

Sebastian Aretz
Dr. sc. hum.

Proteomanalyse der humanen Glaskörperflüssigkeit und des Sekretoms retinaler Pigmentepithelzellen

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. rer.nat. J. Kopitz

Im Gegensatz zu anderen Körperflüssigkeiten, wie Blutplasma oder Liquor, ist das Proteom der Glaskörperflüssigkeit des menschlichen Auges erst unvollständig aufgeklärt. Da der Glaskörper den größten Teil der menschlichen Auges ausmacht und mit anderen okulären Geweben in Verbindung steht, ist davon auszugehen, dass Bestandteile des Glaskörpers neben rein strukturellen Funktionen auch an einer Vielzahl biochemischer Prozesse, wie Wachstumsregulation oder interzellulärer Kommunikation im Auge, beteiligt sind. Somit kann eine detaillierte Analyse der menschlichen Glaskörperflüssigkeit, sowohl zum Verständnis solcher physiologischer Prozesse im Auge als auch möglicher pathologischer Veränderungen beitragen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit eine umfassende Katalogisierung der im Glaskörper nachweisbaren Proteine vorgenommen. Da aus ethischen Gründen eine Probengewinnung von gesunden Probanden nicht möglich war, wurde für die Studie Glaskörpermaterial von Patienten, die eine Vitrektomie im Rahmen der Behandlung einer epiretinalen Gliose erhalten haben, herangezogen. Diese Operationsindikation wurde ausgewählt, da im Rahmen dieser Erkrankung keine Proteomveränderungen des Glaskörpers, zu erwarten sind. Auf Grund der Komplexität der Proteinzusammensetzung im Glaskörper war eine Vorfraktionierung der Proben vor der eigentlichen Proteomanalyse notwendig. Dazu wurden verschiedene Möglichkeiten der Vorfraktionierung getestet. Die meisten Proteine waren nach einer kombinierten Vorfraktionierung durch Flüssigphasen-Isoelektrische-Fokussierung und anschließender SDS-Gelelektrophorese nachweisbar. Da bei diesem Verfahren gegenüber einfachen Verfahren, die nur einen oder gar keinen Vorfraktionierungsschritt beinhalten, auch einige Proteine nicht mehr nachweisbar waren, ist zur Erstellung einer umfassenden Proteomliste eine synergistische Kombination verschiedener Vorfraktionierungsstrategien notwendig. Auf diese Weise ist es gelungen nach tryptischem Verdau, der durch die Vorreinigung erhaltenen Fraktionen über massenspektrometrische Analyse mit einem UPLC-gekoppelten Tandemmassenspektrometer, einen Katalog von insgesamt 1111 im Glaskörper nachweisbaren Proteine zu erstellen. Diese Proteine wurden auf der Basis ihrer Gen-Ontologie (GO-Term) mit Hilfe bioinformatischer Methoden nach ihrer Funktion klassifiziert. Beim Vergleich der Glaskörperproteome von 3 Individuen zeigte sich eine sehr große Heterogenität der individuellen Proteome. Insgesamt wurden nur 262 der 1111 Proteine in allen drei Proben gefunden.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass ein großer Teil der im Glaskörper vorhandenen Proteine aus dem Blutplasma über die Vorderkammer in den Glaskörper gelangen. Ein Vergleich unseres Katalogs des Glaskörperproteoms mit einem aus dem HUPO-Projekt stammenden umfassenden Katalog des Plasmaproteoms bestätigt, dass die Proteine, die im Blutplasma hochabundant sind, auch im Glaskörper vorkommen. Allerdings ergibt sich aus unseren Untersuchungen auch, dass 73% aller im Glaskörper nachgewiesenen Proteinspezies bisher nicht im Blutplasma gefunden wurden. Dies zeigt, dass offensichtlich im Auge selbst synthetisierte Proteine in ganz erheblichem Maße zur Zusammensetzung des Glaskörperproteoms beitragen. Um in diesem Zusammenhang zu überprüfen, ob das retinale Pigmentepithel (RPE) die Glaskörperzusammensetzung beeinflussen kann, wurde im nächsten Schritt das RPE-Sekretom analysiert.

Zur Analyse des RPE-Sekretoms wurden aus Spenderaugen RPE-Zellen gewonnen und kultiviert. Das konditionierte Medium der Kulturen wurde dann mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden analysiert. Es wurden 319 Proteinspezies im Sekretom kultivierter RPE-Zellen nachgewiesen. Davon waren 88% auch im Glaskörper vorhanden. Demgegenüber lag die Überlappung mit dem HUPO Plasmaproteom bei nur 3,5%. Diese Zahlen stärken die Hypothese, dass das RPE beträchtlich zur Glaskörperzusammensetzung beitragen kann. Zu Vergleichszwecken wurde auch das Sekretom einer permanenten vom RPE abgeleiteten Zelllinie (ARPE-19) untersucht. Dabei wurden nur 82% der in den primären Kulturen gefundenen Proteine auch in der Zelllinie nachgewiesen.

Obwohl die oben beschriebene große Heterogenität in der Glaskörperzusammensetzung verschiedener Individuen die Detektion spezifischer pathologischer Veränderungen enorm erschwert, wurden erste noch sehr präliminäre Versuche zur Detektion solcher Marker im Glaskörperflüssigkeit von Patienten mit trockener altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) durchgeführt. Es wurden dabei 5 Proteine gefunden, die vermehrt in den AMD Proben auftauchen. Bei 10 anderen Proteinen wurde in den Normalkontrollen eine vermehrte Expression gegenüber den AMD-Proben gefunden. Diese Untersuchungen wurden allerdings nur mit jeweils 5 Kontrollproben und 5 AMD-Proben durchgeführt. Hier ist eine Verifizierung mit einer deutlich größeren Probenzahl abzuwarten.

Insgesamt stellt die vorliegende Arbeit die bisher umfassendste Analyse der menschlichen Glaskörperflüssigkeit und die erste Sekretomanalyse an RPE und ARPE-19-Zellen dar. Damit wurde eine Grundvoraussetzung für die folgende Analyse pathologischer Glaskörperveränderungen und der Rolle des RPEs bei solchen Veränderungen geschaffen