

Ivanka Steliyanova Dacheva
Dr. med.

Proteomanalyse von Glaskörperflüssigkeit bei Patienten mit Makulaödem infolge eines retinalen Venenverschlusses

Fach/Einrichtung: Augenheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. Michael J. Koss

Retinale Venenverschlüsse sind eine der häufigsten Erblindungsursachen in den westlichen Ländern. Trotz großer Fortschritte in der Diagnostik und Therapie gibt es nur wenige Erkenntnisse über die pathophysiologischen Mechanismen. Das vitreale Proteom bei dieser Erkrankung bleibt bis dato verschlüsselt.

Das Ziel dieser Dissertation ist einen Überblick über das vitreale Proteom beim retinalen Venenverschluss zu verschaffen, sowie dysregulierte Proteine zu identifizieren und näher zu analysieren.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 44 nicht vortherafierte Patienten mit Makulaödem nach einem retinalen Venenverschluss ohne neovaskuläre Komplikationen und 24 Kontrollen mit Mouches volantes eingeschlossen. Die Entnahme von unverdünnten Glaskörperproben erfolgte im Rahmen einer 23-gauge Kernvitrektomie vor der intravitrealen Medikamenteninjektion. Sie wurden nach dem tryptischen Verdau (Bottom-up Verfahren) durch Kapillarelektrophorese gekoppelte Massenspektrometrie zur Proteinsequenzierung und durch Flüssigkeitschromatografie gekoppelte Tandemmassenspektrometrie zur Proteinidentifizierung analysiert. Die identifizierten Peptidsequenzen wurden ihren Mutterproteinen zugeordnet. Zur Suche nach dysregulierten Proteinen wurden die Unterschiede in der Signalintensität zwischen zufällig ausgesuchten 30 Proben der Venenverschlussgruppe und 16 Proben der Kontrollgruppe mit Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Das restliche Drittel der Proben wurde zur Verifizierung der dysregulierten Proteine mit receiver operating characteristic-Analyse verwendet. Der quantitative Proteinnachweis erfolgte mit Enzyme-linked Immunosorbent Assay von jeweils zwölf Proben mit einem retinalen Venenverschluss und Kontrollen. Die Proteine wurden zusätzlich mit Hilfe von WebGestalt (WEB-base Gene SeT AnaLysis Toolkit), Wikipathways, PathwayCommons Tools und Disease analysis tool, sowie STRING Database analysiert. Zur Untersuchung des

Einfluss verschiedener Faktoren auf das Glaskörperproteom und insbesondere auf die dysregulierten Proteine wurden Subgruppen nach den folgenden Kriterien gebildet: Größe der betroffenen Fläche, Ischämiegrad, Dauer des retinalen Venenverschlusses, Verteilung intraretinaler Flüssigkeit, Lage des Glaskörpers, Linsenstatus.

Insgesamt wurden 709 Peptide von 96 Mutterproteinen im Glaskörper identifiziert. Die Signalintensitäten von 17 Proteinen unterschieden sich signifikant im Vergleich zwischen der Venenverschluss- und der Kontrollgruppe. Nach Korrektur für multiples Testen nach Benjamini-Hochberg blieben fünf Proteine signifikant dysreguliert - Clusterin (Regulationsfaktor 1,85, $p=0,012$), Complement factor C3 (Regulationsfaktor 1,49, $p=0,035$), Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 (IGLL5, Regulationsfaktor 3,84, $p=0,0014$), Opticin (Regulationsfaktor 0,51, $p=0,0034$) und Vitronectin (Regulationsfaktor 10,2, $p=0,0088$). Die weitere Analyse zeigte eine große Fläche unter der Kurve – entsprechend: 0,884, 0,955, 1,000, 0,741 und 0,786. Die Signalintensitäten dieser fünf Proteine waren auch signifikant in den meisten Vergleichen zwischen den Subgruppen und der Kontrollgruppe. Durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay konnten signifikant hohe bzw. niedrige Konzentrationen von vier der fünf dysregulierten Proteine nachgewiesen werden – Clusterin (Regulationsfaktor 2,53, $p=0,00003$), Complement factor C3 (Regulationsfaktor 1,13, $p=0,038$), Opticin (Regulationsfaktor 0,91, $p=0,049$) und Vitronectin (Regulationsfaktor 2,84, $p=0,00014$).

Weitere Analysen der dysregulierten Proteine zeigten eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen (Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 und Complement factor C3). Complement factor C3 führt über eine Endothelschädigung und Aktivierung von Komplementrezeptoren zu einer Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Das Clusterin spielt vielfältige Rollen – Regulation der Apoptose, lipidbindende und chaperon-ähnliche Eigenschaften, Regulation der Komplementkaskade, Zelladhäsion, -überlebens und -proliferation. Das herunterregulierte Opticin spielt eine Rolle bei strukturellen Veränderungen im Glaskörper und ist ein Angiogeneseinhibitor. Die Hauptfunktionen von Vitronectin sind Regulation der Hämostase und Förderung der Zelladhäsion und -migration.

Clusterin, Complement factor C3, Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5, Opticin und Vitronectin sind im Glaskörper von Patienten mit einem retinalen Venenverschluss dysreguliert und könnten in der Pathophysiologie von dieser Erkrankung eine Rolle spielen. Die genauen Mechanismen sollten in weiteren experimentellen Studien untersucht werden.