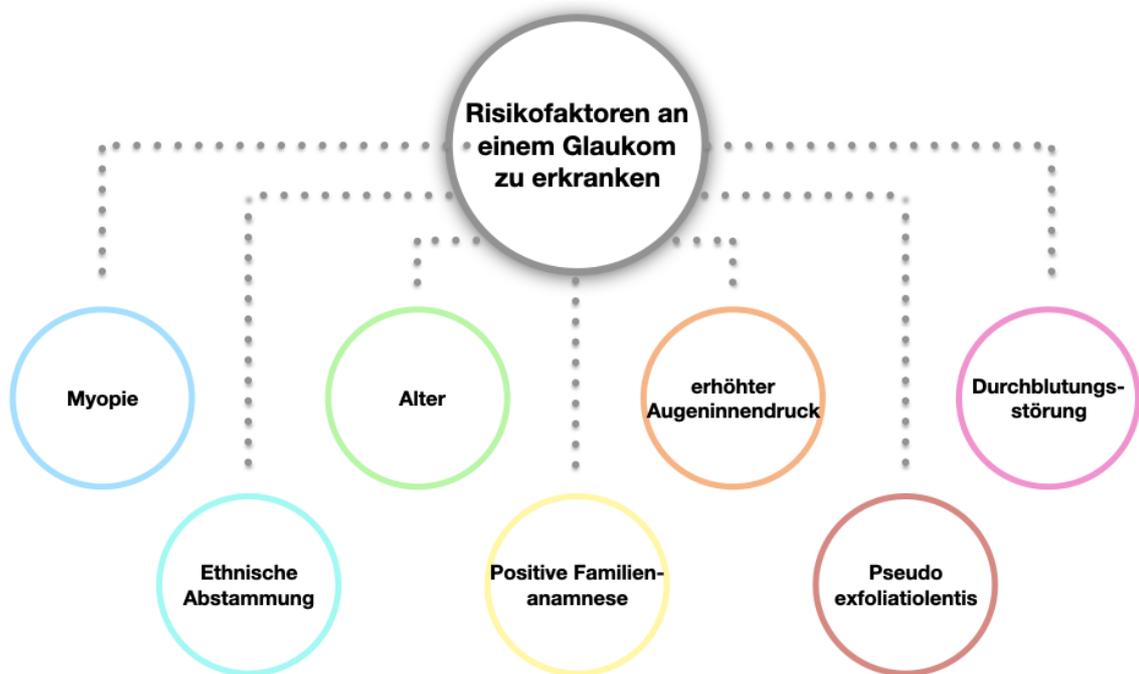


Abbildung 2 Risikofaktoren an einem Glaukom zu erkranken
(Grafik Jill Brögmann)

Viele Risikofaktoren sind bereits gut erforscht und lassen sich mit Studien belegen: ein erhöhter Augeninnendruck (Quigley, 1993), Durchblutungsstörungen (Quigley, 1999), Myopie (Daubs & Crick, 1981), Alter (Quigley, 1993; Sommer et al., 1991), Ethnische Abstammung (Sommer et al., 1991), Positive Familienanamnese (Hart, Yablonski, Kass, & Becker, 1979), Pseudoexfoliativitis (Harju & Vesti, 2001). Es gibt jedoch auch noch viele Unklarheiten bezüglich anderer, noch nicht erforschter Risikofaktoren.

2.2.3 Glaukomformen und Einteilung

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, die verschiedenen Formen des Glaukoms zu klassifizieren. Eine der gängigsten Unterteilungen, die in der Literatur verwendet werden, ist die Unterscheidung nach der Pathophysiologie.

Für die Klassifizierung werden hierbei die Konfigurationen des Kammerwinkels und dessen Ursachen betrachtet.

Gemäß nachstehender Tabelle 1 werden die Kammerwinkelkonfigurationen unterschieden in Offenwinkel-, Engwinkel- und kindliches Glaukom (Lang, 2019).

Die Ursachen differenziert man in primär und sekundär, wobei die primären Formen des Glaukoms immer spontan auftreten, sekundäre jedoch auf allgemeine Vorerkrankungen, Medikamente, Trauma oder andere Augenerkrankungen zurückzuführen sind (Cordula Dahlmann, 2017).

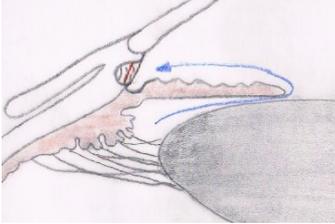
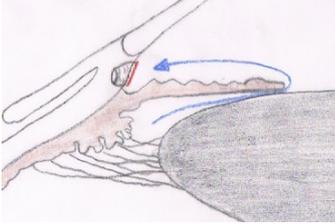
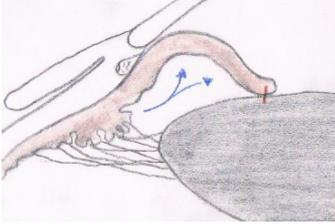
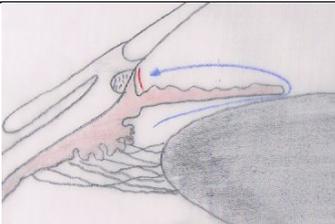
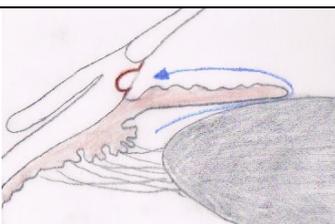
Glaukomform	Ursache	Bild	Häufigkeit	Abflussbehinderung
Offenwinkelglaukom	primär		Über 90% aller Glaukome	im Trabekelwerk selber
	sekundär		2-4% aller Glaukome	Durch unterschiedliche Zellen Verlegung des Trabekelwerks
Engwinkelglaukom	primär		Etwa 5 % aller Glaukome	Durch Irisgewebe, Verlegung des Trabekelwerks und Blockade des Kammerwinkels
	sekundär		2-4% aller Glaukome	Verlegung des Trabekelwerks durch vordere Synechien, Narben, sowie neugebildete Gefäße (=Rubeosis iridis)
Angeborenes Glaukom			1% aller Glaukome	Trabekelwerk nicht voll ausdifferenziert und/oder durch embryonales Gewebe verlegt

Tabelle 1 Einteilung der Glaukomformen

(Tabelle und Grafik Jill Brögmann in Anlehnung an Lang, 2019)

Ursprung der Pathogenese der unterschiedlichen Glaukomformen ist in den Bildern in Rot gekennzeichnet, der graue ovale Körper soll die Linse darstellen, die blassrosa Struktur ist die Iris, der blaue Pfeil stellt den Fluss des Kammerwassers dar

2.2.3.1 primäre Glaukome

Die am häufigsten diagnostizierte Glaukomform ist das **primäre Offenwinkelglaukom (POAG)** (Hahn, 2012), welches im Krankheitsverlauf häufig erst im chronischen Stadium diagnostiziert wird, da die Betroffenen die Symptome sehr spät wahrnehmen (Lang, 2019).

Die Diagnose erfolgt unter anderem mithilfe einer Messung des Augeninnendrucks sowie einer Gesichtsfeldmessung und äußert sich in einer Erhöhung des Drucks auf über 21 mmHg (Hahn, 2012). Der Kammerwinkel ist bei dieser Glaukomform zwar geöffnet, jedoch besteht im Trabekelwerk selbst eine Abflussbehinderung (Lang, 2019). Durch den dauerhaften Anstieg des Augeninnendrucks kommt es im Verlauf der Krankheit zu einer Optikusatrophie, also zu einem Untergang von Nervenfasern bedingt durch Minderdurchblutung. In der Folge dieses Verlustes kommt es im Gesichtsfeld zu spezifischen Defekten (Lang, 2019).

Analog zum primären Offenwinkelglaukom ist auch für die anderen Formen des primären Glaukoms die Betrachtung der Ursachen elementar zur erfolgreichen Diagnostik der Glaukomform.

So lässt sich auch noch das **Normaldruckglaukom (NTG)** als primäres Glaukom kategorisieren. Die Ursache ist häufig auf genetische Übertragung zurückzuführen (Hahn, 2012). Der Name lässt bereits den Rückschluss darauf zu, dass der Augeninnendruck bei dieser Glaukomform nicht erhöht ist, sondern im Normalbereich von 10-21 mmHG liegt (Lang, 2019). Der Papillenbefund zeigt hingegen einen eindeutigen glaukotypischen Defekt mit den spezifischen Gesichtsfeldausfällen (Ishida, Yamamoto, Sugiyama, & Kitazawa, 2000).

Die Ätiologie dieser Glaukomform ist derzeit noch nicht ausreichend erforscht.

Der **akute Winkelblock** oder auch Glaukomanfall gehört ebenfalls zu den primären Glaukomen und stellt eine Notfallsituation dar (Lang, 2019). Die Patienten klagen typischerweise über starke Augenschmerzen, Visusreduktion, Wahrnehmung von regenbogenfarbigen Ringen um eine Lichtquelle sowie Übelkeit, Erbrechen und starke Kopfschmerzen. Klinisch ist ein rotes Auge festzustellen (Peter Walter, 2017). Der Glaukomanfall sollte umgehend medikamentös therapiert werden. Andernfalls entwickelt sich dieser zu einem chronischen Winkelblock (Peter Walter, 2017). Von einem Winkelblockglaukom spricht man erst dann, wenn bereits eine Optikusatrophie entstanden ist. Der Kammerwinkel ist bei dieser Glaukomform durch die periphere Iris blockiert. Dies nennt man auch den Pupillarblockmechanismus, bei dem es zu einem Anstieg des Drucks in der hinteren

Augenkammer kommt. Der Widerstand im Trabekelwerk und auch die Produktion des Kammerwassers sind normal (Lang, 2019). Der Glaukomanfall tritt häufig bei über 60-jährigen auf. Eskimos sind häufiger betroffen als andere Menschen, Farbige dagegen eher seltener (Lang, 2019).

Außerdem gehört das **kongentiale Glaukom** zu den primären Glaukomformen. Das angeborene Glaukom manifestiert sich erfahrungsgemäß besonders bei Jungen vor dem ersten Lebensjahr und tritt bei einer von 10000 Geburten auf. Es wird autosomal-rezessiv vererbt und tritt zu 75 % beidseitig auf. Eine Entwicklungsstörung im Trabekelwerk führt zu Abflussbehinderungen des Kammerwassers und zu einem Anstieg des intraokulären Drucks (Hahn, 2012).

Zu den primären Glaukomen gehört definitionsgemäß auch die **okuläre Hypertension**, bei der die Patienten über Jahre einen erhöhten Augeninnendruck vorweisen. In der Regel kommt es jedoch nicht zur Schädigung des Sehnervs oder zu Gesichtsfeldausfällen. In zehn Prozent der Fälle kann sich jedoch ein primäres Offenwinkelglaukom manifestieren (Hahn, 2012). Diese Patienten weisen meist einen intraokulären Druck von über 25 mmHG auf, sind jünger und haben eine positive Familienanamnese. (Lang, 2019)

2.2.3.2 sekundäre Glaukome

Anders als die primären Glaukomformen muss bei den sekundären Ausprägungsvarianten besonderes Augenmerk auf die Einwirkungen durch Medikamente, Entzündungen, Traumata, Blutung, Tumore oder andere Augenerkrankungen geworfen werden (Lang, 2019). Die sekundären Glaukome machen etwa 20 % aller Glaukome aus (Hahn, 2012) und haben ausnahmslos eine schlechtere Prognose für den Krankheitsverlauf als die Primären (Lang, 2019).

Die Ursache für das sekundäre Offenwinkelglaukom liegt meist in einer Abflussbehinderung des Kammerwassers in das Trabekelwerk. Die Produktion des Kammerwassers ist nicht gehemmt (Lang, 2019).

Eines der weltweit häufigsten sekundären Offenwinkelglaukome ist das **Pseudoexfoliationsglaukom (PEX)**. Die Inzidenz dieser Glaukomform ist bei Skandinaviern und etwa ab dem 60. Lebensjahr am häufigsten. Das Trabekelwerk wird hierbei durch fibrilläres Matrixmaterial, welches sich aus der Basalmembran aller Strukturen lösen kann, verstopft. Zunächst lagert sich das zellfreie Material an der Linse, dem vorderen Glaskörper, der Iris und den Zonularfasern ab. In diesem Stadium spricht man dann zunächst von einem Pseudoexfoliationssyndrom, welches sich in 20-

60 Prozent der Fälle in ein Glaukom entwickelt (Hahn, 2012). Diese Entwicklung manifestiert sich durch die dauerhafte Erhöhung des Augeninnendrucks in Folge der Verstopfung des Trabekelwerkes mit den einhergehenden, glaukomtypischen Gesichtsfeldeinschränkungen.

Das **Pigmentdispersionsglaukom** ist das zweite wichtige, sekundäre Offenwinkelglaukom. Die Prävalenz ist bei jungen Männern, die unter einer Myopie leiden, am häufigsten. Auf Grund von Reibung zwischen der Iris und den Zonularfasern lösen sich Pigmentgranula aus der Iris und lagern sich auf dem Hornhautendothel ab. Die Makrophagen im Trabekelwerk versuchen diese Granula zu phagozytieren. Sobald es zu einer Überflutung der Granula kommt, verstopfen dieser das Trabekelwerk und verhindern so den Abfluss des Kammerwassers (Hahn, 2012).

Zusätzlich kann es bei den sekundären wie bei den primären Glaukomformen auch zu einem sekundären Engwinkelglaukom kommen. Das **Neovaskularisationsglaukom** ist eines der häufigsten und am schwersten zu kontrollierende. Durch ischämische Netzhauterkrankungen (z.B. Diabetes), schwere intraokulare Entzündungen oder Tumore kommt es bei dieser Glaukomform zu einer Ausschüttung von vaskulären Wachstumsfaktoren. Diese werden durch den Strom des Kammerwassers in die vordere Augenkammer und somit zum Kammerwinkel gespült und führen dort zur Neubildung von Gefäßen. Durch das Übermaß an neuen Gefäßen wird der Abfluss des Kammerwassers in das Trabekelwerk eingeschränkt. Deswegen muss immer erst die zugrunde liegende Erkrankung therapiert werden, bevor diese Glaukomform behandelt wird (Hahn, 2012; Lang, 2019).

Ein **Trauma** des Auges, welches zu Blut oder Exsudat im Kammerwinkel oder einem dauerhaften Kontakt von Iris zum Trabekelwerk führt, kann zu einem sekundären Engwinkelglaukom führen (Lang, 2019).

2.2.4 Diagnose

Um das Glaukom eindeutig zu diagnostizieren, bedarf es unterschiedlicher Untersuchungen, um Differentialdiagnosen auszuschließen, eine genaue Prognose stellen und einen Therapieplan, individuell auf die Glaukomform abgestimmt einleiten zu können.

Die vier wichtigsten Untersuchungen sind die Tonometrie - Messung des Augeninnendrucks (IOD), die Gonioskopie - Untersuchung des Kammerwinkels, die Perimetrie - Gesichtsfelduntersuchung und die Ophthalmoskopie - Beurteilung der Papille (Peter Walter, 2017).

2.2.4.1 Tonometrie

Der Normbereich, in dem sich der Augeninnendruck bewegen sollte, liegt zwischen 10 bis 20 mmHg. Er unterliegt aber tageszeitlichen Schwankungen, auf Grund von Änderungen in der Herzfrequenz, Blutdruck oder der Atmung. Außerdem variiert er mit zunehmendem Alter. Aus diesem Grund gehört die Tonometrie ab dem 40. Lebensjahr zur Routinekontrolle. Schwankungen bis zu 5 mmHg werden bei Gesunden als physiologisch erachtet. Bei Patienten, die unter einem Glaukom leiden, sind größere Schwankungen festzustellen.

Bei Druckwerten von 22 bis 25 mmHg besteht Glaukom-Verdacht, Werte über 26 mmHg sind pathologisch (Peter Walter, 2017).

Es gibt verschiedene Tonometer, um den Augeninnendruck (intraokularer Druck, IOD) zu bestimmen. Die Applanationstonometrie nach Goldmann (sitzender Patient) ist am weitesten verbreitet und bietet die präzisesten Ergebnisse. Dazu wird zunächst mittels Augentropfen die Hornhaut betäubt, um dann ein planes Druckkörperchen auf die Hornhaut aufzulegen und somit vorsichtig die Hornhaut zu applanieren (abzuplatten). Der intraokulare Druck ergibt sich dann aus dem dafür aufgebrauchten Druck (Lang, 2019).

Weitere Tonometrieverfahren sind die Non-Kontakt-Tonometrie, bei der der Druck mittels Luftstoß ermittelt wird oder auch die Impressionstonometrie, die häufig bei bettlägerigen Patienten zum Einsatz kommt. Sie funktioniert analog zur Applanationstonometrie und kann mittels eines planen Druckkörpers den Augeninnendruck messen (Lang, 2019).

2.2.4.2 Gonioskopie

Bei der Gonioskopie wird der Kammerwinkel auf seine Anatomie, die Weite des Winkels und auf pathologische Veränderungen untersucht. Somit stellt diese Art der Untersuchung die Möglichkeit der Klassifizierung des Glaukoms dar und dient der Unterscheidung ob es sich zum Beispiel um ein Engwinkel- oder Offenwinkelglaukom handelt oder ob Pigmentierung oder Verklebungen sichtbar sind. Da auch bei dieser Untersuchung die Spaltlampe mit dem Gonioskop direkt auf die Hornhaut aufgelegt werden muss, wird dazu das Auge mittels Tropfen anästhesiert (Hahn, 2012; Lang, 2019).

2.2.4.3 Ophthalmoskopie

Durch die Untersuchung der Papille mittels Ophthalmoskopie kann der Behandler feststellen, ob bereits ein Schaden durch das Glaukom entstanden ist und wie weit dieser fortgeschritten ist. Die Form, Farbe, Papillenrandschärfe, Papillenexkavation und die Nervenfaserschicht werden dabei untersucht. Sobald die Papille eine fortschreitende glaukomatöse Veränderung aufweist, geht dies zunehmend mit einem Gesichtsfeldausfall einher (Hahn, 2012; Lang, 2019).

2.2.4.4 Gesichtsfelduntersuchung (Perimetrie)

Der funktionelle Schaden, den ein Glaukom mit sich bringt, lässt sich mit der Perimetrie gut darstellen. Um speziell früh auftretende, glaukomatöse Gesichtsfeldausfälle ausfindig zu machen, benutzt man heutzutage die statische Computerperimetrie (Lichtuntersuchungsempfindlichkeitsmessung). Unter Mitarbeit des Patienten wird das computergesteuerte, halbautomatische Rasterperimetriegerät (Octopus, Humphrey-Field-Analyser) genutzt, um das zentrale 30 Grad Gesichtsfeld auf Beeinträchtigungen zu untersuchen. Diese reicht für die Glaukomdiagnostik meist aus (Lang, 2019).

Das Gesichtsfeld kann wie ein Berg als dreidimensionale Struktur mit aufsteigender Empfindlichkeit dargestellt werden (siehe Abbildung 3). Auf der Spitze des Gesichtsfeldberges ist die Sehschärfe am besten. Diese liegt in der Fovea und nimmt zur Peripherie kontinuierlich ab. Die Grenzen in die Peripherie sind etwa oben 50 Grad, nasal 60 Grad, unten 70 Grad und temporal 90 Grad. Der nasale Abfall der Empfindlichkeit ist steiler als der temporale (Bowling, 2020).

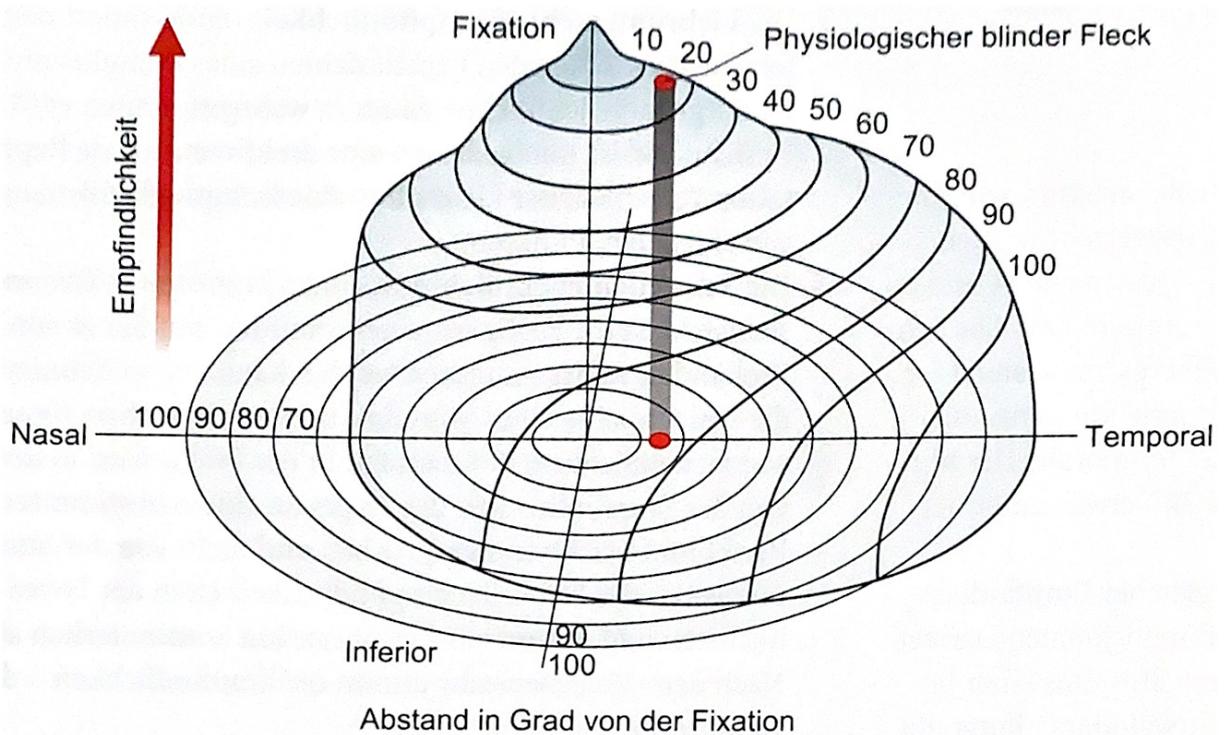


Abbildung 3 Gesichtsfeldberg

Quelle des Bildes: *Klinische Ophthalmologie von Kanski und Bowling*, Seite 340 (Kanski, 2012)

Komplette Ausfälle im Gesichtsfeld bezeichnet man als Skotome, die absolut – also gar kein Licht wird wahrgenommen - oder relativ - leichte Lichtwahrnehmung vorhanden - sein können (Lang, 2019). Dabei werden an unterschiedlichen Stellen Lichtsignale abgegeben. Der Patient signalisiert mit einer Taste am Gerät, ob er den Lichtpunkt wahrgenommen hat. Wenn er wahrgenommen wurde, wird er zu einem späteren Zeitpunkt dunkler gezeigt, wenn er nicht wahrgenommen wurde, wird er später nochmal heller gezeigt. Mit diesem Verfahren wird die Reizschwelle der unterschiedlichen Netzhautorte festgelegt. Die Helligkeitsempfindung nimmt von der Peripherie zum Zentrum des Gesichtsfeldes hin zu (Grehn, 2019).

Bei der statischen computergesteuerten Perimetrie bekommt man als Ergebnis eine Darstellung von Zahlen-, Graustufen- oder Farbausdruck, der auch gleichzeitig die Differenz zum Normalwert und die Signifikanz der Abweichung ortsbezogen aufzeigt. Je dichter das Netz der Prüfpunkte ist und je näher an der Wahrnehmungsschwelle geprüft wird, desto zuverlässiger sind die Messergebnisse. Kleine Skotome können durchaus unbemerkt bleiben, wenn das Netz der Prüforte relativ grob ist und die Schritte der Helligkeitseinstellung sehr groß sind.

Somit lässt sich festhalten, dass der Gesichtsfeldbefund umso genauer wird, je dichter

das Netz wird und je kleiner die Schritte der Helligkeitssteigerung werden. Nachteil der Methode ist der sehr hohe Zeitaufwand und die gute und lange Konzentration, die dem Patienten abgefordert wird. Deswegen geht man im Alltag häufig einen Kompromiss ein und entscheidet auch anhand der vorherigen Anamnese, wie detailliert die Perimetrie gemacht werden sollte. Zu Beginn der Glaukomerkrankung entstehen einzelne kleine inselförmige Gesichtsfeldausfälle innerhalb der zentralen 30 Grad des Gesichtsfeldes. Diese verdeutlichen die Wichtigkeit einer genauen Perimetrie beim anfänglichen Verdacht auf Vorliegen einer Glaukoms (Grehn, 2019).

In der Uniklinik Mainz werden Gesichtsfelduntersuchungen sowohl an dem Gerät Humphrey Field Analyzer 750i (HFA) als auch am Octopus 900 durchgeführt.

Bei der Untersuchung entstehende, wichtige Werte sind:

1. Mittlerer Defekt (MD)

(Mean Deviation bei HFA oder Mean Defect bei Octopus)

Der MD-Wert ergibt sich aus den durchschnittlichen Werten der totalen Deviation oder Depression. Es werden die aktuell gemessenen Werte mit den alterskorrigierten Normalwerten verglichen. Somit spiegelt dieser Wert das Ausmaß des gesamten Gesichtsfeldverlustes wider. Zentral gelegene Punkte werden stärker gewichtet als periphere. Der MD-Wert bei einem gesunden Auge liegt bei circa 0 dB. Die Norm liegt bei -2 bis +2 dB.

Bei den unterschiedlichen Geräten, die für die Messung verwendet werden können, muss man darauf achten, dass Humphrey immer negative Werte darstellt, wo hingegen Octopus mit positiven Werten arbeitet. Um die Werte der unterschiedlichen Geräte besser miteinander vergleichen zu können, können die Werte von der Perimetrie am Octopus wie folgt umgerechnet werden (Miglior et al., 2007):

$$\text{MD (Humphrey)} = \text{MD (Octopus)} \times (-1)$$

Um nun mit Hilfe des Wertes Patienten in Gruppen einzuteilen, haben sich in den letzten Jahren viele unterschiedliche Modelle etabliert (Brusini & Johnson, 2007). In der hier vorliegenden Doktorarbeit ist die Gruppeneinteilung aus der untenstehenden Tabelle zu entnehmen:

Kein Gesichtsfelddefekt	MD \geq 0
Beginnender Gesichtsfelddefekt	MD < 0 und \geq -6
Mäßiger Gesichtsfelddefekt	MD < -6 und \geq -12
Fortgeschrittener Gesichtsfelddefekt	MD < -12

Tabelle 2 MD korrelierte Gruppeneinteilung der Gesichtsfelddefekte

2. Musterstandardabweichung (PSD/LV)

(Pattern Standard Deviation bei HFA oder Loos Variance bei Oktopus)

Der PSD oder LV-Wert berücksichtigt nicht nur die generelle Depression im gesamten Gesichtsfeld, sondern auch noch Begleiterkrankungen wie zum Beispiel Katarakt.

3. Cup Disc Ratio (C/D Ratio)

(Cup = Vertiefung (Exkavation) in der Papille, Disc = Gesamtfläche der Papille, Ratio = Verhältnis)

Dieser Wert beschreibt das Verhältnis der Vertiefung der Papille zu ihrer Gesamtfläche. Es ist jedoch ein grobes und subjektives Maß. Die Vertiefung wird beim Glaukom größer, da der Sehnerv geschädigt wird - somit steigt der C/D Wert bei einem Glaukompatienten. Ein Wert von 0,3 - 0,5 wird als physiologisch anerkannt. Wenn ein Wert von 1,0 gemessen wird, ist der Sehnerv komplett ausgehöhlt.

2.2.5 Therapie

Das Ziel der Therapie beinhaltet vor allem das Senken des Augeninnendrucks - beim leichten und mittleren Stadium - um mindestens 30% (Hahn, 2012; Schwartz & Budenz, 2004). So soll die Ausbreitung des Gesichtsfeldausfalls zumindest reduziert, möglicherweise sogar gestoppt werden. Der Zieldruck ist bei jedem Patienten individuell durch Medikamente, Lasertherapie oder Operation einzustellen und hängt vom Ausmaß des Glaukomschadens, des Augeninnendrucks ohne Therapie, der Progressionsrate und dem Alter des Patienten ab (Peter Walter, 2017).

2.2.5.1 Medikamentöse Therapie

In der Regel beginnt die Therapie des Glaukoms lokal mit Augentropfen, die den Augeninnendruck senken sollen. Zunächst wird aus fünf Wirkstoffgruppen eine für den Patienten passende Monotherapie mit einem Präparat gewählt. Wenn dies nach sechs Wochen keine Effizienz, also keine oder eine unzureichende Drucksenkung erzielt, steigt man auf eine Kombinationstherapie von meist zwei Präparaten um (Hahn, 2012). Diese Art der Therapie führt häufig zu Nebenwirkungen, darunter beispielsweise brennende, stechende Augen oder Nasenschleimhautproblemen. Auf Grund dessen lässt die Compliance des Patienten oft nach (Peter Walter, 2017).

