

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. C. A. Deeg

# Differenziell exprimierte Proteine im Serum von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Johanna Katrin Zipplies  
aus  
Breitbrunn

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Deeg
Koreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Erhard
	Univ.-Prof. Dr. Ammer
	Univ.-Prof. Dr. Köstlin
	Univ.-Prof. Dr. Hartmann

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

**Meinen Eltern**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Klinisches Bild der equinen rezidivierenden Uveitis .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b>Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis .....</b>	<b>12</b>
2.3.1	Leptospireninfektion.....	12
2.3.2	ERU als autoimmunmedierte Erkrankung .....	14
<b>2.4</b>	<b>Pathogenese der ERU .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>Therapie der ERU.....</b>	<b>21</b>
2.5.1	Konservative Therapie.....	21
2.5.2	Cyclosporinimplantate .....	22
2.5.3	Trans-pars-plana Vitrektomie .....	22
<b>2.6</b>	<b>Retinale Autoantigene.....</b>	<b>22</b>
<b>2.7</b>	<b>Humane Uveitis.....</b>	<b>26</b>
<b>2.8</b>	<b>Die Bedeutung von Serum.....</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>Proteomics .....</b>	<b>27</b>
2.9.1	2D-Gelelektrophorese.....	29
2.9.2	2D-Difference gel electrophoresis (DIGE).....	29
2.9.3	Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) zur Proteinidentifikation.....	30
<b>2.10</b>	<b>Serum- und Plasmaproteomics.....</b>	<b>31</b>
2.10.1	Humanes Serumproteom.....	31
2.10.2	Serumproteomuntersuchung bei Tieren .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Serumgewinnung.....	35
<b>3.2</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>36</b>
3.2.1	Puffer .....	36
3.2.2	Puffer und Lösungen für die Serumdepletion .....	36
3.2.3	Puffer und Lösungen für die zweidimensionale Gelelektrophorese .....	37

3.2.4	Puffer und Lösungen für 2D-DIGE .....	38
3.2.5	Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
<b>3.3</b>	<b>Methodenvergleich für die Serumdepletion.....</b>	<b>40</b>
3.3.1	Albumin und IgG Depletionskit .....	40
3.3.2	Albumindepletion mittels Salzfällung .....	40
3.3.3	Depletionskit ProteomeLab IgY-12 high capacity.....	41
<b>3.4</b>	<b>Aufbereitung der Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese.....</b>	<b>42</b>
3.4.1	Dialyse .....	42
3.4.2	Konzentrierung .....	43
<b>3.5</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Serum- und depletierten Serumproben ..</b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Eindimensionale Gelelektrophorese .....</b>	<b>44</b>
3.6.1	Durchführung der Elektrophorese mit Fertiggelen .....	44
<b>3.7</b>	<b>Zweidimensionale Gelelektrophorese.....</b>	<b>44</b>
3.7.1	Rehydratisierung der Proben.....	44
3.7.2	Isoelektrische Fokussierung .....	45
3.7.3	Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele für die 2. Dimension .....	46
3.7.3.1	Herstellung der kleinen Gele.....	46
3.7.3.2	Herstellung der großen Gele.....	47
3.7.4	Äquilibration und zweite Dimension .....	48
3.7.5	Färbung der Gele.....	49
3.7.5.1	Silberfärbung.....	49
3.7.5.2	Bluesilver Färbung .....	50
3.7.6	Trocknung der gefärbten Gele.....	50
<b>3.8</b>	<b>2D-DIGE .....</b>	<b>51</b>
3.8.1	Vorbereitung der Proben für die Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen .....	53
3.8.2	Herstellung des internen Standards .....	53
3.8.3	Fluoreszenzmarkierung der Proben .....	54
3.8.3.1	Experiment 2D-DIGE 1: Markierung der Serumproben mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.....	54
3.8.3.2	Experiment 2D-DIGE 2: Markierung der depletierten Serumproben mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen .....	55
3.8.4	Scannen der Gele.....	55
<b>3.9</b>	<b>Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen.....</b>	<b>56</b>
3.9.1	Entfärben und Verdauen der Proteinspots .....	56
3.9.2	Massenanalyse .....	57
3.9.3	Datenbanksuche.....	58

<b>3.10</b>	<b>Densitometrische Bildanalyse .....</b>	<b>59</b>
3.10.1	Eindimensionale Gele.....	59
3.10.2	Zweidimensionale Gele .....	59
<b>3.11</b>	<b>Statistische Auswertung der Fluoreszenz-markierten Gele mittels der DeCyder Software Version 6.5.....</b>	<b>60</b>
3.11.1	DIA-Differential in gel analysis.....	60
3.11.2	BVA-Biological variation analysis .....	60
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Erstellung einer Landkarte des Serumproteoms des Pferdes.....</b>	<b>63</b>
4.1.1	Identifikationen von Serumproteinen.....	64
<b>4.2</b>	<b>Ermittlung der besten Methode zur Entfernung der abundanten Proteine im Serum.....</b>	<b>69</b>
4.2.1	Vergleich des Albumin- und IgG-Entfernungskits und der Serumdepletion mittels Salzfällung .....	69
4.2.2	Entfernung abundanter Serumproteine durch polyklonale Antikörper .....	71
	(ProteomeLab IgY-12 Säule).....	
4.2.2.1	Proteinidentifikationen aus dem Eluat der Serumdepletionssäule ProteomeLab IgY-12 .....	73
4.2.2.2	Validierung der Entfernungseffizienz von Albumin .....	74
4.2.2.3	Bestimmung der Reduktion des Proteins Apolipoprotein A-I.....	75
<b>4.3</b>	<b>Vergleich der Vollseren an ERU erkrankter Pferde mit augengesunden Kontrollseren .... mittels 2D-DIGE Technologie (2D-DIGE Experiment 1) .....</b>	<b>76</b>
4.3.1	Darstellung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Vollserumgele.....	77
4.3.2	Ermittlung differenziell exprimierter Proteine im Vollserum von an ERU .....	80
	erkrankten Pferden .....	
4.3.2.1	Differenziell exprimierte und identifizierte Proteine im Vollserum.....	85
<b>4.4</b>	<b>Vergleich der depletierten Seren an ERU erkrankter Pferde mit augengesunden .....</b>	<b>90</b>
	<b>depletierten Kontrollseren mittels 2D-DIGE Technologie (2D-DIGE Experiment 2) .....</b>	<b>90</b>
4.4.1	Darstellung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Gele mit depletiertem Serum.....	90
4.4.2	Ermittlung differenziell exprimierter Proteine im depletierten Serum .....	93
4.4.2.1	Differenziell exprimierte und identifizierte Proteine im depletierten Serum .....	97
<b>4.5</b>	<b>Auflistung und Expressionsmuster aller identifizierten differenziell exprimierten .....</b>	<b>102</b>
	<b>Proteine im Serum von Pferden mit ERU.....</b>	<b>102</b>

<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>127</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>147</b>

μ	Mikro (10)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AMD	engl.: Age related maculadegeneration Alterbedingte Makuladegeneration
ApoH	Apolipoprotein H
ApoA-IV	Apolipoprotein AIV
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AHSG	Alpha-2HS-Glykoprotein
ATIII	Antithrombin III
BP	Bandpass
°C	Grad Celcius
CD	Cluster of differentiation
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cRALBP	engl.:cellular retinaldehyde-binding protein zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
Cy2	3-(4-Carboxymethyl)phenylmethyl)-3'-ethyloxacarboyanine halide <i>N</i> -hydroxysuccinimidyl ester
Cy3	1-(5-Carboxypentyl)-1'-propylindocarboyanine halide <i>N</i> - hydroxysuccinimidyl ester
Cy5	1-(5-Carboxypentyl)-1'-methylindodicarboyanine halide <i>N</i> - hydroxysuccinimidyl ester
DBP	Vitamin D binding protein
DIGE	Difference-gel-electrophoresis
dpi	Dots per inch, Bildpunkte pro Zoll
DMF	N,N Dimethyl Formamide
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalitis

EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
EAAU	Experimentelle autoimmune vordere Uveitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIU	Endotoxin induzierte Uveitis
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
FCA	Freund's complete adjuvant
g	Gramm
GS	Glutamine synthetase
GFAP	Glial fibrillary acid protein
h	engl.: hour Stunde
hc	Heavy chain
HCl	Salzsäure
HEU	engl.: horse experimental uveitis experimentelle Uveitis des Pferdes
HK	High molecular-weight Kininogen
HKa	Kininostatin
HLA	engl.: human leucocyte antigene Humane Leukozyten Antigen
HUPO	Human proteome project
HSP	Heat shock protein
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
ID	Identifikationsnummer
Ig G	Immunglobulin der Klasse G
IGLV3-25	Immunglobulin Lambda variable 3-25
Ig M	Immunglobulin der Klasse M
Ig Y	Immunglobulin der Klasse Y
IL	Interleukin
INF $\gamma$	Interferon gamma
IRBP	Interphotoreceptor retinoid-binding protein
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
K	Kontrolle
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität

M	Molar
MALDI	engl.: Matrix assisted laser desorption/ionisation Matrix unterstützte Laserdesorbtion/Ionisation
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MHC-II	engl.: major histocompatibility complex-II Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid
ng	Nanogramm
NL	nicht linear
p	Signifikanz
PCR	engl.: Polymerase chain reaction Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
pg	Picogramm
PMT	Photomultiplier Tube
PPP	Plasma-Proteom-Projekt
rcf	relative centrifugation force
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
S-AG	S (soluble)-Antigen
SARS	Severe acute respiratory syndrome
sCrry	engl.: Soluble complement receptor related protein Y
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
Tab.	Tabelle
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethylendiamin
Th1	T-Helfer 1

## Abkürzungsverzeichnis

---

Th2	T-Helfer 2
TOF	Time of flight
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt
VEGF	Vascular endothelium growth factor
Vh	Voltstunden

## 1 Einleitung

Die equine rezidivierende Uveitis ist eine Augenerkrankung des Pferdes mit einer hohen Prävalenz, die 10% der Pferdepopulation betrifft (Spiess 1997). Die Erkrankung ist durch immer wiederkehrende Entzündungsschübe des inneren Auges, die durch unterschiedlich lange entzündungsfreie Phasen unterbrochen werden charakterisiert und führt letztendlich zu der Erblindung des Pferdes. Die intraokuläre Entzündung ist durch autoreaktive T-Zellen gekennzeichnet (Deeg *et al.* 2001). Neben der Bedeutung für die Veterinärmedizin dient die ERU als geeignetes Modell für die humane autoimmune Uveitis. Sowohl die Ätiologie, als auch die Pathogenese der Erkrankung ist trotz zahlreicher Untersuchungen noch nicht eindeutig geklärt.

Proteine stellen die aktiven Komponenten im Körper dar. Die Kenntnis über die Funktion und das Expressionsmuster von Proteinen in verschiedenen Geweben, Zellen und Körperflüssigkeiten ist essenziell für die Aufklärung von molekularen Prozessen, die physiologisch und unter krankhaften Bedingungen in einem Organismus ablaufen. Die Unterschiede der Proteine bezüglich ihrer Menge, Struktur und Funktion können als Indikatoren für pathologische Prozesse dienen. Das Blut zirkuliert ständig im Körper, steht mit allen Zellen des Körpers im Kontakt und repräsentiert den Zustand des Körpers sehr genau. Diese Tatsache, der hohe Proteingehalt der Probe und die Möglichkeit der gering invasiven Probenentnahme unterstreichen die Wahl des Untersuchungsmediums.

Die Methode der Wahl zur Auftrennung komplexer Proteingemische ist die zweidimensionale Gelelektrophorese. Dieser Arbeit vorausgegangene Untersuchungen der Zielgewebe Retina und Glaskörper bei der ERU mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese konnten differenziell exprimierte Proteine identifizieren, die Aufschluß über die Immunantwort, das Entzündungsgeschehen und den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke geben konnten.

Bislang gibt es keine vergleichende Serumproteomuntersuchungen von an ERU erkrankten Pferden und gesunden Kontrolltieren.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mit der vergleichenden Serumproteomanalyse mittels 2D-DIGE in Seren von an ERU erkrankten Pferden und gesunden Kontrolltieren Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren, die zur Aufklärung der Pathogenese auf molekularer Ebene beitragen oder als Marker fungieren können.

## 2. Literatur

### 2.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis

Bei der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU), früher auch periodische Augenentzündung, Mondblindheit oder rezidivierende Iridozyklitis genannt, handelt es sich um eine endogene, nicht traumatische Entzündung der Augeninnenstrukturen (Werry and Gerhards 1992). Die Erkrankung verläuft chronisch rezidivierend und führt durch den progredienten Verlauf zur Zerstörung der intraokulären Strukturen und damit zur Erblindung des Pferdes (Gerhards and Wollanke 2001). Diese Augenerkrankung beim Pferd wurde schon im 18. Jahrhundert als spezifische Augenentzündung beschrieben (Paglia *et al.* 2004). Die ERU betrifft etwa 10% der Pferdepopulation, tritt weltweit auf und ist die häufigste Ursache für das Erblinden von Pferden (Gilger *et al.* 1999; Spiess 1997). Ein erblindetes Pferd muss aus Gründen des Tierschutzes euthanasiert werden, da es durch die Erblindung erheblichem Stress ausgesetzt ist und eine Gefahr für sich selbst und andere darstellt. Dies bedeutet für den Besitzer neben dem ideellen auch einen finanziellen Verlust.

Neben der Bedeutung der ERU für die Veterinärmedizin ist die ERU auch ein wertvolles Modell für die humane autoimmune Uveitis. Die ERU zeigt sowohl im Bezug auf klinische als auch bezüglich immunpathologischer Aspekte große Ähnlichkeit zur humanen autoimmunen Uveitis (Deeg *et al.* 2002a; Kalsow *et al.* 1998). Da das Pferd die einzige Tierart ist, bei der eine Uveitis einerseits spontan auftritt (ERU) (Hines 1990) und andererseits durch die Applikation von retinalen Antigenen induziert werden kann (HEU) (Deeg *et al.* 2004; Deeg *et al.* 2002b), bietet dieses Modell einen Vorteil gegenüber den bekannten Modelltieren Ratte und Maus, bei denen Uveitis nie spontan, sondern nur nach Induktion auftritt. Somit ist das Pferd das einzige existierende Tiermodell für Untersuchungen zur Pathogenese der spontanen Uveitis.

### 2.2 Klinisches Bild der equinen rezidivierenden Uveitis

Das klinische Bild der equinen rezidivierenden Uveitis ist äußerst variabel (Spiess 1997). Die ERU ist von alternierenden Phasen mit akuten Entzündungserscheinungen und Phasen ohne Entzündungserscheinungen,

sogenannten Ruhestadien, geprägt. Das Ausmaß und die Dauer der immer wiederkehrenden Entzündungsschübe sind sehr unterschiedlich (Cook 1983), wobei sich die Intervalle zwischen den Entzündungsschüben und den Ruhephasen tendenziell verkürzen (Spiess 1997). Die Entzündung kann zunächst klinisch unbemerkt mit sehr geringen Symptomen einhergehen oder zu äußerst heftigen Beschwerden und Störungen des Allgemeinbefindens führen (Gerhards and Wollanke 2001). Die Erkrankung kann sowohl einseitig als auch auf beiden Augen auftreten (Cook 1983). Unter Berücksichtigung der beteiligten anatomischen Strukturen kann zwischen einer vorderen Uveitis (Iridozyklitis) und einer hinteren Uveitis (Chorioretinitis) unterschieden werden. Die akute vordere Uveitis ist für die Pferde meist sehr schmerzhaft, und die Symptome sind von der so genannten Abwehrtrias Blepharospasmus, Tränenfluss und Photophobie geprägt. Zusätzlich kann die Hornhaut ödematös und das Kammerwasser getrübt sein (Gerhards and Wollanke 2001; Spiess 1997). Bei der hinteren Uveitis fehlen die Schmerzsymptome meist, da die Choroidea keine sensiblen Nerven besitzt. Die Diagnose wird oft erst im Rahmen einer Augenuntersuchung bei Hinweisen von Visusverlust oder einer Ankaufsuntersuchung gestellt. Ophthalmologisch können dann Netzhautnarben festgestellt werden (Gerhards and Wollanke 2001). Durch die immer wiederkehrenden Entzündungsschübe und die daraus resultierende Zerstörung der okulären Strukturen sind im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit auch in der Ruhephase Veränderungen im Auge festzustellen. Diese können hintere Synechien, fokale Eintrübungen der Linse bis zur reifen Katarakt und im Endstadium eine Phthisis bulbi umfassen (Gilger *et al.* 1999; Spiess 1997).

