

Matthias Nobl  
Dr. med.

## **Proteomanalyse des Glaskörpers bei exsudativer altersabhängiger Makuladegeneration**

Fach/Einrichtung: Augenheilkunde

Doktorvater: apl. Prof. Dr. med. Michael J. Koss

Die exsudative altersabhängige Makuladegeneration ist die häufigste Ursache für Erblindung in den industrialisierten westlichen Ländern. Trotz intensiver klinischer und vorklinischer Forschung wird die Erkrankung bis jetzt noch nicht komplett verstanden, insbesondere auf dem molekularen Level. Die Einführung von intravitrealen anti-VEGF Medikamenten stellt einen Durchbruch in der Behandlung dar. Diese Therapie stabilisiert den Visus in einem Großteil der Patienten, jedoch kommt es nur bei einem Drittel zu einer Verbesserung und bei einigen Patienten bleibt eine Wirkung ganz aus. Auch das Therapiemanagement ist für die behandelnden Augenärzte eine große Herausforderung. Es ist im Voraus schwer einzuschätzen, ob und wenn ja wie gut Patienten auf die Therapie ansprechen. Die individuell notwendige Intensität der Behandlung im Verlauf ist ebenfalls nicht vorherzusagen. Um diese Hindernisse zu überwinden, wurde vorliegende Studie mit dem Ziel durchgeführt, signifikante Veränderungen des Proteoms des Glaskörpers bei der exsudativen Makuladegeneration zu identifizieren. Dadurch können therapeutische und diagnostische Biomarker herausgearbeitet oder eventuell neue Therapieansätze aufgezeigt werden.

Bei der vorliegenden Dissertationsschrift handelt es sich um eine retrospektive klinisch-experimentelle Arbeit zur Analyse des Glaskörperproteoms bei exsudativer altersabhängiger Makuladegeneration. 132 Patienten wurden fortlaufend in die Studie eingeschlossen. Davon lag bei 108 Patienten eine nicht vorbehandelte exsudative altersabhängige Makuladegeneration vor. 24 Patienten mit Mouches volantes bildeten die Kontrollgruppe. Die Studie beruht damit auf einem der größten Patientenkollektive im Vergleich zu ähnlichen Studien.

Zur Gewinnung der Proben wurde bei den Patienten der Fallgruppe im Rahmen einer Mehrfachtherapie eine limitierte 23-Gauge single port Kernvitrektomie mittels handgehaltenem Intrektor durchgeführt. Patienten aus der Kontrollgruppe wurden mit dem gleichen chirurgischen Verfahren behandelt.

Der gewonnene Glaskörper wurde in einem bottom-up Ansatz mittels massenspektrometrischer Techniken analysiert. Nach tryptischem Verdau wurde dieser in einem ersten Schritt via Kapillarelektrophorese online gekoppelt an ein Flugzeitmassenspektrometer untersucht, um Peptide zu detektieren und semiquantifizieren. Flüssigchromatographie online gekoppelt an Tandem-Massenspektrometrie kam in einem zweiten Schritt zum Einsatz, um die detektierten Peptide anhand ihrer Aminosäuresequenz zu identifizieren. Für die statistische Auswertung fanden in dieser Studie erstmalig in der Literatur verschiedene klinische Diagnosegruppen der exsudativen altersabhängigen Makuladegeneration Verwendung. Nur dieser Ansatz wird der Komplexität der Erkrankung gerecht und ermöglicht es den Einfluss einer Blutung auf die Ergebnisse auszuschließen. Choroidale Neovaskularisation ohne Blutung, choroidale Neovaskularisation mit Blutung und hämorrhagische choroidale Neovaskularisation waren die Gruppen, denen die Patienten zugeteilt wurden. Für die Identifikation von signifikanten Veränderungen im Glaskörper wurden zufällig ausgewählte zwei Drittel der Proben als Analyse-Set in Betracht gezogen. Das restliche Drittel bildete das Validierungs-Set und wurde mittels Receiver Operating Characteristic analysiert.

Insgesamt wurden 765 Peptide im Glaskörper detektiert. Diese ließen sich 101 Proteinen zuordnen. Vier Proteine mit signifikant unterschiedlicher Signalintensität wurden in der statistischen Analyse auf Basis des Abschlusstestprinzips herausgearbeitet. Dabei handelt es sich um Clusterin, Opticin, Pigment epithelium-derived factor und Prostaglandin-H2 D-isomerase.

Zur Bestätigung wurde ein Vergleich von allen Proben der Fallgruppe und der Kontrollgruppe aus dem Analyse-Set ohne Berücksichtigung der Diagnosegruppen durchgeführt. Alle vier genannten Proteine erzielten ein signifikantes Ergebnis. Die Validierung mittels Receiver Operating Characteristic brachte folgende Resultate: 0,747 für Clusterin; 0,656 für Opticin; 0,514 für Pigment epithelium-derived factor und 0,712 für Prostaglandin-H2 D-isomerase. Vor allem Clusterin und Prostaglandin-H2 D-isomerase konnten so in einem unabhängigen Probenstet validiert werden. Zur weiteren Bestätigung der massenspektrometrischen Ergebnisse wurde die vitreale Proteinkonzentration der vier Proteine mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay gemessen. Dabei bildeten sich die gleichen Veränderungen ab, die schon in der Massenspektrometrie beobachtet worden sind.

Um das Alter als potentiellen Confounder ausschließen zu können, wurden Rangkorrelationskoeffizienten für Alter und Proteinkonzentration berechnet. Es wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang beobachtet.

In dieser Studie wurden Clusterin, Opticin, Pigment epithelium-derived factor und Prostaglandin-H2 D-isomerase erstmalig unter der Verwendung von klinischen Diagnosegruppen mit der exsudativen altersabhängigen Makuladegeneration assoziiert. Sie könnten in Zukunft Verwendung finden als diagnostische oder therapeutische Biomarker und so einen ersten Schritt in Richtung individualisierte Medizin in diesem Bereich darstellen. Zusätzlich könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Ausblick auf zukünftige Therapieansätze geben. Besonders Clusterin scheint in dieser Hinsicht interessant zu sein, da bereits gezeigt werden konnte, dass gewisse Wirkstoffe, sogenannte Antisense-Oligonukleotide, gegen dieses Protein potente Inhibitoren der Angiogenese sind und Apoptose in Endothelzellen induzieren.

Weitere Studien, maßgeschneidert für die vier genannten Proteine und auf Basis von seriellen Daten, sind jedoch notwendig, um Clusterin, Opticin, Pigment epithelium-derived factor und Prostaglandin-H2 D-isomerase als Biomarker zu bestätigen und neue Therapieansätze mit ihnen als Zielstruktur zu erforschen.