Die fünf wichtigsten Wirkstoffgruppen sind Parasympathomimetika (Miotika), Prostaglandinderivate, Sympathomimetika (alpha 2 Agonisten), beta-Rezeptor Blocker und Karboanhydrasehemmstoffe.

Die **Parasympathomimetika** (z.B. Pilocarpin) gelten als Ursprung der Glaukomtherapie. Heute werden diese speziell für das Winkelblockglaukom eingesetzt (Peter Walter, 2017). Sie verbessern den Kammerwasserabfluss durch Erhöhung des trabekulären Abflusses (Lang, 2019).

Zu den neueren Wirkstoffen in der Therapie des Glaukoms gehören die **Prostaglandinderivate** wie zum Beispiel Lantanoprost oder Travoprost. Die Drucksenkung um ca. 30% kommt hierbei durch eine Erhöhung des uveoskleralen Abfluss zustande (Peter Walter, 2017).

Zu den **Sympathomimetika** gehören unter anderem Clonidin, Apraclonidin oder Dipivephrin. Der Wirkungsmechanismus bei den Präparaten ist grundsätzlich das Senken des Augeninnendrucks durch Hemmung der Kammerwasserproduktion und Steigerung des trabekulären Abflusses. Clonidin hat zusätzlich die Besonderheit, dass es systemisch wirkt, indem es den Blutdruck senkt und somit zur okulären

Vasokonstriktion führt (Lang, 2019).

Die Kammerwasserproduktion kann durch **beta-Rezeptor-Blocker** gesenkt werden. Zu beachten ist allerdings, dass diese oft nicht nur lokal, sondern auch systemisch wirken können. Ein wichtiges Präparat in der klinischen Medizin ist Timolol (Hahn, 2012).

Da das Enzym Carboanhydrase die wichtigste Substanz ist um das Kammerwasser zu produzieren, erwirkt die lokale Wirkung von **Karboanhydrasehemmstoffen** wie Dorzolamid oder Brizolamid die Senkung der Produktion des Kammerwassers (Lang, 2019).

Die systemische Therapie wird besonders beim Glaukomanfall vorübergehend eingesetzt. Zu dieser gehören die **Osmotika** (z.B. Mannit), die aus den Flüssigkeitsräumen - beim Auge vor allem Glaskörper und Kammerwasser - das Wasser durch die hyperosmotische Substanz entziehen. Somit kommt es zu einer generellen Volumenminderung des Auges (Lang, 2019).

Auch durch die systemische Gabe des Karboanhydrasehemmstoffs Azetazolamid lässt sich die Kammerwasserproduktion absenken, wodurch eine kurzfristig wirkende Therapie möglich ist.

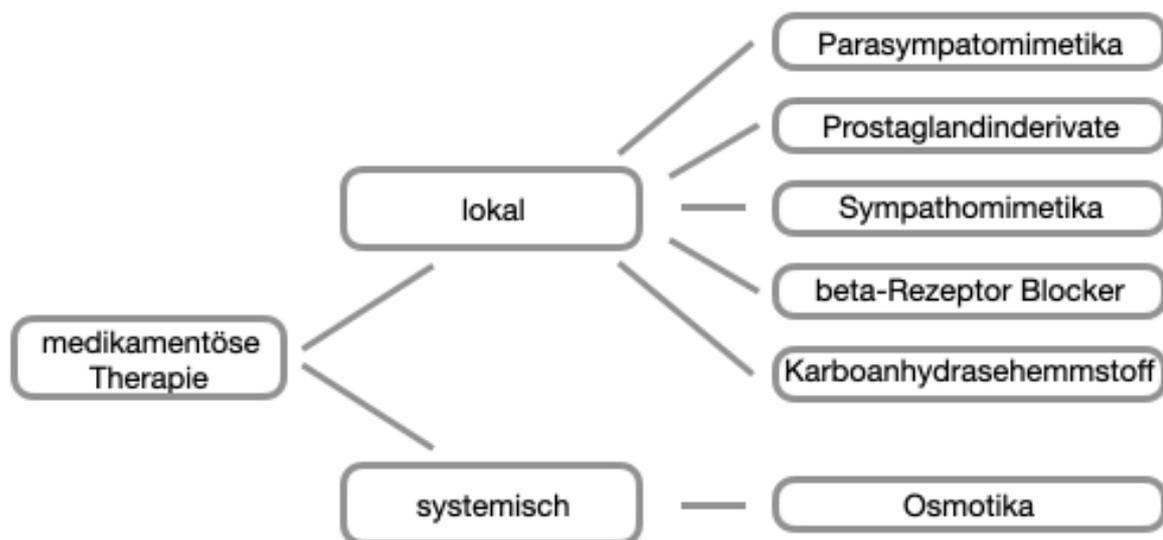


Abbildung 4 medikamentöse Therapie

(Grafik Jill Brögmann)

2.2.5.2 Operative Therapie

Wenn jedoch durch die lokale Therapie kein oder ein unzureichendes Ergebnis der Drucksenkung erzielt wird, ist eine operative Verfahren indiziert (Hahn, 2012). Die Indikation liegt auch vor, wenn ein stark erhöhter Augeninnendruck existiert oder ein fortgeschrittener Glaukomschaden besteht (Peter Walter, 2017).

Bei der operativen Therapie besteht die Wahl zwischen einer Lasertherapie und einem chirurgischen Eingriff unterscheiden.

Zu den Lasertherapien gehören die Lasertrabekuloplastik, bei der das Ziel hauptsächlich die Reduktion der Tropftherapie und das Herauszögern einer Operation ist. Mit Hilfe eines Argon Laser oder YAG Laser sind Drucksenkungen bis zu 30% zu erwarten (Peter Walter, 2017). Durch den Laser werden sogenannte Laserherde in den vorderen Anteil des Trabekelwerk erzeugt, die eine Aufdehnung erzielen und einen besseren Abfluss des Kammerwassers ermöglichen (Lang, 2019). Da dieses Verfahren einem geringen Risiko unterliegt, kann es jederzeit wiederholt werden. In 75% der Fälle mit einem primären Offenwinkelglaukom, Pseudoexfoliations- oder Pigmentdispersionsglaukom wird der angestrebte Augeninnendruckwert erreicht (Hahn, 2012).

Eine weitere Möglichkeit in der Lasertherapie ist die Zyklodestruktion, bei der durch Kryo-, Diathermie- und Laserbehandlung Teile des Ziliarkörpergewebes verödet werden und es somit zur Reduktion der Produktion des Kammerwassers kommt (Hahn, 2012). Diese Art der Therapie ist irreversibel, das heißt, dass es nach der Behandlung zu einer bleibenden Hypotonie am Auge kommen kann. Auf Grund dessen ist es erstrebenswert, diese Variante der Therapie erst zu wählen, wenn eine andere operative Therapie nicht möglich ist oder nicht zum gewünschten Ziel geführt hat (Peter Walter, 2017).

Die letzte wichtige Lasertherapie ist die Laseriridotomie, die vor allem beim Glaukomanfall zum Einsatz kommt. Bei diesem Verfahren wird eine Öffnung in die Iris präpariert, wodurch wieder eine Verbindung von der hinteren zur vorderen Augenkammer hergestellt wird. Dadurch ist die Kammerwasserzirkulation wieder gewährleistet (Peter Walter, 2017). Die Iridektomie lässt sich auch chirurgisch durchführen und verfolgt das gleiche Ziel wie die Laseriridotomie.

Der wichtigste und älteste chirurgische Eingriff in der Therapie des Glaukoms ist die Trabekulektomie. Mit dieser Operation werden in 80-85% der Fälle dauerhaft die Augeninnendruckwerte gesenkt (Lang, 2019). Durch die Herstellung eines künstlichen

Abflusses, über eine Präparation in die Sklera, die das Kammerwasser dann unter die Bindehaut fließen lässt, entsteht ein sogenanntes Sickerkissen, in dem sich das Kammerwasser sammeln kann. Diese Operation wird immer in Verbindung mit einer Iridektomie durchgeführt (Hahn, 2012). Um die präparierte Sklera offen zu halten, verwendet man Zytostatika (Mitomycin-C oder 5-Fluoruracil), die den Heilungsprozess und damit die Vernarbung - also den Verschluss - verhindern sollen.

Zu den neueren operativen Verfahren gehören die nicht-penetrierende Glaukomoperationen, zu denen unter anderem auch die Sklerektomie gehört. Durch eine Ausdünnung des Trabekelmaschenwerks und anschließendes Einbringen eines Implantates wird der Schlemmkanal offen gehalten (Hahn, 2012).

Zudem gehört die Kanaloplastik auch zu den nicht-penetrierenden Glaukomoperationen. Bei diesem Eingriff wird ein Faden auf Spannung im Schlemmkanal verknötet und hält diesen dadurch dauerhaft offen (Hahn, 2012).

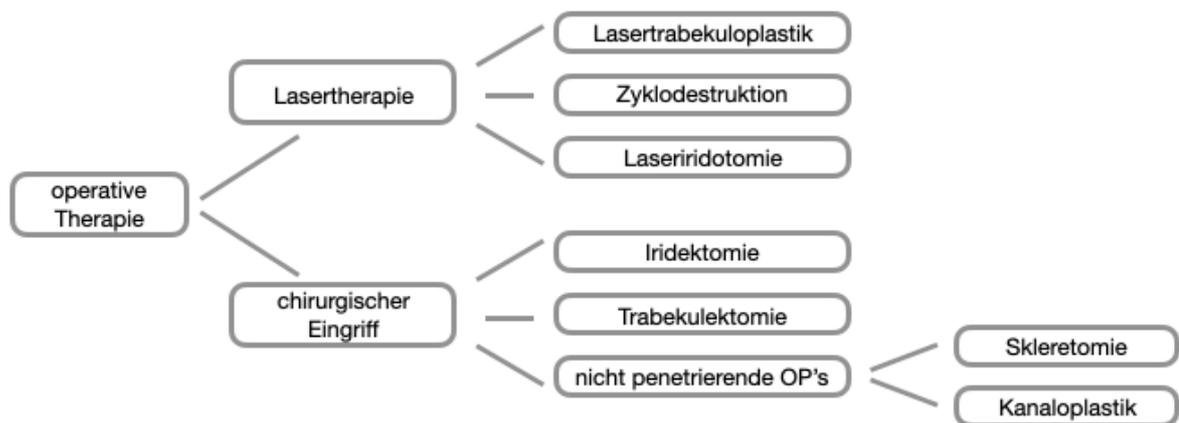


Abbildung 5 operative Therapie

(Grafik Jill Brögmann)

2.3 Das Kammerwasser

2.3.1 Funktion

Die wichtigste Funktion des Kammerwassers ist die Versorgung der Linse und der Hornhautinnenfläche. Da diese Strukturen keine eigene Blutversorgung besitzen, durch die sie mit den notwendigen Nährstoffen versorgt werden könnten, ziehen sie sich aus dem Ultrafiltrat - dem Kammerwasser - die erforderlichen Ionen.

Der Innenraum des Auges besitzt keine Lymphgefäße, sodass das Kammerwasser auch diese Aufgabe übernimmt und die Lymphflüssigkeit über den Kammerwasserabfluss ausscheidet.

Außerdem fängt das Kammerwasser freie Radikale durch den hohen Anteil an Ascorbinsäure ab, was zu einer Detoxifikation führt.

Durch den Ausgleich von Produktion und Abfluss des Kammerwassers wird der Augeninnendruck reguliert. Der normale Druck liegt bei 10 bis 20 mmHg.

Durch den Augeninnendruck bekommt die Hornhaut des Augapfels ihre gewölbte Form und gewährleistet somit eine konstante Refraktion des Auges (Grehn, 2019).

2.3.2 Bildung und Zirkulation

Die Produktion des Kammerwassers unterliegt einem Tag- Nacht- Rhythmus, welcher nachts um ca. 40 Prozent vermindert (Grehn, 2019), ansonsten aber weitestgehend konstant und vom Augeninnendruck unabhängig ist. In der Regel werden pro Minute 2 - 6 µl gebildet. Das Gesamtvolumen beträgt 0,2 – 0,4 ml, was bedeutet, dass pro Minute ein bis zwei Prozent des Kammerwassers ersetzt werden (Lang, 2019).

In den Ziliarzotten wird es gebildet und in die Augenhinterkammer sezerniert. Sobald ein genügend hoher Druck in der Hinterkammer durch das neue Kammerwasser entstanden ist, hebt sich die Iris von der Linsenvorderwand ab, das Kammerwasser passiert den sogenannten ersten physiologischen Pupillarwiderstand und fließt somit stoßweise in die Vorderkammer. Der zweite physiologische Widerstand wird im Trabekelwerk angenommen, über das etwa 85 Prozent des Kammerwassers in den Schlemm-Kanal abfließen und anschließend über Kammerwasservenien dem venösen System zugeführt wird. Die restlichen 15 Prozent des Kammerwassers werden über ein uveosklerales Gefäßsystem dem venösen Kreislauf zugeführt (Lang, 2019).

2.3.3 Zusammensetzung und Bestandteile

Das Kammerwasser wird zu einem Drittel durch Ultrafiltration des Blutes produziert und zu zwei Drittel durch aktiven Ionentransport. Aus diesem Grund hat das Kammerwasser eine vergleichbare Elektrolytzusammensetzung wie das Blutplasma. Die Proteinkonzentration ist insgesamt geringer, der Laktat-, Pyruvat- und Ascorbinsäurespiegel ist vergleichsweise erhöht.

Bei der Produktion spielt das Enzym Carboanhydrase eine wichtige Rolle. Über die Hemmung des Enzyms lässt sich die Produktion des Kammerwassers senken und der Augeninnendruck geht in der Folge zurück, was bei der Therapie des Glaukoms zum Einsatz kommen kann (Hahn, 2012).

2.4 Immunsystem

2.4.1 Allgemein

Im Allgemeinen ist das Immunsystem das Abwehrsystem des Menschen gegenüber fremden Substanzen, die in den Organismus eingedrungen sind und versuchen, diesen zu zerstören. Diesen Vorgang nennt man Immunreaktion (A. G. Johnson, 2001).

In der Literatur findet man viele verschiedene Möglichkeiten die Immunreaktion einzuteilen. Die häufigste verwendete Einteilung ist die der Spezifität, die sich in zwei Äste unterteilen lässt.

Der erste Ast beschreibt das angeborene oder auch unspezifische Immunsystem. Es kann, sobald es mit einem unspezifischen Erreger in Berührung kommt, reagieren und den Erreger vernichten. Dies ist also die Basisabwehr. Durch Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptor PRR) auf den Erregern werden die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert. Die Zellen, die zum angeborenen System gehören, sind sogenannte Fresszellen wie Granulozyten, Makrophagen und Monozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen und die Mastzellen. Außerdem gehört das Komplementsystem mit bestimmten Eiweißen zum angeborenen Immunsystem.

Der zweite Ast des Immunsystems ist das erworbene oder auch spezifische Immunsystem. Nicht nur Zellen wie T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen (aktivierte B-Zellen können sich zu Plasmazellen differenzieren) spielen bei diesem Immunsystem eine wichtige Rolle, auch Antikörper und Zytokine sind für die spezifische Immunität von Relevanz (Kaufmann, 2013; Schmetzer, 2015).

Wichtige Organe, die bei der Immunabwehr eine Rolle spielen, sind zentral der Thymus und das Knochenmark, in denen immunkompetente Zellen entstehen, und peripher die Milz, die Lymphknoten, die Tonsillen, Peyer-Plaques des Interstitium und die Mukosa, in denen Immunkompetenz exprimiert wird (A. G. Johnson, 2001).

Das Immunsystem ist medizinisch wichtig für den Schutz vor Infektionserkrankungen, Bildung von Tumoren, bei allergischen Reaktionen, Organtransplantationen und Autoimmunerkrankungen (A. G. Johnson, 2001).

2.4.2 Komplementsystem im Rahmen der Glaukopathogenese

Wie bereits erwähnt ist das Komplementsystem ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems. Das Komplementsystem beeinflusst allerdings nicht nur das angeborene Immunsystem, sondern auch das erworbene. Zu den Bestandteilen des Komplementsystems gehören 30 unterschiedliche Serumproteine, die zum Großteil in der Leber synthetisiert werden. Sowohl im Blut als auch membrangebunden können sie in Interaktion treten (Sarma & Ward, 2011). Sobald ein Komplementfaktor aktiviert wird, löst dies eine kaskadenartige Proteolyse aus und aktiviert einen weiteren Faktor.

Außerdem weisen verschiedene Bestandteile des Komplementsystems eine verstärkte Aktivität in der Retina von Glaukompatienten mit erhöhtem intraokulärem Druck auf (Kuehn et al., 2006). In einer Studie mit Mäusen wurden die Komponenten C3 und C5 bei am Glaukom erkrankten Mäusen hochreguliert identifiziert. Das Komplementsystem scheint somit zu einem Zellverlust bei der Erkrankung Glaukom zu führen (Reinehr et al., 2021).

Die Studiengruppe um Hubens et al. hat kürzlich durch eine Analyse herausgefunden, dass bei POAG Patienten ein signifikanter Anstieg im Blutserum und dem Kammerwasser von dem C3 Komplex zu verzeichnen ist (Hubens, Beckers, Gorgels, & Webers, 2021). Außerdem wurde eine Korrelation festgestellt zwischen den Komplement C3 Verhältnissen und der Rate der Krankheitsprogression. Somit lässt sich abschließend eine Hypothese aufstellen, dass die Aktivierung des Komplementsystems eine Rolle bei der Glaukomprogression spielt.

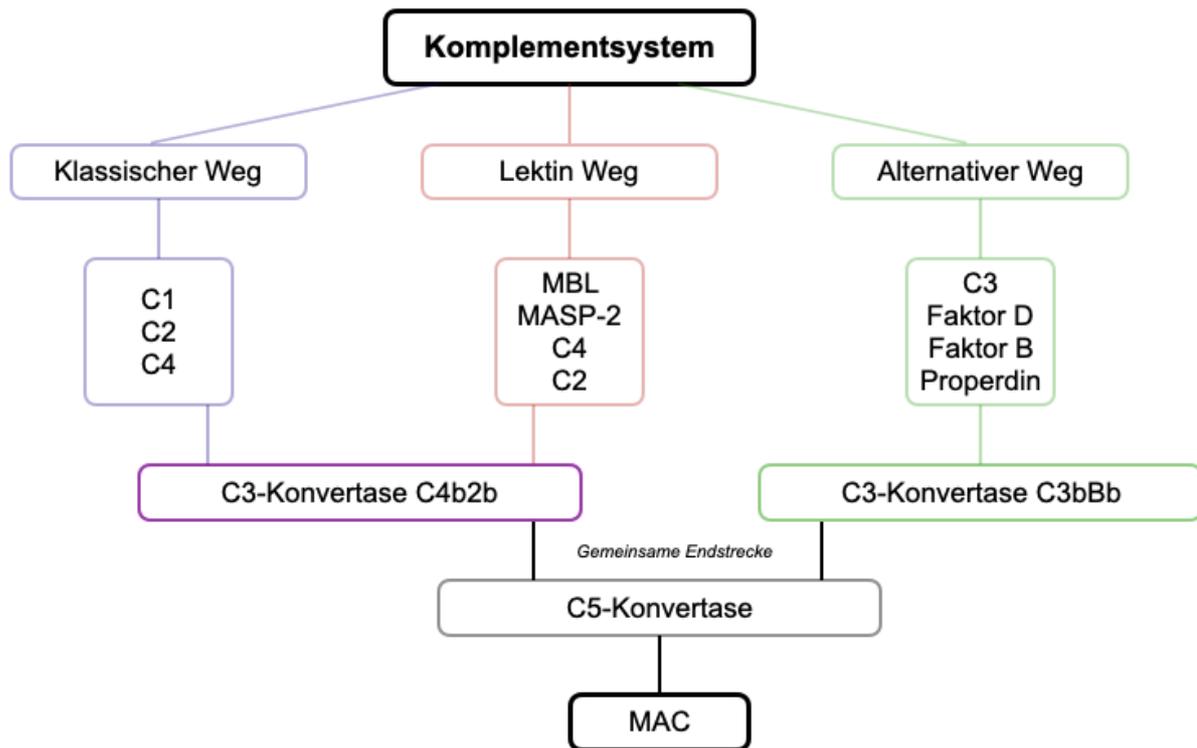


Abbildung 6 Komplementsystem

(Grafik Jill Brögmann) vereinfachte Darstellung des Komplementsystems

Wie in Abbildung 6 zu sehen, besteht das Komplementsystem aus zunächst drei unterschiedlichen Wegen, die entweder durch einen Antigen-Antikörper-Komplex, Kohlenhydratstrukturen auf pathogenen Oberflächen oder spontan aktiviert werden. Der erste Weg ist der klassische Weg. Daneben gibt es den sogenannten Lektinweg und als drittes den alternativen Weg. Alle Wege münden in die gemeinsame Endstrecke.

Beim klassischen Weg wird durch eine Antigen-Antikörper Reaktion mit IgG- und IgM-Antikörpern der Weg aktiviert. Zunächst wird der C1 Komplex aktiviert, der aus dem Faktor C1q, C1r und C1s besteht. Daraufhin werden wiederum Faktoren C4 und C2 aktiviert, wodurch am Ende die C3- Konvertase (C4b2b) entsteht.

Der Auslöser für die Reaktionskaskade des Lektinwegs sind gebundene pathogene Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche. Dadurch wird das Mannose- bindendes Lektin (MBL) und das Enzym MASP-2 sowie im Anschluss die Faktoren C4 und C2 aktiviert. Wie beim klassischen Weg entsteht dann die gleiche C3- Konvertase (C4b2b), über die folglich beide Wege in die gemeinsame Endstrecke münden.

Der alternative Weg wird spontan in Gang gesetzt und macht etwa 80 % der Komplementreaktionen aus (Merle, Noe, Halbwachs-Mecarelli, Fremeaux-Bacchi, & Roumenina, 2015). Die spontane Aktivierung erfolgt durch C3b, welches in den vorangegangenen Wegen generiert wird oder durch spontane Hydrolyse entsteht. C3b bindet im Anschluss an den Faktor B, der wiederum durch den Faktor D gespalten wird, und sodann eine C3- Konvertase (C3bBb) des alternativen Weges entstehen lässt. Durch Faktor P -Properdin- welches von neutrophilen Granulozyten produziert und nach Aktivierung freigesetzt wird, wird die C3- Konvertase stabilisiert, da diese sonst sehr kurzlebig ist.

An diesem Punkt trifft der alternative Weg auf die anderen beiden Wege und fusioniert zu einer gemeinsamen Endstrecke in der die C3- Konvertase die C5- Konvertase bildet. Die C5- Konvertase spaltet C5 zu C5a und C5b.

Es entsteht ein Membranangriffskomplex (MAC) mit C6 und C7, der in die Zellmembran eingebaut wird. Durch die zusätzliche Bindung von C8 und die Porenbildung von C9 in der Membran entsteht ein Einstrom von extrazellulärer Flüssigkeit in die Zelle, was zum Zelltod führt (Bhakdi & Trandum-Jensen, 1991). Aus diesem Grund wird dieser Reaktionsweg auch lytischer Komplex genannt.

Zudem entstehen aus der Spaltung von Komplementfaktoren weitere Fragmente wie C3a, C4a und C5a, die als Anaphylatoxine gemeinsam mit den Granulozyten zu lokalen Entzündungen führen (Köhl, 2001). Die Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem wie bereits oben erwähnt, stellen die Anaphylatoxine dar.

Außerdem kann durch Opsonierung von Pathogenen indirekt die Phagozytose antigenabhängiger Zellen erleichtert werden. Die Opsonierung beschreibt beim Komplementsystem die Markierung der Zielzelle mit einem Opsonin, damit die Zielzelle einfacher phagozytiert werden kann (Ricklin, Hajishengallis, Yang, & Lambris, 2010). Durch die Opsonierung können Phagozyten, meist durch das Molekül C5a, die Pathogene einfacher erkennen und zerstören.

Wie bei allen Mechanismen im menschlichen Körper gibt es auch beim Komplementsystem nicht nur Aktivatoren, sondern auch Regulatoren, damit das System im physiologischen Gleichgewicht bleibt. Die Carboxypeptidase lässt zum Beispiel die Faktoren C3a und C5a schneller abbauen (Sarma & Ward, 2011). Eine hemmende Wirkung haben unter anderem der Faktor H, DAF (decay acceleration

factor), Cd55, CD59, Vimentin, C4-bindendes Protein und S-Protein gegenüber dem Komplementsystem (Kawa, Machalinska, Roginska, & Machalinski, 2014).

Es wird vermutet, dass das Komplementsystem am retinalen Ganglienzelltod im Rahmen der Glaukopathogenese eine wichtige Bedeutung haben könnte, da bereits bei Glaukopatienten eine starke Veränderung der Antikörper-Reaktionen gegen körpereigene Strukturen festgestellt werden konnte (Xu & Chen, 2016).

2.4.3 Antikörper Aufbau und Funktion

Antikörper sind Proteine, die im Blutplasma vorhanden sind und dort von den Plasmazellen gebildet werden. Somit gehören die Antikörper zur erworbenen humoralen Immunantwort.

Eine Plasmazelle entwickelt sich aus einem B-Lymphozyten und produziert spezifische und einer bestimmten Klasse zugehörige Antikörper. Nach Zweitkontakt mit dem Antigen baut die B-Gedächtnis-Zelle eine stärkere Immunantwort auf.

Etwa 20% der Plasmaproteine sind Antikörper. Bei einer Elektrophorese findet man die Antikörper in der Fraktion der γ (Gamma)-Globuline. Um die Antikörper von anderen Proteinen sprachlich abzugrenzen, wird in der Literatur häufig der Ausdruck der Immunglobuline (Ig) verwendet.

Es gibt fünf Antikörperklassen: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE, auf die im Weiteren noch genauer eingegangen wird. Die Grundstruktur der unterschiedlichen Immunglobuline ist jedoch immer gleich aufgebaut und besteht aus zwei leichten Polypeptidketten (L-Kette) und zwei schweren Polypeptidketten (H-Kette). Diese sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden (A. G. Johnson, 2001; Kaufmann, 2013)(siehe Abbildung 7).

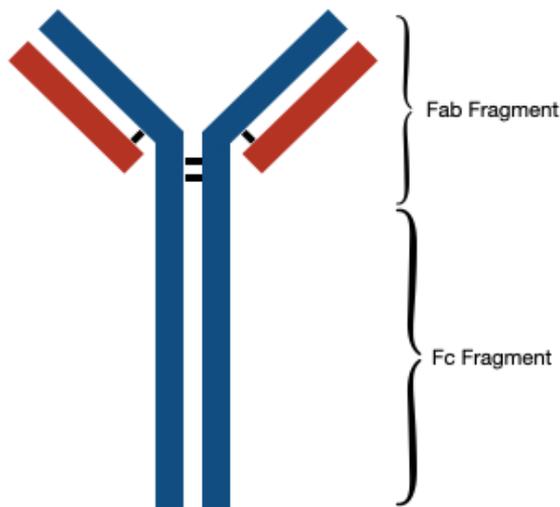


Abbildung 7 Grundstruktur eines IgG Antikörpers
(Grafik Jill Brögmann)

Das Fc Fragment enthält die rezeptorbildende Domäne des Antikörpers, über den das Komplementsystem aktiviert werden kann. Das Fab Fragment ist die Bildungsstelle zu Antigenen. Jedes Fab Fragment besteht aus zwei Aminosäureketten einer leichten Kette (rot) und einer schweren Kette (blau). Diesen sind über Disulfidbrücken (schwarz) miteinander verbunden.

Bei den verschiedenen Antikörperklassen unterscheidet sich die H-Kette an spezifischen Aminosäuresequenzen, die sich Isotypen nennen, und durch einen griechischen Buchstaben Gamma (γ), Alpha (α), My (μ), Epsilon (ϵ) und Delta (δ) gekennzeichnet werden.

Die Aminosäuresequenzen sind bei allen fünf Klassen an der L-Kette gleich. Unabhängig von ihrer Klassenzugehörigkeit besitzen alle Antikörpermoleküle entweder L-Ketten vom Kappa (κ)- oder Lambda (λ)-Typ (A. G. Johnson, 2001; Kaufmann, 2013).