### **2.3 Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis**

Obwohl die ERU beim Pferd schon lange bekannt und ausführlich untersucht ist, konnte die Ätiologie noch nicht gänzlich geklärt werden. Zur Ätiologie der ERU wurden über die Jahre viele Hypothesen aufgestellt. Bis heute werden im Wesentlichen noch zwei Theorien diskutiert:

#### **2.3.1 Leptospireninfektion**

Schon seit 1940 wird eine bakterielle Infektion mit Leptospiren als mögliche Ursache für die equine rezidivierende Uveitis vermutet und von verschiedenen Autoren untersucht (Brandes *et al.* 2007; Pearce *et al.* 2007; Wollanke *et al.* 1998; Dwyer *et*

al. 1995; Matthews *et al.* 1987; Sillerud *et al.* 1987; Heusser 1948). In mehreren Studien wurde das Vorkommen von erhöhten Antikörpertitern gegen Leptospiren im Serum von an ERU erkrankten Pferden festgestellt (Wollanke *et al.* 1998; Dwyer *et al.* 1995; Sillerud *et al.* 1987). Diese Ergebnisse konnten bei anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden (Wollanke 2004; Matthews *et al.* 1987). Matthews *et al.* haben in England bei 11,1% aller untersuchten Pferde mit Uveitis, aber auch bei 9,1% der augengesunden Kontrollpferde einen positiven Titer gegen Leptospiren im Serum gemessen. Eine mögliche Ursache für die abweichenden Untersuchungsergebnisse zu den anderen Studien sieht der Autor in der unterschiedlichen Prävalenz von Leptospireninfektionen in Abhängigkeit der geografischen Lage. Des Weiteren wurden Untersuchungen des anti-Leptospiren-Antikörpertiters im Glaskörpermaterial durchgeführt (Wollanke 2004). In 90% (382/426) der untersuchten Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden konnten Leptospirenantikörper nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Antikörpertiter im Glaskörper und im Serum waren die Antikörpertiter gegen Leptospiren in den Glaskörpern signifikant höher als im Serum. Aus 52,8% (189/358) der Proben konnten Leptospiren kultiviert werden, jedoch aus keiner der gesunden Kontrollen. In 39 von 55 (71%) der Glaskörperproben konnte mittels PCR Leptospiren-DNA nachgewiesen werden (Wollanke 2004). Sowohl der kulturelle Nachweis der Leptospiren als auch der Nachweis mittels PCR in dieser Untersuchung kann nach Meinung der Autorin als Ursache für die intraokuläre Antikörperproduktion gesehen werden (Wollanke 2004). Bei einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von Glaskörpermaterial konnten in 4 von 17 (24%) uveitischen Proben intakte Leptospiren frei im Glaskörper und Fragmente in Phagozyten inkorporiert gefunden werden (Brandes *et al.* 2007). In 16 von 16 untersuchten Proben war der Nachweis von Leptospiren mittels PCR, die auf dem Nachweis von 16S-rDNA von *Leptospira interrogans* basiert, positiv (Brandes *et al.* 2007). Bei einer Untersuchung in den USA auf Leptospiren-DNA und -Antigen in fixierten Augen von Pferden mit ERU konnten diese Untersuchungen dagegen nicht bestätigt werden (Pearce *et al.* 2007). Dort konnte in keinem der Augen mittels PCR Leptospiren-DNA nachgewiesen werden.

Um den Zusammenhang zwischen der Leptospireninfektion und ERU zu untersuchen, führten Williams *et al.* bereits im Jahr 1971 einen Induktionsversuch mit Leptospiren bei Shetlandponys durch (Williams *et al.* 1971). Achtzehn Ponys wurden

subkutan mit *Leptospira pomona* immunisiert. Alle mit Leptospiren infizierten Ponys entwickelten nach 12 bis 14 Monaten eine Uveitis. Die uveitischen Augen zeigten eine nicht granulomatöse Entzündung und eine deutliche Infiltration mit Lymphozyten. Die lange Zeitspanne zwischen der Leptospireninfektion und den Veränderungen der Augen ließ die Autoren ein immunmediertes Geschehen durch eine Kreuzreaktivität der Leptospirenantigene mit okulärem Gewebe vermuten (Williams *et al.* 1971). Die Kreuzreaktivität zwischen Leptospirenlysaten und equiner Kornea und Linse wurde später von Parma *et al.* näher untersucht (Parma *et al.* 1997; Parma *et al.* 1992a; Parma *et al.* 1987; Parma *et al.* 1985). Anti-Leptospiren-Antikörper zeigten Kreuzreaktivität zu Proteinen aus fünf verschiedenen Fraktionen der equinen Kornea und Linse (Parma *et al.* 1992a). Diese Antikörper wurden als komplementbindende Immunglobulinsubklasse charakterisiert. Durch die Bindung der Antikörper an die Kornea wurde eine Aktivierung der Komplementkaskade vermutet, die wiederum die Gewebeerstörung verursacht (Parma *et al.* 1992b).

Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen okulärem Gewebe und Leptospirenantigenen zeigt die Entdeckung zweier Leptospiren-Lipoproteine LruA und LruB (Verma *et al.* 2005). LruA- und LruB- spezifische Antikörper kreuzreagieren mit okulärem Gewebe wie Linse, Ziliarkörper und Retina. LruA spezifisches Antiserum zeigt mit Linsenextrakt bei 22kDa, bei Ziliarkörperextrakt bei 65 kDa eine deutliche Bande und LruB reagierte bei Retinaextrakt bei 30kDa mit einer deutlichen Bande (Verma *et al.* 2005). Zusätzlich konnte in okulären Flüssigkeiten von den an ERU erkrankten Pferden ein deutlich höherer IgG- und IgA-Antikörpertiter gegen LruA und LruB als im Serum gemessen werden. In den okulären Flüssigkeiten von augengesunden Kontrolltieren konnten keine Antikörpertiter gegen LruA und LruB gemessen werden. Die Autoren sehen in den intraokulär erhöhten Antikörpertitern den Beweis für die intraokuläre Expression der beiden Proteine und den Grund für eine lokale Antikörperproduktion.

### **2.3.2 ERU als autoimmunmedierte Erkrankung**

Der rekurrende Charakter der Erkrankung, die erfolgreiche Anwendung von Kortikosteroiden in der Therapie (Romeike *et al.* 1998; Spiess 1997) und der unzureichende Erfolg einer antibiotischen Therapie unterstützen die Hypothese eines immunmedierten Geschehens (Hines 1984).

Um die Hypothese eines immunmedierten Geschehens zu belegen, wurden die Zellinfiltrate der Augen von an ERU erkrankten Pferden untersucht (Deeg *et al.*

2002a; Deeg *et al.* 2001; Kalsow and Dwyer 1998; Romeike *et al.* 1998). Es konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten der vorherrschende Zelltyp in den Augen uveitischer Pferde sind (Deeg *et al.* 2002a; Deeg *et al.* 2001; Gilger *et al.* 1999; Kalsow and Dwyer 1998; Romeike *et al.* 1998; Spiess 1997). Bei histologischen Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass T-Lymphozyten über 70% der infiltrierenden Entzündungszellen in der Uvea ausmachen (Romeike *et al.* 1998). Die T-Lymphozyten waren in der Uvea gleichmäßig verteilt zu finden. Als Besonderheit konnten Formationen lymphoider Follikel beobachtet werden. Hauptsächlich waren diese Follikel im Irisstroma und in der Choroidea lokalisiert (Deeg *et al.* 2002a; Dubielzig 1997). Die Peripherie der Follikel bestand aus CD3<sup>+</sup>-Zellen, wobei das Zentrum von CD3<sup>-</sup>-Zellen gebildet wurde (Deeg *et al.* 2002a). Romeike *et al.* charakterisierten die Zellen im Zentrum der Follikel als B-Lymphozyten (Romeike *et al.* 1998). Die infiltrierenden T-Lymphozyten in dem Ziliarkörper und Stroma wurden als überwiegend CD4<sup>+</sup>-T-Zellen charakterisiert (Gilger *et al.* 1999). Bei der Untersuchung von Glaskörpermaterial konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Leukozyteninfiltrat des Glaskörpers zu 90% aus Lymphozyten bestand (Deeg *et al.* 2001). Eine durchflußzytometrische Untersuchung zeigte, dass über 50% der Lymphozyten CD4<sup>+</sup> waren (Deeg *et al.* 2001).

Aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen können sich entweder zu einem Th1- oder Th2-Phänotyp differenzieren, der jeweils durch die Produktion bestimmter Zytokine charakterisiert ist (Mosmann and Coffman 1989). Th1-Zellen sind proinflammatorische Zellen, die typischerweise Zytokine wie Interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) und Interleukin 2 (IL-2) sezernieren. Th2-Zellen werden als antiinflammatorisch betrachtet, die typischerweise Interleukin 4 und 10 sezernieren. Der Th1-Phänotyp wird mit der zellulären Immunantwort assoziiert, während der Th2-Phänotyp mit der humoralen und allergischen Immunantwort in Verbindung gebracht wird (Becker *et al.* 2000).

Die Auslösung einer Immunantwort ist von der Antigenpräsentation an die T-Lymphozyten abhängig. Th1- Zellen können ein Antigen nur in Kombination mit einer MHC-Klasse-II Präsentation erkennen (Unanue and Allen 1987). Die MHC-II-Antigenexpression wird wiederum von INF $\gamma$  induziert, das von aktivierten Th1-Zellen sezerniert wird. Um näher zu untersuchen, welche Immunmechanismen in das Krankheitsgeschehen involviert sind, wurde die MHC-II-Expression in histologischen Schnitten uveitischer Pferde untersucht (Romeike *et al.* 1998). Es wurde eine deutlich erhöhte Expression von MHC-II-Molekülen in dem Trabekelwerk und dem

nichtpigmentierten Ziliarepithel gezeigt. Die MHC-II-Expression auf Müllerzellen und retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) korrelierte mit dem Schweregrad der pathologischen Veränderungen der Augen (Romeike *et al.* 1998). Bei der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) der Ratte ist außerdem eine mit der Uveitis einhergehende Pinealitis bekannt (Donoso *et al.* 1987; Gery *et al.* 1986; Kalsow and Wacker 1978). Die für die experimentelle Induktion verwendeten Proteine, S-Antigen und Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) sind sowohl in den Photorezeptorzellen des Auges, als auch in den Pinealozyten exprimiert. In 8 von 10 untersuchten Pinealdrüsen uveitischer Pferde wurde eine deutliche Ansammlung MHC II exprimierender Zellen und eine Infiltration mit T-Lymphozyten festgestellt (Kalsow *et al.* 1999).

Um den Entzündungstyp, der bei der ERU abläuft, näher zu bestimmen, untersuchten Gilger *et al.* die Menge transkribierter mRNA für die Zytokine INF $\gamma$ , IL-2 und IL-4 in okulärem Gewebe (Gilger *et al.* 1999). In der Iris und dem Ziliarkörper uveitischer Pferde konnten deutlich erhöhte Werte für IL-2 und INF $\gamma$ , nicht aber für IL-4 gemessen werden. Bei der Untersuchung der peripheren Blutlymphozyten konnte kein Unterschied in der Zytokinexpression zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferde festgestellt werden (Gilger *et al.* 1999). Die erhöhte Zytokinexpression von IL-2 und INF $\gamma$  in Verbindung mit einer niedrigen IL-4 Expression ist typisch für eine Th1-medierte Immunantwort (Romagnani 2000). Bei der vergleichenden Proteomanalyse von Retinae aus an ERU erkrankten Pferden mit gesunden Kontrollretinae konnte eine Aktivierung der Müllergliazellen durch eine erhöhte Expression von Glia fibrillary acidic protein (GFAP) und Vimentin, bei gleichzeitig erniedrigter Expression von Glutamin Synthetase (GS), gezeigt werden (Hauck *et al.* 2007). Mittels immunohistochemischer Methoden konnte in Verbindung mit der Aktivierung der Müllergliazellen das proinflammatorische Zytokin INF $\gamma$  in den Müllergliazellen der Netzhäute von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen werden, aber nicht in den gesunden Kontrollretinae (Hauck *et al.* 2007). Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Müllergliazellen bei der ERU hin und bestätigt die Rolle der Th1-Zellen im immunmedierten Geschehen der ERU.

Da der Glaskörper direkt mit dem betroffenen Gewebe in Verbindung steht und die chirurgische Entfernung des Glaskörpers zu einer Unterbrechung der Rezidive bei an Uveitis erkrankten Menschen und Pferden führt, stellt er ein interessantes Untersuchungsmaterial dar. Mit der proteomischen Analyse von Glaskörpern an ERU

erkrankter Pferde und gesunder Kontrollen wurden unter anderem differenziell exprimierte Proteine identifiziert, die die Beteiligung des Immunsystems näher charakterisieren (Deeg *et al.* 2007a). In dem Glaskörperproteom uveitischer Pferde waren Complement C3 und Carboxylesterase D1 deutlich höher exprimiert als in Glaskörperproben gesunder Pferde. Histone deacetylase complex subunit SAP 18 konnte nur in den Glaskörpern uveitischer Pferde nachgewiesen werden (Deeg *et al.* 2007a). Die Beteiligung und Bedeutung von C3, einem zentralem Bestandteil der Komplementkaskade, in Verbindung mit dem Schweregrad der Uveitis wurde bei der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAAU) der Ratte nachgewiesen (Jha *et al.* 2006). Bei komplementdepletierten Ratten und normalen Lewisratten wurde eine EAU ausgelöst, wobei gezeigt werden konnte, dass die Krankheitshäufigkeit, -dauer und -schwere bei den komplementdepletierten Ratten wesentlich geringer war.

Die humorale Immunantwort von an ERU erkrankten Pferden auf spezifische retinale Antigene untersuchte zuerst Maxwell (Maxwell 1991). Der Autor konnte weder bei der Reaktionshäufigkeit noch bei der Reaktionsstärke der humoralen Immunantwort von an ERU erkrankten Pferden und gesunden Kontrollpferden auf die retinalen Proteine S-Antigen und Rhodopsin einen Unterschied feststellen. 31% der Seren uveitischer Pferde reagierten allerdings mit einem nicht identifizierten Netzhaut-Protein unter 26 kDa, jedoch keines der Kontrollseren (Maxwell 1991).

Um diese Untersuchungen zu erweitern, testeten Deeg *et al.* die humorale Immunantwort auf die retinalen Antigene, S-Antigen und IRBP mit Serum- und Glaskörperproben. Des Weiteren führten sie mit peripheren Blutlymphozyten und infiltrierenden Lymphozyten aus ERU-Glaskörpermaterial, das bei der Vitrektomie gewonnen wurde, *in vitro* Proliferationsassays durch, um die T-Zellantwort auf retinale Antigene zu testen (Deeg *et al.* 2001). In 81% der untersuchten uveitischen Seren konnten Antikörper auf S-Antigen oder IRBP oder auf beide retinalen Antigene gefunden werden. In allen uveitischen Glaskörperproben konnte ein hoher IgG-Gehalt festgestellt werden, während in den Kontrollen kein IgG gemessen werden konnte. In 73% der Glaskörperproben an ERU erkrankter Pferde, jedoch in keiner der Glaskörperproben gesunder Kontrollpferde, konnten retinaspezifische Antikörper gegen S-Antigen und IRBP nachgewiesen werden (Deeg *et al.* 2001). Zusätzlich wurden in 10 von 24 untersuchten uveitischen Glaskörperproben Tetanus-Antikörper nachgewiesen, die einen Hinweis auf die Zerstörung der Blut-Retina-Schranke geben. Bei T-Zell-Proliferationsassays reagierten die peripheren Blutlymphozyten auf

die Stimulation mit retinalen Antigenen nur bei zwei an ERU erkrankten Pferden. Bei den vitrealen Lymphozyten konnte allerdings bei 10 von 14 Pferden eine deutliche Reaktion gegen verschiedene retinale Antigene gezeigt werden (Deeg *et al.* 2001). Die Präsenz von spezifischen Autoantikörpern und die Proliferation autoantigenspezifischer T-Lymphozyten in dem betroffenen Organ Auge im Vergleich zur Peripherie deutet auf die wichtige Rolle der Autoimmunität in der ERU hin.

## **2.4 Pathogenese der ERU**

Die besondere Empfänglichkeit von okulärem Gewebe für pathologische Autoimmunreaktionen wird zwei Hauptfaktoren zugeschrieben. Erstens besitzt das Auge gewebespezifische Moleküle besonders in der Linse und der Retina, die als potente Antigene fungieren können, zweitens ist das gesunde Auge als immunprivilegiertes Organ durch die Blut-Augen-Schranke vom Immunsystem weitgehend abgeschirmt (Gery and Streilein 1994). Bei der ERU, EAU wie auch in der humanen Uveitis wurde festgestellt, dass autoreaktive CD4<sup>+</sup>-Zellen, die gegen retinale Autoantigene gerichtet sind, an der Pathogenese beteiligt sind (Deeg *et al.* 2002a; Deeg *et al.* 2001; Caspi 1999; Nussenblatt and Gery 1996; Hines 1984). Eine EAU kann sowohl durch subkutane Injektion von retinalen Antigenen, als auch durch den adoptiven Transfer von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen induziert werden (Mochizuki *et al.* 1985). In T-Zell defizienten Tieren kann eine EAU nicht induziert werden (Caspi 1999). Bis heute ist nicht geklärt, wie und warum einige wenige autoaggressive T-Zellen in das Auge gelangen können (Prendergast *et al.* 1998). Allerdings ist bekannt, dass nur aktivierte T-Zellen die Blut-Augen-Schranke überwinden können (Greenwood and Calder 1993). Nachdem wenige reaktive T-Zellen in das Auge gelangt sind, kommt es zu einer Verstärkungsreaktion. Die Induktion von Adhäsionsmolekülen auf dem retinalen Gefäßendothel bewirkt die Ausschüttung von Chemokinen und damit die Rekrutierung weiterer Leukozyten. Die Rekrutierung der Zellen verstärkt die Chemokinausschüttung und den Entzündungsprozess (Caspi 1999). Durch die Blockade von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 auf retinalem Gefäßendothel und LFA-1 auf Leukozyten durch monoklonale Antikörper, konnte bei Mäusen eine EAU-Induktion verhindert werden (Whitcup *et al.* 1993). Die molekularen Prozesse, die zur Zerstörung der intraokulären Strukturen und zu den immer wiederkehrenden Entzündungsschüben führen, sind noch völlig ungeklärt. Bei fortschreitender Erkrankung kommt es bei der EAU zum Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke

(Caspi 1999; Whitcup and Nussenblatt 1997; Greenwood *et al.* 1994). Der völlige Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke erleichtert einerseits den Eintritt weiterer Zellen und löslicher Mediatoren ins Auge und andererseits gelangen Entzündungsmediatoren des Auges in die Zirkulation. Dies scheint ein wichtiger Faktor für die Progression des weiteren Krankheitsverlaufs zu sein (Caspi 1999). Hinweise auf den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke konnten auch andere Untersuchungen zeigen. Vergleichende Untersuchungen von uveitischem und gesundem Glaskörpermaterial konnten einen deutlichen Unterschied in der Proteinkonzentration zeigen (Deeg *et al.* 2007a; Deeg *et al.* 2001). Die Proteinkonzentration des Glaskörpermaterials von an ERU erkrankten Pferden war wesentlich höher als die der gesunden Kontrollen. In den uveitischen Glaskörperproben wurde eine deutlich niedrigere Expression des Proteins Pigment epithelium derived factor (PEDF) im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Immunhistochemische Untersuchungen der Retinae von an ERU erkrankten Pferden zeigten eine deutliche niedrigere Expression von PEDF bei gleichzeitig erhöhter Expression des Vascular endothelial growth factor (VEGF). PEDF fungiert als potenter Angiogenese Inhibitor und Inhibitor inflammatorischer Prozesse (Steele *et al.* 1993), während VEGF als Aktivator der Angiogenese und Promotor des endothelialen Zellwachstums fungiert (Walsh 2007). Die Verschiebung dieses Expressionsverhältnisses in uveitischen Augen könnte an der Zerstörung der Blut-Retina-Schranke beteiligt sein (Deeg *et al.* 2007a). Des Weiteren fanden sich sowohl in dieser Studie, als auch bei der vergleichenden Untersuchung des Retinaproteoms zwischen gesunden und an ERU erkrankten Tieren deutliche Hinweise auf den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke. Es konnte eine deutliche Zunahme von klassischen Serumproteinen wie Alpha-1-Antitrypsin, Albumin, IgG1 und 4 hc und Hämoglobin in zweidimensional aufgetrennten Retinae verschiedener uveitischer Stadien im Vergleich zu gesunden Kontrollretinae gezeigt werden (Hauck *et al.* 2007).