2.4.3.1 Antikörperklassen

IgG

Dieser Antikörper kommt der Grundstruktur wie oben beschrieben am nächsten. Die IgG Antikörperklasse ist, die am höchsten dosierteste im Serum mit 700 - 1500 mg%, und hat eine Halbwertszeit von 18 – 25 Tagen. Die Struktur des Immunglobulins G sind Monomere. IgG ist allerdings nicht nur im Serum nachzuweisen, sondern konnte auch im Sekret-, Synovia-, Pleura-, Peritoneal- und Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden. Der Antikörper ist einer der wenigen, der die Plazentaschranke passieren kann. So können über das Blut mütterliche Antikörper zum Fetus transportiert werden. Durch die Bindung von IgG an Komplemente werden eine Reihe von Enzymen

aktiviert, die zu einer Zytolyse führen. Die IgG Klasse enthält die typischen Antikörper für die sekundäre Immunantwort und bildet somit ein Gedächtnis.

In dieser Arbeit werden die Immunglobuline der Klasse G bei Glaukumpatienten untersucht, wobei auch bei Patienten ohne Glaukomerkrankung IgG im Kammerwasser nachgewiesen werden können (A. G. Johnson, 2001; Kaufmann, 2013).

IgM

Die Klasse IgM enthält die typischen Antikörper für die primäre Immunantwort und ist somit als erste im Blut nachweisbar. Ein plötzlicher Anstieg des IgM Titers ist ein wichtiger Hinweis auf eine kürzliche Erstinfektion. IgM können kein immunologisches Gedächtnis bilden. Insgesamt machen IgM zehn Prozent des gesamt Immunglobulinvolumens aus. Die Struktur des Immunglobulins M ist ein Pentamer, aus fünf gleichen Untereinheiten(A. G. Johnson, 2001; Kaufmann, 2013).

IgA

Die Konzentration von IgA im Serum, in dem es hauptsächlich als Dimer vorkommt, liegt bei etwa 15 Prozent und einer Halbwertszeit von sechs Tagen. Bedeutungsvoller ist jedoch das sekretorische IgA, welches sich in Schleimhautgewebe, Speichel, Tränenflüssigkeit und Kolostrum befindet. Dieses bildet eine Abwehrbarriere für Krankheitserreger wie Bakterien, Viren und Toxine (A. G. Johnson, 2001; Kaufmann, 2013).

IgD

Die Immunglobuline der Klasse D findet man gemeinsam mit den IgM vor allem auf Membranen der Lymphozyten des peripheren Blutes. Der Anteil des Moleküls liegt bei unter einem Prozent im Blutplasma und hat eine Plasmahalbwertszeit von zwei bis drei Tagen. Die Funktion dieser Klasse besteht darin, an den ruhenden B-Zellen als Hauptantigenrezeptor zu binden (A. G. Johnson, 2001; Kaufmann, 2013).

IgE

Die Konzentration des freien IgE im Serum ist sehr gering und die geringste von allen Klassen. Die hohe Affinität zu gewebeständigen Zellen wie den Mastzellen und zirkulierenden Zellen wie den basophilen und eosinophilen Granulozyten macht den größeren Anteil dieser Klasse aus. Auf diesen Zellen funktioniert das IgE wie ein Antigenrezeptor. Wenn nun ein Antigen bindet werden Mediatoren der anaphylaktischen Reaktion freigesetzt, was eine Sofortallergie hervorruft.

Im Gegensatz zu den IgG kann diese Klasse nicht die Plazentaschranke überwinden und auch keine Komplemente binden (A. G. Johnson, 2001; Kaufmann, 2013).

2.4.4 Autoantikörper

Diese Art von Antikörper richtet sich gegen körpereigene Antigene und führt nicht selten zu einer Autoimmunreaktion (Kaufmann, 2013). Unter anderem sind diverse Schilddrüsenerkrankungen, Diabetes mellitus Typ 1, rheumatoide Arthritis, Myasthenia gravis oder auch der systemische Lupus erythomatosus ein Resultat des Angriffs von Autoantikörpern auf körpereigene Antigene. Es ist jedoch nicht bewiesen, dass die Autoantikörper für die Manifestation der Autoimmunerkrankungen verantwortlich sind. Viel mehr können sie als Marker dienen, um die Erkrankung möglichst früh zu detektieren und einzudämmen (C. DeMarshall et al., 2015; Scofield, 2004). Darüber hinaus konnten nicht nur bei erkrankten Patienten Autoantikörper festgestellt werden, sondern diese ließen sich auch bei gesunden Individuen bestimmen (Lacroix-Desmazes et al., 1998; Li et al., 2006).

Bereits im Jahr 2003 versuchte Poletaev et al. (Poletaev & Osipenko, 2003) mit seiner Veröffentlichung eine grundsätzliche Einführung des „Immunculus“, in Anlehnung an den Homunculus, zu erreichen. Die Studiengruppe verglich das Immunsystem mit einem Mosaik, welches ein komplexes Netzwerk aus natürlichen Autoantikörpern darstellt. Deswegen würde es schwerwiegende Folgen mit sich bringen, wenn man eine Veränderung in dem „Mosaikbild“ vornimmt. Die Autoantikörper, die vorliegen, sind also nicht direkt als pathologisch zu erachten. Sie haben vielmehr eine protektive Eigenschaft gegenüber den Antigenen. Erst ein Ungleichgewicht von Antikörpern und Antigenen kann zu einer Pathogenese führen (Poletaev & Osipenko, 2003). Vor allem wenn es zu einer erheblichen und anhaltenden Abweichung des optimalen Zustandes des Immunsystems kommt, versucht das natürliche und erworbene Immunsystem erneut das System auf einen optimalen, bereits bekannten Zustand, der immer wieder neu kontrolliert und abgespeichert wird, zurückzuführen. Dazu bedient sich das Immunsystem an einem „Bild des optimalen Zustands sein soll, und versucht diesen durch kompensative oder reparative Prozesse wieder zu erreichen (Poletaev & Boura, 2011).

2.4.5 Einfluss auf das Glaukom

Wichtige, bereits durch Studien belegte Erkenntnis ist, dass Autoantikörper nicht nur eine schädigende Wirkung auf den Organismus ausüben, sondern auch protektiv wirken (Shoenfeld & Toubi, 2005). Bereits in den frühen 1980er Jahren wurde ein genetischer Bezug zum Glaukom hergestellt und seit den späten 1990er Jahren wird angenommen, dass das Glaukom eine Autoimmunkomponente aufweist (Nadine Auler, Henrik Tonner, Norbert Pfeiffer, & Franz H. Grus, 2021).

Weitere zahlreiche Studien haben belegt, dass unterschiedliche Autoantikörper bei Glaukompatienten nachgewiesen werden konnten. Die am häufigsten untersuchten Proteine in den vergangenen Studien waren bisher Hitzeschockproteine, Rhodopsin, Glutathion-S-Transferase oder die Glykosaminoglykane (Grus et al., 2006; Romano, Barrett, Li, Pestronk, & Wax, 1995; Tezel, Seigel, & Wax, 1998; M. Wax, Yang, & Tezel, 2002; M. B. Wax, Barrett, & Pestronk, 1994; M. B. Wax et al., 1998; Yang, Tezel, Patil, Romano, & Wax, 2001).

Zu Beginn der Betrachtungen wurden vor allem Serumproben untersucht.

Schon im Jahr 1994 entdeckte eine Forschergruppe, dass humorale, immunologische Mechanismen eine wichtige Rolle bei der optischen Neuropathie von Glaukompatienten spielen können. Dabei wurden im Serum der Patienten veränderte Autoantikörper gegen das Sjögren-Syndrom-A-Antigen gefunden (M. B. Wax et al., 1994). Auf Basis dieser Erkenntnisse untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen die Autoantikörper-Reaktionen gegen bestimmte Antigene für die unterschiedlichen Glaukomformen, wie dem primären Offenwinkelglaukom (Grus et al., 2006; M. B. Wax, Tezel, Kawase, & Kitazawa, 2001), dem Normaldruckglaukom (Grus et al., 2006; M. B. Wax et al., 2001) oder dem Pseudoexfoliationsglaukom (Joachim, Wuenschig, Pfeiffer, & Grus, 2007). Dabei fiel auf, dass sich die Autoantikörper-Reaktionen bei den einzelnen Glaukomformen unterscheiden (Joachim, Reichelt, Berneiser, Pfeiffer, & Grus, 2008; Joachim, Wuenschig, et al., 2007; M. B. Wax et al., 2001).

Nach einigen Jahren begannen Forschergruppen zusätzlich zum Serum das Kammerwasser der Erkrankten genauer auf Autoantikörper zu untersuchen. Die Besonderheit im Vergleich zum Serum besteht darin, dass das Kammerwasser das Ultrafiltrat des Blutes darstellt - wie im Abschnitt Kammerwasser genauer beschrieben - und auch im direkten Kontakt zu den anatomischen Strukturen steht, die bei der Glaukopathogenese von Bedeutung sind. Bei den Versuchen mit Kammerwasser wurden einige Autoantikörper-Reaktionen untersucht, mit dem Ergebnis, dass diese auf die unterschiedlichen Formen des Glaukoms zurückgeführt werden können

(Joachim, Bruns, Lackner, Pfeiffer, & Grus, 2007; Joachim, Wuenschig, et al., 2007). Diese Studien stützen die These, dass dem Kammerwasser eine Eigenmodulation bei immunologischen Vorgängen zugeschrieben werden kann (Mochizuki, Sugita, Ishikawa, & Watanabe, 2000; Niederkorn, 1999).

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der longitudinalen Veränderung der IgG im Kammerwasser von Glaukumpatienten. Das Ziel ist, herauszufinden, ob sich einzelne Antikörper im Kammerwasser mit Fortschreiten der Krankheit verändern oder in der Konzentration ab- oder ansteigen. Daraus lassen sich Schlussfolgerungen zur Pathogenese ziehen, die auf der Ebene des Immunsystems derzeit nicht ausreichend erforscht sind, um in der Diagnostik angewandt werden zu können.

Bestenfalls lassen sich somit einzelne Biomarker, die für die Progression des Krankheitsbildes Glaukom verantwortlich sind, bestimmen.

Medizinisch betrachtet würde eine klare Analyse des Immunsystems und Feststellung von Antikörpern, die an der Progression beteiligt sind, zu einer Diagnose-Strategie-Entwicklung beitragen, die das Ausbrechen oder Voranschreiten der Glaukomerkrankung unterbindet.

In einigen vorangegangenen Studien wurden bereits Autoantikörper bezogen auf das Glaukom identifiziert. Diese Studien untersuchten vor allem das Serum der Erkrankten mittels Protein-Microarray-Analyse. Dabei zeigten verschiedene Autoantikörper ein niedrigeres oder erhöhtes Antikörperlevel (Grus, Joachim, Hoffmann, & Pfeiffer, 2004; Joachim, Grus, & Pfeiffer, 2003). Durch diese Studien wurden bereits einzelne Antikörper identifiziert, deren potenzielle Autoantikörper-Biomarker für die Diagnose eines Glaukoms hilfreich sein könnten.

Es ist schon länger bekannt, dass die Identifizierung von Biomarkern die Früherkennung von Krankheiten ermöglichen kann. Heutzutage finden molekulare Biomarker bereits in der Diagnostik und der frühzeitigen Einschätzung des Behandlungserfolges reale Anwendungsszenarien.

Biomarker werden als ein objektiver, quantifizierbarer und/oder qualifizierbarer biologischer Indikator für ein Ereignis oder einen Prozess im Organismus verwendet. Die Biomarker sollten nach der Abhängigkeit ihrer Verwendung als diagnostischer Marker, als Parameter für die Schwere einer Erkrankung oder als Anhaltspunkt das

Fortschreiten einer Krankheit oder das Ansprechen auf eine Therapie in Anlehnung an die Richtlinie der US Food and Drug Administration (FDA) definiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Geräte

Material

Humphrey HFA II 750i

Octopus 900

Eppendorf Concentrator 5301

Eppendorf Reference® Pipette

sciFLEXARRAYER® S3

Spotting Nadel PDC 60

Kühlthermomixer
(Orbitalschüttler)

SensoSpot®
(Fluorescence Microarray Reader)

Hersteller

Carl Zeiss Meditec AG, Jena, D

Haag-Streit International AG, Koeniz, Ch

Eppendorf AG, Hamburg, D

Eppendorf AG, Hamburg, D

Scienion AG, Berlin, D

Scienion AG, Berlin, D

HLC Bio Tech, Bovenden, D

Miltenyi Biotec, Radolfzell, D

Chemikalien

Material

Nitrocellulose FilmSlides
ONCYTE® AVID

DPBS
(Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline)

Tween 20

Super G Blocking Buffer

Humanes IgG

Water HPLC grade

Affini Pure Goat Anti-Human IgG

Ausgewählte Antigene

(siehe Anlage 2)

Kammerwasser

Hersteller

Grace Bio-Labs, Bend, USA

Gibco, Carlsbad, USA

ICN Biomedicals, Meckenheim, D

Grace Bio Labs, Bend, USA

Sigma Aldrich, St. Louis, USA

PanReac, AppliChem, Darmstadt, D

Alexa Fluor®647, Jackson

ImmunoResearch, West Grove, USA

Lösung: 0,5% Tween-DPBS (100ml)

DPBS	99,5ml
Tween 20	500 µl

Software und Datenbanken

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Microsoft® Office Professional 2021 (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Autodrop-detection Software	Scienion AG, Berlin, D
sciDrop-Volume	Scienion AG, Berlin, D
ImaGene® 5.5	BioDiscovery, Los Angeles, USA
Statistica®	Statsoft, Tulsa, USA
SwissProt	UniProt Consortium (www.uniprot.org)
Endnote® X9	Clarivate Analytics, USA

3.2 Methode

3.2.1 Kammerwasserentnahme

Im Rahmen jeder Trabekulektomie oder Kataraktoperation wurde in der Uniklinik Mainz dem Auge Kammerwasser entnommen, sofern eine Zustimmung durch den Patienten vorlag. Der Patient wurde im Vorfeld ausführlich über die geplante Verwendung informiert. Eine Genehmigung der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (Mainz) ermöglichte die wissenschaftliche Verwendung der entnommenen Proben.

Sofern möglich wurde eine Entnahme von ungefähr 50 bis 100 µl des Kammerwassers vorgenommen. Dieses Volumen reichte für die wissenschaftliche Verwendung und Weiterverarbeitung im Labor aus. Die Kammerwasserprobe wurden intraoperativ mit einer kleinen Spritze abgesaugt. Dabei ist darauf zu achten, dass diese nicht mit Spülflüssigkeit oder Blut kontaminiert wurde. Die Entnahme erfolgte aus diesem Grund zu Beginn des operativen Eingriffs. Das Kammerwasser wurde im Anschluss in einem Eppendorfgefäß in einem Tiefkühlgerät bei -80°C gelagert.

3.2.2 Patientenauswahl

Über mehrere Jahre wurden in der Augenklinik der Uniklinik Mainz wie oben beschrieben alle Kammerwasserproben von Patienten, die ihr Einverständnis erklärt

haben, gesammelt. Dadurch konnte eine Datenbank im Labor der Augenklinik erstellt werden, in der die relevanten Daten aller Patienten in Relation gesetzt werden konnten.

Um einen longitudinalen Vergleich zu erzielen, wurden aus dieser Datenbank von über 2000 Patienten die Patienten ausgewählt, die mehr als eine Trabekulektomie oder Kataraktoperation in der Uniklinik durchführen ließen.

Für die ausgewählten Patienten wurde ein Datenblatt ausgefüllt (siehe Anhang 1). Dieses dokumentierte, welche Augenerkrankungen vorlagen, ob Allgemeinerkrankungen bei dem Patienten diagnostiziert wurden und ob eventuell Medikamente regelmäßig eingenommen wurden. Darüber hinaus wurden alle operativen Eingriffe an beiden Augen, der Visus, Ergebnisse aus Messungen des Augeninnendrucks sowie die Parameter der Gesichtsfelduntersuchung festgehalten. Die patientenspezifischen Daten wurden im Anschluss in einer Excel® Tabelle niedergeschrieben.

Es gab teilweise nicht ausreichende klinische Daten. Dies kann unterschiedliche Gründe haben wie zum Beispiel eine Überweisung mit bereits vorhandenen Messdaten des Gesichtsfeldes oder Augeninnendruckmessung.

Es kommt sehr häufig vor, dass die Patienten nach einer erfolgten Operation nicht mehr zur Abschlussuntersuchung vorstellig werden. Somit fehlen dann auch die klinischen Parameter nach der Operation. Außerdem fehlte bei einigen Patienten eine klare Diagnose von Allgemeinerkrankungen.

3.2.3 Versuchsdurchführung mit Protein-Microarray

In der Vergangenheit wurde bereits für Studienarbeiten im Labor der Augenklinik Mainz die Protein-Microarray Technologie zur Analyse von Antikörpermustern in menschlichen Serumproben verwendet. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Kammerwasserproben der Probanden auf longitudinale Veränderungen der Antikörper ebenfalls mittels der Microarray Technologie untersucht.

Die Versuchsdurchführung wurde durch geschultes Personal ausgeführt.

Spotten

Zu Beginn werden mit Hilfe des Sciflexarrayer® S3 Gerät, die zu untersuchenden Antigene, die sich schon in anderen Studien als wichtige Marke herausgestellt haben (siehe Anlage 2) auf eine Nitrocellulose Film Slide aufgetragen. Dazu ist es im Vorfeld nötig, alle Proteine auf eine Konzentration von 1mg/ml einzustellen.

Das Array-Gerät war ein Non-contact-Spotter und funktioniert piezoelektrisch. Das piezoelektrische Funktionsprinzip basiert auf einer Glasnadel mit einem außerhalb liegenden Keramikanteil, mit der die Flüssigkeiten aufgenommen werden. Durch eine elektrische Spannung wurde der Keramikanteil der Glasnadel kontrahiert und ein definierter Tropfen wurde präzise ausgegeben. Insgesamt wurden jeweils drei Tropfen, immer mit einer Menge von ca. 300 pl, platziert, sodass ein sogenannter Spot aus drei Tropfen mit einer Menge von insgesamt ca. 1 nl entstand. Um eine Qualitätssicherung der Tropfen zu gewährleisten, war es wichtig, dass sowohl die Form der Tropfen, der Abstand der Tropfen zueinander, als auch die Auslenkung (Flugbahn) ständig überprüft wurden. Dies wird über den Einsatz einer Autodrop-detection Software und Scidrop-Volume Software sichergestellt.

Die Fixierung der Proteine wurde durch die Nitrocellulose- Beschichtung der Slides (Objektträger) ermöglicht. Durch die polaren Wechselwirkungen auf molekularer Ebene haften die Proteine nach dem Auftragen fest auf den Slides.

Die Spots mit den drei Tropfen sind in sogenannte Subarrays (Felder) mit jeweils 41 solcher Spots organisiert. Ein Spot je Subarray wurde mit einer Positivkontrolle in Form von humanem IgG betropft. Die 40 übrigen Spots wurden mit den zuvor ausgewählten Antigenen belegt.

Auf jedem Slide wurden 16 Subarrays aufgebracht. Ein Subarray wurde bei jedem Slide als Negativkontrolle verwendet, indem auf diesem nur PBS inkubiert wurde.

Auf den verbleibenden Subarrays konnte jeweils eine Kammerwasserprobe untersucht werden. Mit jedem Slide ließen sich demnach insgesamt 15 Kammerwasserproben analysieren.

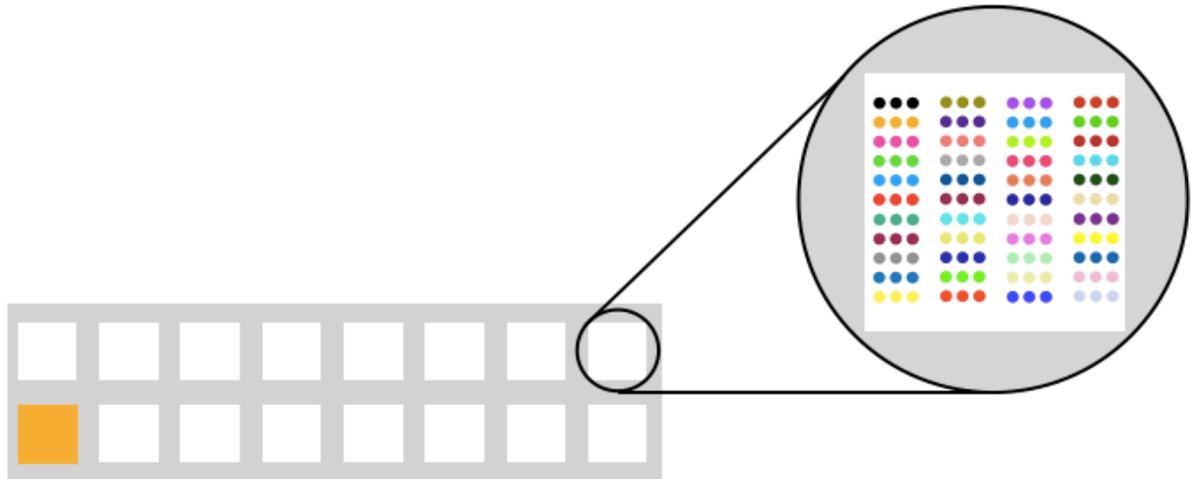


Abbildung 8 Slides mit gespotteten Proteinen

(Grafik Jill Brögmann)

Die Vergrößerung rechts stellt schematisch dar, wie ein Subarray nach dem Spotten der 40 unterschiedlichen Antigene und einer Positivprobe aussieht

Das orange markierte Subarray stellt schematisch die Negativkontrolle, welche mit PBS inkubiert wurde, dar. Die Positivkontrolle ist in jeden Subarray als Spot inkubiert, wie Tabelle 3 zu entnehmen.

Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5	Spalte 6	Spalte 7	Spalte 8	Spalte 9	Spalte 10	Spalte 11	Spalte 12
HSPD1	HSPD1	HSPD1	NTF3	NTF3	NTF3	GST	GST	GST	VIM	VIM	VIM
CLTA	CLTA	CLTA	SPTA1	SPTA1	SPTA1	ADRB2	ADRB2	ADRB2	b-S-Crys	b-S-Crys	b-S-Crys
HSPA1A	HSPA1A	HSPA1A	ANXA5	ANXA5	ANXA5	SNCG	SNCG	SNCG	VDAC2	VDAC2	VDAC2
CALD1	CALD1	CALD1	TOP1	TOP1	TOP1	GAPDH	GAPDH	GAPDH	14-3-3 a/b	14-3-3 a/b	14-3-3 a/b
IQGAP1	IQGAP1	IQGAP1	PNMA2	PNMA2	PNMA2	MCM7	MCM7	MCM7	MCTS1	MCTS1	MCTS1
C1QBP	C1QBP	C1QBP	TARS	TARS	TARS	ANP32B	ANP32B	ANP32B	FLNA	FLNA	FLNA
GFAP	GFAP	GFAP	TNNI3	TNNI3	TNNI3	Cyclo. A	Cyclo. A	Cyclo. A	g-Syn	g-Syn	g-Syn
NSE	NSE	NSE	LPPR3	LPPR3	LPPR3	CLUS	CLUS	CLUS	CALR	CALR	CALR
b-L-Crys	b-L-Crys	b-L-Crys	SOD	SOD	SOD	ACTN1	ACTN1	ACTN1	COPA	COPA	COPA
HNRNPF	HNRNPF	HNRNPF	HSP27	HSP27	HSP27	TGFB111	TGFB111	TGFB111			
CLTA	CLTA	CLTA	ADRB2	ADRB2	ADRB2	SNCG	SNCG	SNCG	ACT	ACT	ACT
			Printing buffer	Printing buffer	Printing buffer	IgG 0.08g/L	IgG 0.08g/L	IgG 0.08g/L			

Tabelle 3 schematische Anordnung aller Antigene auf einem Subarray

Proteinbestimmung des Kammerwassers

Da die Proteinkonzentration bei allen Proben unterschiedlich hoch ist, wurden diese aneinander angeglichen. Mit Hilfe des BCA Assay wurde zunächst die unterschiedliche Konzentration ermittelt, um diese im Anschluss anzupassen. Die Konzentrationsgrenze der Proteine im Kammerwasser wurde bei 0,7 mg/ml festgelegt. Um diesen standardisierten Wert zu erreichen, wurde den Proben, die über diesem Wert lagen, eine ausreichende Menge PBS zugeführt, sodass alle Kammerwasserproben diese Konzentration aufwiesen.

BCA Test

Dieser Test wurde im Jahr 1985 von Smith et al. entwickelt und basiert auf einer kolorimetrisch nachweisbaren Farbreaktion (Smith et al., 1985). Diese Methode macht allerdings nur eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration in der Probe möglich, ob die Qualität der Proteine ausreichend ist, kann nicht ermittelt werden.

Zu 10 µl der Kammerwasserprobe wurden 190µl Farbenreagenz auf eine Mikrotiterplatte hinzugefügt. Die Farbenreagenz bestand aus zweiwertigen Kupferionen und Bicinchinonsäure-Molekülen. Zunächst reagierten die zweiwertigen Kupferionen mit den anwesenden Proteinen zu einwertigen Kupferionen und eine grüne Lösung entstand. Die Lösung färbte sich violett, wenn die einwertigen Kupferionen mit zwei Molekülen der Bicinchinonsäure reagierten. Die Inkubationszeit für diesen Arbeitsschritt betrug 30 min und wurde bei 37°C in einem Brutschrank durchgeführt. Die Inkubationsschritten sollten auf Grund der Reaktionszeit beim BCA Assay bei allen Proben gleichzeitig erfolgen, da die Reaktionszeit proportional zum Farbumschlag ist. Die Inkubationszeit sollten zu den gleichen Bedingungen und den gleichen Zeitraum bei allen Proben aufweisen, damit der Farbumschlag ausschließlich auf Unterschiede im Proteingehalt zurückgeführt werden kann.

Nachfolgend wurde die Proteinkonzentration in einem Photometer bestimmt. Das Absorptionsmaximum lag bei 562nm. Im Anschluss konnte für jede einzelne Probe errechnet werden, wie viel PBS der Probe zugeführt werden musste, um die vorher festgelegte Konzentrationsgrenze von 0,7 mg/ml zu erreichen.

Inkubation

Die mit Antigenen beschickten Slides wurden nun für die Applikation mit dem Kammerwasser vorbereitet. Zur Trennung der einzelnen Subarrays wurde auf jedes Slide eine Inkubationskammer gelegt. Alle Arbeitsvorgänge der Inkubation fanden in einem Orbitalschüttler bei 4°C statt. Die Inkubation erfolgte immer genau nach den Arbeitsschritten aus einem von der Arbeitsgruppe entwickelten Ablaufprotokoll:

1. **Blocking:** Es wurden 100 µl von der Lösung SuperG blocking auf die Objektträger aufgetragen und für eine Stunde in den Orbitalschüttler gestellt. Hierbei wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Oberfläche blockiert.
2. Die überschüssige Lösung wurde abgesaugt.
3. **Waschen:** Diese erfolgte mit PBS und 0,5% Tween, um ungebunden SuperG blocking Moleküle zu entfernen. Das Waschen erfolgte in einem kurzen und drei langen Waschvorgängen. Im Anschluss wurde der Slide für zehn Minuten in den Orbitalschüttler gestellt.
4. Die überschüssige Lösung wurde abgesaugt.
5. **Kammerwasserproben aufbringen:** Nun wurden 100 µl der Kammerwasserprobe mit einer Konzentration von mindestens 0,7 mg/ml auf die Subarrays aufgetragen. Pro Subarray wurde eine Kammerwasserprobe pipettiert. Um die Inkubation zu ermöglichen, war eine feuchte Umgebung notwendig. Dazu wurde ein Slide zusammen mit einem befeuchteten Tuch in eine luftdicht verschlossene Box gelegt. Die Box wurde für eine Inkubationszeit von 16 Stunden im Orbitalschüttler gedreht.
6. Das Kammerwasser wurde abgesaugt.
7. **Waschen:** Wiederholung der Schritte aus Punkt 3
8. **Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper aufbringen:** Zunächst wurde der sekundäre Antikörper (Hersteller: Alexa Fluor 647 AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcy fragment specific, 109-605-008, Jackson Immunoresearch) in einem Verhältnis von 1/500 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden 100 µl dieser Lösung auf jedes Subarray aufgetragen. Die Inkubationszeit dieses Schrittes im Orbitalschüttler betrug eine Stunde.
9. Die Sekundärantikörper wurden abgesaugt

10. **Waschen:** Der letzte Waschschrift erfolgt, anders als die vorangegangenen, einmal kurz und einmal lang mit PBS und 0,5 % Tween und im Anschluss zweimal lang mit HPLC grade Wasser.
11. Die überschüssige Lösung wurde abgesaugt.
12. **Trocknung:** Der Objektträger wurde für zwei Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

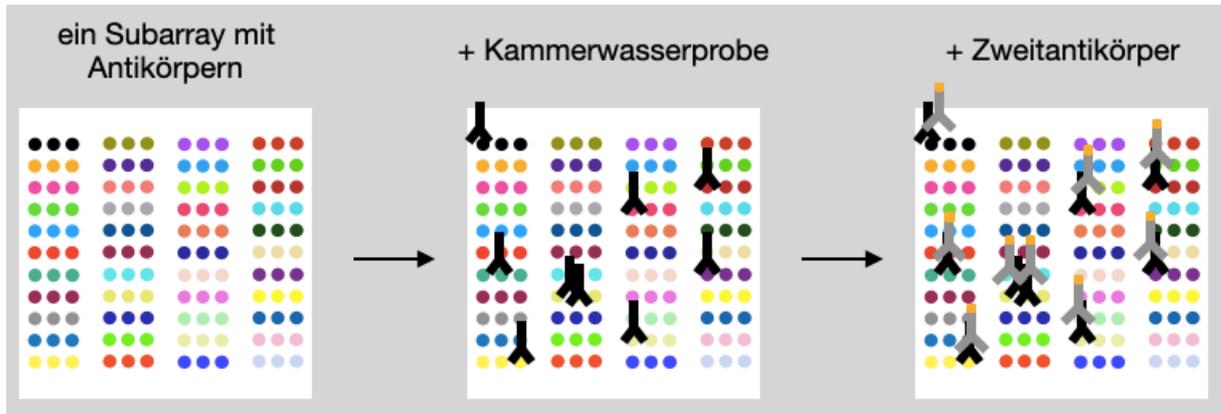


Abbildung 9 Schritte der Inkubation

(Grafik Jill Brögmann)

Scannen

Zum Auslesen der Objektträger wurde das Gerät Sensospot von Sensovation® verwendet, welches mit Hilfe einer CCD - Kamera bei einer Wellenlänge von 633 nm die Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper anregt, welche wiederum eine Emissionswellenlänge von 647 nm abgeben. Das dabei entstandene Signal wurde durch einen Photosensor in elektrische Impulse übersetzt und konnte so in eine Datei umgewandelt werden. Die Ergebnisse wurden als 16-bit TIFF (tagged image file format) -Bilddateien abgespeichert.