Um die Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen zu erklären, werden drei unterschiedliche Mechanismen diskutiert: molekulare Mimikry, Bystander-Aktivierung und Epitop Spreading (Fujinami *et al.* 2006; Vanderlugt and Miller 2002). Diese Mechanismen schließen sich gegenseitig nicht aus, sondern können gemeinsam auftreten und eventuell sogar interagieren.

Bei der molekularen Mimikry kommt es zu einer Kreuzreaktion zwischen einem Epitop eines exogenen, bakteriellen, viralen oder parasitären Agens und dem Epitop körpereigenen Gewebes (Tizard 2004). Parma et al. zeigten bereits eine Kreuzreaktivität zwischen der Immunreaktion auf das gramnegative Bakterium *Leptospira interrogans* und equiner Kornea und Linse bei Pferden mit ERU (Parma et al. 1997; Parma et al. 1992a). Des Weiteren wurde eine Kreuzreaktivität zwischen zwei neuen Lipoproteinen LruA und LruB des Bakterium *Leptospira interrogans* und okulärem Gewebe gezeigt (Verma et al. 2005).

Die Beteiligung der Bystander Aktivierung wurde bis jetzt nur in Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und Typ-I Diabetes nachgewiesen. Durch eine Virusinfektion kommt es zur Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen und einer Kaskade der Zytokinausschüttung und Makrophagenaktivierung. Diese Antigen-präsentierenden Zellen können wiederum zu einer Aktivierung autoaggressiver T-Zellen führen, die dann eine Autoimmunreaktion auslösen (Fujinami et al. 2006).

Als Epitop wird die antigene Determinante auf der Oberfläche eines antigenen Moleküls bezeichnet (Powell and Black 2001). Es wird zwischen dominanten und kryptischen Epitopen unterschieden. Kryptische Epitope treten erst durch eine Änderung der molekularen Struktur des Moleküls, die z.B. durch Entzündung hervorgerufen wird, für das Immunsystem in Erscheinung (Fujinami et al. 2006; Vanderlugt and Miller 2002; Powell and Black 2001). Epitop Spreading wird für die Progression und den rekurrenden Charakter verschiedener Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel Multiple Sklerose verantwortlich gemacht. Beim Epitop Spreading richtet sich die Immunantwort nicht mehr gegen das Epitop, das ursprünglich die Immunantwort ausgelöst hat, sondern gegen andere Epitope. Richtet sich die Immunantwort gegen Epitope des gleichen Moleküls, spricht man von intramolekularem Epitop Spreading. Richtet sich die Immunantwort gegen Epitope eines anderen Moleküls, handelt es sich um intermolekulares Epitop Spreading (Powell and Black 2001). Die erste Bestätigung der pathologischen Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen durch Epitop Spreading erfolgte bei der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), einem Model für Multiple Sklerose (McRae et al. 1995). Bei der EAE konnte auch festgestellt werden, dass das Epitop Spreading einer hierarchischen Ordnung folgt. Durch die Kenntnis der hierarchischen Ordnung der Peptide konnte durch eine orale

Toleranzinduktion auf die folgenden Peptide in der Kaskade eine Progression der EAE verhindert werden (Vanderlugt *et al.* 2000).

Epitop Spreading konnte beim Pferd sowohl bei durch IRBP induzierter Uveitis als auch bei Pferden mit spontan auftretender ERU gezeigt werden (Deeg *et al.* 2006a; Deeg *et al.* 2002b). In beiden Fällen konnte intermolekulares und intramolekulares Epitop Spreading beobachtet werden. Die mit IRBP immunisierten Pferde zeigten zunächst eine positive T-Zellantwort auf verschiedene IRBP Peptide (intramolekular), und im Verlauf weiterer IRBP-Immunisierungen reagierten diese auf verschiedene S-Antigen Peptide (intermolekular) (Deeg *et al.* 2002b). Bei der spontanen Erkrankung konnte bei allen untersuchten Pferden im Verlauf der Erkrankung eine positive T-Zellantwort auf beide Autoantigene S-Antigen und IRBP gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigten die augengesunden Kontrollen nie eine Reaktion bei den Proliferationsassays. Es konnte aber keine hierarchische Ordnung der betroffenen Peptide festgestellt werden, die eine Voraussage der nächsten Epitope erlauben würde (Deeg *et al.* 2006a).

## **2.5 Therapie der ERU**

Die Ziele der Therapie bestehen darin, das Sehvermögen zu erhalten, die augenschädigenden Folgen der schubweisen Entzündungsvorgänge möglichst gering zu halten und die Schmerzen zu lindern (Gerhards and Wollanke 2001).

### **2.5.1 Konservative Therapie**

Die konventionelle medikamentelle Therapie beruht auf einer vorübergehenden unspezifischen Suppression der lokalen und systemischen Immunreaktionen, um die Schädigung des Auges während einer akuten Entzündungsphase möglichst gering zu halten. Sie kann aber die immer wiederkehrenden Entzündungsschübe nicht verhindern (Gilger and Michau 2004; Schwink 1992).

Die lokal oder subkonjunktival angewendete Applikation von Kortikosteroiden am Auge in der akuten Phase dient der Suppression des immunmedierten Entzündungsgeschehens. Um Verklebungen der Iris mit der Linse zu verhindern, ist zusätzlich eine Weitstellung der Pupille mit Mydriatika/Zykloplegika unbedingt notwendig. Begleitend kann systemisch eine analgetische und antiphlogistische Therapie bis zum Abklingen der akuten Entzündungsanzeichen mit nicht-steroidalen Antiphlogistika durchgeführt werden (Gerhards and Wollanke 2001). Die Prognose ist

oft trotz konsequenter lokaler und systemischer Therapie als ungünstig einzustufen (Werry and Gerhards 1992).

### **2.5.2 Cyclosporinimplantate**

Mit der Anwendung von Cyclosporinimplantaten sollen die Entzündungsschübe bei chronischer ERU unterbunden werden (Gilger *et al.* 2000). Die suprachoroidal platzierten Implantate geben das auf Th1-Zellen immunsuppressiv wirkende Cyclosporin A konstant über fünf Jahre ab. Es konnte nachgewiesen werden, dass Pferde mit ERU durch ein Cyclosporinimplantat meistens keine Rezidive mehr zeigten (Gilger and Michau 2004). In den Fällen, bei denen noch Entzündungsschübe auftraten, waren diese jedoch in Dauer und Schweregrad wesentlich geringer (Gilger *et al.* 2000). In der Regel treten post operationem keine mit dem Implantat assoziierten Komplikationen auf.

### **2.5.3 Trans-pars-plana Vitrektomie**

Die Vitrektomie bietet die Möglichkeit, optisch störende Glaskörpertrübungen und Entzündungsprodukte aus dem Glaskörperaum zu beseitigen und die Rezidivneigung zu verringern. Zusätzlich kann der entnommene Glaskörper als diagnostisches Material genutzt werden (Werry and Gerhards 1992).

Der gesamte Glaskörper wird durch manuelle Aspiration entfernt und durch sterile, physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Bei einer Langzeitstudie über den postoperativen Verlauf von 43 vitrektomierter Pferde konnte Winterberg zeigen, dass bei 97,7% kein Rezidiv auftrat und bei 70% die Sehfähigkeit erhalten wurde (Winterberg 1997). In einer anderen Studie konnte eine Rezidivfreiheit bei 35 von 38 operierten Augen über einen Beobachtungszeitraum von fünf Jahren festgestellt werden (Fruhauf *et al.* 1998). Die Rezidivfreiheit wird durch die Entfernung oder Reduktion der Entzündungsprodukte oder –mediatoren erklärt (Gilger and Michau 2004; Werry and Gerhards 1992). Nicht zu unterschätzende Komplikation nach einer Trans-pars-plana Vitrektomie sind die mögliche postoperative Kataraktbildung oder Netzhautablösung (Fruhauf *et al.* 1998; Winterberg 1997; Werry and Gerhards 1992).

## **2.6 Retinale Autoantigene**

Unter einem Autoantigen wird ein körpereigenes Molekül verstanden, das als Antigen fungiert (Tizard 2004). Um die Jahrhundertwende wurde zum ersten Mal in Erwägung gezogen, dass viele Uveitiden eine nichtinfektiöse Ursache haben könnten. Elschning

stellte als erster die Hypothese auf, dass sich uveitogene Substanzen im Auge befinden (Elschnig 1910). Es dauerte bis 1965, bis das erste Tiermodell für Uveitis etabliert wurde. Wacker und Lipton zeigten, dass die systemische Applikation von homologem Retinagewebe mit Freund's kompletten Adjuvans (FCA) in Meerschweinchen eine Uveitis auslöste (Wacker and Lipton 1965). Bis heute konnten aus dem Retinagewebe verschiedene Antigene isoliert und identifiziert werden. Typische uveitogene Antigene repräsentieren evolutionsgeschichtlich hochkonservierte Proteine, die in der einen oder anderen Art am Sehprozess beteiligt sind (Caspi 1999). Zu den bis heute charakterisierten uveitogenen Antigenen zählen, S-Antigen, IRBP, Rhodopsin, Recoverin, Phosduzin und cRALBP. Die experimentelle Erkrankung, die durch die Applikation von retinalen Antigenen ausgelöst werden kann, wird als experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) bezeichnet. Die entscheidende Rolle der gewebespezifischen Antigene in der Pathogenese der Autoimmunprozesse konnte durch die EAU gezeigt werden (Gery and Streilein 1994). Zu den am besten charakterisierten Antigenen zählen S-Antigen und IRBP. Eine Induktion von EAU mit S-Antigen konnte bei Kaninchen, Meerschweinchen (Rao *et al.* 1979), Ratten (de Kozak *et al.* 1981), Mäusen (Caspi *et al.* 1988) und Primaten (Nussenblatt *et al.* 1981) und mittels IRBP bei Ratten (Gery *et al.* 1986), Mäusen (Caspi *et al.* 1988) und Primaten (Hirose *et al.* 1987) gezeigt werden. Sowohl die klinischen wie auch die pathologischen Erscheinungen der EAU variieren etwas in Abhängigkeit des verwendeten Antigens, der Dosis und der Tierart (de Smet and Chan 2001), jedoch besitzen in allen Modellen CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Pathogenese eine zentrale Rolle (Chan *et al.* 1985). Dies wurde durch adoptive Transfer-Experimente bestätigt, bei denen nur CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Lage waren, die Uveitis in ein anderes Tier zu transferieren (Mochizuki *et al.* 1985).

Die Tiermodelle gleichen in der Pathophysiologie der autoimmunen Uveitis des Menschen und bieten die Möglichkeit, dort grundlegende Mechanismen zu erforschen (Caspi 1999; Gery and Streilein 1994). Nachteile der etablierten Tiermodelle sind, dass bei keiner der Tierarten eine spontane Uveitis auftritt, die EAU der Ratte immer einen monophasischen Verlauf zeigt und die EAU der Maus zwar in Abhängigkeit der Dosis Rezidive zeigt, diese sich aber nicht vorhersagen lassen. Damit bieten diese Modelle keine Möglichkeit, Rezidive oder den Vergleich zwischen der spontanen und induzierten Erkrankung zu erforschen.

Um die Bedeutung der retinalen Antigene als Autoantigene in der ERU und damit ihre Bedeutung für die Pathogenese herauszufinden, wurde die Uveitogenität verschiedener Antigene beim Pferd überprüft. Bei vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Glaskörperinfiltrate bei an ERU erkrankten Pferden überwiegend aus T-Zellen bestehen und diese auf die Stimulation mit IRBP oder S-Antigen deutlich proliferierten (Deeg *et al.* 2001). Da vorangegangene Untersuchungen die Vermutung zuließen, dass IRBP bei der Uveitis ein bedeutendes Autoantigen ist und Hines (Hines 1990) mit S-Antigen bei Ponys keine Uveitis auslösen konnte, wurde IRBP von Deeg *et al.* für den Induktionsversuch ausgewählt. Die periphere Injektion von IRBP in FCA löste in allen sieben Versuchspferden eine Uveitis aus (Deeg *et al.* 2002b). Die Uveitis war in allen Versuchspferden reinduzierbar. Die Entzündungserscheinungen traten immer genau sechs bis sieben Tage nach der Immunisierung auf (Deeg *et al.* 2002b). Damit stellt das Pferd das erste Tiermodell mit reinduzierbarer Uveitis dar. Die klinischen und histologischen Befunde entsprechen denen der spontan auftretenden Uveitis beim Pferd. Die beim Pferd experimentell induzierte Uveitis wurde als Horse experimental uveitis (HEU) bezeichnet. Des Weiteren konnte nach der zweiten Immunisierung mit IRBP zunächst eine T-Zellantwort der PBL auf verschiedene IRBP-Peptide gezeigt werden (intramolekulares Epitop Spreading), dann folgte aber auch intermolekulares Epitop Spreading auf S-Antigen Peptide (Deeg *et al.* 2002b). Diese Ergebnisse veranlassten Deeg *et al.*, die Uveitogenität von S-Antigen beim Warmblut zu überprüfen. Hines hatte in einer anderen Studie Ponys mit S-Antigen immunisiert und konnten bei keinem der Tiere eine Uveitis auslösen (Hines 1990). Den Hauptgrund dafür, dass die Ponys keine Uveitis entwickelten, sah der Autor in dem genetischen Hintergrund (Hines 1990). Aus der EAU weiß man, dass die Empfänglichkeit für die verschiedenen Antigene bei Ratten und Mäusen, um überhaupt eine Uveitis zu entwickeln, nicht nur von der Dosis, sondern vor allem stark von dem genetischen Hintergrund der Versuchstiere abhängt (Nussenblatt and Gery 1996). Von Deeg *et al.* wurden deshalb fünf Pferde mit ausgezüchtetem genetischem Hintergrund, bei dem auch ERU auftritt, subkutan mit S-Antigen und FCA immunisiert (Deeg *et al.* 2004). Nur eines der Pferde entwickelte daraufhin eine Uveitis, die durch folgende Immunisierungen nicht reinduzierbar war. Alle immunisierten Pferde zeigten aber eine antigenspezifische T- und B-Zellantwort. Die Untersuchungen zeigten, dass S-

Antigen beim Pferd nur ein schwaches Autoantigen zu sein scheint (Deeg *et al.* 2004).

Um festzustellen, ob weitere, bislang aber noch unbekannte Autoantigene beim Pferd eine Rolle spielen, wurde das Antikörperbindungsmuster von an ERU erkrankten Pferden zum retinalen Proteom untersucht. Retina wurde zweidimensional aufgetrennt, auf PVDF Membranen geblottet und mit Seren von an ERU erkrankten Pferden und gesunden Kontrollen inkubiert. Nur die Spots, die ausschließlich von den ERU Seren markiert wurden und nicht von den Kontrollseren, wurden ausgewählt und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) identifiziert. In dieser Studie wurden zwei neue ERU-Autoantigene Recoverin und cRALBP identifiziert (Deeg *et al.* 2006b). Die Uveitogenität von Recoverin wurde schon in der Lewisratte bestätigt (Gery *et al.* 1994). CRALBP dagegen war als Autoantigen noch nicht beschrieben. Um als definitives Autoantigen bezeichnet zu werden, mussten die Postulate von Witebsky, modifiziert durch Rose und Bona, erfüllt werden (Rose and Bona 1993). Das erste Postulat wurde mit der Identifizierung des Autoantigens erfüllt. Bei an ERU erkrankten Pferden konnten Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen gegen cRALBP nachgewiesen werden und damit das zweite Postulat von Witebsky erfüllt werden (Witebsky *et al.* 1957). Durch die subkutane Injektion von cRALBP und FCA konnte sowohl bei der Ratte, als auch beim Pferd eine Uveitis ausgelöst werden. Bei allen immunisierten Pferden konnte die Uveitis zudem re-induziert werden (Deeg *et al.* 2006b). Damit ist das dritte Postulat von Witebsky erfüllt und cRALBP gilt als vollständig charakterisiertes Autoantigen.

Trotz der nahezu kompletten Zerstörung der intraokulären Strukturen können in erblindeten Pferden immer noch Rezidive in den betroffenen Augen beobachtet werden. Das Fortschreiten der Entzündung bei der ERU, HEU und auch EAU führt unter anderem zu einer Zerstörung der äußeren Photorezeptorsegmente (Deeg *et al.* 2002b; Caspi *et al.* 1988), dem physiologischen Expressionsort der Autoantigene S-Antigen und IRBP. Trotzdem konnte bei dem Vergleich des Expressionsmusters der Autoantigene S-Antigen, IRBP und cRALBP in fortgeschrittenen Krankheitsstadien der ERU eine konstante, bei IRBP sogar eine erhöhte Expression festgestellt werden (Deeg *et al.* 2007b). Die konstante Expression der Autoantigene erklärt die anhaltenden Entzündungsschübe, wobei der Mechanismus der konstanten Expression trotz der Zerstörung der Expressionsorte noch zu klären ist.

## 2.7 Humane Uveitis

Zehn Prozent der Erblindungen von Menschen in der westlichen Welt werden durch Uveitis verursacht (Nussenblatt 1990). In Deutschland ist die Uveitis nach der altersbedingten Makuladegeneration, Glaukom und diabetischer Retinopathie die vierthäufigste Ursache für Blindheit (Fiehn 2003). Es gibt Betroffene in allen Altersklassen und bei beiden Geschlechtern gleichermaßen häufig. Verschiedenste Ursachen führen beim Menschen zu dem klinischen Erscheinungsbild der Uveitis. Allgemein wird zwischen einer infektiösen und nicht infektiösen Ätiologie unterschieden. Es gibt infektiöse Ursachen viraler Genese, wie zum Beispiel das Epstein Barr-Virus oder Herpes simplex/zoster, bakterieller Genese wie zum Beispiel atypische Mykobakterien und parasitärer Genese wie zum Beispiel Onchozerkose oder Toxoplasmose, die Uveitis verursachen. Bei den nicht infektiösen Ursachen gibt es isolierte Augenerkrankungen wie das Fuchssche Uveitis Syndrom, die Birdshot Chorioretinopathie oder ein Trauma, das zur Uveitis führt. Außerdem wird die Uveitis häufig mit immunologisch vermittelten Systemerkrankungen wie z.B. Spondylitis ankylosa, Morbus Behçet, Sarkoidose und systemischem Lupus erythematoses beobachtet (Fiehn 2003). Bei manchen Autoimmunerkrankungen konnte eine deutliche genetische Prädisposition festgestellt werden. Bei bestimmten humanen Leukozyten Antigen (HLA)-Haplotypen, wie zum Beispiel für HLA-A29 bei Birdshot Chorioretinopathie und für HLA-B51 bei Morbus Behçet wurde eine Prädisposition für die Autoimmunerkrankungen und die damit verbundene Uveitis festgestellt (Nussenblatt 1991, 1990). Bei den Uveitiden nicht infektiöser Ursache ist der Hauptpfeiler der Behandlung immer noch eine unspezifische Suppression des Immunsystems durch eine lokale und systemische Kortikosteroidtherapie. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der weiteren und genaueren Erforschung der Pathogenese, um gezielter wirkende Therapeutika entwickeln zu können. Die Klärung der Pathogenese am humanen Modell gestaltet sich schwierig, da das Untersuchungsmaterial von humanen Patienten meistens erst im Endstadium der Erkrankung zu gewinnen ist (Becker *et al.* 2000; Forrester 1991). Um die Pathogenese genauer zu untersuchen, werden Tiermodelle benötigt, die dem Krankheitsbild der humanen Uveitis möglichst ähnlich sind, um aus den daraus resultierenden Untersuchungsergebnissen neue Therapieansätze zu entwickeln (Becker *et al.* 2000; Gery and Streilein 1994).

## 2.8 Die Bedeutung von Serum

Das Blut zirkuliert ständig durch den ganzen Körper, steht mit jedem Gewebe in direktem Kontakt und fungiert als Transportmedium mit unterschiedlichen Aufgaben und für die verschiedensten Moleküle (Issaq *et al.* 2007). Das Blut spiegelt den Zustand des Körpers zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt wieder. Proteinkonzentrationen im Blut besitzen für ihre physiologische Funktion meist nur einen geringen Spielraum, Änderungen in der Konzentration und/oder Funktion spiegeln meist einen pathologischen Prozess wieder (Issaq *et al.* 2007; Pieper *et al.* 2003). Die Tatsache, dass Blut aus verschiedenen Zelltypen, verschiedenen chemischen Verbindungen und Proteinen besteht, macht es zu einem sehr nützlichen diagnostischen Mittel. Abhängig von der Fragestellung kann das Blut in verschiedene Komponenten aufgetrennt werden. Allgemein wird zwischen den zellulären Bestandteilen (roten und weißen Blutkörperchen) und den flüssigen Bestandteilen unterschieden. Der flüssige Bestandteil gerinnungsgehemmten Blutes wird als Plasma bezeichnet. Als Serum wird der durch Blutgerinnung von Fibrin und korpuskulären Bestandteilen befreite, wässrige und leicht gelb gefärbte Bestandteil des Blutes bezeichnet (Pschyrembel 1998). Da Serum für diagnostische Zwecke einfach und gering invasiv zu gewinnen ist, den momentanen Zustand des Körpers repräsentiert und das breiteste proteomische Spektrum im Vergleich zu anderen Körperflüssigkeiten besitzt, stellt es eine interessante und vielversprechende Untersuchungsquelle für proteomische Analysen dar (Issaq *et al.* 2007; Omenn 2006; Anderson and Anderson 2002).

## 2.9 Proteomics

Unter Proteomics versteht man im weitesten Sinn die sehr umfassende Erforschung von Proteinen mittels biochemischer Methoden (Pandey and Mann 2000). Der Begriff Proteomics wird traditionell mit der Auftrennung von Proteinen verschiedener Zelltypen, Geweben oder Körperflüssigkeiten mit zweidimensionaler Gelelektrophorese in Verbindung gebracht (Meri and Baumann 2001). Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Gesamtheit verschiedener Proteinextrakte und deren Expressionsmuster zu analysieren (Wittmann-Liebold *et al.* 2006). Im Zuge dieser Entwicklung wurde ein neuer Begriff in die Proteinforschung eingeführt. Marc Wilkins prägte 1996 das Wort Proteom ‚PROTEins expressed by a genOME‘ (Wilkins

*et al.* 1996a). Das Wort Proteom soll den Zusammenhang zwischen dem Genom und den vom Genom exprimierten Proteinen verdeutlichen. Während ein Organismus oder eine Zelle nur ein definitives Genom besitzt, das als statisch bezeichnet werden kann, ist das Proteom eines Organismus oder einer Zelle dynamisch und verändert sich unter verschiedenen Bedingungen und repräsentiert den Zustand des Organismus oder der Zelle zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt unter ganz bestimmten Bedingungen (Wilkins *et al.* 1996b). Die endgültige Entschlüsselung des Genoms hat gezeigt, dass die alleinige Kenntnis aller Gene nicht ausreicht, um die biologischen Vorgänge in einem Organismus vollständig zu erklären (Pandey and Mann 2000). Proteomics ist das Gegenstück zu Genomics, wobei es sich auf die Genprodukte, die Proteine, konzentriert, die die aktiven Komponenten in einem Organismus darstellen. Die Messung der Genexpression kann zwar auch auf der Ebene der mRNA Analyse erfolgen, wobei dabei meist die Menge der mRNA gemessen wird, die aber nicht mit den funktionell aktiven Proteinen korreliert (Gygi *et al.* 1999). Die Anzahl der Proteine eines Proteoms übersteigt die Anzahl der zugrundeliegenden Gene, da Proteine häufig posttranslationale Modifikationen erfahren (Wilkins 1997). Modifikationen der Proteine, wie zum Beispiel Isoformen, Glykosylierungen oder Phosphorylierungen lassen sich nicht aus der DNA Sequenz ablesen, machen aber einen großen Anteil der Proteine aus und sind vor allem für die Funktion der Proteine ausschlaggebend (Meri and Baumann 2001; Pandey and Mann 2000; Wilkins 1997). Um die dynamischen Prozesse in einem Organismus oder in Zellen zu verstehen, die während der Zellentwicklung, Zelldifferenzierung oder der Entwicklung von Krankheitsprozessen entstehen, ist es essenziell, die daran beteiligten Proteine zu erfassen und ihre Funktion zu kennen (Wittmann-Liebold *et al.* 2006; Wilkins *et al.* 1996b). Die Kenntnis der unterschiedlichen Expressionsmuster von Proteinen bestimmter Gewebe, Zellen oder Körperflüssigkeiten unter verschiedenen Bedingungen führt zur Aufklärung von molekularen Prozessen, der Identifikation von Krankheitsmarkern und der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

Um die schnelle Entwicklung von Proteomics zu koordinieren und möglichst effektiv zu gestalten, haben sich verschiedene Wissenschaftler zusammengeschlossen (HUPO, <http://hupo.org>), um Richtlinien für gewisse Standards in den verschiedenen Forschungsgebieten zu erarbeiten (Wilkins *et al.* 2006).

### **2.9.1 2D-Gelelektrophorese**

Für die Analyse von komplexen Proteingemischen aus Zelllysaten oder Körperflüssigkeiten ist die zweidimensionale Gelelektrophorese bis heute die Methode der Wahl (Carrette *et al.* 2006; Rabilloud 2002). Eingeführt wurde diese Methode schon in den frühen siebziger Jahren (Klose 1975; O'Farrell 1975), konnte aber auf Grund unzureichender Reproduzierbarkeit und mangelnder Möglichkeiten in der Proteinidentifikation nicht genutzt werden. Die heutige 2D-Gelelektrophorese in Kombination mit der Massenspektrometrie hat einen zentralen Stellenwert in der Analyse unterschiedlichster Proteome eingenommen (Carrette *et al.* 2006; Gorg *et al.* 2004). Die zweidimensionale Gelelektrophorese basiert auf dem Prinzip der Auftrennung der Proteine in der so genannten ersten Dimension entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend in der zweiten Dimension auf einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrem Molekulargewicht. Die Einführung von Streifen mit immobilisierten pH-Gradienten von Görg *et al.* für die erste Dimension hat die Reproduzierbarkeit, Auflösung und die Separationsbandbreite sehr basischer oder saurer Proteine erheblich verbessert und erlaubt die Anwendung der Technik in größerem Maßstab (Gorg *et al.* 1988). Abhängig von der gewählten Gelgröße und dem pH-Gradienten können bis zu 5000 Proteine gleichzeitig aus komplexen Proteingemischen auf einem Gel aufgetrennt werden (Gorg *et al.* 2004). Für diese Art der Proteinauftrennung wurden inzwischen verschiedene Färbetechniken mit sehr unterschiedlicher Sensitivität entwickelt, um das entstandene Proteinmuster auf den Gelen sichtbar zu machen (Miller *et al.* 2006; Westermeier and Marouga 2005). Für die spätere Identifikation der Proteine ist es wichtig, die Kompatibilität der verwendeten Färbemethode mit dem Massenspektrometer zu berücksichtigen.

### **2.9.2 2D-Difference gel electrophoresis (DIGE)**

Um Unterschiede in der Proteinexpression zwischen zwei Proben besser detektieren und quantifizieren zu können, wurde von Ünlü *et al.* eine Modifizierung der konventionellen 2D-Gelelektrophorese eingeführt (Unlu *et al.* 1997). Mit einer Fluoreszenzmarkierung zweier verschiedener *Drosophila*-Extrakte vor der zweidimensionalen Gelelektrophorese und anschließender gemeinsamer Auftrennung der Proben auf demselben Gel konnten Ünlü *et al.* Unterschiede in der Proteinexpression der Proben im Nanogrammbereich nachweisen (Unlu *et al.* 1997). Es wird zwischen einer Minimal-Labeling und einer Saturation-Labeling Methode

unterschieden (Lilley and Friedman 2004). Bei der Anwendung von 2D-DIGE werden die verschiedenen zu untersuchenden Proben mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gleicher Ladung und Masse markiert, welche aber in der Spektralanalyse unterschiedlich aufgelöst werden, und anschließend gemeinsam aufgetrennt. Dies bietet den Vorteil, gegenüber der herkömmlichen 2D-Gelelektrophorese, Variationen der Laufmuster bei verschiedenen Gelen ausschließen zu können, da die zu vergleichenden Proben auf einem Gel aufgetrennt werden (Marouga *et al.* 2005). Die Gele werden nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese in verschiedenen, den Farbstoffen entsprechenden Wellenlängen, mit einem speziellen Laserscanner gescannt, und können mittels eines Softwareprogrammes visualisiert und analysiert werden. Die Markierung der Probe mit Fluoreszenzfarbstoff ist mit der Massenspektrometrie kompatibel (Lilley and Friedman 2004). Um den genauen Vergleich mehrerer Gele untereinander zu ermöglichen, wurde ein interner Standard in den Versuchsaufbau integriert (Alban *et al.* 2003). Der interne Standard repräsentiert alle im Experiment verwendeten Proben und kommt in jedem Gel vor, wodurch die experimentellen Variationen zwischen den verschiedenen Gelen rechnerisch beseitigt werden können.

### **2.9.3 Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) zur Proteinidentifikation**

Die Massenspektrometrie ist zur zentralen Analysemethode in der Proteinforschung geworden (Domon and Aebersold 2006). 1988 führten Karas und Hillenkamp die Matrix unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ein (Karas and Hillenkamp 1988). Mit der Methode der MALDI-MS war es zum ersten Mal möglich, Proteine als intakte Moleküle zu analysieren. Die zu analysierende Probe wird zunächst mit Trypsin, einer Endopeptidase, in definierte Fragmente geschnitten und dann in eine geeignete Matrix, die in der Regel aus organischen Molekülen besteht, eingebettet. Im Hochvakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers wird die kristalline Oberfläche der präparierten Probe einem intensiven Impuls kurzweiliger Laserbestrahlung ausgesetzt, die Ionen werden direkt in die Gasphase überführt, beschleunigt und dann abhängig von ihrem Masse/Ladungsverhältnis detektiert (Lottspeich 2006). Über die entstehenden Spektren werden zunächst die Peptidmassen und dann die Peptidsequenzen der Proben bestimmt.

Zur weiteren Optimierung der Proteinanalytik wurde zu Beginn des 21. Jahrhundert die Tandem Time-of-flight Technologie eingeführt, die die Sensitivität der Methode erhöhte (Vestal and Campbell 2005; Medzihradzky *et al.* 2000). Anhand von Standardpeptiden konnte eine Sensitivität bei der Detektion von einem 1 fmol erreicht werden (Vestal and Campbell 2005). Die Fortschritte in der Automatisierung des Ablaufs der MALDI-MS Technologie und dem Datenbankenabgleich macht diese Analysemethode zu einer Technologie, die in großem Maßstab angewendet werden kann (Gevaert and Vandekerckhove 2000; Jensen *et al.* 1997).

## **2.10 Serum- und Plasmaproteomics**

Im Rahmen der Human Proteome Organization (HUPO, <http://hupo.org>) wurden verschiedene Forschungsprojekte wie auch das Plasma Proteome Project (PPP) gegründet, um projektübergreifenden Austausch zu fördern und auch die Etablierung von gewissen Standards und die Einrichtung von Datenbankplattformen zu koordinieren (Omenn 2006). Die öffentlich verfügbare Datenbank der HUPO beinhaltet 3020 bestätigte Proteinidentifikationen mit mehr als zwei Peptiden für das PPP (Omenn *et al.* 2005).

Das Serum-/Plasmaproteom ist unter verschiedenen Gesichtspunkten ein außergewöhnliches Proteom. Es ist das komplexeste Proteom des Menschen, da es kein eigenes Genom besitzt aber andere Gewebeproteome als Untereinheiten besitzt (Issaq *et al.* 2007; Anderson and Anderson 2002). Da das Serum/Plasma ständig mit dem ganzen Körper in Kontakt steht und dessen Zustand repräsentiert, ist davon auszugehen, dass das Serum-/Plasmaproteom einige noch nicht charakterisierte Marker enthält, die zur Klärung von Krankheitsprozessen beitragen können oder von diagnostischer oder therapeutischer Bedeutung sind (Issaq *et al.* 2007; Pieper *et al.* 2003; Anderson and Anderson 2002). Außerdem gilt das Serum-/Plasmaproteom als das am schwierigsten zu charakterisierende Proteom, da die dynamische Bandbreite der Konzentrationsunterschiede der vorkommenden Proteine  $10^9$  beträgt und damit besonders hohe Anforderungen an die Analysemethoden stellt (Pieper *et al.* 2003; Anderson and Anderson 2002).

### **2.10.1 Humanes Serumproteom**

Die Charakterisierung des humanen Serumproteoms wurde zunächst von Pieper *et al.* durchgeführt (Pieper *et al.* 2003). Vor der zweidimensionalen

gelelektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine wurden die abundanten Serumproteine mittels einer Immunoaffinitätschromatografie entfernt. Anschließend wurden die Serumproteine chromatografisch der Größe nach in verschiedene Gruppen aufgeteilt und dann zweidimensional aufgetrennt. Insgesamt konnten 1800 verschiedene Spots mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Diese 1800 Spots repräsentierten 325 verschiedene Proteine. Die 325 Proteine wurden in Anlehnung an Anderson (Anderson and Anderson 2002) in sechs verschiedene Kategorien eingeteilt. Der größte Anteil der identifizierten Proteine (126) zählt zu den klassischen Plasmaproteinen. Die nächste Gruppe (113 Proteine) gehört zu den intrazellulären Proteinen, die aus Zellen oder Gewebe aufgrund von Gewebedefekten oder Zellyse ins Plasma austreten. Die dritte Kategorie (29 Identifikationen) wird von Proteinen der extrazellulären Matrix gebildet oder von Proteinen, die in andere extrazelluläre Flüssigkeiten als Plasma sezerniert werden. Fünfundzwanzig Proteinidentifikationen gehören zu den vesiculären Proteinen, von denen man annimmt, dass sie ins Plasma sezerniert werden. Die fünfte Kategorie stellen Zelloberflächen- und Membranproteine mit 21 Identifikationen dar. Zehn Proteine konnten aufgrund unzureichender Informationen über ihre Funktion keiner Gruppe zugeordnet werden. Von besonderem Interesse bei dieser Untersuchung war, zu zeigen, dass es mit dieser Technologie auch möglich ist, Proteine, die in sehr geringen Konzentrationen im Serum vorkommen, wie zum Beispiel Interleukin-6, Parathyroidhormon und Caspase 10, auf den Gelen zu visualisieren und anschließend zu identifizieren.