Aus den Bilddateien wurden im Anschluss mit der Software ImaGene® die Intensitäten der einzelnen Spots ermittelt. Zusätzlich wurde auch die Hintergrundintensität erfasst. Auch die Qualität der Spots wird in diesem Schritt berücksichtigt. Darunter fallen die Größe, die Form und die Position auf dem Objektträger.

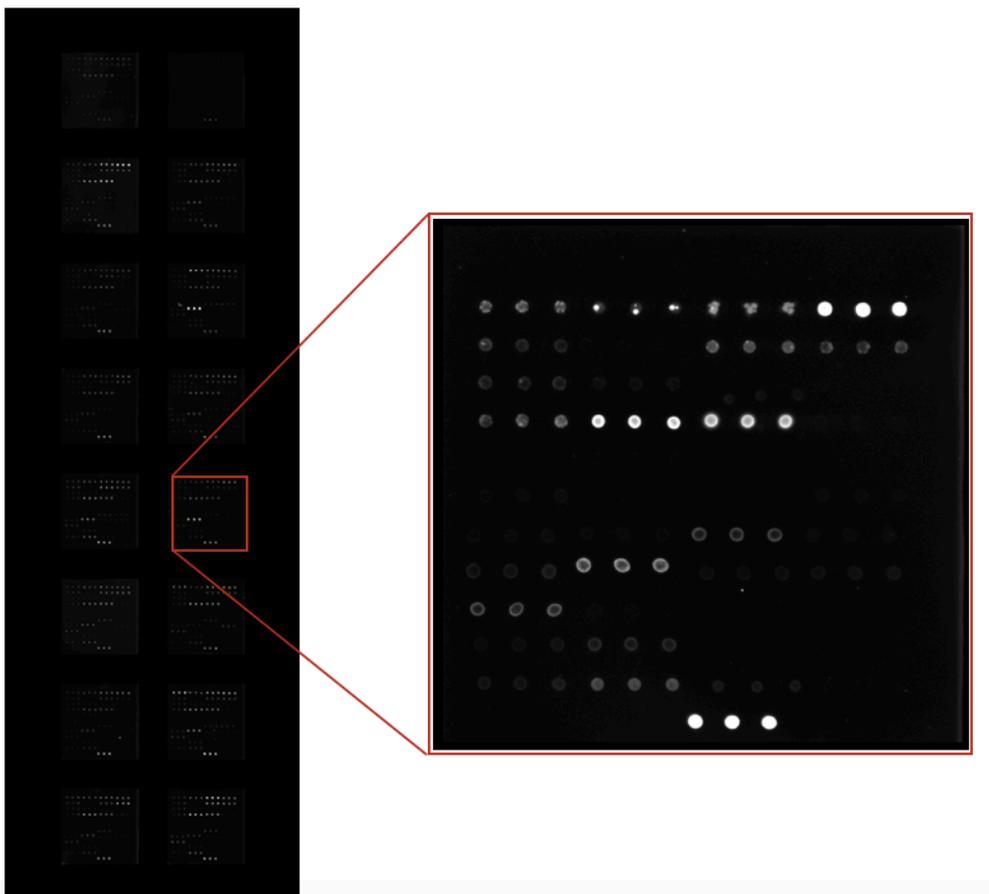


Abbildung 10 Scan eines Slids

Rechts ist ein kompletter Objektträger nach dem Scan zu sehen. Links ist ein Subarray in Vergrößerung abgebildet. 15 Subarrays sind mit den Antigenen inkubiert, ein Subarray mit der Negativkontrolle. Die Positivkontrolle ist wie in Tabelle drei zu sehen, auf jedem Subarray inkubiert

3.2.4 Statistische Auswertung

Grenzwerte bestimmen

Das Ergebnis der Scans aller 18 Slides wird in tabellarischer Form ausgegeben. Jedes Subarray wurde dabei in die einzelnen Spots mit deren Intensität aufgeschlüsselt.

Zu Beginn der Auswertung wurde der Grenzwert, auch LOD (limit of detection, deutsch: Detektionslimit) genannt, für jedes einzelne Antigen definiert, um fehlerhafte oder unzureichende Ergebnisse auszuschließen. Die Berechnung des Grenzwertes erfolgt anhand der Negativkontrolle, des mit PBS inkubierten Subarrays, wie folgt:

$$\text{Grenzwert} = \text{Mittelwert von PBS} + 2 \times \text{Standardabweichung von PBS}$$

Der Mittelwert (MD) eines jeden Antikörpers ergibt sich wie folgt:

$$\text{Mittelwert von Protein X} = \frac{\text{Intensität aller drei Spots des Protein X addiert}}{\text{Anzahl der validen Spots}}$$

Der ermittelte Grenzwert wurde verwendet, um Intensitäten von Antikörper auszuschließen, die unter dem Detektionslimit lagen.

Antikörper, die bei weniger als 50% der Patienten detektiert werden konnten wurden für weitere Analysen ausgeschlossen.

Normalisierung

Außerdem war eine Normalisierung der Microarray Daten notwendig, um diese vergleichbarer zu machen und technische Varianzen auszugleichen.

Dafür wurden mit Hilfe der Positivkontrolle die Intensitäten der Subarrays angeglichen.

Für jedes Subarray wurde ein Normalisierungsfaktor berechnet:

$$\text{Normalisierungsfaktor (Subarray)} = \frac{\text{humanes IgG (Subarray)}}{\text{Durchschnitt aller humanen IgG}}$$

Der daraus resultierende, subarrayspezifische Normalisierungsfaktor wurde auf die Intensitäten der einzelnen Spots dieses Subarrays angewandt.

Statistische Methoden

Die Signalstärke, die beim Scannen der einzelnen Objektträger gemessen wird, entspricht keiner Normalverteilung. Dies liegt daran, dass die maximale Signalstärke bei 65535 liegt, demnach höhere Werte nicht gemessen werden können, da sie in der Sättigung liegen. Alle weiteren Werte, die darüber liegen würden, können nicht mehr differenziert werden und ergeben somit auch einen Wert von 65535.

Für das statistische Auswerten ist deshalb der Spearman Rho Test für die Korrelationsanalyse und der Kruskal-Wallis Test für die Varianzanalyse notwendig.

Korrelationsanalyse nach Spearman Rho

Mit dem Test nach Spearman können lineare Zusammenhänge zwischen zwei Variablen errechnet werden. Die Korrelation wird mit dem sogenannten Korrelationskoeffizienten $= r$ angegeben. Der Spearman Rho Korrelationskoeffizient ist ein Maß für die Stärke eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen.

Der genaue Abstand der Datenerhebung ist nicht von Relevanz. Der Koeffizient r kann Werte von $+1$ bis -1 annehmen. Wenn ein Wert von $r = +1$ oder $r = -1$ erreicht wird, geht man davon aus, dass Datenpunkte genau auf der Linie der besten Anpassung liegen und nicht davon abweichen. Wenn der Koeffizient $r = 0$ ergibt, dann liegt kein Zusammenhang der Variablen vor, wenn der Wert $r > 0$ ist, dann ist dies eine sogenannte positive Assoziation, was in diesem Fall bedeutet, dass beide Variablen ansteigen. Dem gegenüber steht eine negative Assoziation: wenn $r < 0$, muss man davon ausgehen, dass der Wert einer Variablen steigt und der Wert der anderen Variablen sinkt. Je näher der Wert r an 0 liegt, desto größer ist die Variation um die Linie der besten Anpassung.

Die Korrelationsanalyse nach Spearman wird bei nicht normalverteilten Daten verwendet.

Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis

Anhand des Kruskal-Wallis Test können unabhängige Studienproben - hier Kammerwasserproben von mehreren Patienten und unterschiedlichen Operationsdatum - auf den Unterschied der zentralen Tendenz untersucht werden. Dieser Test berücksichtigt, dass nicht alle Studienproben die gleiche Verteilung haben.

Es wurde bei beiden Analysen ein Alpha Level von $p < 0,05$ festgelegt. Im anschließenden Abschnitt „Ergebnisse“ sind in allen Tabellen der Korrelationskoeffizient r aufgeführt. Dieser Wert ist ein Maß für die Effektstärke. Je mehr der Wert von Null abweicht, desto stärker der Effekt.

Progression

In der Medizin verwendet man den Begriff Progression für die Beschreibung der Verschlechterung bzw. Verschlimmerung des Krankheitszustandes. Eine Verschlechterung des Sehvermögens geht also mit einer zunehmenden Progression einher. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Progression des MD Wert-Verlustes gegen die Zeit hinzugezogen. Der MD-Wert ist ein nützlicher Wert, um den Sehnerv-Verlust der am Glaukom erkrankten Patienten in Bezug auf die Zeit zu verdeutlichen. Eine Trendlinie, die sich durch alle Punkte ziehen ließe, bezeichnet man als lineare Regressionsgerade. Diese Gerade ergibt sich aus der Regressionsgleichung, die aus der Analyse hervorgesagt wurde.

Der Progressionswert, also wie stark sich der MD Wert im Verhältnis zu der Zeit geändert hat, entspricht der Steigung der Trendlinie. Die Progression ist um so stärker, je negativer der Wert ist.

4 Ergebnisse

Die statistische Auswertung wurde in drei Analysen unterteilt, die unterschiedliche longitudinale Effekte zwischen den Antikörperleveln und den klinischen Parametern untersuchen. Die Analysen erfolgten jeweils für die Untergruppen POAG, PEX und NTG.

In der ersten Auswertung wird die Korrelation der klinisch erhobenen Daten von Gesichtsfeld und Augeninnendruck, die am nächsten am Operationsdatum lagen, zu dem im Microarray ermittelten Antikörperlevel untersucht.

Die zweite Auswertung korreliert das Antikörperlevel mit der Progression der MD Werte vor der Operation eines jeden Patienten.

In der dritten Auswertung werden nur Probanden betrachtet, die häufiger als einmal operiert wurden. Die zeitliche Differenz zwischen den Operationen gegen das Antikörperlevel korreliert.

Der Ausschluss der Patienten erfolgte durch die im Abschnitt Methoden erläuterte statistische Auswertung und für jede oben genannte Gruppe separat.

4.1 Analyse der klinischen Daten

4.1.1 Patientenkollektiv

Es konnten insgesamt $n = 250$ Patienten in die Analyse der klinischen Daten mitaufgenommen werden, die die Ansprüche der Gruppenzugehörigkeit erfüllten. Grundlage für die Auswahl der klinischen Daten waren die Untersuchungsergebnisse des Gesichtsfeldes sowie die Augeninnendruckwerte. Außerdem erfolgte eine Unterteilung in drei der häufigsten Glaukomformen, die bei den Patienten diagnostiziert wurden. Das primäre Offenwinkelglaukom (POAG) wurde bei $n = 170$ Patienten, das Normaldruckglaukom (NTG) bei $n = 23$ Patienten und das Pseudoexfoliationsglaukom (PEX) bei $n = 57$ Patienten diagnostiziert. Der prozentual größte Anteil an Probanden hat das primäre Offenwinkelglaukom.

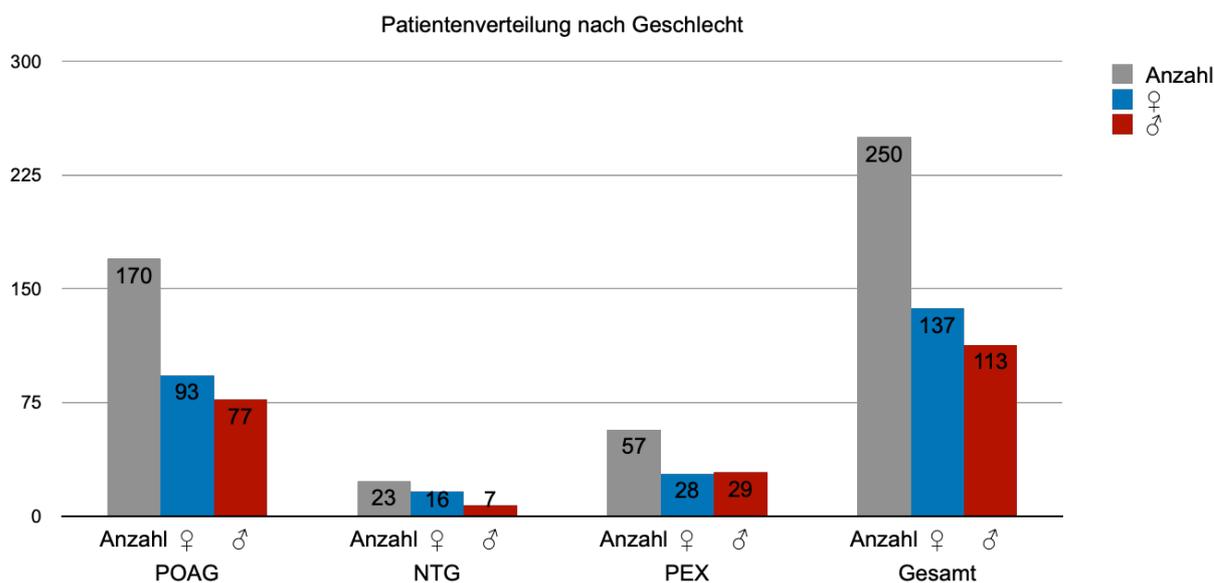
Tabelle 4 Stammdaten der Studiengruppe 1

	Anzahl	♂	♀	Ø Alter	Max. Alter	Mind. Alter
POAG	170	77	93	69,9	94	31
NTG	23	7	16	75,5	86	59
PEX	57	29	28	72,4	84	54
Gesamt	250	113	137	70,9	94	31

Das durchschnittliche Alter der Patienten mit einem POAG lag bei 69,9 Jahren, beim NTG bei 75,5 Jahren und beim PEX bei 72,4 Jahren, sodass ein durchschnittliches Alter für alle Patienten von 70,9 Jahren ermittelt wird. Der jüngste Patient der Studie war 31 Jahre alt und der älteste 94 Jahre, wodurch sich eine Spannweite von 63 Jahren ergibt (vgl. Tabelle 4).

Die Verteilung der männlichen und weiblichen Probanden ist wie folgt: POAG n= 77 Männer und n= 93 Frauen, NTG n= 7 Männer und n= 16 Frauen und PEX n= 29 Männer und n= 28 Frauen (vgl. Abbildung 11).

Abbildung 11 Patientenverteilung nach Geschlecht



Die Anzahl der Augeninnendruckmessungen bei allen untersuchten Patienten lag bei 246. Dabei betrug der Mittelwert der Messungen einen Tensio von 17,2 mmHg. Der geringste gemessene Augeninnendruck ergab 4 mmHg und der höchste 52mmHg. Die Anzahl aller gemessenen Patienten bezüglich des Wertes C/D Ratio lag bei n= 178 und des Wertes MD bei n= 230. Dabei lag der kleinste mittlere Defekt (MD) bei 2,5 dB und der größte bei -30,3 dB. Daraus ergibt sich ein Durchschnitt von -8,8 dB. Mit einem Wert von 0,97 erreichte eine Messung das Maximum für die C/D Ratio. Der Mindestwert für die C/D Ratio lag bei 0, woraus sich ein Durchschnittswert von 0,67 ergibt (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5 Anzahl der erhobenen klinischen Daten

alle Werte der Gesichtsfelduntersuchung sind Humphrey Werte oder umgerechnete Octopuswerte

	Gruppe	Anzahl aller gemessenen Patienten	Mind. Wert	Max. Wert	Ø Wert
Tensio	POAG	167	4,00	52,00	17,61
	NTG	23	7,00	26,00	15,96
	PEX	56	5,00	32,00	16,52
	Gesamt	246	4,00	52,00	17,20
C/D	POAG	113	0,00	0,97	0,67
	NTG	20	0,43	0,94	0,71
	PEX	45	0,35	0,95	0,66
	Gesamt	178	0,00	0,97	0,67
MD	POAG	153	-30,31	2,50	-9,26
	NTG	23	-23,20	1,10	-8,62
	PEX	54	-23,00	1,50	-7,72
	Gesamt	230	-30,30	2,50	-8,80

Wenn man nun die Messungen bei den unterschiedlichen Glaukomformen betrachtet, wurden insgesamt bei n = 167 POAG Patienten eine Messung für den Augeninnendruck, bei NTG n = 23 und bei PEX n = 56 durchgeführt. Die Mindestwerte des Augeninnendrucks weichen alle in den unterschiedlichen Glaukomformen nicht stark voneinander ab, POAG 4 mmHG, NTG 7 mmHg und PEX 5 mmHG. Dem gegenüber stehen die Maximalwerte, die sehr stark in den verschiedenen Glaukomformen abweichen, POAG 52 mmHG, NTG 26 mmHG und PEX 32 mmHG. Die Werte des MD, die bei der Messung des Gesichtsfeldes entstanden sind, können von n = 153 POAG, 23 = NTG und 54 = PEX Patienten für die Studie verwendet

werden. Die Abweichung der Messungen des MD vom Maximal- und Mindestwert, bei den verschiedenartigen Glaukomformen, ist nicht schwerwiegend. Lediglich der Mindestwert des MD bei POAG Patienten weicht mit -30,31 dB vom NTG mit -23,20 dB und PEX mit -23,00 dB ab. Die Kohorte des POAG weist einen maximalen Wert von 2,50 dB, des NTG von 1,10 dB und des PEX von 1,50 dB, beim MD auf.

4.1.2 Korrelation der klinischen Daten und der Microarraydaten

Der Spearman Rho Test diente der statistischen Auswertung, um Korrelationen zwischen den klinisch erhobenen Daten und Immunreaktionen in Form des Antikörperlevels bei Glaukumpatienten zu untersuchen. Bei den klinischen Daten wurden lediglich die Daten, die dem Operationsdatum am nächsten liegen berücksichtigt.

Bei Patienten, die unter einem primären Offenwinkelglaukom leiden ergab die Korrelation zwischen den klinischen erhobenen Daten vor der Operation und den Antikörpern keine Signifikanz.

Tabelle 6 klinische Daten der POAG Patienten in Korrelation mit den Antikörpern

alle Werte in der Tabelle sind r-Werte, die in rot markierten Werten sind statistisch signifikant ($p < 0,05$)

	Tensio	Lineare C/D	MD
HSPD1	0,088	0,000	0,097
NTF3	0,054	0,013	-0,113
GST	0,054	0,129	-0,125
VIM	0,057	0,066	-0,024
ADRB2	0,011	0,102	0,036
b-S-Crys	0,024	0,047	0,063
HSPA1A	0,086	-0,129	0,056
SNCG	0,135	0,168	-0,076
CALD1	0,074	0,076	0,014
TOP1	0,013	0,099	-0,032
GAPDH	0,032	0,148	0,023
C1QBP	0,151	0,039	-0,034
GFAP	0,059	0,034	-0,033
Cyclo. A	0,046	0,082	-0,040
g-Syn	0,113	-0,009	0,028
NSE	0,018	-0,070	-0,017
LPPR3	0,079	0,018	-0,098
CLUS	0,132	0,086	-0,012
CALR	0,030	0,132	-0,064
b-L-Crys	0,038	0,012	-0,006
HNRNPF	0,122	-0,101	-0,103
HSP27	0,089	-0,008	-0,012
CLTA	0,147	0,081	-0,116
ADRB2	0,030	-0,044	-0,020
AK-Level-Gesamt	0,078	0,017	-0,013

Bei dem Normaldruckglaukom korreliert die Messung der Cup Disk Ratio, die am nächsten am Operationsdatum war, mit einer hohen Anzahl von Antikörpern positiv. Eine starke Korrelation mit einem $r > 0,7$ weisen folgende Antikörper auf: SNCG, CLUS und HNRNPF. In eine mittelstarke Korrelation von $r > 0,5$ bis $r > 0,7$ reihen sich folgende weiteren Antikörper ein: dazu gehören HSPD1, NTF3, VIM, b-S-Crys, GAPDH, C1QBP, GFAP, Cyclo-A, NSE, CALR, b-L-Crys, HSP27 und CLTA. Insgesamt weisen acht Antikörper keine Signifikanz auf. Der mittlere Defekt, der am

nächsten am Operationsdatum war, korreliert negativ mit dem Antikörper NTF3 - Neurotrophin 3 ($r = -0,449$) (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7 klinische Daten der NTG Patienten in Korrelation mit den Antikörpern

alle Werte in der Tabelle sind r-Werte, die in rot markierten Werten sind statistisch signifikant ($p < 0,05$)

	Tensio	Lineare C/D	MD
HSPD1	0,409	0,633	-0,252
NTF3	0,416	0,500	-0,449
GST	0,279	0,389	-0,129
VIM	0,147	0,508	-0,362
ADRB2	0,088	0,397	-0,071
b-S-Crys	0,363	0,572	-0,294
HSPA1A	0,026	0,314	0,214
SNCG	0,441	0,771	-0,244
CALD1	-0,127	0,449	-0,180
TOP1	-0,050	0,337	-0,210
GAPDH	0,176	0,497	-0,247
C1QBP	0,412	0,669	-0,252
GFAP	0,007	0,547	-0,128
Cyclo. A	0,354	0,576	-0,328
g-Syn	-0,096	0,307	-0,007
NSE	0,250	0,650	-0,254
LPPR3	-0,021	0,330	-0,180
CLUS	0,413	0,772	-0,275
CALR	0,265	0,530	-0,192
b-L-Crys	0,418	0,558	-0,333
HNRNPF	0,203	0,748	-0,198
HSP27	0,016	0,589	0,011
CLTA	0,527	0,686	-0,164
ADRB2	0,262	0,253	0,004
AK-Level-Gesamt	0,142	0,549	-0,376

Die Korrelationsanalyse bei Pseudoexfoliationsglaukom- Patienten zeigt eine signifikante Korrelation der Antikörper GST und LPPR3 gegenüber dem Tensio. Der Tensio korreliert positiv mit dem Antikörper GST ($r = 0,312$) - Glutathione-S-Transferase, wohingegen der Antikörper LPPR3 ($r = -0,392$) - Lipid Phosphate Phosphatase - Related Protein Type 3 - negativ korreliert.

Gegenüber den klinischen Messwerten des Gesichtsfeldes ergibt die Analyse keine Signifikanz.

Tabelle 8 klinische Daten der PEX Patienten in Korrelation mit den Antikörpern

alle Werte in der Tabelle sind r-Werte, die in rot markierten Werten sind statistisch signifikant ($p < 0,05$)

	Tensio	Lineare C/D	MD
HSPD1	-0,314	0,330	-0,046
NTF3	0,071	0,013	0,006
GST	0,312	-0,056	0,114
VIM	0,120	0,148	-0,014
ADRB2	-0,089	0,262	-0,148
b-S-Crys	-0,089	0,119	-0,095
HSPA1A	0,165	0,096	0,101
SNCG	-0,190	0,089	-0,188
CALD1	0,083	0,209	-0,038
TOP1	0,051	0,095	-0,104
GAPDH	-0,016	0,148	-0,111
C1QBP	0,217	-0,054	0,158
GFAP	0,110	0,116	-0,160
Cyclo. A	0,079	0,253	-0,200
g-Syn	-0,132	0,134	0,041
NSE	0,030	0,086	-0,089
LPPR3	-0,392	0,188	-0,092
CLUS	-0,036	0,053	-0,089
CALR	-0,073	0,154	-0,026
b-L-Crys	0,134	0,055	-0,053
HNRNPF	0,007	0,115	-0,045
HSP27	0,204	0,078	0,135
CLTA	0,168	-0,082	0,138
ADRB2	0,140	0,250	-0,178
AK-Level-Gesamt	-0,145	0,250	-0,135

4.2 Analyse der Progression des Gesichtsfelddefekts vor der Operation

4.2.1 Patientenkollektiv

Wie Tabelle 9 zu entnehmen, ist die Verteilung von männlichen und weiblichen Probanden bei dem POAG und dem PEX ausgewogen. Mit insgesamt n=53 stellt das POAG auch die größte Gruppe dar. Davon sind n = 24 Patienten männlich und n = 29 weiblich. Die Kohorte, die an einem PEX erkrankte, lag bei n = 21, bestehend aus 9 männlichen und 12 weiblichen Patienten. Dagegen steht jedoch eine ungleichmäßige Verteilung des Geschlechts beim NTG. Die Gruppe um das NTG, mit n = 12, wovon ein Proband männlich ist, stellt die kleinste Gruppe dar.

Das durchschnittliche Patientenalter aller Glaukomformen liegt bei 71,7 Jahren.

Tabelle 9 Stammdaten der Studiengruppe 2

	Anzahl	♂	♀	Ø Alter	Mind. Abstand (Tage) zur OP	Max. Abstand (Tage) zur OP	Ø Anzahl der MD Messungen
POAG	53	24	29	68,9	0	1751	6
NTG	12	1	11	76,0	53	620	6
PEX	21	9	12	76,2	26	1687	5
Gesamt	86	34	52	71,7	0	1751	6

Im Durchschnitt wurden bei allen Glaukomformen sechs Messungen des Gesichtsfelds vor der Operation durchgeführt, wobei der MD Wert in der Progression beobachtet wird. Die Messung des MD Wertes bei NTG Patienten überwiegt im Durchschnitt den Mittelwert aller Messungen mit sechs. Der maximale Abstand der Messung des Gesichtsfelds zur OP lag bei POAG Patienten bei 1751 Tagen, bei NTG Patienten bei 620 Tagen und bei PEX Patienten bei 1687 Tagen.

4.2.2 Korrelation der Progression des MD Wertes vor der Operation und der Microarraydaten

Bevor eine Korrelationsbestimmung durchgeführt wurde, wurde eine Progressionsrate vom MD Wert vor der Operation gegen die Zeit berechnet. Anhand des Beispiels in Abbildung 12 wird exemplarisch für einen Patienten verdeutlicht, wie die Progressionsrate für jeden Patienten bestimmt wurde.