### **2.10.2 Serumproteomuntersuchung bei Tieren**

Die Analyse und Charakterisierung der Serumproteome verschiedener Tierarten ist noch nicht weit fortgeschritten (Miller *et al.* 2004). Die Hauptursachen dafür sind die noch unzureichenden Depletionsmethoden für das Serum der verschiedenen Spezies und die unvollständig charakterisierten Genome der Tierarten, was eine eindeutige Identifizierung der Proteine mit dem Massenspektrometer und die darauf folgende Datenbankanalyse erschwert. Näher untersucht mit zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden bislang das Ratten-, Mäuse-, Pferde- und Rinderserum (Chatterji and Borlak 2007; Miller *et al.* 2004; Wait *et al.* 2002; Haynes *et al.* 1998). Bei der ersten Erstellung einer Referenzkarte vom Serum gesunder Ratten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese konnten 56 Spots identifiziert werden, die 22 verschiedenen Proteinidentifikationen entsprachen (Haynes *et al.* 1998). Diese

Referenzkarte wird regelmäßig erweitert und kann unter <http://linux.farma.unimi.it> eingesehen werden. Mit der zweidimensionalen Auftrennung von Mäuseserum ohne Anwendung von Depletionsmethoden konnten 50 verschiedene Proteine indentifiziert werden (Chatterji and Borlak 2007). Bei der Auftrennung von Rinderserum wurden 21 verschiedene Proteine lokalisiert und identifiziert (Wait *et al.* 2002). Miller *et al.* haben 25 verschiedene Genprodukte im zweidimensional aufgetrenntem Pferdeserum lokalisiert und massenspektrometrisch identifiziert (Miller *et al.* 2004).

Die Serumproteomuntersuchung bei Tieren hat bis heute hauptsächlich Anwendung bei Tumorerkrankungen und für den Vergleich von Medikamentenwirkungen bei Ratten- und Mausmodellen gefunden (Chatterji and Borlak 2007; Gianazza *et al.* 2002). Es gibt noch keine vergleichenden Serumproteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese zur Untersuchung der EAU, ERU oder auch der humanen autoimmunen Uveitis.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchungsmaterial

Für diese Arbeit wurden Serumproben von 15 augengesunden Pferden sowie von 20 an ERU erkrankten Pferden untersucht. Die an ERU erkrankten Pferde stammten aus dem Patientengut der Klinik für Pferde der Ludwigs-Maximilians-Universität München (Vorstand Prof. H. Gerhards). Die Diagnose der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) erfolgte anhand klinischer Kriterien (Werry and Gerhards 1992). Für die Experimente gab es keine Vorauswahl der Proben; es wurden die Serumproben des jeweils nächsten in der Klinik vorgestellten ERU-Patienten in die Untersuchung miteinbezogen. Die Kontrollgruppe wurde dann entsprechend der Rasse, dem Alter und dem Geschlecht passend zu den ERU-Patienten ausgesucht. Für die 2D-DIGE Experimente (Kap. 3.8 ff) wurden die Serumproben der in den Tabellen 3.1.1 und 3.1.2 aufgeführten Pferde verwendet.

<b>Pferd</b>	<b>ERU-Serumproben</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>
Dominum	1	Bay.Warmblut	9 Jahre	Wallach
LapTop 3	2	Old. Warmblut	12 Jahre	Wallach
Perina	3	Warmblut	19 Jahre	Stute
Santana	4	Ung.Warmblut	12 Jahre	Wallach
R.Löwenherz	5	Old.Warmblut	8 Jahre	Wallach
Gigolo	6	Warmblut	6 Jahre	Wallach

Tab. 3.1.1: Rasse, Alter und Geschlecht der an ERU erkrankten Pferde, die für die 2D-DIGE Experimente verwendet wurden.

<b>Pferd</b>	<b>Kontroll-Serumprobe</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>
Kristall	1	Warmblut	10 Jahre	Wallach
Lord	2	Bay.Warmblut	15 Jahre	Wallach
Fire Lady	3	West.Warmblut	18 Jahre	Stute
Calypso	4	Warmblut	12 Jahre	Wallach
Gran Coeur	5	Han.Warmblut	21 Jahre	Wallach
Quidditch	6	Bay.Warmblut	6 Jahre	Wallach

Tab.3.1.2: Rasse, Alter und Geschlecht der augengesunden Pferde, die für die 2D-DIGE Experimente verwendet wurden.

### 3.1.1 Serumgewinnung

Nach Desinfektion der Injektionsstelle mit einem Hautdesinfektionsmittel<sup>1</sup> wurde Blut aus der Vena jugularis entnommen und in Serumröhrchen<sup>2</sup> gefüllt. Nach Abschluss der Gerinnung wurde das Serum zehn Minuten bei Raumtemperatur und 290 rcf zentrifugiert und anschließend abpipettiert. Die Serumproben wurden mit einem EDTA-freien Proteaseinhibitor<sup>3</sup> versetzt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

<sup>1</sup> Fa. Dr. Schumacher, Melsungen

<sup>2</sup> Fa. Sarstedt, Nürnberg

<sup>3</sup> Fa. Roche, Mannheim

## **3.2 Puffer und Lösungen**

### **3.2.1 Puffer**

#### **Dialysepuffer, pH 8,5**

Tris<sup>4</sup> (50 mmol) 6,05 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

### **3.2.2 Puffer und Lösungen für die Serumdepletion**

Die Puffer wurden mit dem dem Depletionskit ProteomeLab IgY-12 High capacity<sup>5</sup> mitgeliefert.

#### **Verdünnungspuffer 1x, pH 7,4**

10 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

#### **Strippingpuffer 1x, pH 2,5**

0,1 M Glycine HCl

#### **Neutralisationspuffer 10x, pH 8,0**

1 M Tris-HCl

#### **Natriumazidlösung 1%**

Natriumazid 0,5 g

ad 50 ml Aqua bidest.

---

<sup>4</sup> Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien: Fa. AppliChem, Darmstadt

<sup>5</sup> Fa. Beckman Coulter, Krefeld

### 3.2.3 Puffer und Lösungen für die zweidimensionale Gelelektrophorese

**Lysepuffer** (zu 1 ml aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt)

Harnstoff (9 M) <sup>6</sup>	27,00 g
Thioharnstoff (2 M) <sup>7</sup>	7,60 g
CHAPS (4%) <sup>8</sup>	2,00 g
DTT (65 mM) <sup>9</sup>	0,50 g

ad 50 ml Aqua bidest.

Bei Raumtemperatur (RT) fünf Stunden rühren.

Vor Gebrauch wurden pro 1 ml Lysepuffer 0,1 ml Aqua bidest. zugesetzt.

#### Äquibrierungslösung

1 M Tris-HCl pH 6,8	50,00 ml
Harnstoff <sup>10</sup> (6 M)	360,00 g
Glycerin	300,00 ml
SDS (1,8%)	18,00 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

#### Agarose-Lösung

Agarose <sup>11</sup> (0,5%)	0,25 g
------------------------------	--------

ad 50 ml Elektrophoresepuffer.

Aufkochen und anschließend auf 58°C temperieren.

Vor der Verwendung wurden zusätzlich 0,5 ml SDS-Lösung 20% zugesetzt.

#### Ammoniumpersulfatlösung (APS)

Ammoniumpersulfat (10%)	0,10 g
-------------------------	--------

ad 1 ml Aqua bidest.

---

<sup>6</sup> Fa GE Healthcare, Freiburg

<sup>7</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>8</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>9</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>10</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>11</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

### **Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3**

Tris (120 mM)	15,00 g
Glycin (960 mM)	72,00 g
SDS (0,05%)	5,00 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

Die Stammlösung wurde zur Elektrophorese 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

### **Aufbewahrungspuffer für Polyacrylamidgele, pH 8,8**

Tris (375 mM)	45,30 g
---------------	---------

mit 5 M HCl auf pH 8,8 titrieren

ad 1000 ml Aqua bidest.

### **Gelpuffer, pH 8,8**

Tris (1 M)	121,00 g
------------	----------

mit 5 M HCl auf pH 8,8 titrieren

ad 1000 ml Aqua bidest.

## **3.2.4 Puffer und Lösungen für 2D-DIGE**

### **DIGE-Probenpuffer, pH 8,5**

Tris (30 mM)	182,00 mg
Harnstoff (7 M)	21,00 g
Thioharnstoff (2 M)	7,60 g
CHAPS (4%)	2,00 g

mit 5 M HCl auf pH 8,5 titrieren

ad 50 ml Aqua bidest.

### **Lysin-Lösung**

Lysin <sup>12</sup>	18,00 mg
---------------------	----------

ad 10 ml Aqua bidest.

---

<sup>12</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

### 3.2.5 Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### Tris-HEPES-SDS Laufpuffer-Stammlösung für Fertiggele

Tris (1 M)	121,00 g
HEPES (10 mM)	2,38 g
SDS (1%)	10,00 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

Die Stammlösung wurde zur Elektrophorese 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

#### Probenpuffer (reduzierend)

Aqua bidest.	4,00 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,00 ml
Glycerin, wasserfrei	0,80 ml
SDS-Lösung (10%)	1,60 ml
Bromphenolblau-Lösung	0,20 ml
2-Mercaptoethanol <sup>13</sup>	0,40 ml

ergeben 8,00 ml Probenpuffer.

---

<sup>13</sup> Fa. BioRad

### **3.3 Methodenvergleich für die Serumdepletion**

Um eine geeignete Methode zur Entfernung der abundanten Proteine aus dem Serum zu finden wurden drei Methoden verglichen. 22 Proteine machen 99% der Proteinmasse aus (Issaq *et al.* 2007). Diese Proteine werden im Folgenden als abundante Proteine bezeichnet. Albumin und Immunglobulin G sind die zwei in größter Menge vorkommenden Proteine und machen alleine mindestens 60% der Proteinmasse aus.

#### **3.3.1 Albumin und IgG Depletionskit**

Die Proteine Albumin und Ig G gehören zu den abundanten Proteinen im Serum. Um niedriger konzentrierte Proteine besser detektieren zu können, wurde eine Depletion der beiden Proteine durchgeführt.

Der Albumin- und IgG-Depletionskit<sup>14</sup> basiert auf dem Prinzip eines antikörperbeschichteten Trägergels. 15 µl Serum wurden mit 750 µl Trägergel in einem Röhrchen gemischt und für mindestens eine halbe Stunde in einer Rotationszentrifuge bei 250 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der inkubierte Serum-Gel-Mix in die obere Kammer der Mikrozentrifugensäule pipettiert und bei 6500 rcf für fünf Minuten zentrifugiert. Das Filtrat entsprach der depletierten Serumprobe. Um die Probe kompatibel für die zweidimensionale Gelelektrophorese zu machen, wurde eine Volumeneinengung und Konzentrierung mittels einer Acetonpräzipitation vorgenommen.

Zwei Milliliter Aceton wurden in einem Glasröhrchen für 20 Minuten bei -20°C gekühlt. Das Volumen des Filtrats wurde auf zwei Mikrozentrifugengefäße<sup>15</sup> verteilt und jeweils 1 ml eiskaltes Aceton hinzugefügt. Die Präzipitation findet bei -20°C über mindestens zwei Stunden statt. Anschließend wurden die Mikrozentrifugengefäße bei 13000 rcf, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet bei Raumtemperatur für 5 Minuten getrocknet. Das Pellet wurde in Lysepuffer resuspendiert (siehe Kap. 3.2.3) und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **3.3.2 Albumindepletion mittels Salzfällung**

Die zu entalbuminisierenden Serumproben wurden zunächst mit 0,1 M NaCl Lösung versetzt und für 60 Minuten bei 4°C in einen Rotor eingespannt und inkubiert. Nach

---

<sup>14</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>15</sup> Fa. Millipore, Schwalbach

einer Stunde wurde eisgekühltes Ethanol (42%) dazugegeben und die Röhren nochmals für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Um das erste Pellet zu erhalten, mussten die Röhren bei 16000 rcf bei 4°C für 45 Minuten zentrifugiert werden. Der Überstand wurde in ein neues Röhren überführt und mittels 0,8 M Natriumacetat auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt. Anschließend wurde der Überstand bei 16000 rcf bei 4°C für 45 Minuten zentrifugiert, um ein zweites Pellet zu erhalten. Die Pellets wurden zusammengefasst, in Lysepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 3.3.3 Depletionskit ProteomeLab IgY-12 high capacity

Für die Entfernung der abundanten Proteine aus dem Pferdeserum wurde der Depletionskit ProteomeLab IgY-12 High Capacity verwendet. Mit den polyklonalen aviären Antikörpern, die an Trägerkugeln gekoppelt sind, können zwölf abundante Proteine aus humanem Serum, Plasma und Cerebrospinalflüssigkeit entfernt werden (siehe Tab. 3.3.3.1).

Serum Albumin	Apolipoprotein AI
IgG	Apolipoprotein AII
Fibrinogen	Haptoglobin
Transferrin	Alpha-Antitrypsin
IgA	Alpha 1-Acidglycoprotein
IgM	Alpha 2-Macroglobulin

**Tab. 3.3.3.1:** Die zwölf Serumproteine, die mit der ProteomeLab IgY-12-Säule aus humanem Serum entfernt werden können.

Zur Serumdepletion wurden Mikrozentrifugensäulen verwendet, in denen die entsprechenden Antikörper auf Mikroträgerkugeln immobilisiert sind.

Zunächst wurden 20 µl Serum mit 480 µl Verdünnungspuffer (siehe Kap. 3.2.2) in einem Probenröhrchen<sup>16</sup> gemischt. Die mit 500 µl Verdünnungspuffer bestückte Säule wurde bei 400 rcf für 30 Sekunden abzentrifugiert. Die Säule wurde nun mit dem verdünnten Serum befüllt, verschlossen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einen Overhead-Rotor<sup>17</sup> eingespannt. Während der

<sup>16</sup> Fa. Sarstedt, Nürnberg

<sup>17</sup> Fa. ASID Bonz, Lohhof

Inkubationszeit binden die polyklonalen Antikörper die entsprechenden Serumproteine. Nach der 15 minütigen Inkubationszeit wurde die Säule wieder bei 400 rcf für 30 Sekunden abzentrifugiert. Der Durchfluss entspricht der depletierten Serumprobe. Die Säule wurde umgehend mit 500 µl Verdünnungspuffer befüllt, gemischt und abzentrifugiert. Um die nicht spezifisch gebundenen Proteine zu entfernen und eine maximale Ausbeute zu erlangen, wurde dieser Waschschrift insgesamt dreimal durchgeführt. Der Durchfluss wurde aufgefangen und später konzentriert.

Nach dem letzten Waschschrift wurden 500 µl Strippingpuffer (siehe Kap. 3.2.2) auf die Säule gegeben, um die an die Trägerkugeln gebundenen Proteine zu lösen. Die Säulen wurden verschlossen, gemischt und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 400 rcf für 30 Sekunden abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

Um die Kugeln zu regenerieren, mussten sie nach dem Strippen sofort mit 0,6 ml 1:10 verdünnter Neutralisationslösung (siehe Kap. 3.2.2) versetzt werden. Dann wurde die Säule bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert und anschließend bei 400 rcf für 30 Sekunden zentrifugiert. Danach wurden die Kugeln umgehend mit 500 µl Verdünnungspuffer resuspendiert, um die Säule zu regenerieren.

Die Säule konnte dann direkt für einen neuen Durchgang verwendet werden oder bei 4°C für maximal sieben Tage aufbewahrt werden. Wird die Säule länger als sieben Tage aufbewahrt, ist der Verdünnungspuffer mit 0,02% Natriumazid zu versetzen, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden.

### **3.4    Aufbereitung der Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese**

#### **3.4.1   Dialyse**

Um Interferenzen bei der isoelektrischen Fokussierung infolge zu hoher Ionenkonzentrationen in den depletierten Serumproben, die mit salzhaltigem Puffer verdünnt waren, zu vermeiden, war eine Reduktion des Salzgehaltes notwendig. Die depletierten Serumproben wurden in Dialysegefäßen (Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Unit, 7 kDa cut off)<sup>18</sup> über Nacht bei 4°C gegen Dialysepuffer (siehe Kap. 3.2.1) dialysiert.

---

<sup>18</sup> Fa. Pierce, Bonn

### 3.4.2 Konzentrierung

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese war es notwendig eine adäquate Probenmenge zu erlangen. Deshalb wurde eine Volumeneinengung der verdünnten Serumproben durchgeführt. Jeweils 500 µl der depletierten und dialysierten Proben wurden in Microcon YM-3 Zentrifugen Filtereinheiten<sup>19</sup> (cut off 3 kDa) pipettiert und verschlossen. Anschließend wurden alle Cups bei 14000 rcf für 30 Minuten bei 21°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und mit der konzentrierten Probe wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in Aliquots bei - 20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.5 Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Serum- und depletierten Serumproben

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford 1976). Durch eine Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm.