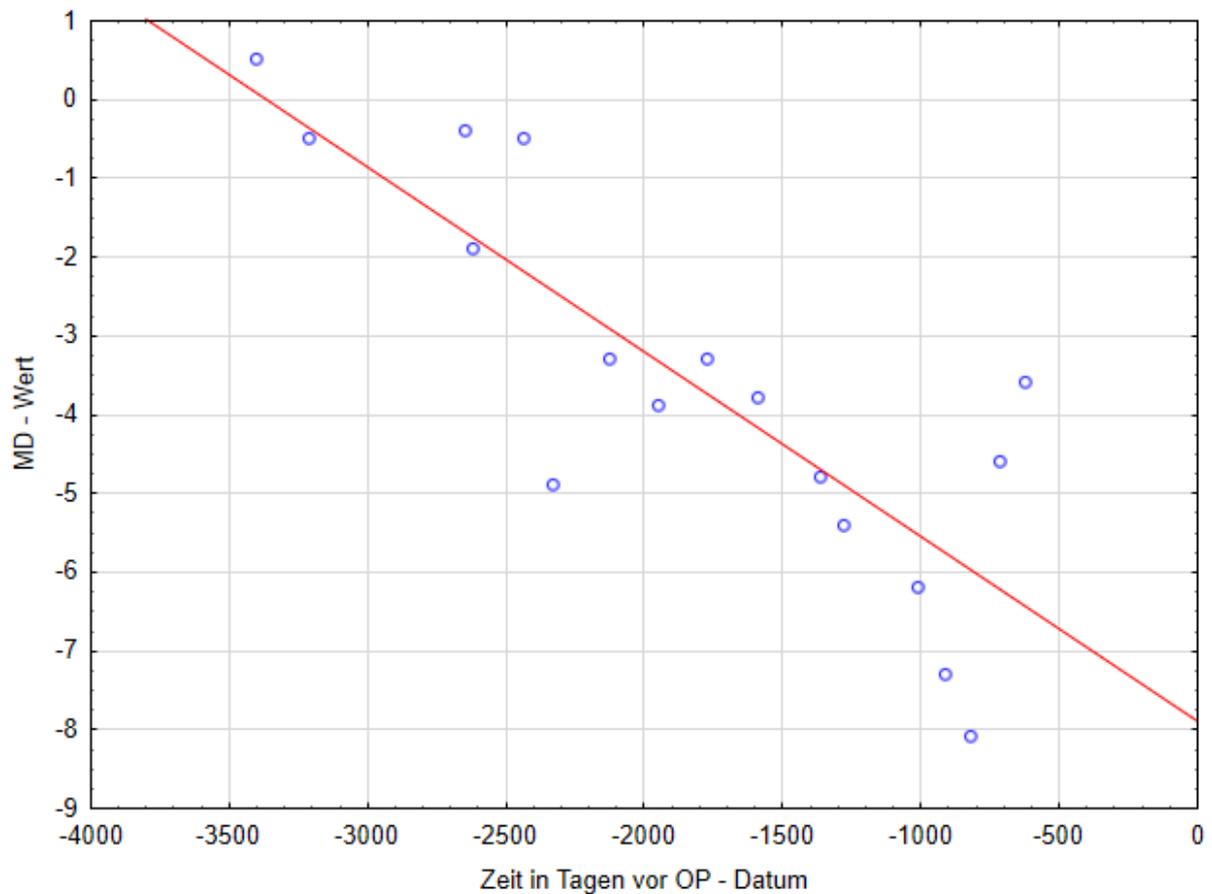


Abbildung 12 Streudiagramm-Progression des MD Werts/Zeit

Dieses Streudiagramm stellt die Progression eines Patienten exemplarisch dar.

Auf der X-Achse wird die Zeit vor der Operation in Tagen dargestellt ganz rechts in diesem Diagramm liegt der Zeitpunkt der Operation. Auf der Y-Achse befindet sich der MD Wert. Die blauen Punkte markieren die MD Werte, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vor der Operation gemessen wurden. Bei diesem Patienten waren es insgesamt 17 Messungen.

Wie anhand der Punkte zu erkennen ist, verschlechtert sich der MD Wert im Laufe der Zeit immer mehr.

Die rote Linie stellt die Regressionsrate dar, die sich aus allen ermittelten MD Werten im Zeitraum vor der Operation ergeben hat.

Die Korrelationsanalyse nach Spearman Rho erfolgte durch die ermittelte Progressionsrate und dem Antikörperlevel, welches bei der Microarrayanalyse gescannt wurde. Die Progressionsrate von allen Patienten ist Anhang 3 zu entnehmen. In der nachstehenden Tabelle sind nur die signifikanten Daten mit der Progressionsrate aufgeführt.

Tabelle 10 Progressionsrate

es sind lediglich die signifikanten Daten in dieser Tabelle aufgeführt, eine Tabelle mit allen Patienten befindet sich im Anhang. Es wurde lediglich die Progressionsrate vor der Operation betrachtet.

Patient	r ²	N	Progressionsrate / Tag	Progressionsrate / Jahr
1	0,744	7	0,003	1,276
2	0,322	15	-0,001	-0,216
3	0,984	5	-0,002	-0,575
4	0,901	10	-0,007	-2,398
5	1,000	3	-0,001	-0,520
6	0,769	6	-0,002	-0,686
7	0,997	4	-0,003	-1,024
8	0,998	3	-0,020	-7,290
9	0,863	5	-0,003	-1,220
10	0,997	3	-0,053	-19,497
11	0,694	17	-0,002	-0,857
12	0,665	7	-0,003	-1,039
13	0,772	5	-0,006	-2,132
14	0,994	3	0,000	0,105
15	0,972	5	-0,005	-1,770
16	0,996	3	-0,013	-4,811
17	0,996	3	-0,013	-4,811
18	0,779	6	-0,002	-0,797
19	0,809	6	-0,004	-1,363
20	0,997	4	-0,001	-0,339
21	0,846	5	-0,001	-0,482
22	0,693	6	-0,005	-1,785
23	0,839	6	-0,004	-1,383
24	0,971	4	-0,002	-0,616

Nach der Durchführung des Spearman Rho Tests ergibt sich eine Korrelation für den Antikörper NTF3 - Neurotrophin 3 - bei einem Normaldruckglaukom. Die Korrelation ist negativ (vgl. Tabelle 11) und liegt bei $r = -0,666$. Dies lässt sich bereits in Gruppe eins, der Korrelationsanalyse von Normaldruckglaukom Patienten mit dem MD Wert vor der Operation, konstatieren (vgl. Tabelle 7). Bei dieser Analyse ist der Effekt jedoch nicht so groß ($r = -0,449$).

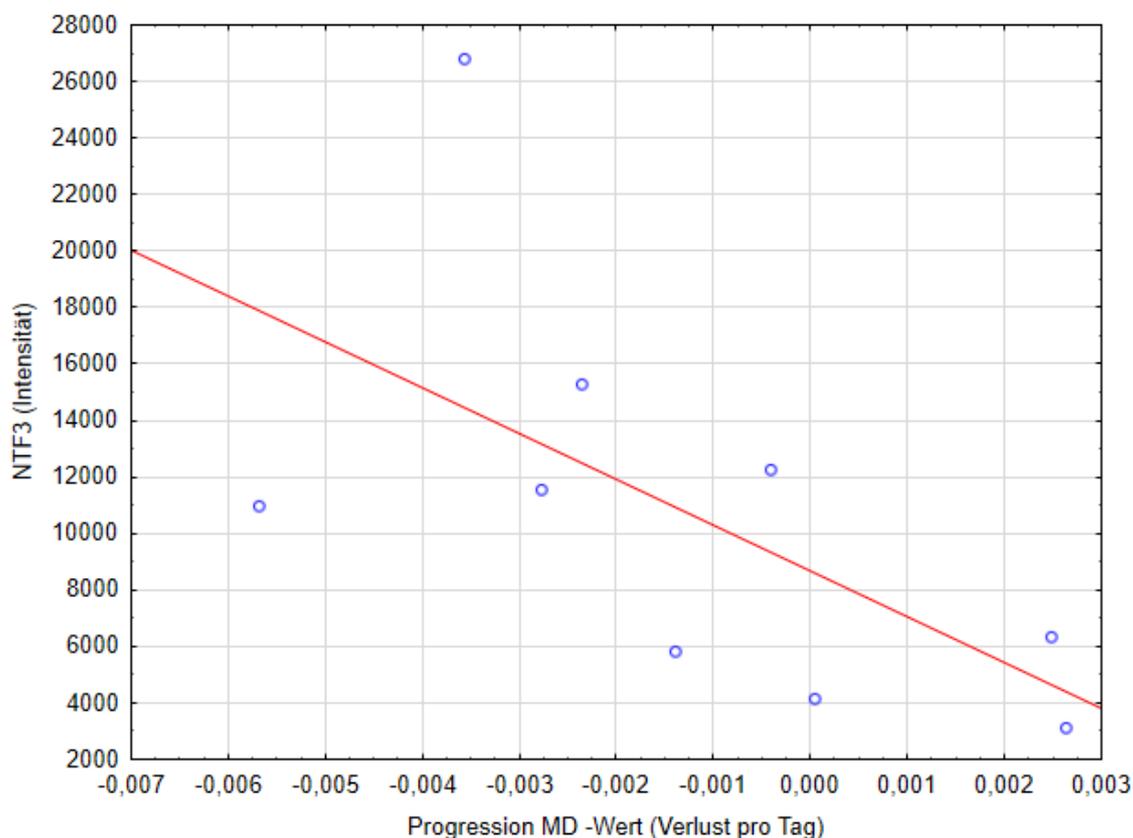


Abbildung 13 Streudiagramm-Progression der MD-Wert Progression/ NTF3 Intensität

Auf der X-Achse spiegelt sich die Progression anhand des MD- Wertes wider, auf der Y-Achse ist die Intensität des Antikörpers NTF3 dargelegt. Die blauen Punkte Stellen jeweils einen Patienten dar. Die rote Linie ist die Regressionsgerade ($r = -0,666$), die sich aus der Summe aller Progressionswerte der insgesamt neun Patienten ergeben hat.

Abbildung 13 zeigt die Progression des Antikörpers NTF3 beim Normaldruckglaukom. Die Signalstärke des Antikörpers spiegelt sich auf der Y-Achse wider. Auf der X-Achse ist der MD Verlust pro Tag aufgetragen. Die rote Linie stellt den negativen Regressionsgrad dar, die sogenannte Trendlinie. Die blauen Punkte stellen die zuvor durch die Analyse hervorgehobenen neun Patienten dar. Insgesamt waren 12 Patienten mit einem Normaldruckglaukom für die Studie von Relevanz, bei der Auswertung der Signalstärke mit dem Antikörper NTF3 wiesen jedoch nur 9 Patienten eine ausreichende Signalstärke auf.

Je stärker die Progression des MD Wert Verlustes pro Tag ist, desto höher der Antikörperlevel für NTF3.

Tabelle 11 Korrelation der Progression

Korrelationsanalyse bei den unterschiedlichen Glaukomformen (POAG, NTG und PEX) zu den Antikörpern
Alle Werte in der Tabelle sind r-Werte, die in rot markierten Werten sind statistisch signifikant ($p < 0,05$)

	POAG	NTG	PEX
HSPD1	0,340	0,142	-0,412
NTF3	0,195	-0,666	0,204
GST	0,141	-0,535	-0,063
VIM	-0,069	-0,262	-0,080
ADRB2	-0,078	0,433	0,206
b-S-Crys	0,008	0,036	-0,033
HSPA1A	-0,214	0,771	0,016
SNCG	-0,157	0,090	0,150
CALD1	-0,071	-0,059	-0,042
TOP1	0,003	-0,105	0,022
GAPDH	-0,005	-0,233	0,010
C1QBP	-0,242	-0,028	0,184
GFAP	-0,084	-0,133	-0,008
Cyclo. A	-0,120	-0,245	-0,052
g-Syn	0,186	-0,035	0,230
NSE	-0,376	0,166	0,016
LPPR3	0,069	-0,004	0,148
CLUS	-0,164	-0,238	0,130
CALR	-0,053	0,300	-0,075
b-L-Crys	-0,156	-0,224	0,025
HNRNPF	-0,130	-0,250	0,101
HSP27	-0,090	0,542	0,216
CLTA	-0,306	-0,190	0,078
ADRB2	-0,044	0,236	0,053
AK-Level-Gesamt	0,097	-0,189	0,087

Es lässt sich jedoch keine weitere Korrelation bei den anderen Glaukomformen und den Antikörpern erkennen (vgl. Tabelle 11).

Neben der Korrelationsanalyse wurde auch ein Anova Test nach Kruskal Wallis durchgeführt. Dafür wurde die Progressionsrate in vier Gruppen unterteilt: in eine starke, mittlere, leichte oder positive Progressionsrate. Die starke Gruppe wurde ab einem Progressionswert von $< -0,003$ festgelegt, die mittlere Gruppe zwischen $-0,001$ und $-0,003$, die leichte Gruppe zwischen 0 und $-0,001$ und die positive Gruppe beinhaltet alle Progressionswerte > 0 . Die positive Gruppe fällt komplett aus der Auswertung, da der MD trotz Glaukomerkrankung besser geworden ist. Den vorliegenden Unterlagen ist nicht genau zu entnehmen, ob dies an einer medikamentösen Einstellung liegt oder ob andere Gründe dafür ausschlaggebend

sind.

Die Ergebnisse des Kruskal Wallis Tests befinden sich im Anhang 3, da diese Analyse keine signifikanten Ergebnisse geliefert hat. Aus diesem Grund war im Anschluss auch kein Post hoc Test mehr notwendig.

4.3 Analyse der Probenentnahmen von mindestens zwei Operationen an einem Patienten

4.3.1 Patientenkollektiv

Für die Analyse von Proben mit mehr als zwei Operationen bei einem Patienten fanden sich insgesamt 49 Studienteilnehmer, 20 männliche und 29 weibliche Probanden. Im Durchschnitt liegen 1117 Tage zwischen den Operationen. Außerdem muss auch unter den unterschiedlichen Glaukomformen unterschieden werden.

Tabelle 12 Stammdaten der Studiengruppe 3

	Anzahl	♂	♀	Ø Alter	Mind. Abstand zwischen den OPs	Max. Abstand zwischen den OPs	Ø Abstand
POAG	31	14	17	73,8	36	5595	896
NTG	6	1	5	78,4	41	1176	366
PEX	12	5	7	76,1	34	3432	649
Gesamt	49	20	29	74,9	34	5595	1117

Beim POAG konnten vollzählig n= 31 Patienten in die Studie mit aufgenommen werden, unter diesem Patientenkollektiv sind 14 Männer und 17 Frauen. Der durchschnittliche Abstand der Operationen liegt bei 1117 Tagen. Dies ergibt sich aus einem Mindestabstand von 34 Tagen und einem Maximalabstand von 5595 Tagen.

Die Gesamtanzahl der NTG Patienten liegt bei sechs - davon männlich n= 1 und weiblich n= 5. Im Mittel liegen 366 Tage zwischen den Operationen, wobei der Mindestabstand 41 Tage und der Maximalabstand 1176 Tage ist.

Das PEX wurde im Durchschnitt bei den Patienten mit einem Abstand von 1117 Tagen operiert. Bei den insgesamt 12 Patienten von denen 5 männlich und 7 weiblich sind, liegt der Altersdurchschnitt bei 76,1 Jahren (vgl. Tabelle 12).

Tabelle 13 MD-Werte der Patienten, die zweimal an einem Auge operiert wurden

Patient	Diagnose	MD vor der 1. OP	1.OP	MD vor der 2. OP	2.OP
1.	POAG	-21,6	Trabekulektomie	-21,1	Katarakt-OP
2.	POAG	-7,9	Trabekulektomie	-22,3	Katarakt-OP
3.	POAG	-17,0	Trabekulektomie	-17,3	Katarakt-OP
4.	POAG	-5,09	Trabekulektomie	-4,5	Katarakt-OP
5.	POAG	Keine Angaben	Katarakt-OP	Keine Angaben	Trabekulektomie
6.	NTG	-0,66	Trabekulektomie	-0,87	Katarakt-OP
7.	POAG	-1,5	Katarakt-OP	-3,0	Trabekulektomie
8.	POAG	-8,11	Trabekulektomie	-8,11	Katarakt-OP
9.	PEX	-5,1	Trabekulektomie	-8,7	Trabekulektomie

Insgesamt liegen Daten von neun Patienten vor, denen in der Uniklinik in Mainz zweimal am gleichen Auge Kammerwasser entnommen wurde. Davon sind n = 7 diagnostizierte POAG Patienten, ein NTG Patient sowie ein PEX Patient bei der Kohorte verzeichnet. Bei einem POAG Patienten wurden keine Angaben zum MD Wert gemacht. Vor allem bei dem Patienten unter Zeile 2 ist ein drastischer MD Wert-Verlust zwischen den Operationen zu verzeichnen. Bei den anderen Patienten ist der Verlust des MD Wertes nicht groß, teilweise hat sich der MD Wert auch gar nicht verändert. Bei sieben Patienten erfolge in der ersten Operation die Trabekulektomie und in der Folge Operation die Katarakt Operation. Bei zwei Patienten war die Reihenfolge entgegengesetzt.

4.3.2 Korrelationsanalyse Antikörperlevel und der Zeit

Es wurde die Korrelation des Antikörperlevels gegen den Abstand der Probenentnahme bei den drei häufigsten Glaukomformen analysiert. Dies wurde mit dem Spearman Rho Test untersucht.

Es ergibt sich eine signifikante positive Korrelation gegenüber dem C1QBP - Komplement C1q bindendes Protein - und dem POAG. Der r Wert liegt bei $r = 0,714$ und spiegelt somit einen relativ hohen Effekt wider.

Besonders kennzeichnend sind außerdem beim PEX die Antikörper, VIM ($r = 0,672$) -

Vimentin -, CALD1 (r = 0,781) - Caldesmon 1 -, Cyclo A (r = 0,745) - Cyclophilin A - und ADRB2 (r = 0,714) - Beta 2 Adenozeptor (vgl. Tabelle 14).

Diese Antikörper korrelieren alle positiv mit der Zeit.

Tabelle 14 Korrelationsanalyse

Analyse der Antikörper gegenüber der Zeit zwischen der Probenentnahme bei den unterschiedlichen Glaukomformen, POAG, NTG und PEX

Alle Werte in der Tabelle sind r-Werte, die in rot markierten Werte sind statistisch signifikant ($p < 0,05$)

	POAG	NTG	PEX
HSPD1	0,523	0,600	0,400
NTF3	0,042	0,400	0,657
GST	0,440	0,500	0,071
VIM	0,010	0,142	0,672
ADRB2	0,642	-0,300	0,515
b-S-Crys	0,261	0,100	0,309
HSPA1A	-0,600	-1,000	0,800
SNCG	-0,142	-0,300	0,190
CALD1	-0,151	-0,142	0,781
TOP1	0,173	0,085	0,624
GAPDH	0,142	-0,100	0,587
C1QBP	0,714	-0,200	0,542
GFAP	0,472	-0,600	0,261
Cyclo. A	0,078	0,100	0,745
g-Syn	0,240	0,800	0,142
NSE	-0,333	-0,400	0,163
LPPR3	0,342	0,142	0,136
CLUS	-0,223	0,000	0,503
CALR	0,160	0,100	0,166
b-L-Crys	-0,563	0,000	0,612
HNRNPF	0,034	0,100	0,516
HSP27	-0,272	0,200	0,257
CLTA	0,428		0,542
ADRB2	0,257	-0,300	0,714
Gesamt AK	0,192	-0,142	0,118
Tage seit vorheriger Probe	1,000000	1,00000	1,000000

5 Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit untersucht die noch nicht ausreichend erforschten Autoantikörper im Kammerwasser, die möglicherweise auch an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt sind, auf ihren longitudinalen Verlauf (Rieck, 2013).

Die Augenerkrankung Glaukom stellt eine weltweit sehr verbreitete Krankheit dar. Sie tritt vor allem im hohen Alter auf (Guedes, Tsai, & Loewen, 2011). Bei einer im Schnitt zunehmend älter werdenden Gesellschaft ist davon auszugehen, dass Glaukomerkrankungen vermehrt auftreten (Quigley & Broman, 2006). Deshalb ist es notwendig, neben dem Lebensalter weitere Gründe und Risikofaktoren für die Entstehung eines Glaukoms frühzeitig zu erkennen und diesen auf dem neusten Stand der Medizin vorzubeugen oder sie zu behandeln (Guedes et al., 2011; Stein, Khawaja, & Weizer, 2021). Nicht nur kann eine frühzeitige Diagnose die Lebensqualität des Patienten steigern, sondern auch das Gesundheitssystem entlasten. Gerade die aktuellen Probleme der verschiedenen Gesundheitssysteme aller Länder in der weltweiten Corona-Pandemie zeigen die Notwendigkeit zur Entlastung deutlich.

Derzeit beschränkt sich die Therapie eines Glaukoms wie oben beschrieben auf eine medikamentöse Einstellung des Augeninnendrucks oder einen operativen Eingriff (Shah & Wormald, 2011). Eine endgültige Heilung erbringen diese Maßnahmen jedoch nicht, sie hemmen lediglich den progressiven Verlauf der Erkrankung. Meist wird die Erkrankung in einem mittleren oder sehr späten Stadium diagnostiziert, wenn bereits ein irreversibler Sehkraftverlust eingetreten ist (Weinreb et al., 2014).

Ziel sollte es sein, die Krankheit schon vor dem Untergang von retinalen Ganglienzellen zu diagnostizieren und zu behandeln. Die Diagnose sollte mit einem immunologischen Test im Rahmen von Routineuntersuchung beim Arzt, durch die Analyse von definierten Biomarkern, möglich gemacht werden. Deswegen ist es in Zukunft weiter notwendig, an möglichen Wechselwirkungen von Autoantikörpern bezogen auf das Glaukom zu forschen. Es ist bereits bekannt, dass die gemessenen serologischen Autoantikörper nicht nur das Vorhandensein einer Erkrankung anzeigen, sondern auch Aufschluss darüber geben können, wie der Krankheitsverlauf aussehen wird (Komáromy, Koehl, & Park, 2021).

Die Besonderheit dieser Arbeit liegt darin, dass das Antikörpermuster im Kammerwasser untersucht wurde. Es wurden bereits einige Studien veröffentlicht, die die serologischen Autoantikörper in Bezug auf das Glaukom analysierten (Bell et al., 2019; Bell, Funke, Pfeiffer, & Grus, 2012; Shin, Kim, Han, & Yi, 2020). Jedoch ist es genauso interessant und wichtig zu erforschen welche Autoantikörper im

Kammerwasser des Auges, direkt dort, wo die Krankheit auftritt, bereits in einem frühen Stadium auf ein Glaukom hinweisen könnten, um frühzeitig eine intensive Diagnostik und gegebenenfalls eine Therapie einleiten zu können. Eine Studie verdeutlichte, dass Autoantikörpermuster im Kammerwasser eine starke Übereinstimmung mit den Antikörpern im Serum aufweisen (Boehm et al., 2012). Um diese Studie weiter zu untermauern, sollte vor allem ein Fokus auf die Untersuchung des Kammerwassers gelegt werden.

Insgesamt wurden 40 Antikörper untersucht, die bei vergangenen Studien auffällig waren. Davon erwiesen sich acht Antikörper als potenzielle Glaukom Biomarker.

In dem nachfolgenden Abschnitt werden nicht nur die Ergebnisse der Protein-Microarray-Analyse intensiv erläutert, sondern auch die methodischen Nachteile dargelegt.

5.1 Korrelation der Antikörperlevel mit den klinischen Daten

In den ersten zwei statistischen Analysen wurden die klinisch erhobenen Daten mit dem Antikörperlevel korreliert. In der ersten Analyse wurden nur die klinischen Daten vor der Operation mit dem Antikörperlevel korreliert. Bei der zweiten Analyse wurde nach einer Wechselwirkung zwischen der Progression des MD Werts und Antikörpern gesucht.

Bei der ersten statistischen Analyse ist auffällig, dass viele signifikante Korrelationen bezogen auf die klinischen Daten insbesondere beim NTG auftreten, vor allem bei der Korrelation zum C/D Ratio. Die Cup-Disc-Ratio beschreibt das Verhältnis der Fläche der Exkavation zur Fläche der Papille. Nicht nur die Fläche, sondern auch der Durchmesser der Exkavation stehen in einem bestimmten Verhältnis zueinander. Die Papille bei NTG Patienten zeigte in vergangenen Studien einen tendenziell schmalen neuroretinalen Rand für eine bestimmte Menge an Gesichtsfelduntersuchungen (Song & Caprioli, 2014). Also kann man davon ausgehen, dass der Messwert C/D Ratio eine wichtige Messgröße für das Normaldruckglaukom ist.

Beim NTG ist der Augeninnendruck in einem physiologischen Bereich, jedoch liegen für das Glaukom typische Gesichtsfeldausfälle und Schädigungen des Sehnervs vor. Die derzeitige Lehrmeinung geht davon aus, dass das Normaldruckglaukom auf Grund einer Durchblutungsstörung oder einem zu hohen Blutdruck entsteht (Lang, 2019).

Bereits seit 2008 wird in der Forschung diskutiert, dass vermehrt beim NTG immunologische Prozesse an der Pathogenese dieser Glaukomform beteiligt sind (Gerste, 2008), vor allem da nicht wie bei allen anderen Glaukomformen der erhöhte Augeninnendruck vorliegt. Es ist möglich, dass die ermittelten Antikörper in dieser Arbeit Ursache oder Folge der Erkrankung sein können. Auffällig ist auch dass es bei allen drei Analysen die Analyse mit den meisten Signifikanzen ist. Dies würde die Theorie bestärken, dass das Normaldruckglaukom eine starke Autoimmune Komponente beinhaltet.

Des Weiteren wurde bei der Korrelation mit den klinischen Daten Antikörper gefunden, die Proteine binden, welche bei der Bildung und Degeneration von Neuronen im peripheren und zentralen Nervensystem eine Rolle spielen.

Zum einen war beim Pseudoexfoliationsglaukom der Antikörper LPPR3 signifikant. Die Ergebnisse der ersten statistischen Analysen zeigen, dass das Antikörperlevel bei PEX Patienten gegen LPPR3 bei einem steigenden Augeninnendruck sinkt ($r = -0,392$).

Zum anderen waren bei Normaldruckglaukompatienten der Antikörper NTF3 signifikant. Den erhobenen Daten im Ergebnisteil ist zu entnehmen, dass der Antikörper NTF3 bei der ersten statistischen Analyse beim NTG eine positive Korrelation mit $r = 0,500$ zur C/D Ratio aufweist, gleichzeitig aber auch eine negative Korrelation mit $r = -0,449$ beim MD-Wert festzustellen ist. Außerdem ist der Antikörper NTF3 bei der zweiten statistischen Auswertung hervorstechend. Bei der Progression des MD Wertes von NTG Patienten ist die Korrelation auch deutlich negativ $r = -0,666$. Diese Erkenntnis deckt sich mit der ersten statistischen Auswertung. Die negative Korrelation in beiden Analysen spiegelt die Vergleichbarkeit der Daten aus der ersten und zweiten Analyse wider. Dies könnte mit einem weiter fortschreitenden Stadium der Erkrankung zusammenhängen, der wiederum den Anstieg der Antikörper begünstigt.

Die Lipidphosphat-Phosphatase (LPP)-Familie ist die Superfamilie in die auch das Protein **LPPR3** (Lipidphosphat-Phosphatase related Protein Typ 3) klassifiziert wird. Insgesamt wurden fünf Mitglieder (LPPR1 - LPPR5) identifiziert, die im Gehirn des Menschen angereichert sind (Bräuer & Nitsch, 2008; Brindley, 2004; Strauss & Bräuer, 2013). Es handelt sich dabei um integrale Membranproteine die für die Modulation von

Zellmigration, Neuritendegeneration und Mitogenese zuständig sind. Die genaue Rolle und Mechanismen des Antikörpers sind jedoch noch nicht bekannt.

Das bisher am besten erforschte Protein der Suprafamilie ist das LPPR4. Darüber ist bekannt dass es eine LPA-induzierte Migration aufweist und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen hemmt (Gaaya et al., 2012), es die exzitatorische Neurotransmission reguliert (Trimbuch et al., 2009) und es vor LPA-induzierter Neuritendegeneration schützt (Bräuer et al., 2003).

Es wurde ein Nachweis für die Koexpression von Paaren der LPPR Mitglieder geliefert. Leider ist die genaue Funktion der einzelnen LPPR Mitglieder noch weitestgehend ungeklärt. Trotzdem vermutet man, dass die Proteinmitglieder zusammenwirken, um ihre biologische Funktion auszuführen. Die genaue biologische Wirkung ist noch ungeklärt, jedoch geht man davon aus, dass die Proteinfamilie für die Morphologie und das Wachstum von neuronalen Zellen während der Entwicklung und nach einem Trauma zuständig ist (Fuchs, Eickholt, & Leondaritis, 2020). Ein möglicher Auslöser für das PEX ist ein Trauma. Somit würde der Bezug zu der neurodegenerativen Erkrankung Glaukom gezogen werden können, da in den hier vorliegenden Ergebnissen eine negative Korrelation gegen den Antikörper LPPR3 hergestellt werden konnte. Bislang ist es noch keiner Forschergruppe gelungen, den Antikörper in neurodegenerativen Erkrankungen zu identifizieren und zu isolieren.

Jedoch wurde das Mitglied LPPR3 als Autoantikörper bei anaplastischem großzelligem Lymphom durch eine Protein-Array Analyse identifiziert (Patel et al., 2012). Seit einigen Jahren wird diskutiert, ob zirkulierende Autoantikörper als potenzielle Biomarker für die Früherkennung von Krebs eine wichtige Rolle spielen, so auch LPPR 3 (Ludwig et al., 2012).

Auf Grund der hier vorliegenden Ergebnisse lässt sich auch ein möglicher Zusammenhang zwischen dem PEX Glaukom und dem LPPR3 herstellen. Die negative Korrelation zum gemessenen Tensio bei PEX Patienten vor der Operation lässt auf einen Abfall der Antikörper schließen. Vermutlich sinkt folglich auch das Proteinlevel. Durch die Publikation von Fuchs et al. wurde bereits ein Zusammenhang zwischen einem Trauma und dem Protein hergestellt. Eine klare Verbindung zur negativen Korrelation beim Augeninnendruck lässt sich nicht herstellen. Durch die Ergebnisse lässt sich kein Rückschluss der Funktion von LPPR3 auf das Glaukom führen. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass das Protein LPPR3 eine wichtige Rolle bei einem gesunden Auge spielt. Dies könnte durch eine weitere Studie mit einer gesunden Kontrollgruppe untersucht werden.

Auch das Protein Neurotrophin-3 (**NTF3**) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wachstums, Unterstützung des Überlebens und der Differenzierung von bereits entwickelten sowie reifer Neuronen im peripheren oder zentralen Nervensystem. Es gehört zu der Gruppe der Neurotrophine, und somit zur Familie der neurotrophen Faktoren (NTFs). Zu den Faktoren gehören außerdem der Nervenwachstumsfaktor (NGF) und der Brain derived neurotrophic Faktor (BDNF) (Kalcheim, Carmeli, & Rosenthal, 1992).

Außerdem ist das Protein NTF3 nach einer ischämischen Schädigung von Relevanz für das Überleben von Neuronen, so also auch in der Netzhaut. In der Literatur wird jedoch kontrovers diskutiert, ob dies immer von Vorteil oder auch eher von Nachteil sein kann. Im Jahr 2002 fand eine Forschergruppe um Bates et al. mit einer Studie heraus, dass ein verringerter NTF3 Spiegel zu kleineren Infarktläsionen bei zerebraler Ischämie führen kann. Dem gegenüber steht ein erhöhter NTF3 Spiegel, der zu einem verstärkten neuronalen Zelltod führte (Bates et al., 2002). Wiederum eine andere Studie aus dem Jahr 2012 unterstreichen die neuroprotektiven Faktoren von NTF3 nach zerebraler Ischämie (Zhang et al., 2012).

Somit lässt sich nach der aktuellen Studienlage nicht belegen, ob ein Anstieg oder ein Senken des Proteinspiegels das Voranschreiten des Unterganges von retinalen Ganglienzellen begünstigt. In der hier vorliegenden Arbeit ist mit voranschreitender Krankheit und dem damit verbundenen Anstieg der C/D ratio auch das Antikörperlevel gestiegen. Der Wert C/D Ratio ist ein grober und subjektiver Messwert, der die Vertiefung des Sehnervs angibt. Je größer die Vertiefung ist, desto mehr wurde bereits vom Sehnerv zerstört. Um dem entgegenzuwirken, steigt vermutlich das Antikörperlevel von NTF3, damit eine komplette Sehnervaushöhlung verhindert wird. Eine weitere Hypothese ist, dass der gesteigerte Antikörperlevel eine Ursache für die Schädigung der retinalen Ganglienzellen und deren Axone ist. Leider kann anhand der erhobenen Daten nicht klar differenziert werden welche Hypothese zutreffend ist. In der Publikation von Johnson et al. wird diskutiert, ob eine Verabreichung mittels Medikamente den weiteren Nervenzelluntergang bei der Erkrankung Glaukom verhindern würde. Im Tiermodell wurde in der Studie dies mit Erfolg durchgeführt (T. V. Johnson, Bull, & Martin, 2011). Somit kann ein Zusammenhang mit den aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnissen gezogen werden. Es ist nicht nur möglich, dass das Protein NTF3 einen Einfluss auf die Pathogenese des NTG hat, sondern auch dass durch einen Anstieg des Proteins von einem fortgeschrittenen Stadium ausgegangen werden kann. Da die Pathogenese meist in der Diagnostik mit dem MD oder dem C/D

Ratio gemessen wird, ist eine positive Korrelation zu erwarten, wie es in dieser Arbeit bei der ersten und statistischen Auswertung beim C/D Ratio der Fall ist. Die Korrelation des MD Werts von NTG Patienten weist eine negative Korrelation bei der ersten und zweiten statistischen Analyse auf. Dies würde auch zu der vorangegangenen Hypothese passen, da mit Verschlechterung des MD Wertes im Verlauf des Glaukoms das Antikörperlevel steigt.

Mit dem Antikörper gegen GST wurde ein weiterer möglicher Antikörper ermittelt, der bei der Entwicklung und Entstehung des PEX eine Rolle spielen könnte. Bei steigendem Tensio lag bei PEX Patienten ein erhöhtes Level an Antikörpern gegen GST vor ($r = 0,312$).

Die zentrale Rolle des Enzyms Glutathiontransferase (**GST**) besteht in der Entgiftung des Organismus von organischen Stoffen und die Antioxidation (Yu, Weng, Guo, Chen, & Yao, 2013). Durch die Bindung von Glutathion an toxische Metaboliten oder organismusfremde organische Verbindungen (Xenobiotika) können diese aus dem Organismus entfernt werden. Zu den Xenobiotika gehören unter anderem Karzinogene, Gifte und Drogen (Eaton & Bammler, 1999).

Ob ein Polymorphismus des Enzyms Glutathiontransferase einen Einfluss auf das Glaukom hat, wird in diversen Studien entgegengesetzt diskutiert. Einerseits untersuchte die Studiengruppe um Yilmaz et al., ob sich ein Unterschied des Enzyms bei einem Exfoliationssyndrom im Vergleich zu einem Exfoliationsglaukom erschließen lässt. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied ermittelt (Yilmaz et al., 2005). Andererseits liefert eine Studie das Ergebnis, dass eine signifikante Beteiligung des Polymorphismus von GST für eine Erkrankung an einem Pseudoexfoliationsglaukom gegeben ist (Khan et al., 2010).

Ebenfalls wurden andere Glaukomformen wie das primäre Offenwinkelglaukom oder das Engwinkelglaukom unter dem Einfluss des GST- Polymorphismus untersucht. Diese Studie ergab, dass bestimmte GST- Polymorphismen ein Risikofaktor für das Glaukom sind (Abu-Amero, Morales, Mohamed, Osman, & Bosley, 2008). In der hier vorliegenden Arbeit steigt der Antikörperlevel GST positiv bei PEX Patienten mit steigendem Tensio. Dies könnte tatsächlich auf einen Vermehrten Polymorphismus des Proteins GST zurückzuführen sein. Wenn durch Mutation das Protein GST falsch gefaltet wird, könnte das Antikörperlevel steigen um das Protein zu eliminieren. Dieses Protein ist dem Immunsystem vermutlich noch nicht begegnet und wir deswegen direkt

vom Immunsystem entfernt (Vormehr, Türeci, & Sahin, 2019). Warum dies gerade bei PEX Patienten korreliert, könnte auf die genetische Komponente der Entstehung des Pseudoexfoliationsglaukom zurückzuführen sein. Bis heute untersuchten unterschiedliche Forschergruppen immer wieder den Zusammenhang von GST zum Glaukom (besonders zum primären Offenwinkel Glaukom). Zuletzt veröffentlichte eine Forschergruppe um A. Liu et al. eine Studie, die wieder bestätigte, dass ein bestimmter GST Genotyp ein redoxbezogener Marker in der Glaukompathogenese ist (Liu et al., 2021).

Es ist in vorangegangenen Studien belegt worden, dass das Pseudoexfoliationsglaukom eine genetische Ursache hat. Es wurde bereits eine Hypothese aufgestellt, die eine Kombination des Risikos an einem POAG zu erkranken mit dem GST Polymorphismus im Gen in Verbindung setzt (Sobot et al., 2022). Studien zu einer Verknüpfung mit dem NTG gibt es bereits (Yang et al., 2001). In der Studie von J Yang et al. wurden bei 52% der Probanden das Anti-GST- Antikörper nachgewiesen. Unter den Probanden waren NTG aber auch POAG Patienten mit einbezogen.

5.2 Korrelation der longitudinalen Proben und des Antikörperlevels

In der dritten statistischen Analyse wurde die Korrelation von den Antikörpern zu der Zeit zwischen den Operationen untersucht. Eine Operation wird bei Patienten mit einem Glaukom lediglich durchgeführt, um die Progression der Erkrankung zu vermindern. Durch die Operation hat man jedoch keinen Einfluss auf die weiter fortschreitenden biologischen Prozesse im Körper, wie zum Beispiel der Immunreaktion. Es liegen immer mehrere Monate oder manchmal sogar Jahre zwischen den Operationen, wodurch es schon rein aufgrund der zeitlichen Komponente in der Regel zu einem deutlichen Voranschreiten der Erkrankung, dem Glaukom, gekommen ist. Dies sollt sich meist anhand der Gesichtsfeldmessung und dem IOD belegen lassen. Jedoch weisen auch manche Patienten keinen progressiven Verlauf dieser klinischen Messwerte aus. Auf Basis der Daten von Tabelle 12 ist zu entnehmen, dass nur neun der insgesamt 49 Patienten zweimal am gleichen Auge operiert wurden. Bei sieben der neun Patienten wurde zuerst die Trabekulektomie durchgeführt. Anhand des gemessenen MD Wertes ist lediglich bei einem Patienten eine deutliche Verschlechterung des Gesichtsfeldes beim POAG feststellbar. Die Verschlechterung des Gesichtsfeldes erfolgt bei einem Patienten der sich als erstes

einer Trabekulektomie unterzog. Dies zeigt leider den Misserfolg der Operation bei diesem Patienten. Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Bei den anderen Patienten sind nur leichte Abweichungen des MD Werts zu verzeichnen. Dies könnte daran liegen, dass die zweite Operation an dem Auge nicht wegen des Glaukoms durchgeführt wurde, sondern zum Beispiel ein Katarakt mittels Operation therapiert wurde.

Die Auswertungen zeigen, dass das Antikörperlevel von VIM ($r = 0,672$), CALD1 ($r = 0,781$), Cyclo A ($r = 0,745$) und ADRB2 ($r = 0,714$) bei PEX Patienten und C1QBP ($r = 0,714$) bei POAG Patienten im longitudinalen Verlauf ansteigt.

Im Einzelnen wird im Anschluss auf die fünf Antikörper genau eingegangen und die aktuelle Studienlage mitberücksichtigt. In der dritten Analyse wurden die Antikörper in Korrelation auf die Zeit betrachtet. Aussagekräftiger wäre es die gleiche Studie mit mehr Kammerwasserproben je Patient zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchzuführen. Dies gestaltet sich in der Klinik jedoch schwierig, da man nur an das seltene Produkt, Kammerwasser, im Zuge einer Operation, gelangt. Gegebenenfalls sollte man als Bestätigung für diese Studie die folgenden Studien an Tiermodellen weiter ausbauen oder auf Serumuntersuchungen zurückgreifen.

Die Proteine VIM, CALD1 und ADRB2 übernehmen in glatten Muskelzellen, also auch im Bereich des Kammerwinkels, wichtige Funktionen.

Die Hauptaufgabe des Proteins Vimentin (**VIM**) innerhalb der Zelle ist, sowohl die Zellintegrität aufrecht zu halten sowie die Zelle vor Stress zu schützen (Satelli & Li, 2011).

In der Vergangenheit wurde bereits durch viele Forschergruppen die Bedeutung des Antikörpers Vimentin im Zusammenhang mit dem zum Glaukom untersucht.

Bei einem Experiment mit Mäusen, die an einem Glaukom erkrankten, zeigten die skleralen Fibroblasten unter anderem eine Steigerung des Proteins Vimentin (Oglesby et al., 2016).

In einer der neusten Studien aus dem Jahr 2020 wurde ermittelt, dass der Vimentin Spiegel bei Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom je nach intraokulärem Druck variieren kann. Daneben wird in der Studie auch darüber diskutiert, ob eine abnormale Sklera-Biomechanik die angemessenen Kompensationen und Druckschwankungen im Auge verhindern kann. Das Ergebnis ist dann eine zunehmende Progressionsrate des primären Offenwinkelglaukoms (Iomdina et al., 2020). Es ist bereits bekannt, dass Vimentin bei POAG Patienten als Autoantikörper-

Biomarker verwendet werden kann (Beutgen, Perumal, Pfeiffer, & Grus, 2019). Durch die Studiengruppe der Universität Mainz wurde auch bereits im Jahr 2007 ein erhöhter Antikörperspiegel von Vimentin bei Patienten mit einem Normaldruckglaukom nachgewiesen (Joachim, Bruns, et al., 2007).

Aus der dritten Statistik (siehe Tabelle 13) dieser Arbeit kann eine deutliche positive Korrelation der longitudinalen Proben von Patienten mit einem PEX-Glaukom in Bezug auf die Zeit bei dem Antikörper VIM mit einem r - Wert von 0,672 entnommen werden. Dies unterstreicht die aufgestellte Hypothese, dass Vimentin einen potenziellen Biomarker darstellt, insbesondere da er im longitudinalen Vergleich auch ansteigt. In der Vergangenheit wurden das POAG (Joachim et al., 2008; May, 2015) und das NTG (Joachim, Bruns, et al., 2007) in Bezug auf einen Vimentin Spiegel analysiert, bei beiden Studien war der Vimentin Spiegel hochreguliert. In der hier vorliegenden Studie war eine Signifikanz jedoch bei PEX Patienten feststellbar. Beim PEX wird das Trabekelwerk durch fibrilläres Matrixmaterial, welches sich aus der Basalmembran aller Strukturen gelöst hat, verstopft. Aus diesem Grund lässt sich die Hypothese aufstellen, dass vor allem im Kammerwasser von PEX Patienten das Vimentin feststellen lässt, da Vimentin im Zytosol von Fibroblasten auftritt. Wenn also ein erhöhtes Vorkommen an fibrillärem Matrixmaterial im Trabekelwerk zu verzeichnen ist, dann kann man davon ausgehen, dass damit auch der Vimentin Spiegel steigt. Es ist möglich, dass der Körper auf Grund des Ansteigens des Proteins Vimentin vermehrt Autoantikörper bildet.

Es ist bereits bekannt, dass die Veränderung des Gens, welches für Vimentin codiert, also unterschiedliche Varianten, zu einem Katarakt führen können (Ma et al., 2016; Müller et al., 2009; Zhai et al., 2017). Wie beim GST Polymorphismus, kann ein Bezug auf das PEX Glaukom hergestellt werden, wodurch das Proteinlevel von Vimentin steigt und somit vermutlich auch das Antikörperlevel steigt.

Der Beta 2 Adrenozeptor wird von dem Gen **ADRB2** kodiert. Dieser ist hauptsächlich in der Zellmembran von Eukaryoten, aber auch im Golgi-Apparat und dem Endosom zu finden. In der Zellmembran von glatten Muskeln ist der Rezeptor insbesondere für die Relaxation des Muskels zuständig.

Der Beta 2 Adrenozeptor befindet sich im Auge im Bereich des Ziliarkörpers und reguliert den Anstieg des intraokulären Drucks. In der Augenheilkunde wird ein Anstieg

des intraokulären Drucks bereits mit einem beta-2-Adenozeptor Agonisten therapeutisch behandelt (Hohberger et al., 2019; Jünemann et al., 2018). In der Studie von Hohberger et al. hat man zuvor nachgewiesen, dass bei Patienten mit einem Glaukom der Gehalt des Autoantikörpers im Serum angestiegen ist, im Vergleich zu gesunden Patienten. Deswegen geht man davon aus, dass ADRB2 an der frühen Ätiologie des Glaukoms beteiligt ist (Hohberger et al., 2019).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Antikörper gegen ADRB2 im longitudinalen Vergleich erhöht vorliegt. Dies könnte bedeuten, dass das Protein vermehrt abgebaut wird und folglich der IOD steigt. Dies kann sowohl auf eine erhöhte Immunantwort zurückzuführen sein als auch auf eine erhöhte medikamentöse Therapie. Unter diesen Umständen könnte dieses Ergebnis auch eine Verfälschung auf Grund der medikamentösen Einnahme ergeben haben. Aus der erhobenen Datenlage geht nicht vollständig hervor, wann und welche Medikamente eingenommen wurden und konnten daher nicht in die Auswertung einfließen. Hohberger et al. haben den Autoantikörper einer frühen Ätiologie zugeschrieben. Es wurde in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg des Antikörperlevels in einem möglichen späten Stadium nachgewiesen, da die Kammerwasserproben im longitudinalen Verlauf untersucht wurden. Dadurch ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Antikörpersiegel auch in der frühen Ätiologie eine Rolle spielen kann. Es ist möglich, dass das Antikörperlevel im Verlauf der Krankheit immer weiter ansteigt. Somit unterstützen die hier vorliegenden Ergebnisse die Erkenntnisse der Studie von Hohberger et al. Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass das PEX Glaukom eine der Glaukomformen ist, welche sehr schnell voranschreitet, was die Aussage von Hohberger et al. bekräftigt, dass der Autoantikörper einer frühen Ätiologie zugeschrieben werden kann.

Das Gen **CALD1** kodiert zu dem Protein Caldesmon. Das Protein ist wie ADRB2 und VIM im Zytoplasma von Zellen der glatten Muskulatur bei Eukaryoten, also auch in den inneren Muskeln des menschlichen Auges, nachzuweisen.

Es spielt eine regulatorische Aufgabe bei der Kontraktion von Muskelzellen. Die Kontraktion ist abhängig von der Calcium-Konzentration im Zytoplasma.

Die Zellen im Trabekelmaschenwerk des Auges können auch kontrahieren. Durch die kontrollierte Kontraktion kann der Abflusswiderstand im Trabekelmaschenwerk aktiv moduliert werden. Dies ist im gesunden beziehungsweise normalen Zustand

notwendig. Wenn diese Modulation jedoch gestört ist, kann dies eine Erhöhung des intraokulären Drucks zur Folge haben (Lang, 2019).

Eine Studie hat bereits herausgefunden, dass es durch eine Überexpression von Caldesmon in glatter Muskulatur zu einer Umgestaltung der Aktin Filamente im Zytoplasma und Umstrukturierung der Zell-Zell Kontakte kommt (Grosheva et al., 2006). Durch diese Verbindung ist ein besserer Abfluss des Kammerwassers möglich und der intraokuläre Druck im Auge sinkt. Auf Grund der Studie von Grosheva et al. ergab sich die Idee, Caldesmon in der Gentherapie von Patienten mit Glaukom einzusetzen, um diese Erkrankung zu bekämpfen. In einem Review von 2015 wird erneut die wichtige Stellung der Regulation vom Abfluss des Kammerwassers über das Trabekelwerk und des Schlemmkanals deutlich und dass dieser noch weiter erforscht werden sollte (Tian, Gabelt, Geiger, & Kaufman, 2009).

Ein Grund dafür, dass das Kammerwasser schlechter abfließt könnte der erhöhte Antikörper Spiegel sein. Eine mögliche Begründung dafür könnte sein, wenn der Antikörper Spiegel steigt, sinkt der Proteinspiegel und es kommt zu einem schlechteren Kammerwasserabfluss. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass das Antikörperlevel im longitudinalen Verlauf bei PEX Patienten steigt. Ein Grund dafür könnte das fibrilläre Matrixmaterial sein, welches sich aus der Basalmembran aller Strukturen lösen kann und zu einer Verstopfung im Trabekelmaschenwerk führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die im Jahr 2019 veröffentlichte Studie der Forschergruppe der Universität Mainz, in der sowohl VIM als auch CALD1 als potenzielle Autoantikörper-Biomarker für die Glaukomdiagnostik präsentiert wurden (Beutgen et al., 2019). In der Studie von Beutgen et al. wurden der Antikörper CALD1 bei POAG Patienten nachgewiesen. Im Vergleich zum POAG gehört das PEX zu den sekundären Glaukomen. Eine bedeutsame Ähnlichkeit der beiden Glaukomformen ist der Untergang der retinalen Ganglienzellen.

Das Protein Cyclophilin A (**Cyclo-A**), welches zur Gruppe der Isozyme gehört, ist im Zytosol von Eukaryoten sehr häufig nachweisbar. Die Hauptaufgabe ist die Unterstützung und Vereinfachung der Proteinfaltung in der Zelle (Stamnes, Rutherford, & Zuker, 1992). Neuere Studien haben gezeigt, dass das Protein Cyclophilin A auch außerhalb der Zellen nachgewiesen werden kann.

Cyclophilin A kann auch eine Verbindung mit Cyclophilin D eingehen und hemmt somit die Permeabilitätsübergangsporen in den Mitochondrien. Bei ischämischer Verletzung der Netzhaut, durch den Anstieg des IOD, verhindert Cyclosporin A die Hochregulation der Expression des Proteins Cyclophilin D und unterstützt damit das Überleben der retinalen Ganglienzellen. Innerhalb der ersten 12 Stunden einer ischämischen Verletzung der Netzhaut konnte eine Überexpression des Proteins Cyclophilin D signifikant nachgewiesen werden (Kim et al., 2014). Bei einem progressiven Verlauf steigt das Antikörperlevel von Cyclo A bei PEX Patienten, in dieser Arbeit, an. Dies könnte auf ein erhöhtes Proteinlevel von Cyclophilin A zurückzuführen sein, da das Immunsystem gegen den progressiven Prozess des Ganglienzelluntergangs ankämpft und vermehrt Cyclophilin D hemmt.

Ein Zusammenhang zwischen Cyclophilin D und einer neurodegenerativen Augenerkrankung Glaukom wird schon seit geraumer Zeit vermutet und entsprechend untersucht. Eine Forschergruppe fand im Jahr 2008 heraus, dass durch pharmakologische Addition von Cyclophilin D bei POAG Patienten die Dysfunktion der Calciumregulation im Trabekelwerk wieder stabilisiert und der IOD wieder kontrolliert werden kann (He, Ge, & Tombran-Tink, 2008).

In den vorliegenden Ergebnissen der Korrelationsanalyse aus den Daten der dritten statistischen Analyse wurde eine deutliche positive Signifikanz beim PEX Glaukom gegenüber den longitudinalen Proben festgestellt. Der r - Wert liegt bei 0,745.

Es ist noch nicht bekannt in welchem Zusammenhang die Autoantikörper mit dem Glaukom stehen. Der Grund des in dieser Studie gezeigten Anstiegs des Autoantikörpers Cyclophilin A könnte darin bestehen, dass der Körper vermehrt Cyclophilin A bildet, um möglichst viele Ganglienzellen vor dem Untergang zu schützen. Der Untergang der Ganglienzellen beim Pseudoexfoliationsglaukom ist zumeist durch ein Trauma, Entzündungen sowie oxidativen Stress oder Hypoxie verursacht. Es handelt sich in der Folge also nur um einen „Selbstschutz“ des Körpers. Da es aber nicht das Ziel sein kann, zu erblinden, ist eine mögliche Aktivierung des Autoantikörpers Cyclophilin A gegeben, der das körpereigene Antigen bildet und dadurch entweder die Krankheit Glaukom weiter fördert, das Fortschreiten verhindert oder einfach ein Begleitphänomen sein kann.

Die Sezernierung des Proteins aus der Zelle erfolgt auf Grund eines Entzündungsreizes. Es wurde bereits stark diskutiert, an welchen menschlichen Erkrankungen das Protein beteiligt sein kann. Unter anderem stehen Herz-Kreislauf-

Erkrankungen, Parodontitis, Krebs, Virusinfektionen, Asthma und neurodegenerative Erkrankungen im Verdacht, in einem engen Zusammenhang mit der Proteinexpression von Cyclophilin A zu stehen (Nigro, Pompilio, & Capogrossi, 2013).

Das Protein **C1QBP** (Complement component 1 Q subcomponent-binding protein) bildet gemeinsam mit C1r und C1s den Komplementsystemfaktor C1. Das Komplementsystem im Wesentlichen wurde bereits im Abschnitt 2.4 Immunsystem erklärt. Das Protein ist auch unter dem Namen p32 bekannt und wurde bereits durch mehrere Studien in allen wichtigen Zellkompartimenten nachgewiesen. Dazu gehören sowohl das Zytoplasma, der Kern oder die Mitochondrien (van Leeuwen & O'Hare, 2001).

Dem Protein werden viele Aufgaben zugeordnet. Dazu gehören Entzündungs- und Infektionsprozesse, Regulation der Apoptose, Proteinsynthese in Mitochondrien und Transkriptionsregulation. Außerdem fungiert das Protein als endothelialer Rezeptor für Plasmaproteine an Zelloberflächen (Joseph, Ghebrehiwet, & Kaplan, 1999). In der hier vorliegenden Arbeit ist das Antikörperlevel im longitudinalen Vergleich bei PEX Patienten gestiegen, was auf einen erhöhten Proteinspiegel schließen lässt und es vermehrt auf Grund der Erkrankung zu einer Apoptose, die durch das Protein C1 Reguliert wird, führt.

Der C1 Komplex aktiviert die Komplementkaskade des klassischen Weges. Wenn vermehrt Antikörper gegen dieses Protein vorliegen, könnte es sein, dass der klassische Weg nicht mehr aktiviert wird und es im Anschluss nicht zu einem gemeinsamen Endstück führen. Dies hätte zur Folge, dass das Immunsystem nicht mehr ausreichend aktiviert wird.

Im Jahr 2008 experimentierte eine Forschergruppe, ob das Protein C1QBP eine Wechselwirkung mit dem FOXC1 (Forkhead-Box-C1-Gen) Protein eingeht. Es ist zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt, dass Mutationen von FOXC1 häufig zu einem Glaukom führen können. Durch die Interaktion beider Proteine wurde die Transkriptionsaktivität gehemmt. Die Schlussfolgerung der Studie ergab, dass eine beeinträchtigte Interaktion der Proteine zu einer Axenfeld-Rieger-Malformation und folglich zu einem Glaukom führen kann (Huang et al., 2008).

Inzwischen geht die Studienlage sogar soweit, dass man unter anderem den Antikörper C1QBP als potenziellen Glaukom-Biomarker benennen kann, da in einer Studie bei POAG-Patienten ein deutlich erhöhter Wert des Antikörpers im Serum

festgestellt werden konnte (Beutgen, Schmelter, Pfeiffer, & Grus, 2020). Die durchgeführte Korrelationsanalyse der dritten Statistik zeigt bei POAG Patienten eine positive Signifikanz des C1QBP Antikörpers in Bezug auf die Zeit ($r = 0,714$). Das Ergebnis der hier vorliegenden Studie unterstreicht die vorangegangene Studie von Beutgen et al. Die Unterschiede in den Arbeiten liegen zum einen darin, dass bei der Arbeit aus dem Jahr 2020 das Serum der Patienten auf das Protein untersucht wurden, und in der vorliegenden Arbeit das Kammerwasser untersucht wurde. Zum anderen wurde bei der Studie von Beutgen et al. kein longitudinaler Vergleich durchgeführt. Es wurde mit der hier vorliegenden Arbeit die Studienarbeit von Beutgen et al. untermauert, dass C1QBP als potenzieller Biomarker geeignet ist, da dieser Antikörper auch in dieser Arbeit bei der Untersuchung des Kammerwassers eindeutige Signifikanzen bei Patienten mit einem POAG aufweist.

5.3 Bedeutung und Entstehung der Antikörper beim Glaukom

Alle im vorangegangenen Abschnitt erläuterten Proteine sind intrazelluläre Proteine und sollten deshalb auch nicht im Kammerwasser, also extrazellulär nachweisbar sein. Trotzdem wurden Antikörper gegen diese Proteine in der hier vorliegenden Studie ermittelt. Eine reine Hypothese wie die intrazellulären Proteine ins Kammerwasser gelangen ist, dass bei dem Nervenzellenuntergang bei der Glaukomerkrankung die intrazellulären Proteine aus der Nervenzelle in das umliegende Gewebe einströmen. Der Kontakt der Proteine mit dem Immunsystem erfolgt über die Blut - Retina Schranke oder die Blut – Kammerwasser Schranke. Auf Grund des ersten Kontakts mit der Immunabwehr werden Antikörper gegen diese Proteine gebildet. Warum das Immunsystem gegen diese, dem Körper nicht fremden Proteine, Antikörper bildet kann auf zwei Hypothesen basieren. Die Erste ist, dass diese Proteine durch Mutationen im Gen falsch codiert sind oder durch Chaperone falsch gefaltet sind und somit vom Immunsystem eliminiert werden (Gong, Kosoko-Lasaki, Haynatzki, & Wilson, 2004; Wiggs & Pasquale, 2017). Die zweite Hypothese ist, dass die Proteine an einem Ort vorhanden sind, an dem diese im Regelfall nicht sein sollten und somit durch die Antikörper detektiert und entfernt werden (Iomdina et al., 2020; Samelska et al., 2021; Wallace, Murphy-Ullrich, Downs, & O'Brien, 2014; Wallace, Pokrovskaya, & O'Brien, 2015).