Die Reaktionslösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

H <sub>2</sub> O	800 µl
Bradford-Reagenz <sup>20</sup>	200 µl

Zur Erstellung einer Eichkurve diente ein BSA Standard<sup>21</sup>, der in den Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8 µg/ml Reaktionslösung gemessen wurde.

Die Serumproben wurden 1:10 mit Aqua bidest. vor der Proteinbestimmung verdünnt. Die depletierten Serumproben wurden vorab konzentriert. Von den Proben wurden jeweils 1 bis 10 µl zu der Reaktionslösung gegeben. Das Volumen der zu messenden Proteinlösung wurde dabei so gewählt, dass die Messwerte im linearen Bereich der Eichkurve lagen. Die photometrische Bestimmung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde dann entsprechend an der Eichgerade abgelesen und gemäß der eingesetzten Probenmenge berechnet.

---

<sup>19</sup> Fa. Millipore, Schwalbach

<sup>20</sup> Fa. BioRad, München

<sup>21</sup> Fa. New England Biolabs, Frankfurt

### **3.6 Eindimensionale Gelelektrophorese**

#### **3.6.1 Durchführung der Elektrophorese mit Fertiggelelen**

Die eindimensionale Auftrennung des Serums und des depletierten Serums erfolgte auf zehnpromzentigen Fertiggelelen<sup>22</sup>. Die Fertiggele wurden in eine Bio-Rad Mini Protean II Cell Kammer<sup>23</sup> eingespannt. Anschließend wurden die Elektrophoresekammern mit Tris-HEPES-SDS Laufpuffer befüllt und 30 Minuten bei 4°C stehen gelassen, damit die Gele wieder etwas aufquellen konnten. Die aufzutrennenden Serum- und depletierten Serumproben wurden mit reduzierendem Probenpuffer (siehe Kap. 3.2.5) entsprechend ihrer Ausgangskonzentration auf 0,5 µg, 0,250 µg und 0,125 µg Protein pro Probe verdünnt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Die verschiedenen Konzentrationen dienen der späteren Ermittlung des linearen Bereichs. Zur Ermittlung der Bandenhöhe diente ein Molekulargewichtsmarker<sup>24</sup> in der ersten Geltasche, welcher Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht enthielt. Die restlichen Geltaschen wurden mit je 10 µl des Probengemisches befüllt. Nachdem die Gele in die Kammern eingesetzt waren, wurden die Elektrophoresekammern mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Während der ersten zehn Minuten erfolgte die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 12,5 mA pro Gel, danach mit einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel (Power Pac 300 Power Supply)<sup>25</sup>.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele über Nacht mit kolloidalem Coomassie<sup>26</sup> gefärbt.

### **3.7 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

#### **3.7.1 Rehydratisierung der Proben**

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden auf Plastikstreifen fixierte, getrocknete Polyacrylamidgele in 11 oder 24 cm Länge mit einem immobilisierten, nichtlinearen pH-Gradienten von 3-11 eingesetzt (Immobiline DryStrip pH 3-11 NL, 11 cm oder 24 cm)<sup>27</sup>. Das Auftragen der Probe erfolgte durch Rehydratisierung der Streifen. Dazu wurde die Probe zuerst mit Lysepuffer zu einem konstanten Volumen aufgefüllt (das

---

<sup>22</sup> Fa. Pierce, Bonn

<sup>23</sup> Fa. BioRad, München

<sup>24</sup> Fa. Fermentas, St.Leon Rot

<sup>25</sup> Fa. BioRad, München

<sup>26</sup> Fa. Pierce, Bonn

<sup>27</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

Gesamtvolumen bestimmt die Dicke des zu rehydratisierenden Gels) und mit Trägersubstanzen für die isoelektrische Fokussierung (Pharmalyte) versetzt wie folgt:

Für 11 cm Streifen

Probe + Lysepuffer	210 µl
Pharmalyte 3-10 <sup>28</sup>	2,2 µl
Bromphenolblau <sup>29</sup>	1,1 µl

Für 24 cm Streifen

Probe und Lysepuffer	460 µl
Pharmalyte 3-10	4,6 µl
Bromphenolblau	2,3 µl

Nachdem die Rehydratationslösung gleichmäßig in die Vertiefung einer Quellkammer einpipettiert wurde, wurde die Schutzfolie vom trockenen Gelstreifen abgezogen und dieser mit der Gelfläche auf die Probe aufgelegt, ohne dass sich Luftblasen zwischen Rehydratationslösung und Streifen befanden. Um zu verhindern, dass der im Lysepuffer enthaltene Harnstoff auskristallisiert, wurde der Streifen anschließend mit entgastem Paraffinöl überschichtet. Durch Aufnahme der probehaltigen Rehydratationslösung hatten sich die trockenen Streifen nach fünf Stunden rehydriert (In-Gel Hydration).

### 3.7.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer Multiphor II Elektrophoreseeinheit<sup>30</sup>. Beim Aufbau der Elektrophoreseeinheit wurde zwischen Kühlplatte und Wanne, sowie zwischen Wanne und Streifenhalter, Paraffinöl pipettiert, um eine gleichmäßige Temperatur von 20°C während der Fokussierung aufrechtzuerhalten. Die rehydratisierten Streifen wurden mit der gequollenen Gelseite nach oben so auf dem Streifenhalter platziert, dass ihre saure Seite zur Kathode, die basische Seite zur Anode zeigte. Nach dem Auflegen der angefeuchteten Elektrodenstreifen<sup>31</sup>, wurden die Elektroden angelegt und die Gelstreifen mit entgastem Paraffinöl überschichtet.

---

<sup>28</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>29</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>30</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>31</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Hilfe eines EPS 3501 XL Electrophoresis Power Supply<sup>32</sup> für die 11 cm Streifen und mit einem PNC 10000-6 POS Power Supply<sup>33</sup> für die 24 cm Streifen folgendermaßen durchgeführt:

Für 11 cm Streifen, pH 3-11

Phase	1	2	3
Spannung (V)	150	300	1000
Linearer Anstieg (h)	0:01	0:01	0:01
Zeit (h)	2	3	13

Für 24 cm Streifen, pH 3-11

Phase	1	2	3	4
Spannung (V)	50	600	2000	3000
Linearer Anstieg (h)	0:01	02:00	02:00	02:00
Zeit (h)	2	5	4	ca. 18

Die Fokussierung wurde bei den 11 cm Streifen bei einer Summe von ca. 14000 Vh, bei den 24 cm Streifen von ca. 50000 Vh, beendet. Im Anschluss wurden die Gelstreifen entweder direkt für die zweite Dimension vorbereitet oder in Plastikhüllen verpackt und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

### 3.7.3 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele für die 2. Dimension

#### 3.7.3.1 Herstellung der kleinen Gele

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurden zwölfprozentige oder 9-15%ige Gradientengele in einer Größe von 7,5 cm x 8 cm und einer Geldicke von 0,75 mm verwendet. Zum Gießen der Gele wurde ein BV 102 Mini Slab Gel Gießstand<sup>34</sup> verwendet. Für jeweils zwei Gele wurden nachstehende Acrylamid-Lösungen hergestellt:

<sup>32</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>33</sup> Fa. Knürr-Heinzinger, Rosenheim

<sup>34</sup> Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

	<b>9%-Lösung</b>	<b>15%-Lösung</b>	<b>12%-Lösung</b>
<b>Acrylamid (30%)</b>	0,750 ml	1,250 ml	2,000 ml
<b>Aqua bidest</b>	1,125 ml	0,400 ml	1,750 ml
<b>Glycerin (80%)</b>	---	0,225 ml	---
<b>Gelpuffer</b>	0,625 ml	0,625 ml	1,250 ml

Bei den 9-15%igen Gradientengelen wurde unmittelbar vor dem Gießen der Gele zu jeder Lösung 12,5 µl 10% APS sowie 5 µl TEMED zugegeben, bei den 12% Gelen 25 µl 10% APS und 10 µl TEMED.

Die 9-15%igen Gradientengele wurden nach einer von Rehm beschriebenen Methode erstellt (Rehm 2002). Bei den Gradientengelen wurde in eine Pipette zuerst die 9%-Lösung und nachfolgend die 15%-Lösung aufgezogen. Nachdem einige Luftblasen durch die Pipette gezogen wurden, bildete sich der Gradient. Die Lösung wurde im Anschluss zwischen die beiden Glasplatten des Gelgießstandes pipettiert und die Geloberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Polymerisierungszeit von einer Stunde und nach der Entfernung des Isopropanols konnte das Gel zur Proteinauftrennung in der zweiten Dimension verwendet werden.

### 3.7.3.2 Herstellung der großen Gele

12% Gele und 9-15% Gradientengele wurden in einer Multicasting Chamber Ettan II<sup>35</sup> gegossen. Die Kammer erlaubt es, 13 Gele mit einer Schichtdicke von 0,75 mm und einer Größe von 25 x 20 cm gleichzeitig zu gießen. Die Gradientengele wurden mit einem Ettan II Gradientenmischer<sup>36</sup> hergestellt. Für die Gele wurden folgende Lösungen angesetzt und entgast:

	<b>9% Lösung</b>	<b>15% Lösung</b>	<b>12% Lösung</b>
<b>Acrylamid (30%)</b>	114 ml	190 ml	304 ml
<b>Aqua bidest</b>	122 ml	13 ml	265 ml
<b>Glycerin 80%</b>	----	34 ml	----
<b>Tris 1M, pH 8,8</b>	143 ml	143 ml	191 ml

<sup>35</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>36</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

Unmittelbar vor dem Einfüllen der Lösungen in den Gradientenmischer wurden 1,25 ml 10% APS (siehe Kap. 3.2.3) und 125 µl TEMED zugefügt. Nach dem Gießen wurden die Gele mit Isopropanol überschichtet und nach einer Auspolymerisierungszeit von drei Stunden direkt für die zweite Dimension verwendet oder in 375 mM Trispuffer (pH 8,8) bei 4°C aufbewahrt.

### 3.7.4 Äquilibrierung und zweite Dimension

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen äquilibriert. Hierzu wurden sie jeweils zehn Minuten auf dem Schüttler nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

1. Reduktionslösung: Äquilibrierungslösung + DTT<sup>37</sup> (0,3 g/30 ml)
2. Carbamylierungslösung: Äquilibrierungslösung + Jodacetamid<sup>38</sup> (1,44 g/30 ml)

Der Carbamylierungspuffer enthielt außerdem 0,01% Bromphenolblau<sup>39</sup>, um die Lauffront bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese sichtbar zu machen.

Für eine Reduktion von elektroosmotischen Effekten beim Proteintransfer enthielt die Äquilibrierungslösung Harnstoff und Glycerin. Ein Zusatz von DTT zum ersten Äquilibrierungspuffer diente der kompletten Reduktion von Disulfidbrücken zu –SH Gruppen, die anschließend mit Jodacetamid in stabile Carbamidomethyl-Gruppen umgewandelt wurden.

Nach der Äquilibrierung wurden die Streifen auf das Polyacrylamidgel aufgelegt, ohne dass sich Luftblasen zwischen dem Gel und dem Streifen befanden, und anschließend mit in Laufpuffer aufgekochter und auf 58°C temperierter Agarose (0,5%) überschichtet. Nachdem die Agarose abgekühlt und damit ausgehärtet war, wurden die Gele in die Elektrophoresekammern eingesetzt und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese für die kleinen Gele erfolgte während der ersten 30 Minuten mit einer konstanten Spannung von 60 V und nachfolgend mit einer konstanten Spannung von 175 V (BP 500 Plus Power Supply)<sup>40</sup>. Die großen Gele sind für 30 Minuten bei konstant 1 Watt pro Gel eingelaufen, und wurden dann auf konstante 12 Watt pro Gel erhöht. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Umgebungstemperatur von 4°C, um eine Überhitzung der Gele zu unterbinden. Der

---

<sup>37</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>38</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>39</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>40</sup> Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

Lauf wurde beendet, kurz bevor die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurden die Gele gefärbt.

### 3.7.5 Färbung der Gele

Alle Färbungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Gele befanden sich dabei in Plastikschaalen auf einem Schüttler. Die Färbung der Gele umfasste die unten aufgeführten Schritte. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch jeweils frisch hergestellt.

#### 3.7.5.1 Silberfärbung

Die Sensitivität dieser Färbemethode liegt bei 0,3–10 ng Protein (Switzer *et al.* 1979).

	Zeit	Lösung	Herstellung von 1 Liter
<b>Fixierung</b>	2 x 20 Min	50% Methanol 12% Essigsäure 0,0185% Formaldehyd	500 ml Methanol + 200 ml 60% Essigsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O + 500 µl Formaldehyd 37%
<b>Inkubation</b>	3 x 10 Min	50% Ethanol	500 ml Ethanol + 500 ml H <sub>2</sub> O
<b>Inkubation</b>	1 x 0,2 Min	0,8 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	200 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>41</sup> /1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Waschen</b>	2 x kurz	H <sub>2</sub> O	
<b>Silberimprägnierung</b>	1 x 20 Min	11,8 mM AgNO <sub>3</sub> 0,028% Formaldehyd	2 g AgNO <sub>3</sub> /1000 ml H <sub>2</sub> O + 750 µl Formaldehyd 37%
<b>Waschen</b>	1 x kurz	H <sub>2</sub> O	
<b>Entwicklung</b>	variabel	0,57 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,02 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,0185% Formaldehyd	60 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /1000 ml H <sub>2</sub> O + 25 ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Lösung (s.o.) + 500 µl Formaldehyd 37%
<b>Stoppen</b>	>10 Min	50 % Methanol 12% Essigsäure	500 ml Methanol + 200 ml 60% Essigsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Konservierung</b>	>20 Min	20% Ethanol 2% Glycerin	200 ml Ethanol + 25 ml 80% Glycerin ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

Tab. 3.7.5.1.1: Entwicklungslösungen für die Silberfärbung eines Polyacrylamidgels.

<sup>41</sup> Fa. Merck, Darmstadt

### 3.7.5.2 Bluesilver Färbung

	Zeit	Lösung	Herstellung von 1 Liter
<b>Fixierung</b>	2x15 Min	20% Methanol 10% Phosphorsäure	200 ml Methanol 117 ml Phosphorsäure (85%) ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Inkubation</b>	3x10 Min	10% Phosphorsäure	117 ml Phosphorsäure (85%) ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Inkubation</b>	1x15 Min	20% Methanol 10% Phosphorsäure 10% Ammoniumsulfat	200 ml Methanol 117 ml Phosphorsäure (85%) 100 g Ammoniumsulfat
<b>Färben</b>	über Nacht	Coomassie-Lösung	2 g Coomassie G <sup>42</sup> in 100 ml H <sub>2</sub> O heiß rühren (30 Min), anschließend filtern 1,5 vol% der Coomassie-Lösung zur vorherigen Lösung dazugeben
<b>Waschen</b>	3x15 Min	H <sub>2</sub> O	
<b>Konservierung</b>	>20 Min	20% Ethanol 2% Glycerin	200 ml Ethanol + 25 ml 80% Glycerin ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

Tab. 3.7.5.2.1: Entwicklungslösungen für die Bluesilver Färbung eines Polyacrylamidgels.

### 3.7.6 Trocknung der gefärbten Gele

Um die gefärbten Gele zu trocknen, wurden diese unter Zuhilfenahme von viel Wasser falten- und luftblasenfrei zwischen zwei Zellglasbögen<sup>43</sup> ausgestrichen, in Plastikrahmen eingespannt und für mindestens drei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Gele aus den Rahmen genommen, das überstehende Zellophan abgeschnitten und in Klarsichtfolien aufbewahrt.

<sup>42</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>43</sup> Fa. DETI GmbH, Meckesheim

### 3.8 2D-DIGE

Für den Vergleich der Serumproben wurde die 2D-DIGE Technologie gewählt, um differenziell exprimierte Proteine zu quantifizieren und anschließend mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) zu identifizieren. Die Proben wurden mit der Minimal-Fluoreszenzmarkierungsmethode (Viswanathan *et al.* 2006; Lilley and Friedman 2004) markiert. Die Sensitivität der Proteindetektion bei dieser Methode liegt bei 0,1-0,2 ng Protein (Miller *et al.* 2006; Viswanathan *et al.* 2006; Lilley and Friedman 2004).

Hierbei binden die drei unterschiedlichen CyDye Fluorochrome (Cy2/Cy3/Cy5)<sup>44</sup> an die  $\epsilon$ -Aminoreste des Lysins der Proteine. Bei der Markierungsreaktion nach dem Minimalprinzip werden nur 3% der jeweiligen Proteine markiert und bei diesen 3% nur ein Lysin pro Protein. Alle anderen Proteine bleiben unmarkiert. Die Farbstoffe besitzen alle das gleiche Molekulargewicht (500 Da) und eine positive Ladung. Das zusätzliche Molekulargewicht der Farbstoffe beeinflußt das Laufmuster der Proteine kaum. Da die positive Ladung des Lysins durch die positive Ladung des Farbstoffs ersetzt wird, ändert sich auch der isoelektrische Punkt der Proteine nicht. Die Fluoreszenzmarkierung der Proben erfolgt vor der Separation der Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und ist mit der Proteinidentifikation mittels Massenspektrometer kompatibel (da nur 3% der Gesamtmenge des Proteins markiert ist und die anderen 97% unverändert bleiben). Nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden die Gele zwischen den Glasplatten in den entsprechenden Wellenlängen der CyDye Fluorochrome mit Hilfe des Typhoon Trio Scanners<sup>45</sup> eingescannt. Im Anschluß werden die Gele silbergefärbt, um das Proteinmuster sichtbar zu machen. Die eingescannten Fluoreszenzbilder werden mit der ImageQuant TL Software<sup>46</sup> visualisiert, zugeschnitten und mit der DeCyder Version 6.5 Software<sup>47</sup> ausgewertet. Die mit der DeCyder Software ermittelten differenziell exprimierten Spots werden auf dem Silbergel lokalisiert, ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifiziert.