In einer Studie mit Mäusen wurde bereits herausgefunden, dass bei einer vorübergehenden Erhöhung des IOD eine T-Zellen-Infiltration in die Netzhaut

diagnostiziert werden kann. Auch wenn der IOD danach auf ein normales Niveau zurückgesetzt ist, führt die T-Zellen-Infiltration zu einer verlängerten Phase der Degeneration retinaler Ganglienzellen. Diese Studie ist ein Beweis dafür, dass die glaukomatöse Neurodegeneration teilweise durch T-Zellen vermittelt wird (Chen et al., 2018).

Ob die Antikörper eine Folge oder die Ursache für die pathologischen Prozesse beim Glaukom sind, konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend beantwortet werden. Ein enger Zusammenhang wurde bereits mit glaukombezogenen Antigenen und biologischen Prozessen, wie die mRNA Regulation und Apoptose, hergestellt. Da die Apoptose der Hauptgrund für das Absterben der retinalen Ganglienzellen ist, könnten die Antikörper für die Glaukompathogenese ausschlaggebend sein (Guo et al., 2005; Quigley et al., 1995).

Für einige Krankheiten wurden bereits Autoantikörper diagnostiziert, mit deren Hilfe eine Diagnose der Erkrankung möglich wäre. Dazu gehören Psoriasis (Qiu et al., 2020), Rheuma (Pongratz et al., 2020) oder Alzheimer (San Segundo-Acosta et al., 2021)

Eine genaue Autoantikörper Biomarker Analyse bezüglich der neurodegenerativen Erkrankung Glaukom würde eine eindeutige Krankheitsklassifikation beim Glaukom liefern. Es könnte zu Früherkennung genutzt werden, um die Progression der Erkrankung schnellstmöglich einzudämmen (Beutgen et al., 2019). Derzeit ist die einzige mögliche Therapie, die Verwendung von Augeninnendruck senkenden Tropfen oder eine Operation. Ein Autoantikörpertest ist zeitsparend und minimalinvasiv. Aus diesem Grund sollte die Forschung weiter an möglichen Biomarker-Kandidaten forschen. Außerdem sollten mehr Studien das Antikörperrepertoire in ganzheitlichen Ansätzen überprüfen, um ein vollständiges Bild des Repertoires in Gesundheit und Krankheit zu erhalten.

5.4 Ausschluss von Fehlern und limitierenden Faktoren

SAP- Datenerhebung

Es ist zu betonen, dass alle klinisch erhobenen Daten lediglich aus dem Archiv des Computersystems SAP der Uniklinik Mainz entnommen wurden.

Wie dem Anhang zu entnehmen ist, wurden bei dem Bogen, der ausgefüllt werden musste, auch Informationen eingetragen, die allein auf den ungeprüften Angaben der Patienten beruhen. Dies betrifft beispielsweise Aussagen über

Allgemeinerkrankungen oder Medikamenteneinnahme.

Die auf die Augenheilkunde bezogenen Daten wurden in der Augenklinik selbst erhoben und für diese Arbeit verwendet. Dabei ist zu betonen, dass nicht vermerkt wurde, in welchem Zustand sich der Patient befand, als die Messung des Gesichtsfeldes oder des Augeninnendrucks durchgeführt wurden. Es wurde außerdem nicht genau dokumentiert, ob die Daten unter medikamentösen Einflüssen entstanden sind. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass die Ergebnisse vielleicht sogar „falsch positiv“ sind. Das Ergebnis der Messung des Augeninnendrucks hängt zum Beispiel maßgeblich von der Einnahme bestimmter Medikamente ab. Für die Gesichtsfelduntersuchung ist es wegen des „Müdigkeitszustand“ des Auges relevant, ob die Messung am Vormittag oder am Nachmittag durchgeführt wurde.

Ein weiterer Faktor, der nicht vergessen werden sollte, ist die Grundeinstellung der Patienten, die sich in der Klinik behandeln lassen. In der Regel sind es zunächst gesundheitsbewusste Menschen, die generell den Arzt aufsuchen, sei es für einen Routine-Checkup oder wenn sich zum Beispiel die Sehkraft verschlechtert hat (Kuroedov, Zhukov, Sol'nov, Kushim, & Makarova, 2004). Dadurch entsteht auch eine gewisse Verzerrung der erhobenen Daten. Zusätzlich sind es meist die Patienten, die ein Glaukom in einem schweren Stadium haben, die sich der Operation unterziehen und stationär aufgenommen werden.

Kammerwasserentnahme

Bei der Entnahme der Proben während der Operationen am Auge kann die Qualität des Kammerwassers aus unterschiedlichen Gründen variieren. Obwohl eine SOP (standard operation procedure) eingehalten wurde, kann es an der Erfahrung des Operateurs liegen, ob viel Blut, Spülwasser oder andere Verunreinigungen mit in die Probe gelangen. Deshalb kann daher auch die Menge des Kammerwassers variieren und mit ihr die Konzentration der Proteine. Um die verschiedenen Proben vergleichbar zu machen, wird bei der hier vorliegenden Studie der BCA Test verwendet (siehe Material und Methoden).

Eine Studie mit Kammerwasser durchzuführen ist von besonderer Bedeutung, da das Kammerwasser nur durch einen operativen Eingriff entnommen werden kann. Aus diesem Grund ist das Material, das Kammerwasser, seltener verfügbar und gegenüber Serumuntersuchungen so wertvoll. Außerdem geht man davon aus, dass es deutlich aussagkräftigere und genauere Analysen ermöglicht, da es genau am Ort der

entstehenden Krankheit entnommen wird.

Eine weitere Besonderheit ist, dass es möglich war, zwei oder mehr Proben von unterschiedlichen Zeitpunkten eines Patienten zu sammeln, da die Forschergruppe bereits seit 2007 Kammerwasserproben, die unter einer Augenoperation in der Uniklinik in Mainz entnommen wurden, lagern. Dessen ungeachtet muss man feststellen, dass die Probe nur eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Operation liefert. Allerdings hat die Lagerungszeit einen großen Einfluss auf die Proteinhäufigkeit (Enroth, Hallmans, Grankvist, & Gyllensten, 2016). Nur wenn der Patient sich einer weiteren Operation unterzogen hat, können die Proben longitudinal verglichen werden.

Microarray

Wie bereits im Abschnitt Material und Methoden angesprochen, ist es wichtig, dass bei der Herstellung der Spots besonderer Wert auf die Qualität gelegt wird, damit dieser in die Studie mit aufgenommen werden kann. Wenn ein Spot den zuvor festgelegten Qualitätsmerkmalen nicht genügt, wird dieser manuell aussortiert und wenn möglich erneut gespottet.

Die Beschaffenheit aller Tropfen kann eine unterschiedliche Viskosität aufweisen. Die Verwendung eines Non-contact-Spotter kann bei sehr viskösen Proben zu einer verminderten Spotqualität führen, ist es unwahrscheinlicher, gute Spots mit sehr viskösen Proben herzustellen zu können. Hier spielt die Kapillarwirkung eine entscheidende Rolle bei der Spotherstellung.

Nicht nur die Beschaffenheit des Tropfens selbst, sondern auch die Wahl des Objektträgers ist für den Versuchsaufbau von Relevanz. Hierzu wurde eine Nitrozelluloseschicht gewählt, da in vorangegangenen Studien bereits bewiesen wurde, dass das Signal/Rauschen-Verhältnis für die Ermittlung der Antikörperlevel am geeignetsten ist (Coarfa et al., 2021). Es ist deshalb wichtig, dass die Qualität der Nitrozelluloseschicht einwandfrei und gleichmäßig ist.

Die letzte Qualitätskontrolle durchlaufen die einzelnen Spots beim Scannen. Durch die Signalstärke werden fehlerhafte Spots aussortiert und ein Detektionslimit wird festgelegt. Wenn die Signalstärke gesättigt oder unter dem berechneten Detektionslimit liegt werden die Spots nicht ausgewertet.

Gruppengröße

Ein weiterer wichtiger Punkt bei einer statistischen Analyse ist die Gruppengröße der unterschiedlichen Gruppen, um einen Effekt statistisch relevant nachweisen zu

können, wenn dieser vorliegt. Leider ist die Gruppengröße in allen drei statistischen Analysen nicht gleich groß. Damit ist die statistische Power eher schwach, da die Gruppen nicht ausgewogen sind. Ein Grund dafür ist, dass unter anderem das häufigste diagnostizierte Glaukom das primäre Offenwinkelglaukom ist, wodurch die anderen Glaukomformen, wie zum Beispiel das Pseudoexfoliationsglaukom oder das Normaldruckglaukom in den Hintergrund rücken (Lang, 2019). Gerade deshalb ist es umso wichtiger auch diese Glaukomformen mit in die Studie aufzunehmen. Aus diesem Grund wurden diese Glaukomformen in der hier vorliegenden Arbeit mit berücksichtigt.

In der Gesamtbetrachtung haben Alter und Geschlecht der Patienten keine Berücksichtigung erfahren. Hierdurch kann ein Einfluss auf das Ergebnis nicht ausgeschlossen werden. Aus der bekannten Datenlage geht jedoch hervor, dass die unterschiedlichen Glaukomformen in unterschiedlichen Lebensabschnitten auftreten, womit auch das Alter ein nicht irrelevanter Faktor ist. So tritt zum Beispiel das Pseudoexfoliationsglaukom meist erst ab dem 60. Lebensjahr auf, wohingegen das primäre Offenwinkelglaukom schon ab dem 40. Bis 50. Lebensjahr auftreten kann (Höhn & Pfeiffer, 2017).

5.5 Fazit und Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit konnten insgesamt acht Antikörper als potenzielle Biomarker für die Erkrankung Glaukom festgestellt werden. Die spezifische Rolle der Antikörper bei der Pathogenese des Glaukoms sollte weiter erforscht werden. Aufgrund der derzeitigen Studienlage könnte man davon ausgehen, dass die Autoantikörper eine Folge der Erkrankung Glaukom sind. Auf eine Aktion, in diesem Fall das Zugrundegehen von Nervenzellen, folgt eine Reaktion, also der Anstieg oder Abfall von Antikörpern, folglich eine Reaktion des Immunsystems. Wenn durch einen Anstieg des IOD, beispielsweise durch ein Trauma oder Ähnliches, das Auge eine Störung seines Gleichgewichtes erfährt, versucht der Körper dieser durch eine Reaktion entgegenzuwirken. Das kann beispielsweise durch einen Anstieg von Proteinen, die eine Schutz- und/oder eine Wiederaufbaufunktion für zugrunde gehende Nervenzellen haben, erreicht werden.

Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ I oder Hashimoto werden heutzutage schon mit Tests auf Autoantikörper diagnostiziert. Dies gehört bereits zum Goldstandard der Medizin. Des Weiteren sind bereits einige Autoantikörper bekannt, die als potenzielle Tumormarker bei verschiedenen Krebserkrankungen festgestellt wurden (Yadav et al., 2019). Bei weiteren Forschungen zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson (C. A. DeMarshall et al., 2015; Han, Nagele, DeMarshall, Acharya, & Nagele, 2012) oder Alzheimer (DeMarshall et al., 2016) wurden bereits potenzielle Biomarker vorgeschlagen, um eine frühzeitige Diagnostik zu ermöglichen. Bei der neurodegenerativen Erkrankung Glaukom wurden bereits durch mehrere Studien glaukomspezifische veränderte Autoantikörperlevel aufgezeigt. Einige der Autoantikörperwerte waren im Vergleich zu nicht glaukomatösen Patienten erhöht oder erniedrigt. Demzufolge wurden diese Autoantikörper als brauchbare Biomarker für die Glaukomfrüherkennung vorgeschlagen (Beutgen et al., 2019). Da die potenziellen Biomarker auch einen Teil der natürlichen Autoimmunität darstellen, diese bei einer Erkrankung quantitativ verändert sind, sollte ein Test entwickelt werden der quantitativ den Spiegel der Autoantikörper misst und somit eine klare Aussage über den Status gibt, ob ein Patient an einem Glaukom erkrankt ist oder nicht. Somit kann schnellstmöglich mit der drucksenkenden Therapie begonnen und ein Verlust des Sehvermögens verlangsamt werden.

Insgesamt konnten durch die Studiengruppe der Universität Mainz fünf wichtige Autoantikörper als Biomarker für die Diagnosefindung eines POAGs identifiziert

werden. Dazu gehören VIM, HSPD1, CALD1 PGAM1 und VDAC2 (Beutgen et al., 2019). Zwei der fünf potenziellen Biomarker waren auch in der hier vorliegenden longitudinalen Studie auffällig. Dies untermauert weiter die These, dass vor allem VIM und CALD1 potenzielle Biomarker bei der Glaukomdiagnostik sein könnten (siehe oben). Durch die evidenzbasierte Meta-Analyse aus dem Jahr 2016, von Ahmed et al, wurde deutlich, dass die höchste Glaukom-Diagnosegenauigkeit durch das OCT gewonnen wird, gefolgt von GDx und HRT (Ahmed et al., 2016). Die mittlere Sensitivität liegt bei 78,8% - 84,7% und die mittlere Spezifität bei 82,8% - 91,2%. Um eine Aussage über die Diagnose zu stellen (Boehm et al., 2012). Dies bestärkt den Bedarf an andere immunhistologische Untersuchung für vermutliche Glaukompatienten und somit in der klinischen Praxis großen Mehrwert für die Diagnostik in einem frühen Stadium bringen würde.

Grundsätzlich besteht jedoch das Problem, dass es bei einem serologischen Test an Spezifität mangeln würde, da die identifizierten Glaukom Biomarker auch bei anderen pathologischen Prozessen im Körper identifiziert werden können. Somit sollte in Zukunft auch das Ziel sein, krankheitsabhängige Biomarker zu demaskieren. Dafür ist es weiter sinnvoll, das Kammerwasser zu untersuchen, da die Antikörper, die im Kammerwasser identifiziert werden können, eine höhere Spezifität für das Glaukom aufweisen. Im Folgenden sollte ein Zusammenhang zwischen Biomarkern im Kammerwasser zu Serumbiomarkern hergestellt werden, um eine mögliche Übertragung und Überschneidung von Antikörpern zu verknüpfen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden acht Autoantikörper gefunden, die im Kammerwasser von Patienten mit einem Glaukom in einer longitudinalen Untersuchung potenzielle Biomarker für eine Diagnose der Glaukomerkrankung sein könnten. In Korrelation mit den erhobenen klinischen Daten ist der Antikörper NTF3 bei den klinischen Daten C/D ratio ($r = 0,500$) und MD ($r = -0,449$) bei NTG Patienten signifikant, GST mit einem r -Wert von $0,312$ beim Tensio von PEX Patienten sowie auch LPPR3 ($r = -0,392$). Bei der zweiten Analyse ergibt der Antikörper NTF3 mit einem r -Wert von $-0,666$ bei NTG Patienten eine Signifikanz bei der Korrelation der Progression der MD Werte vor der Operation. Die Analyse der Korrelation der longitudinalen Proben ergab für folgende Antikörper eine Signifikanz: VIM ($r = 0,672$), ADRB2 ($r = 0,714$), Cyclo A ($r = 0,745$), CALD1 ($r = 0,781$) bei PEX Patienten und C1QBP ($r = 0,714$) bei POAG Patienten. Es wurde sich auf die drei häufigsten Glaukomformen konzentriert. Diese sind das POAG, das NTG und das PEX.

Ein Ergebnis ist klar zu erkennen: Autoantikörper sollten in der klinischen Erhebung der Erkrankung eine große Rolle spielen, da durch diese Studie acht Autoantikörper im longitudinalen Vergleich auffällig waren.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war nicht herauszufinden wie die gefundenen Autoantikörper reguliert werden und welcher Auslöser dafür zuständig ist, dass der Autoantikörperspiegel sinkt oder steigt. Dies ist eine wichtige Aufgabe für die Zukunft. Es ist jedoch noch ein langer Weg eine Möglichkeit zu entwickeln, die Antikörper zum Beispiel in der Tränenflüssigkeit oder dem Blutserum eindeutig zu identifizieren, um das Glaukom frühzeitig diagnostizieren und im Anschluss therapieren zu können. Das Kammerwasser stellt für die vereinfachte Diagnosefindung kein nützliches Mittel dar, da die Entnahme immer mit einer Operation verbunden ist. Jedoch war die statistische Untersuchung der Flüssigkeit aufschlussreich und hat die bisher erbrachten Kenntnisse bezüglich bestimmter Autoantikörper bestätigt.

In Zukunft sollte ein besonderer Fokus auf der weiteren Erforschung des Immunsystems in Bezug auf das Glaukom liegen, da dies zu einer vereinfachten und frühzeitigen Diagnosefindung führen könnte.

7 Literaturverzeichnis

- Abu-Amero, K. K., Morales, J., Mohamed, G. H., Osman, M. N., & Bosley, T. M. (2008). Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Arab glaucoma patients. *Mol Vis*, *14*, 425-430.
- Ahmed, S., Khan, Z., Si, F., Mao, A., Pan, I., Yazdi, F., . . . Hodge, W. (2016). Summary of Glaucoma Diagnostic Testing Accuracy: An Evidence-Based Meta-Analysis. *J Clin Med Res*, *8*(9), 641-649.
- Auler, N., Tonner, H., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2021). Antibody and Protein Profiles in Glaucoma: Screening of Biomarkers and Identification of Signaling Pathways. *Biology*, *10*(12), 1296.
- Auler, N., Tonner, H., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2021). Antibody and Protein Profiles in Glaucoma: Screening of Biomarkers and Identification of Signaling Pathways. *Biology (Basel)*, *10*(12).
- Bates, B., Hirt, L., Thomas, S. S., Akbarian, S., Le, D., Amin-Hanjani, S., . . . Moskowitz, M. A. (2002). Neurotrophin-3 promotes cell death induced in cerebral ischemia, oxygen-glucose deprivation, and oxidative stress: possible involvement of oxygen free radicals. *Neurobiol Dis*, *9*(1), 24-37.
- Bell, K., Funke, S., & Grus, F. H. (2019). [Autoimmunity and glaucoma]. *Ophthalmologie*, *116*(1), 18-27.
- Bell, K., Funke, S., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2012). Serum and antibodies of glaucoma patients lead to changes in the proteome, especially cell regulatory proteins, in retinal cells. *PLoS One*, *7*(10), e46910.
- Beutgen, V. M., Perumal, N., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2019). Autoantibody Biomarker Discovery in Primary Open Angle Glaucoma Using Serological Proteome Analysis (SERPA). *Front Immunol*, *10*, 381.
- Beutgen, V. M., Schmelter, C., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2020). Autoantigens in the trabecular meshwork and glaucoma-specific alterations in the natural autoantibody repertoire. *Clin Transl Immunology*, *9*(3), e01101.
- Bhakdi, S., & Trantum-Jensen, J. (1991). Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol Today*, *12*(9), 318-320; discussion 321.
- Boehm, N., Wolters, D., Thiel, U., Lossbrand, U., Wiegel, N., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2012). New insights into autoantibody profiles from immune privileged sites in the eye: a glaucoma study. *Brain Behav Immun*, *26*(1), 96-102.
- Bonomi, L., Marchini, G., Marraffa, M., & Morbio, R. (2001). The relationship between intraocular pressure and glaucoma in a defined population. Data from the Egna-Neumarkt Glaucoma Study. *Ophthalmologica*, *215*(1), 34-38.
- Bowling, B. (2020). *Kanski's Klinische Ophthalmologie*.
- Bräuer, A. U., & Nitsch, R. (2008). Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1781*(9), 595-600.
- Bräuer, A. U., Savaskan, N. E., Kühn, H., Prehn, S., Ninnemann, O., & Nitsch, R. (2003). A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nature neuroscience*, *6*(6), 572-578.
- Brindley, D. N. (2004). Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *Journal of cellular biochemistry*, *92*(5), 900-912.
- Brusini, P., & Johnson, C. A. (2007). Staging functional damage in glaucoma: review of different classification methods. *Surv Ophthalmol*, *52*(2), 156-179.

- Chen, H., Cho, K. S., Vu, T. H. K., Shen, C. H., Kaur, M., Chen, G., . . . Chen, D. F. (2018). Commensal microflora-induced T cell responses mediate progressive neurodegeneration in glaucoma. *Nat Commun*, 9(1), 3209.
- Coarfa, C., Grimm, S. L., Rajapakshe, K., Perera, D., Lu, H. Y., Wang, X., . . . Huang, S. (2021). Reverse-Phase Protein Array: Technology, Application, Data Processing, and Integration. *J Biomol Tech*, 32(1), 15-29.
- Cohen, L. P., & Pasquale, L. R. (2014). Clinical characteristics and current treatment of glaucoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(6).
- Cordula Dahlmann, J. P. (2017). *Augenheilkunde*: Elsevier, Urban & Fischer.
- Daubs, J. G., & Crick, R. P. (1981). Effect of refractive error on the risk of ocular hypertension and open angle glaucoma. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 101(1), 121-126.
- DeMarshall, C., Sarkar, A., Nagele, E. P., Goldwaser, E., Godsey, G., Acharya, N. K., & Nagele, R. G. (2015). Utility of autoantibodies as biomarkers for diagnosis and staging of neurodegenerative diseases. *Int Rev Neurobiol*, 122, 1-51.
- DeMarshall, C. A., Han, M., Nagele, E. P., Sarkar, A., Acharya, N. K., Godsey, G., . . . Nagele, R. G. (2015). Potential utility of autoantibodies as blood-based biomarkers for early detection and diagnosis of Parkinson's disease. *Immunol Lett*, 168(1), 80-88.
- DeMarshall, C. A., Nagele, E. P., Sarkar, A., Acharya, N. K., Godsey, G., Goldwaser, E. L., . . . Nagele, R. G. (2016). Detection of Alzheimer's disease at mild cognitive impairment and disease progression using autoantibodies as blood-based biomarkers. *Alzheimers Dement (Amst)*, 3, 51-62.
- Eaton, D. L., & Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*, 49(2), 156-164.
- Enroth, S., Hallmans, G., Grankvist, K., & Gyllenstein, U. (2016). Effects of Long-Term Storage Time and Original Sampling Month on Biobank Plasma Protein Concentrations. *EBioMedicine*, 12, 309-314.
- Fan, N., Wang, P., Tang, L., & Liu, X. (2015). Ocular Blood Flow and Normal Tension Glaucoma. *Biomed Res Int*, 2015, 308505.
- Gaaya, A., Poirier, O., Mougnot, N., Hery, T., Atassi, F., Marchand, A., . . . Lompré, A.-M. (2012). Plasticity-related gene-1 inhibits lysophosphatidic acid-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation and prevents neointima formation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(10), C1104-C1114.
- Gerste, R. D. (2008). Ophthalmologie: Wie das Normaldruckglaukom entsteht. 105 (38).
- Gong, G., Kosoko-Lasaki, O., Haynatzki, G. R., & Wilson, M. R. (2004). Genetic dissection of myocilin glaucoma. *Hum Mol Genet*, 13 Spec No 1, R91-102.
- Grehn, F. (2019). *Augenheilkunde*: Springer Verlag GmbH Deutschland.
- Grosheva, I., Vittitow, J. L., Goichberg, P., Gabelt, B. T., Kaufman, P. L., Borrás, T., . . . Bershadsky, A. D. (2006). Caldesmon effects on the actin cytoskeleton and cell adhesion in cultured HTM cells. *Exp Eye Res*, 82(6), 945-958.
- Grus, F. H., Joachim, S. C., Bruns, K., Lackner, K. J., Pfeiffer, N., & Wax, M. B. (2006). Serum autoantibodies to alpha-fodrin are present in glaucoma patients from Germany and the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(3), 968-976.
- Grus, F. H., Joachim, S. C., Hoffmann, E. M., & Pfeiffer, N. (2004). Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma. *Mol Vis*, 10, 132-137.
- Guedes, G., Tsai, J. C., & Loewen, N. A. (2011). Glaucoma and aging. *Curr Aging Sci*, 4(2), 110-117.
- Guo, L., Moss, S. E., Alexander, R. A., Ali, R. R., Fitzke, F. W., & Cordeiro, M. F. (2005). Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular

- pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(1), 175-182.
- Hahn, G.-A. (2012). *Kurzlehrbuch Augenheilkunde*: Georg Thieme Verlag KG.
- Han, M., Nagele, E., DeMarshall, C., Acharya, N., & Nagele, R. (2012). Diagnosis of Parkinson's disease based on disease-specific autoantibody profiles in human sera. *PLoS One*, 7(2), e32383.
- Harju, M., & Vesti, E. (2001). Blood flow of the optic nerve head and peripapillary retina in exfoliation syndrome with unilateral glaucoma or ocular hypertension. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 239(4), 271-277.
- Hart, W. M., Jr., Yablonski, M., Kass, M. A., & Becker, B. (1979). Multivariate analysis of the risk of glaucomatous visual field loss. *Arch Ophthalmol*, 97(8), 1455-1458.
- He, Y., Ge, J., & Tombran-Tink, J. (2008). Mitochondrial defects and dysfunction in calcium regulation in glaucomatous trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(11), 4912-4922.
- Henry, E., Newby, D. E., Webb, D. J., Hadoke, P. W., & O'Brien, C. J. (2006). Altered endothelin-1 vasoreactivity in patients with untreated normal-pressure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(6), 2528-2532.
- Hohberger, B., Kunze, R., Wallukat, G., Kara, K., Mardin, C. Y., Lämmer, R., . . . Herrmann, M. (2019). Autoantibodies Activating the β 2-Adrenergic Receptor Characterize Patients With Primary and Secondary Glaucoma. *Front Immunol*, 10, 2112.
- Höhn, R., & Pfeiffer, N. (2017). [Not Available]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 234(7), 931-948.
- Huang, L., Chi, J., Berry, F. B., Footz, T. K., Sharp, M. W., & Walter, M. A. (2008). Human p32 is a novel FOXC1-interacting protein that regulates FOXC1 transcriptional activity in ocular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(12), 5243-5249.
- Hubens, W. H. G., Beckers, H. J. M., Gorgels, T., & Webers, C. A. B. (2021). Increased ratios of complement factors C3a to C3 in aqueous humor and serum mark glaucoma progression. *Exp Eye Res*, 204, 108460.
- Iomdina, E. N., Tikhomirova, N. K., Bessmertny, A. M., Serebryakova, M. V., Baksheeva, V. E., Zalevsky, A. O., . . . Zernii, E. Y. (2020). Alterations in proteome of human sclera associated with primary open-angle glaucoma involve proteins participating in regulation of the extracellular matrix. *Mol Vis*, 26, 623-640.
- Ishida, K., Yamamoto, T., Sugiyama, K., & Kitazawa, Y. (2000). Disk hemorrhage is a significantly negative prognostic factor in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 129(6), 707-714.
- Joachim, S. C., Bruns, K., Lackner, K. J., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2007). Antibodies to alpha B-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal tension glaucoma and IgG antibody patterns against retinal antigen in aqueous humor. *Curr Eye Res*, 32(6), 501-509.
- Joachim, S. C., Grus, F. H., & Pfeiffer, N. (2003). Analysis of autoantibody repertoires in sera of patients with glaucoma. *Eur J Ophthalmol*, 13(9-10), 752-758.
- Joachim, S. C., Reichelt, J., Berneiser, S., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2008). Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246(4), 573-580.
- Joachim, S. C., Wuenschig, D., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2007). IgG antibody patterns in aqueous humor of patients with primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma. *Mol Vis*, 13, 1573-1579.
- Johnson, A. G. (2001). *Immunologie auf 70 Seiten*: Georg Thieme Verlag.

- Johnson, T. V., Bull, N. D., & Martin, K. R. (2011). Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma. *Exp Eye Res*, 93(2), 196-203.
- Joseph, K., Ghebrehiwet, B., & Kaplan, A. P. (1999). Cytokeratin 1 and gC1qR mediate high molecular weight kininogen binding to endothelial cells. *Clin Immunol*, 92(3), 246-255.
- Jünemann, A., Hohberger, B., Rech, J., Sheriff, A., Fu, Q., Schlötzer-Schrehardt, U., . . . Herrmann, M. (2018). Agonistic Autoantibodies to the β 2-Adrenergic Receptor Involved in the Pathogenesis of Open-Angle Glaucoma. *Front Immunol*, 9, 145.
- Kalcheim, C., Carmeli, C., & Rosenthal, A. (1992). Neurotrophin 3 is a mitogen for cultured neural crest cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5), 1661-1665.
- Kanski, B. (2012). *Klinische Ophthalmologie*.
- Kaufmann, S. H. (2013). *Basiswissen Immunologie*: Springer-Verlag.
- Kawa, M. P., Machalinska, A., Roginska, D., & Machalinski, B. (2014). Complement system in pathogenesis of AMD: dual player in degeneration and protection of retinal tissue. *J Immunol Res*, 2014, 483960.
- Khan, M. I., Micheal, S., Akhtar, F., Ahmed, W., Ijaz, B., Ahmed, A., & Qamar, R. (2010). The association of glutathione S-transferase GSTT1 and GSTM1 gene polymorphism with pseudoexfoliative glaucoma in a Pakistani population. *Mol Vis*, 16, 2146-2152.
- Kim, S. Y., Shim, M. S., Kim, K. Y., Weinreb, R. N., Wheeler, L. A., & Ju, W. K. (2014). Inhibition of cyclophilin D by cyclosporin A promotes retinal ganglion cell survival by preventing mitochondrial alteration in ischemic injury. *Cell Death Dis*, 5(3), e1105.
- Köhl, J. (2001). Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol*, 38(2-3), 175-187.
- Komáromy, A. M., Koehl, K. L., & Park, S. A. (2021). Looking into the future: Gene and cell therapies for glaucoma. *Vet Ophthalmol*, 24 Suppl 1(Suppl 1), 16-33.
- Kuehn, M. H., Kim, C. Y., Ostojic, J., Bellin, M., Alward, W. L., Stone, E. M., . . . Kwon, Y. H. (2006). Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension. *Exp Eye Res*, 83(3), 620-628.
- Kuroedov, A. V., Zhukov, V. F., Sol'nov, N. M., Kushim, Z. P., & Makarova, A. (2004). [Efficiency of mass screening system and routine medical check-up of glaucoma patients]. *Voen Med Zh*, 325(4), 38-41.
- Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S. V., Mouthon, L., Ayouba, A., Malanchère, E., Coutinho, A., & Kazatchkine, M. D. (1998). Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods*, 216(1-2), 117-137.
- Lang, G. K. (2019). *Augenheilkunde*: Georg Thieme Verlag KG.
- Li, W. H., Zhao, J., Li, H. Y., Liu, H., Li, A. L., Wang, H. X., . . . Zhang, X. M. (2006). Proteomics-based identification of autoantibodies in the sera of healthy Chinese individuals from Beijing. *Proteomics*, 6(17), 4781-4789.
- Liu, A., Wang, L., Feng, Q., Zhang, D., Chen, K., Yiming, G. H., . . . Dong, L. (2021). Low expression of GSTP1 in the aqueous humour of patients with primary open-angle glaucoma. *J Cell Mol Med*, 25(6), 3063-3079.
- Ludwig, N., Keller, A., Leidinger, P., Harz, C., Backes, C., Lenhof, H. P., & Meese, E. (2012). Is there a general autoantibody signature for cancer? *Eur J Cancer*, 48(15), 2451-2461.
- Ma, A. S., Grigg, J. R., Ho, G., Prokudin, I., Farnsworth, E., Holman, K., . . . Jamieson, R. V. (2016). Sporadic and Familial Congenital Cataracts: Mutational Spectrum and New Diagnoses Using Next-Generation Sequencing. *Hum Mutat*, 37(4), 371-384.

- May, C. A. (2015). Specific densified regions in the postlaminal human glaucomatous optic nerve. *Open Ophthalmol J*, 9, 20-24.
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol*, 6, 257.
- Miglior, S., Pfeiffer, N., Torri, V., Zeyen, T., Cunha-Vaz, J., & Adamsons, I. (2007). Predictive factors for open-angle glaucoma among patients with ocular hypertension in the European Glaucoma Prevention Study. *Ophthalmology*, 114(1), 3-9.
- Mochizuki, M., Sugita, S., Ishikawa, N., & Watanabe, T. (2000). Immunoregulation by aqueous humor. *Cornea*, 19(3 Suppl), S24-25.
- Müller, M., Bhattacharya, S. S., Moore, T., Prescott, Q., Wedig, T., Herrmann, H., & Magin, T. M. (2009). Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation. *Hum Mol Genet*, 18(6), 1052-1057.
- Nieder Korn, J. Y. (1999). Anterior chamber-associated immune deviation. *Chem Immunol*, 73, 59-71.
- Nigro, P., Pompilio, G., & Capogrossi, M. C. (2013). Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis*, 4(10), e888.
- Oglesby, E. N., Tezel, G., Cone-Kimball, E., Steinhart, M. R., Jefferys, J., Pease, M. E., & Quigley, H. A. (2016). Scleral fibroblast response to experimental glaucoma in mice. *Mol Vis*, 22, 82-99.
- Pache, M., & Flammer, J. (2006). A sick eye in a sick body? Systemic findings in patients with primary open-angle glaucoma. *Surv Ophthalmol*, 51(3), 179-212.
- Patel, S., Chen, H., Monti, L., Gould, E., Haralambieva, E., Schmid, J., . . . Pulford, K. (2012). RNASET2--an autoantigen in anaplastic large cell lymphoma identified by protein array analysis. *J Proteomics*, 75(17), 5279-5292.
- Peter Walter, N. P. (2017). *Basiswissen Augenheilkunde*: Springer Verlag Berlin.
- Poletaev, A., & Boura, P. (2011). The immune system, natural autoantibodies and general homeostasis in health and disease. *Hippokratia*, 15(4), 295-298.
- Poletaev, A., & Osipenko, L. (2003). General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus). *Autoimmun Rev*, 2(5), 264-271.
- Pongratz, G., Frieser, R., Brinks, R., Schneider, M., Hartung, W., Fleck, M., & Ehrenstein, B. (2020). Association between autoantibody level and disease activity in rheumatoid arthritis is dependent on baseline inflammation. *Clin Exp Rheumatol*, 38(4), 691-698.
- Qiu, J., Yuan, Y., Li, Y., Haley, C., Mui, U. N., Swali, R., . . . Wu, T. (2020). Discovery of IgG4 Anti-Gliadin Autoantibody as a Potential Biomarker of Psoriasis Using an Autoantigen Array. *Proteomics Clin Appl*, 14(2), e1800114.
- Quigley, H. A. (1993). Open-angle glaucoma. *N Engl J Med*, 328(15), 1097-1106.
- Quigley, H. A. (1999). Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 18(1), 39-57.
- Quigley, H. A., & Broman, A. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*, 90(3), 262-267.
- Quigley, H. A., Nickells, R. W., Kerrigan, L. A., Pease, M. E., Thibault, D. J., & Zack, D. J. (1995). Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36(5), 774-786.
- Reinehr, S., Doerner, J. D., Mueller-Buehl, A. M., Koch, D., Fuchshofer, R., Dick, H. B., & Joachim, S. C. (2021). Cytokine and Complement Response in the Glaucomatous β B1-CTGF Mouse Model. *Front Cell Neurosci*, 15, 718087.
- Resch, H., Garhofer, G., Fuchsjäger-Mayrl, G., Hommer, A., & Schmetterer, L. (2009). Endothelial dysfunction in glaucoma. *Acta Ophthalmol*, 87(1), 4-12.

- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11(9), 785-797.
- Rieck, J. (2013). The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(3), 2393-2409.
- Romano, C., Barrett, D. A., Li, Z., Pestronk, A., & Wax, M. B. (1995). Anti-rhodopsin antibodies in sera from patients with normal-pressure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36(10), 1968-1975.
- Samelska, K., Zaleska-Żmijewska, A., Bałan, B., Grąbczewski, A., Szaflik, J. P., Kubiak, A. J., & Skopiński, P. (2021). Immunological and molecular basics of the primary open angle glaucoma pathomechanism. *Cent Eur J Immunol*, 46(1), 111-117.
- San Segundo-Acosta, P., Montero-Calle, A., Jernbom-Falk, A., Alonso-Navarro, M., Pin, E., Andersson, E., . . . Barderas, R. (2021). Multiomics Profiling of Alzheimer's Disease Serum for the Identification of Autoantibody Biomarkers. *J Proteome Res*, 20(11), 5115-5130.
- Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell Tissue Res*, 343(1), 227-235.
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*, 68(18), 3033-3046.
- Schmetzer, O. (2015). *Basics Immunologie*: Elsevier, Urban et Fischer.
- Schwartz, K., & Budenz, D. (2004). Current management of glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*, 15(2), 119-126.
- Scofield, R. H. (2004). Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet*, 363(9420), 1544-1546.
- Shah, R., & Wormald, R. P. (2011). Glaucoma. *BMJ Clin Evid*, 2011.
- Shin, Y. J., Kim, E., Han, B. K., & Yi, K. (2020). Serum Biomarkers for the Diagnosis of Glaucoma. *Diagnostics (Basel)*, 11(1).
- Shoenfeld, Y., & Toubi, E. (2005). Protective autoantibodies: role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential. *Arthritis Rheum*, 52(9), 2599-2606.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., . . . Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85.
- Sobot, V., Stamenkovic, M., Simic, T., Jerotic, D., Djokic, M., Jaksic, V., . . . Djukic, T. (2022). Association of GSTO1, GSTO2, GSTP1, GPX1 and SOD2 polymorphism with primary open angle glaucoma. *Exp Eye Res*, 214, 108863.
- Sommer, A., Tielsch, J. M., Katz, J., Quigley, H. A., Gottsch, J. D., Javitt, J., & Singh, K. (1991). Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol*, 109(8), 1090-1095.
- Song, B. J., & Caprioli, J. (2014). New directions in the treatment of normal tension glaucoma. *Indian J Ophthalmol*, 62(5), 529-537.
- Stamnes, M. A., Rutherford, S. L., & Zuker, C. S. (1992). Cyclophilins: a new family of proteins involved in intracellular folding. *Trends Cell Biol*, 2(9), 272-276.
- Stein, J. D., Khawaja, A. P., & Weizer, J. S. (2021). Glaucoma in Adults-Screening, Diagnosis, and Management: A Review. *Jama*, 325(2), 164-174.
- Strauss, U., & Bräuer, A. U. (2013). Current views on regulation and function of plasticity-related genes (PRGs/LPPRs) in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(1), 133-138.
- Tezel, G., Seigel, G. M., & Wax, M. B. (1998). Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(12), 2277-2287.

- Tian, B., Gabelt, B. T., Geiger, B., & Kaufman, P. L. (2009). The role of the actomyosin system in regulating trabecular fluid outflow. *Exp Eye Res*, *88*(4), 713-717.
- Trimbuch, T., Beed, P., Vogt, J., Schuchmann, S., Maier, N., Kintscher, M., . . . Kieselmann, O. (2009). Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell*, *138*(6), 1222-1235.
- van Leeuwen, H. C., & O'Hare, P. (2001). Retargeting of the mitochondrial protein p32/gC1Qr to a cytoplasmic compartment and the cell surface. *J Cell Sci*, *114*(Pt 11), 2115-2123.
- Vormehr, M., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2019). Harnessing Tumor Mutations for Truly Individualized Cancer Vaccines. *Annu Rev Med*, *70*, 395-407.
- Wallace, D. M., Murphy-Ullrich, J. E., Downs, J. C., & O'Brien, C. J. (2014). The role of matricellular proteins in glaucoma. *Matrix Biol*, *37*, 174-182.
- Wallace, D. M., Pokrovskaya, O., & O'Brien, C. J. (2015). The Function of Matricellular Proteins in the Lamina Cribrosa and Trabecular Meshwork in Glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther*, *31*(7), 386-395.
- Wax, M., Yang, J., & Tezel, G. (2002). Autoantibodies in glaucoma. *Curr Eye Res*, *25*(2), 113-116.
- Wax, M. B., Barrett, D. A., & Pestronk, A. (1994). Increased incidence of paraproteinemia and autoantibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol*, *117*(5), 561-568.
- Wax, M. B., Tezel, G., Kawase, K., & Kitazawa, Y. (2001). Serum autoantibodies to heat shock proteins in glaucoma patients from Japan and the United States. *Ophthalmology*, *108*(2), 296-302.
- Wax, M. B., Tezel, G., Saito, I., Gupta, R. S., Harley, J. B., Li, Z., & Romano, C. (1998). Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol*, *125*(2), 145-157.
- Weinreb, R. N., Aung, T., & Medeiros, F. A. (2014). The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *Jama*, *311*(18), 1901-1911.
- Wiggs, J. L., & Pasquale, L. R. (2017). Genetics of glaucoma. *Hum Mol Genet*, *26*(R1), R21-r27.
- Xu, H., & Chen, M. (2016). Targeting the complement system for the management of retinal inflammatory and degenerative diseases. *Eur J Pharmacol*, *787*, 94-104.
- Yang, J., Tezel, G., Patil, R. V., Romano, C., & Wax, M. B. (2001). Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *42*(6), 1273-1276.
- Yilmaz, A., Tamer, L., Ates, N. A., Yildirim, O., Yildirim, H., & Atik, U. (2005). Is GST gene polymorphism a risk factor in developing exfoliation syndrome? *Curr Eye Res*, *30*(7), 575-581.
- Yu, Y., Weng, Y., Guo, J., Chen, G., & Yao, K. (2013). Association of glutathione S transferases polymorphisms with glaucoma: a meta-analysis. *PLoS One*, *8*(1), e54037.
- Zhai, Y., Li, J., Yu, W., Zhu, S., Yu, Y., Wu, M., . . . Yao, K. (2017). Targeted Exome Sequencing of Congenital Cataracts Related Genes: Broadening the Mutation Spectrum and Genotype-Phenotype Correlations in 27 Chinese Han Families. *Sci Rep*, *7*(1), 1219.
- Zhang, J., Shi, Q., Yang, P., Xu, X., Chen, X., Qi, C., . . . Liu, Y. (2012). Neuroprotection of neurotrophin-3 against focal cerebral ischemia/reperfusion injury is regulated by hypoxia-responsive element in rats. *Neuroscience*, *222*, 1-9.

8 Anhang

1. Datenblatt

Longitudinale Kammerwasser-Proben

Name: _____

Vorname: _____

Geb.-Datum: _____ Geschlecht: männl. weibl.

Pat.-ID: _____

Kammerwasser-Proben

Entnahmedatum	Eingriff	Proben-ID	RA	LA

Serum-Proben

Entnahmedatum	Eingriff	Proben-ID	RA	LA

Diagnosen

Augenerkrankung	RA	LA
Primäres Offenwinkelglaukom		
Normaldruckglaukom		
Pseudoexfoliationsglaukom		
Engwinkelglaukom		
Pigmentdispersionsglaukom		
Sekundärglaukom		
Congenitales Glaukom		
Trockene AMD		
Feuchte AMD		
Katarakt		
Pseudophakie		
Nachstar		

Presbyopie		
Astigmatismus		
Myopie		
Hyperopie		
Allergische Conjunctivits		
Augentropfenunverträglichkeit		
Epiretinale Gliose		
Cornea guttata		
Okuläre Hypertonie		
Ptosis		

Gesichtsfeld

Glaukom-Gesichtsfeldschaden? RA: Ja Nein

LA: Ja Nein

Datum	RA			LA			Gerät
	MD	MS	PSD/LV	MD	MS	PSD/LV	

HRT

Datum	RA			LA		
	Lineare C/D	Papillenfläche	Randsaumfläche	Lineare C/D	Papillenfläche	Randsaumfläche

GdX

Datum	RA	LA

Autoimmunerkrankungen und Allgemeinerkrankungen

Allgemeinerkrankungen	
Diabetes mellitus Typ 2	
Chronische obstruktive Lungenerkrankung	
Lungenempysem	
Allergische Rhinitis/Bronchitis	
Z.n. Schlaganfall	
Z.n. Herzinfarkt	
Hypertonie	
Hypotonie	
Herzrhythmusstörungen	
Angina pectoris	
Aortenklappenstenose	
Mitralklappenstenose	
Hyponatriämie	
Hypokaliämie	
Hypercholosterinämie	
Hyperlipämie	
Osteoporose	
Hyperthyreose	
Hypothyreose	
Apoplex	
Karzinom	
Tinnitus	
Migräne	

Hörsturz	
Z.n. Thrombose	
Z.n. Schock	
Hyperlipoproteinämie	
Asthma bronchiale	
Allergien allgemein	
Allergiene gegen Konservierungsmittel	
Alzheimer	
Depression	
Leberfunktionsstörungen	
Leberzirrhose	
Nierenfunktionsstörung	
Z.n. Mamma-CA	
Z.n. Prostata-CA	
Prostataadenom	
Prostatahyperplasie	
Ulcus duodei	
Adiposits	
Vorhofflimmern	
Vorhofarrhythmie	
Skoliose	
Koronare Gefäßerkrankung	
Fibromyalgie	
Struge-Weber-Syndrom	
Arthrose	
Hepatitis B	
Osteochondrose	

Autoimmunerkrankungen	
Diabetes Typ 1	
Guillain-Barre-Syndrom	
Hashimoto	
Morbus Crohn	
Morbus Parkinson	
Multiple Sklerose	
Morbus Basedow	
Myastenia Gravis	
Rheuma	
Sicca Syndrom	
Sjögren Syndrom	
Leukämie	
Multiples Myelom	

Medikamente

Augentropfen

Augentropfen	RA	LA	Datum
Timolol AT			
Dorzolamid AT (Trusopt)			
Brinzolamid AT (Azopt)			
Bimatoprost(Lumigan) AT			
Travoprost(Travatan) AT			
Lantanoprost (Xalatan) AT			
Tafluprost (Taflotan) AT			
Clonidin (Isoglaucan) AT			
Brimonidin (Alphagan) AT			
Pilocarpin AT			
Brinzolamid/Timolol AT (Azarga)			
Brimonidin/Timolol AT (Combigan)			
Dorzolamid/Timolol AT (Cosopt)			
Timolol/Pilocarpin (TP- Ophtal)			
Bimatoprost/Timolo AT (Ganfort)			
Latanoprost/Timolol AT (Xalacom AT)			
Travoprost/Timolol (DuoTrav AT)			
Diamox, Glaupax			
Gentamicin			
Ofloxacin AT (Floxal)			
Moxifloxacin (Vingamox)			
Dexa EDO AT			
Diclofenac (Voltaren) AT			

Aciclovir			
Hyaluronsäure (Hyo- GelAT,Artelac AT)			
Dexpanthenol (BepanthenAS, Corneregel)			
Natriumchlorid 5% (Omni-Sorb)			
Hypromellose (Berberil)			

2. Antigenliste

Abkürzung	Artikel	Hersteller
HSPD1	heat shock protein 60kDa (HSP60) human, recombinant	Enzo LifeSciences
NTF3	Neurotrophin 3 Protein	Biomol
GST	Glutathion S transferase (GST) full-length ORF	Abnova
VIM	Vimentin, human	ProGen
CLTA	Clathrin A, B, C	Sigma - Aldrich
SPTA1	Spectrin, alpha	Sigma - Aldrich
ADRB2	Beta - 2 - Adrenergic Receptor	Sigma - Aldrich
b-S-Crys	Beta - S - Crystallin	Sigma - Aldrich
HSPA1A	Heat shock protein 70, HSP70	Sigma - Aldrich
ANXA5	Annexin V	Sigma - Aldrich
SNCG	Gamma - Synuclein	Sigma - Aldrich
VDAC2	Recombinant human voltage dependent anion channel protein 2 (VDAC2)	Abcam
CALD1	Recombinant human Caldesmon	Abcam
TOP1	Topoisomerase 1 human	Sigma
GAPDH	Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase	Abcam
14-3-3 a/b	Recombinant Human 14-3-3 beta protein	Abcam
IQGAP	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 (611 - 710) protein	Abnova
PNMA2	Human paraneoplastic antigen Ma2 PNMA2 full- length ORF (AAH62301, 1 a.a. - 364 a.a.) recombinant protein	Abnova
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	Abnova
MCTS1	Malignant T-cell-amplified sequence 1	Abnova
C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial C1QBP (Human) Recombinant Protein (P01)	Abnova

TARS	Human Threonine--tRNA ligase 1, cytoplasmic TARS full-length ORF (NP_689508.3, 1 a.a. - 723 a.a.) recombinant protein	Abnova
ANP32B	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	Abnova
FLNA	Human Filamin A FLNA full-length ORF (AAH14654, 1 a.a. - 838 a.a.) recombinant protein	Abnova
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	US biological
TNNI3	Troponin I, cardiac muscle	Abcam
Cyclo A	Cyclophilin A	Sigma-Aldrich
g Syn	Gamma-Synuclein	Sigma-Aldrich
NSE	Neuron - specific enolase	Sigma-Aldrich
LPFR3	Lipid phosphate phosphatase-related protein type 3	Protagen
CLUS	clusterin secretory from human, recombinant His-Tag	Enzo LifeScience
CALR	Calreticulin	Sigma-Aldrich
b-L-Crys	Beta - L - Crystallin	Sigma-Aldrich
SOD	Superoxid dismutase 1	Sigma
ACTN1	Human alpha actinin ACTN1 full-length ORF (NP_001093.1, 1 a.a. - 892 a.a.) recombinant protein	Abnova
COPA	Coatomer subunit alpha	Abnova
HNRNPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Abnova
HSP27	heat shock protein 27kDa HSP27 recombinant, human	Enzo LifeScience
TGFB111	Human Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein TGFB111 full-length ORF (AAH32545, 1 a.a. - 444 a.a.) recombinant protein	Abnova
ACT	Actin from bovine muscle	Sigma-Aldrich

3. Progressionsraten aller Patienten

Alle rot markierten Werte sind signifikant.

Patient	r ²	N	Progressionsrate / Tag	Progressionsrate / Jahr
1	0,151	7	0,000	-0,049
2	0,744	7	0,003	1,276
3	0,674	5	-0,011	-3,902
4	0,582	5	-0,006	-2,196
5	0,262	7	-0,008	-2,776
6	0,495	5	-0,006	-2,069
7	0,015	4	0,000	0,122
8	0,903	3	-0,003	-1,050
9	0,022	4	-0,001	-0,211
10	0,863	3	0,008	2,791
11	0,045	5	0,009	3,367
12	0,322	15	-0,001	-0,216
13	0,984	5	-0,002	-0,575
14	0,172	9	-0,001	-0,367
15	0,977	3	-0,003	-0,982
16	0,901	10	-0,007	-2,398
17	0,149	3	0,031	11,349
18	0,555	7	-0,006	-2,332
19	0,339	9	-0,003	-1,065
20	0,484	8	-0,003	-0,990
21	0,203	3	0,000	-0,157

22	0,023	4	0,000	0,068
23	0,013	8	0,000	-0,098
24	0,304	5	0,002	0,909
25	0,719	4	0,004	1,528
26	0,485	5	-0,006	-2,290
27	0,164	3	0,002	0,908
28	0,464	7	-0,004	-1,296
29	0,432	3	-0,019	-6,909
30	0,005	5	0,000	0,014
31	0,031	6	0,000	0,093
32	1,000	3	-0,001	-0,520
33	0,358	5	-0,002	-0,682
34	0,199	4	0,001	0,363
35	0,987	3	0,013	4,670
36	0,405	6	-0,001	-0,507
37	0,451	6	-0,003	-1,008
38	0,769	6	-0,002	-0,686
39	0,139	4	0,000	-0,086
40	0,056	4	0,000	-0,144
41	0,038	3	0,000	-0,047
42	0,997	4	-0,003	-1,024
43	0,084	3	-0,001	-0,335
44	0,972	3	-0,001	-0,190
45	0,972	3	-0,001	-0,190

46	0,841	4	-0,002	-0,847
47	0,998	3	-0,020	-7,290
48	0,861	3	-0,008	-2,813
49	0,881	3	-0,006	-2,124
50	0,487	3	0,003	0,965
51	0,863	5	-0,003	-1,220
52	0,531	4	0,001	0,323
53	0,830	3	0,015	5,597
54	0,651	6	-0,001	-0,273
55	0,072	17	0,000	-0,175
56	0,682	3	0,001	0,334
57	0,997	3	-0,053	-19,497
58	0,005	6	0,000	-0,178
59	0,898	3	-0,002	-0,623
60	0,203	6	-0,001	-0,454
61	0,676	4	0,007	2,585
62	0,855	4	-0,004	-1,284
63	0,104	5	0,000	0,175
64	0,161	4	-0,001	-0,332
65	0,065	4	0,000	0,048
66	0,215	5	-0,001	-0,206
67	0,694	17	-0,002	-0,857
68	0,064	3	0,000	0,030
69	0,539	5	-0,001	-0,218
70	0,005	4	0,000	0,154

71	0,577	4	-0,003	-1,002
72	0,577	4	-0,003	-1,002
73	0,892	4	0,001	0,420
74	0,505	4	0,001	0,220
75	0,126	7	0,001	0,491
76	0,465	6	0,003	1,070
77	0,260	3	-0,006	-2,342
78	0,260	3	-0,006	-2,342
79	0,558	5	-0,016	-5,744
80	0,073	7	0,001	0,415
81	0,527	4	-0,005	-1,780
82	0,904	3	-0,002	-0,850
83	0,231	3	-0,002	-0,831
84	0,065	5	0,000	-0,127
85	0,665	7	-0,003	-1,039
86	0,462	4	0,003	1,192
87	0,040	3	-0,001	-0,245
88	0,239	3	0,003	1,277
89	0,314	7	-0,001	-0,328
90	0,102	9	-0,001	-0,199
91	0,007	6	0,000	0,063
92	0,176	6	-0,001	-0,277
93	0,161	10	-0,001	-0,268
94	0,003	3	0,000	-0,031

95	0,772	5	-0,006	-2,132
96	0,994	3	0,000	0,105
97	0,455	7	-0,002	-0,769
98	0,076	9	-0,001	-0,496
99	0,002	5	0,000	0,089
100	0,549	5	-0,002	-0,559
101	0,013	9	0,000	0,103
102	0,972	5	-0,005	-1,770
103	0,374	5	0,000	-0,150
104	0,261	7	-0,002	-0,752
105	0,125	6	0,003	1,066
106	0,000	7	0,000	0,003
107	0,062	7	0,001	0,183
108	0,810	4	-0,009	-3,268
109	0,727	3	-0,001	-0,322
110	0,283	12	-0,001	-0,525
111	0,047	11	0,000	0,160
112	0,084	12	0,000	-0,182
113	0,312	5	-0,003	-0,958
114	0,105	3	0,000	-0,084
115	0,121	5	-0,003	-1,029
116	0,603	5	-0,026	-9,361
117	0,220	6	-0,001	-0,479
118	0,981	3	-0,003	-0,950
119	0,408	4	0,001	0,506

120	0,499	4	0,002	0,815
121	0,100	4	0,002	0,685
122	0,499	4	0,002	0,815
123	0,222	3	-0,005	-1,716
124	0,996	3	-0,013	-4,811
125	0,222	3	-0,005	-1,716
126	0,996	3	-0,013	-4,811
127	0,779	6	-0,002	-0,797
128	0,556	6	-0,001	-0,357
129	0,581	5	0,004	1,537
130	0,973	3	0,005	1,941
131	0,361	4	0,015	5,595
132	0,007	7	0,001	0,472
133	0,375	8	0,001	0,368
134	0,049	8	0,000	-0,100
135	0,809	6	-0,004	-1,363
136	0,482	5	-0,012	-4,210
137	0,171	7	-0,001	-0,250
138	0,506	3	0,014	5,120
139	0,116	10	0,002	0,550
140	0,042	10	0,001	0,269
141	0,004	6	0,000	0,016
142	0,104	6	-0,001	-0,256
143	0,004	6	0,000	0,016

144	0,938	3	-0,002	-0,644
145	0,296	7	0,001	0,267
146	0,997	4	-0,001	-0,339
147	0,846	5	-0,001	-0,482
148	0,959	3	0,004	1,408
149	0,689	4	0,002	0,758
150	0,366	6	-0,001	-0,276
151	0,054	5	0,000	-0,072
152	0,693	6	-0,005	-1,785
153	0,839	6	-0,004	-1,383
154	0,919	3	-0,003	-1,121
155	0,971	4	-0,002	-0,616

4. Ergebnisse Kruskal Wallis Test

Antikörper	H-Wert	N-Wert	p-Wert
HSPD1	5,922	46	0,116
NTF3	1,396	64	0,706
GST	0,063	68	0,995
VIM	3,516	86	0,318
ADRB2	0,405	65	0,939
b-S-Crys	4,443	81	0,217
HSPA1A	1,214	45	0,749
SNCG	1,502	53	0,681
CALD1	2,57	78	0,462
TOP1	0,783	82	0,853
GAPDH	2,034	54	0,565
C1QBP	1,633	50	0,651
GFAP	1,959	61	0,58
Cyclo-A	4,064	64	0,254
g-Syn	5,739	65	0,125
NSE	2,342	57	0,504
LPPR3	3,746	85	0,29
CLUS	2,589	62	0,459
CALR	0,561	63	0,905
b-L-Crys	4,162	69	0,244
HNRNPF	0,357	56	0,948
HSP27	1,141	48	0,767
CLTA	2,415	46	0,49
AK Level gesamt	1,323	91	0,723