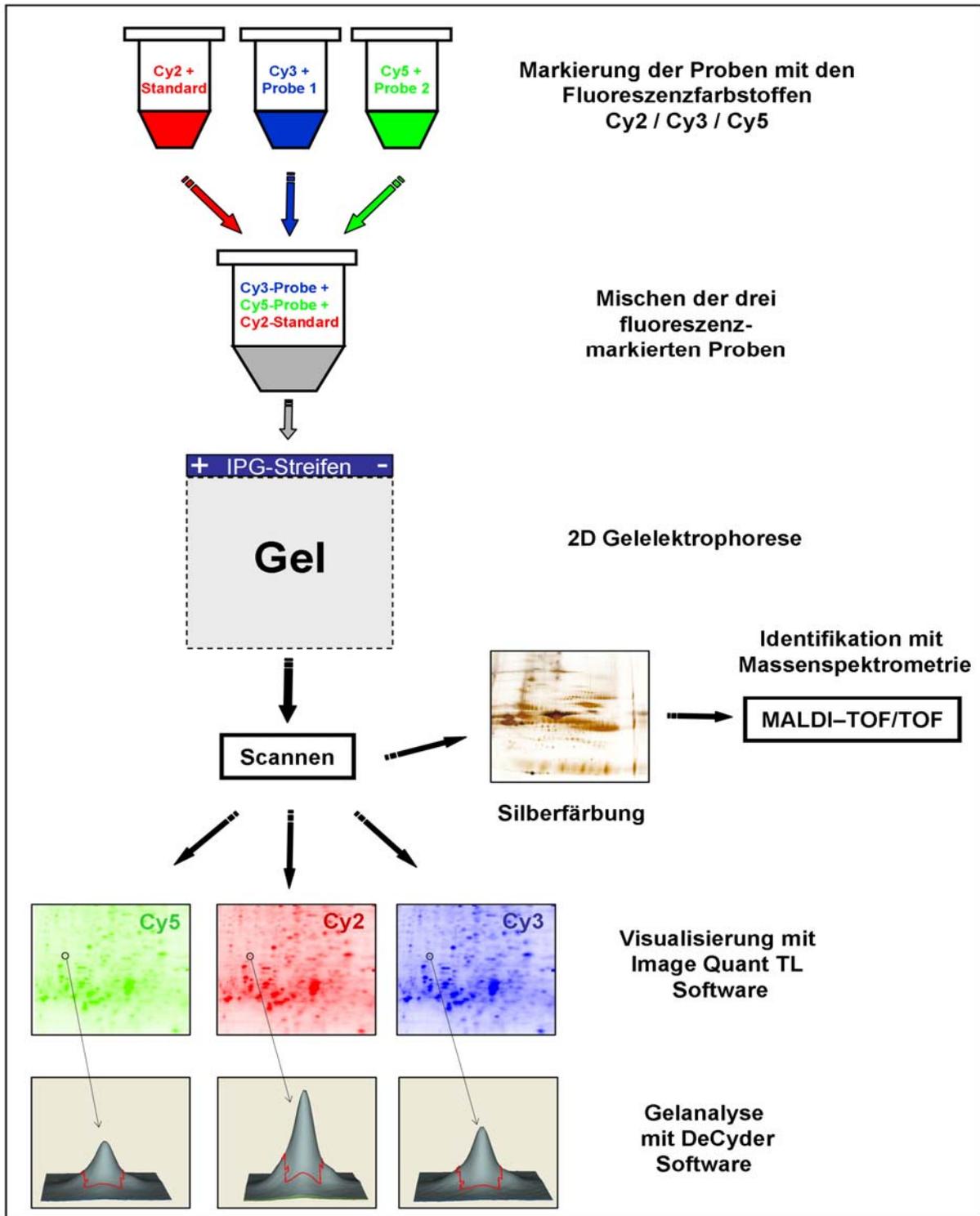
---

<sup>44</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>45</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>46</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>47</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg



**Abb. 3.8.1:** Schematische Darstellung der 2D-DIGE Methode. Die ERU- und Kontrollseren wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder Cy5 markiert, der interne Standard mit Cy2. Alle drei Proben (ERU-Serum, Kontrollserum und der interne Standard) wurden gemischt und in einem Gel zweidimensional aufgetrennt. Anschließend wird das Gel gescannt. Pro Gel entstanden drei Gelbilder, entsprechend der drei verschiedenen Farbstoffe. Diese Gelbilder wurden mit der DeCyder Software ausgewertet, um differenziell exprimierte Spots zu lokalisieren. Das Gel wurde nach dem Scannen silbergefärbt, die entsprechenden differenziell exprimierten Proteine ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifiziert.

### **3.8.1 Vorbereitung der Proben für die Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen**

Von allen Serum- und depletierten Serumproben, die für die 2D-DIGE Experimente ausgewählt wurden (Tab. 3.1.1 und 3.1.2), wurden jeweils drei 50 µg Aliquots vorbereitet. Zu jeder Probe wurde das gleiche Volumen DIGE-Probenpuffer dazugegeben, um einen pH-Wert über 8,0 zu gewährleisten, da der pH-Wert der Probe für eine erfolgreiche Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen über 8,0 liegen muss (Viswanathan *et al.* 2006). Abschließend wurde der pH-Wert nochmals mittels eines pH-Streifens<sup>48</sup> überprüft. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Vor Gebrauch der Farbstoffe mussten diese mit DMF<sup>49</sup> rekonstituiert werden.

Die bei -20° C gelagerten Farbstoffe wurden fünf Minuten vor der Rekonstitution bei Raumtemperatur aufgetaut. Zu jedem Farbstoffröhrchen wurden 5 µl DMF dazugegeben. Anschließend wurden die Lösungen für 30 Sekunden gemischt und für 30 Sekunden bei 12000 rcf zentrifugiert. Diese Lösung dient als konzentrierte Stammlösung.

Von der konzentrierten Stammlösung wurde eine verdünnte Gebrauchslösung zur Markierung der Proben erstellt, dazu wurde die konzentrierte Stammlösung mit DMF 1:2,5 verdünnt. Die Gebrauchslösung besitzt eine Konzentration von 400 pmol Farbstoff/µl.

### **3.8.2 Herstellung des internen Standards**

Der interne Standard setzt sich aus allen in dem Experiment vorkommenden Proben zusammen und dient bei der Auswertung der Gele zur Normalisierung der Gel-zu-Gel Schwankungen. Dazu wurden jeweils ein Aliquot (50 µg) von jedem ERU- und jedem Kontrollserum, die für das Experiment verwendet wurden (Tab. 3.8.3.1.1 und Tab. 3.8.3.2.1), zusammengefasst und mit dem gleichen Volumen DIGE-Probenpuffer versetzt. Das gesamte Volumen wurde durch die Gesamtzahl der Proben dividiert, um wieder entsprechende Aliquots mit jeweils 50 µg Protein zu erhalten, die nun alle in dem Experiment vorkommenden Proben repräsentieren. Der interne Standard wird in jedem Gel gemeinsam mit den zu vergleichenden Proben aufgetrennt.

---

<sup>48</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>49</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

### 3.8.3 Fluoreszenzmarkierung der Proben

Zu den vorbereiteten Aliquots (50 µg) auf Eis wurde entsprechend dem Markierungsschema in Tab. 3.8.3.1.1 und Tab. 3.8.3.2.1 je 1 µl (400 pmol/50 µg Protein) des entsprechenden Farbstoffs dazugegeben. In dem 2D-DIGE-Experiment 1 mit Vollserum wurden die Farbstoffe Cy3 und Cy5 unter den Proben ausgetauscht, um eine einseitige Beeinflussung der Auswertung durch den Farbstoff auszuschließen. Cy2 wurde in beiden Experimenten für den internen Standard benutzt. Die Proben wurden kurz gemischt und abgedunkelt für 30 Minuten auf Eis gestellt. Um die Markierungsreaktion zu stoppen, wurde nach 30 Minuten pro Probe 1 µl Lysin dazugegeben, um dem Farbstoff kompetitiv zu verdrängen. Nach weiteren zehn Minuten konnten die Proben zusammengefasst werden, dabei wurden immer eine ERU-Probe, eine Kontrolle und ein interner Standard zusammengefasst. Anschließend wurden die Proben für die isoelektrische Fokussierung auf IPG-Streifen 3-11 NL, 24 cm, entsprechend Kap. 3.7.2 ff aufbereitet.

#### 3.8.3.1 Experiment 2D-DIGE 1: Markierung der Serumproben mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

Gel	Serumprobe ERU-Patienten	Farbstoff	Serumprobe Kontrollen	Farbstoff	interner Standard	Farbstoff
A	Dominum	Cy5	Kristall	Cy3	interner Standard	Cy2
B	Lap Top 3	Cy5	Lord	Cy3	interner Standard	Cy2
C	Perina	Cy5	Fire Lady	Cy3	interner Standard	Cy2
D	Santana	Cy3	Calypso	Cy5	interner Standard	Cy2
E	R.Löwenherz	Cy3	Gran Coeur	Cy5	interner Standard	Cy2

Tab. 3.8.3.1.1: Markierungsschema der Fluoreszenzfarbstoffe für die Serumproben.

### 3.8.3.2 Experiment 2D-DIGE 2: Markierung der depletierten Serumproben mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

Gel	Dep. Serumprobe ERU-Patienten	Farbstoff	Dep. Serumprobe Kontrollen	Farbstoff	interner Standard	Farbstoff
F	Dominum	Cy5	Kristall	Cy3	interner Standard	Cy2
G	Lap Top 3	Cy5	Lord	Cy3	interner Standard	Cy2
H	Perina	Cy5	Fire Lady	Cy3	interner Standard	Cy2
I	Santana	Cy5	Calypso	Cy3	interner Standard	Cy2
J	Gigolo	Cy5	Quidditch	Cy3	interner Standard	Cy2

Tab. 3.8.3.2.1: Markierungsschema der Fluoreszenzfarbstoffe für die depletierten Serumproben.

### 3.8.4 Scannen der Gele

Im Anschluß an die 2D-Gelektrophorese wurden die Gele zwischen den Glasplatten in den entsprechenden Wellenlängen der CyDye Fluorochrome mit Hilfe des Typhoon Trio Scanners<sup>50</sup> einscannet.

Fluoreszenzfarbstoff	Emission Filter (nm)	Laser (nm)	PMT	Maximale Pixelintensität
Cy2	520 BP 40	Blue2 (488)	variabel	80000-95000
Cy3	580 BP 30	Green (532)	variabel	80000-95000
Cy5	670 BP 30	Red (633)	variabel	80000-95000

Tab. 3.8.4.1: Einstellungen für den Typhoon Trio Scanner.

Zunächst wurde eine Voransicht des Gels bei 1000 microns durchgeführt, um einen optimalen PMT (Photomultiplier Tube)-Wert zu erzielen. Der PMT-Wert legt die gewünschte Pixelintensität fest, die von dem ImageQuant TL Programm<sup>51</sup> berechnet wird und 95000 nicht überschreiten sollte. Der endgültige Scan der Gele erfolgte mit einer Auflösung von 100 microns.

<sup>50</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>51</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

Visualisiert wurden die Gele in den verschiedenen Kanälen, entsprechend der verschiedenen Farbstoffe mit dem ImageQuant TL Programm.

### 3.9 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen

#### 3.9.1 Entfärben und Verdauen der Proteinspots

Die massenspektrometrisch zu analysierenden Spots wurden mit einem Skalpell<sup>52</sup> aus den silbergefärbten Gelen ausgeschnitten. Vor der Rehydratation der Spots in je 100 µl Millipore-Wasser musste noch die Folie<sup>53</sup> von den Gelstücken gelöst werden, mit der die Gele bis zur weiteren Verarbeitung verpackt waren. Nach Entfernen der Plastikfolie wurden die silbergefärbten Spots mit folgenden Lösungen entfärbt:

30 mM Kaliumferricyanid<sup>54</sup> (98,76 mg ad 10 ml H<sub>2</sub>O)

100 mM Natriumthiosulfat<sup>55</sup> (248,18 mg ad 10 ml H<sub>2</sub>O)

Die frisch hergestellten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung im Verhältnis 1:2 gemischt. Die Gelstücke blieben bis zur sichtbaren Entfärbung in einer 96-Loch-Polystrol-Platte<sup>56</sup> in je 100 µl der Entfärbelösung und wurden anschließend einmal eine Minute und zweimal je fünf Minuten in H<sub>2</sub>O, sowie dreimal für je 15 Minuten in Acetonitril<sup>57</sup> (40%) gewaschen.

Der Spotverdau erfolgte mit Trypsin, wodurch eine Spaltung der Proteine zwischen den Aminosäuren Arginin und Lysin stattfand und somit genau definierte Proteinfragmente resultierten. Hierzu wurde eine Trypsin-Lösung (0,5 µg Trypsin<sup>58</sup>/µl) mit einer Tris-Lösung (1 mM, pH 9,5) im Verhältnis 1:50 verdünnt. Von dieser Lösung wurden pro Spot maximal 10 µl zugegeben. Anschließend wurden die Gelstücke über Nacht bei einer Temperatur von 37°C mit der Verdauungslösung inkubiert.

---

<sup>52</sup> Fa. Neo Lab, Heidelberg

<sup>53</sup> Fa. DETI GmbH, Meckesheim

<sup>54</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>55</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>56</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>57</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>58</sup> Fa. Promega, Mannheim

### 3.9.2 Massenanalyse

Die massenspektrometrische Analyse der verdauten Proteinspots erfolgte mittels MALDI-TOF peptide mass fingerprinting und MS/MS in einem MALDI-TOF/TOF Tandem Massenspektrometer<sup>59</sup>.

Die Ionisation der Analytmoleküle erfolgte in Form der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI). Als Matrix diente  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure, welche in Form folgender Lösung eingesetzt wurde:

2,5 mg  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure<sup>60</sup> pro  
1 ml 70% Acetonitril<sup>61</sup> + 0,1% Trifluoressigsäure<sup>62</sup>

Auf dem Probenhalter wurden je 0,5  $\mu$ l dieser Lösung mit 0,5  $\mu$ l der verdauten Probe vermischt. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet war und damit eine Kokristallisation der Analytmoleküle mit den Matrixmolekülen eingetreten war, konnte der Probenhalter in das Massenspektrometer eingelegt werden. Nach Erzeugung eines Hochvakuums konnte der Beschuss der Kristalle mit einem UV-Laser erfolgen. Die Auftrennung der durch den Laserimpuls gebildeten und innerhalb der Ionenquelle beschleunigten Ionen erfolgte mittels eines Flugzeitanalysators (TOF-Analysator, engl. time-of-flight), der die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z-Verhältnis) auftrennt, wobei das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung dem Quadrat der Flugzeit proportional ist. Die Detektion der Ionen erfolgte mit Hilfe eines Sekundärelektronenvervielfachers (SEV) zur Signalverstärkung und eines Transientenrekorders zur Digitalisierung des Signals. Das digitalisierte Signal wurde in einen Computer eingelesen und mit einem Datenverarbeitungsprogramm kalibriert und analysiert. Zusätzlich zur Messung der Massenspektren der jeweiligen Peptide (peptide mass fingerprinting, PMF) erfolgte eine Sequenzanalyse der im PMF signalstärksten Peptide (MS/MS).

Zur Ermittlung der Spektren im positiven Ionen Reflektor Modus wurden 2500 Laserschüsse gemittelt und mit Hilfe einer externen Kalibrierung analysiert. Die Kalibrierung erfolgte anhand der Standardpeptide Angiotensin-2-acetat mit einer monoisotopischen Masse des [M+H]<sup>+</sup> Ionensignals bei 1046.54 Da, Substanz P (1347.74 Da), Bombesin (1619.82 Da), und ACTH 18-3 (2465.20 Da)<sup>63</sup>. Die

<sup>59</sup> ABI 4700 Proteomics Analyzer, Fa. Applied Biosystems, USA

<sup>60</sup> Fa. Bruker Daltonics, Bremen

<sup>61</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>62</sup> Fa. PerkinElmer, Rodgau - Jügesheim

<sup>63</sup> Alle Kalibrationspeptide von Fa. Sigma, Deisenhofen

Bestimmung der monoisotopischen Peakmassen mit einer minimalen relativen Intensität von fünf und einer lokalen Unschärfe mit einer Spanne von 200 m/z erfolgte automatisch innerhalb des Massenbereichs von 800-4000 kD. Bis zu sieben der intensivsten Ionensignale mit einer relativen Intensität >30 (Signal zu Rausch Verhältnis) wurden automatisch als Precursor für die MS/MS-Erfassung ausgewählt, wobei Trypsin-Autolyse-Peaks und Matrixionensignale ausgeschlossen wurden. Im MS/MS positiven Ionenmodus wurden bei 1 kV Kollisionsenergie, einem Druck der Kollisionsgasluft von  $1,6 \times 10^{-6}$  torr und vorgegebener Kalibration jeweils 4000 Spektren gemittelt. Die monoisotopischen Peakmassen wurden, bei einer minimalen relativen Intensität von 10 und einer lokalen Unschärfe mit einer Spanne von 200 m/z, automatisch bestimmt.

### 3.9.3 Datenbanksuche

Mit Hilfe der MASCOT Datenbank Suchmaschine v1.9<sup>64</sup>, die in eine GPS-Explorer Software integriert war, wurden die kombinierten PMF- und MS/MS-Peptid-Massenlisten mit den Einträgen in den öffentlichen Proteindatenbanken verglichen. Die Pferdesequenzen wurden von dem UCSC (genome browser) heruntergeladen (erste Freistellung 1. Januar 2007). Zur Ermittlung dienten die SWISS-PROT Datenbank vom 31.05.2007 (270778 sequences; 99412397 residues) und die MSDB Metadatenbank vom 15.11.2006 (3239079 sequences; 1079594700 residues), in der die NCBI Datenbank erhalten war, unter Beachtung folgender Parameter:

Einträge beschränkt auf Mammalia (39612 und 252365 Sequenzen), 65 ppm Massentoleranz für Peptide, 0,3 Da Fragmenttoleranz, Trypsinschnitt, maximal eine nicht geschnittene Trypsinspaltstelle, Carbamidomethylierung als feste Modifikation und Oxidation von Methioninen als variable Modifikation. Ein Protein galt als identifiziert, wenn der wahrscheinlichkeitsbasierte MOWSE Score signifikant ( $p < 0,05$ ) für die jeweilige Datenbank war (Protein Scores größer als 58 waren signifikant für SwissProt, Scores größer als 67 waren signifikant für MSDB, Scores größer als 54 waren signifikant für die Pferdedatenbank).

Die genannten Datenbanken sind über das World Wide Web frei zugänglich unter:

Mascot: <http://www.matrixscience.com>

USCS: <http://www.genome.uscs.edu>

---

<sup>64</sup> ABI, Matrix Science Ltd., UK

SwissProt: <http://www.expasy.org>  
MSDB: <http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>  
NCBI: <http://ncbi.nlm.nih.gov>

### **3.10 Densitometrische Bildanalyse**

#### **3.10.1 Eindimensionale Gele**

Die quantitative Analyse der eindimensionalen Gele erfolgte durch die LabScan 5.0 Software<sup>65</sup>. Zunächst wurden die mit Imperial Stain gefärbten Gele bei 600 dpi mit einem Farb-Laserscanner eingescannt. Die zu vergleichenden Gelbanden wurden manuell definiert. Der Schwärzungsgrad der Gelbanden wurde densitometrisch bestimmt.

Für den Vergleich der Albuminbanden in Serum und depletierten Serum wurde der Student's *t*-Test verwendet.

#### **3.10.2 Zweidimensionale Gele**

Nach der zweidimensionalen Auftrennung wurden die silbergefärbten Gele in einem Farbscanner (ImageScanner<sup>66</sup>) bei 600 dpi gescannt. In einer automatischen Bildanalyse (ProteomeWeaver 2.2<sup>67</sup>) erfolgte die Detektion der Spots, die Ermittlung der Spotzahl je Gel, sowie die Messung der Intensitäten der einzelnen Spots.

Für die Detektion der Spots wurden folgende Parameter festgelegt: Minimaler Spotradius: 4; Minimale Spotintensität: 2000; Minimaler Kontrast: 10.

Nach der automatischen Spotdetektion erfolgte eine manuelle Korrektur der Parameter, um Artefakte auf den Gelen, die durch das Scannen entstanden waren, auszuschließen.

---

<sup>65</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>66</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>67</sup> Fa.BioRad, München

### **3.11 Statistische Auswertung der Fluoreszenz-markierten Gele mittels der DeCyder Software Version 6.5**

#### **3.11.1 DIA-Differential in gel analysis**

Die DeCyder Gelanalyse begann mit dem DIA (Differential in gel analysis)-Modul. Die mit der ImageQuant TL Software visualisierten Gele wurden in den entsprechenden Farbkanälen einzeln zugeschnitten, um Artefakte, die beim Scannen durch die IPG-Streifen entstanden sind, zu eliminieren und anschließend in das DIA-Programm importiert. Ein Gel besteht aus drei verschiedenen Gelbildern, die die entsprechenden Farbstoffe repräsentieren (Abb. 3.11.2.1). Das DIA-Programm diente der Intragel Analyse (Tannu and Hemby 2006). Neben der Spotdetektion wurde eine Normalisierung des Volumens der Cy3 (Probe 1) und Cy5 (Probe 2) markierten Spots im Bezug zu den Cy2 (interner Standard) markierten Spots durchgeführt (Cy3/Cy2 und Cy5/Cy2). Die Normalisierung der Proben gegen den internen Standard erlaubte später die Anwendung des Student's *t*-Test.

Zunächst wurden die Parameter für die Spotzahlermittlung festgelegt und die Farbstoffe den Gelen zugeordnet. Die geschätzte Spotanzahl wurde auf 2500 Spots pro Gel festgelegt. Um richtig positive Spots einzuschließen und falsch positive Spots auszuschließen, wurden bestimmte Ausschlußparameter festgelegt und anschließend eine automatische Spotdetektion durchgeführt. Ausschlußparameter waren ein Slope  $> 2$  (zu steiler Anstieg und damit ein Hinweis auf Staubartefakte) und ein Spotvolumen unter 30000.

Der automatischen Detektion folgte eine manuelle Überprüfung der einzelnen Spots. Nach jeder manuellen Korrektur mußten die Gele renormalisiert werden.

Jedes Gel der Auswertung wurde separat in dem DIA-Modul bearbeitet.

#### **3.11.2 BVA-Biological variation analysis**

Das BVA (Biological variation analysis)-Modul diente dem Vergleich der Gele untereinander (Intergel-Vergleich) (Tannu and Hemby 2006). Alle im DIA-Modul bearbeiteten Gele eines Experiments wurden in das BVA-Modul importiert. Zunächst mußten die zu vergleichenden Gruppen (ERU-Seren/Kontrollseren) mit den entsprechenden Gelen, Farbstoffen und Rahmenparametern festgelegt werden.

Interner Standard: Cy2

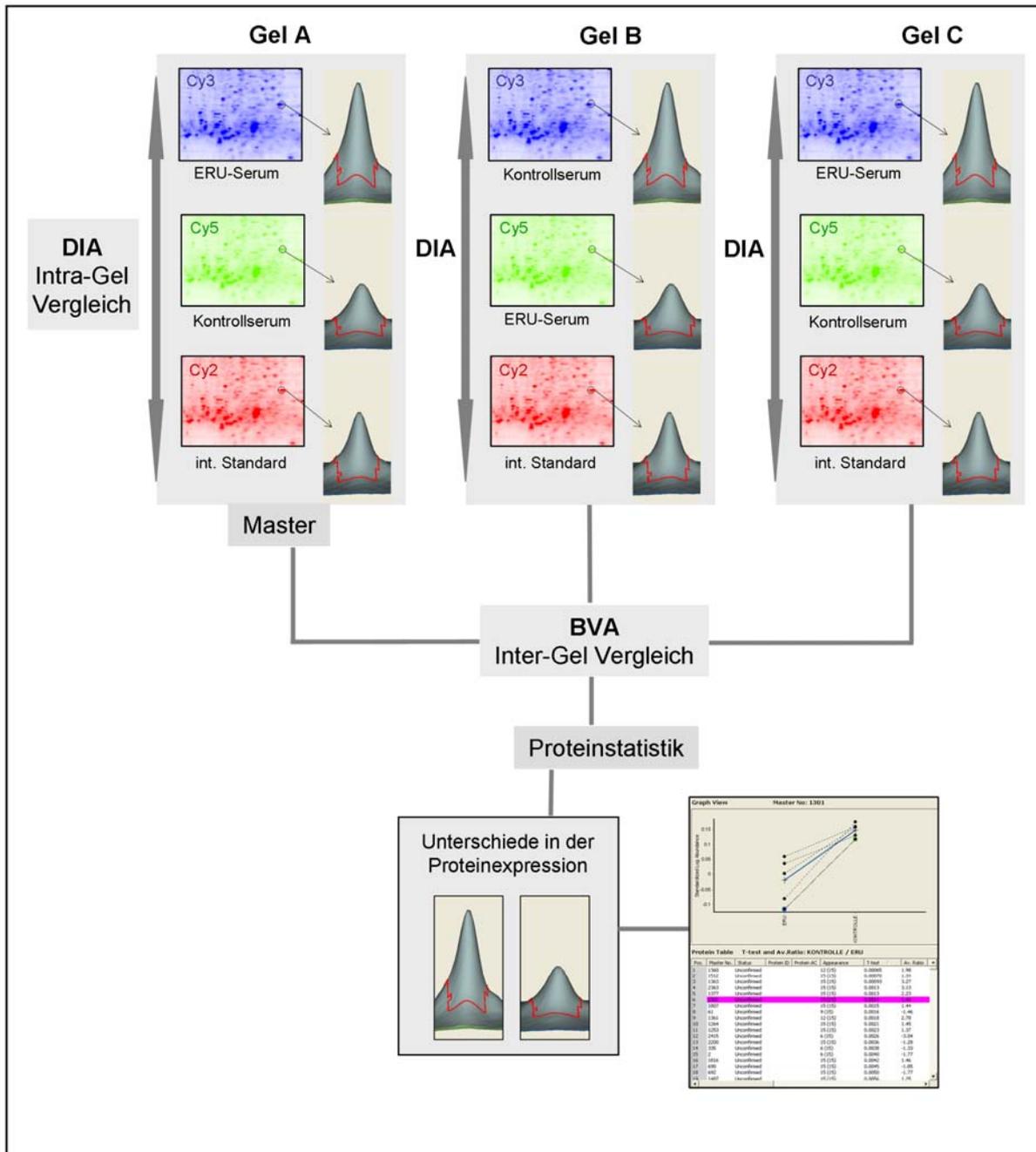
Gruppe 1: ERU Seren (Cy3 oder Cy5)

Gruppe 2: Kontrollseren (Cy3 oder Cy5)

Dann folgte ein erster automatisierter Vergleich aller Gele untereinander. Das Gel mit der besten Auflösung und den meisten Spots wurde als Mastergel definiert.

Der Vergleich der Gele mit dem Mastergel wurde manuell überprüft und durch Hinzufügen oder Entfernen von Spots auf einzelnen Gelbildern verbessert. Zusätzlich konnten noch definierte Referenzpunkte auf den verschiedenen Gelbildern festgelegt werden, die den Abgleich der Gele untereinander verbesserten. Ein automatisierter Neuabgleich unter allen Gelen mußte dann wiederholt werden. Der Student's *t*-Test wurde für den Vergleich der Proteinexpression in den zwei Gruppen (ERU-Seren und Kontrollseren) angewendet. Die Unterschiede in der Proteinexpression wurden zusätzlich noch mit dem Volumenverhältnis (average ratio) der unterschiedlich markierten Proben dargestellt.

Das BVA-Modul ermöglichte verschiedene Darstellungsmöglichkeiten der Gelbilder. Die verschiedenen Spots konnten vergleichend zwei- und dreidimensional dargestellt werden. Zusätzlich gab es eine Übersichtsgrafik und eine tabellarische Auflistung mit den statistischen Parametern zur Einordnung der Spots im Vergleich zu den korrespondierenden Spots in den anderen Gelen. Anhand der Übersichtsgrafik ist es möglich das Expressionsmuster eines bestimmten Spots in allen Gelen zu beurteilen. Die differenziell exprimierten Spots wurden auf einer von der Software erstellten Übersichtskarte (Abb. 4.3.2.2 und Abb. 4.4.2.2) farblich markiert. Von dieser Karte wurde ein 1:1 Ausdruck auf einer transparenten Folie angefertigt. Anhand dieser Folie konnten die Spots auf dem silbergefärbten Gel lokalisiert, ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifiziert werden.

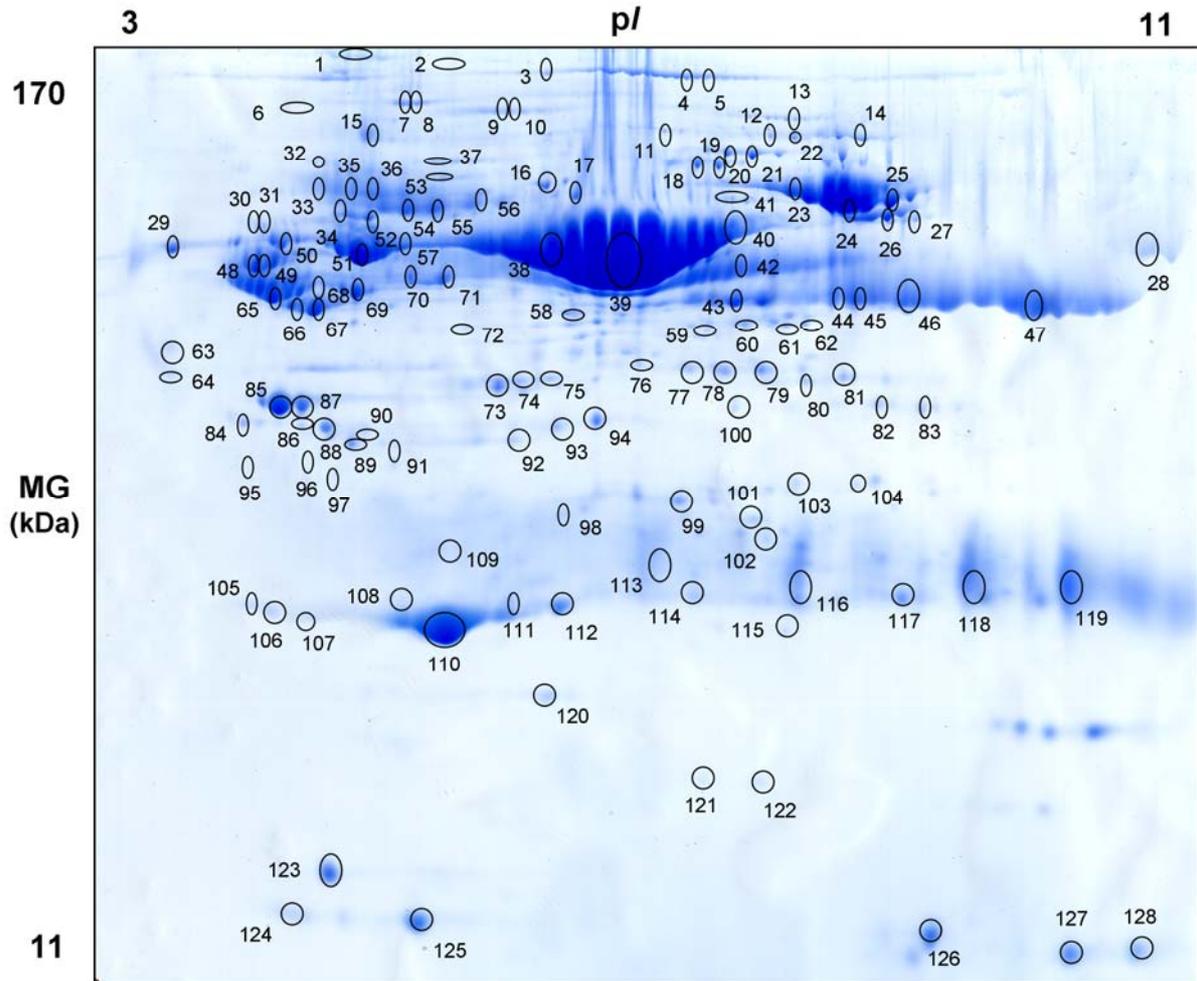


## 4. Ergebnisse

### 4.1 Erstellung einer Landkarte des Serumproteoms des Pferdes

Die Serumproteine 15 gesunder Pferde wurden mit zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt, um eine Referenzkarte für die Serumproteine beim Pferd zu erstellen. Die Gele mit Vollserum zeigten eine gute Auflösung und Reproduzierbarkeit. Das Laufmuster der unterschiedlichen Serumproben war sehr ähnlich. Das Proteinmuster auf dem Gel (Abb. 4.1.1) zeigt die Auftrennung von 600 µg unverdünnten Vollserums eines zehnjährigen gesunden Wallachs. In der ersten Dimension (Horizontalen) wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Auf der linken Seite befinden sich die Proteine, deren pH-Wert im sauren Bereich liegt, auf der rechten Seite die Proteine, deren pH-Wert im basischen Bereich liegt. Durch die Verwendung von IPG-Streifen mit einem nicht linearen pH Gradienten von 3-11 wurde ein breiter pH-Bereich abgedeckt, wobei im mittleren pH Bereich eine höher aufgelöste Auftrennung ermöglicht wurde, da in diesem Bereich der pH Gradient flacher verläuft. In der zweiten Dimension (Vertikalen) wurden die Proteine in einem 12% Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im oberen Bereich des Gels befinden sich die Proteine mit einem hohen Molekulargewicht, im unteren Bereich die Proteine mit niedrigem Molekulargewicht. Mittels einer 2D Bildanalyse-Software (ProteomeWeaver 2.2) konnten 1006 Spots für dieses Gel ermittelt werden.

Aus dem Serumproteom eines gesunden Pferdes konnten von 128 Spots die Proteine massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifiziert werden (Tab. 4.1.1.1). Insgesamt wurden 42 verschiedene Proteine ermittelt.



**Abb. 4.1.1:** Serumproteom eines gesunden Pferdes nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließender Bluesilver-Färbung. In horizontaler Richtung liegt eine Proteinauftrennung nach dem isoelektrischen Punkt vor ( $pI$  3-11), in vertikaler Richtung nach dem Molekulargewicht (170-11 kDa). Die mit Nummern gekennzeichneten Spots konnten massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifiziert werden. Die korrespondierenden Proteinidentifikationen sind in der Tabelle 4.1.1.1 unter der jeweiligen Nummer aufgeführt.

#### 4.1.1 Identifikationen von Serumproteinen

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Accession Nummer <sup>d</sup>	Theoretical		Protein score <sup>g</sup>
				MG <sup>e</sup>	$pI$ <sup>f</sup>	
1	Alpha-1-Antitrypsin 2 und Dynein	Equus Caballus	A1AT2_HORSE	47141	5,23	115
		Equus Caballus	XP_001491008	61485	5,51	445
2	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	284
3	Alpha-2-Makroglobulin	Equus Caballus	XP_001499173	164888	6,21	105

Ergebnisse

4	Alpha-2-Makroglobulin	Equus Caballus	XP_001499173	164888	6,21	219
5	Alpha-2-Makroglobulin	Equus Caballus	XP_001499173	164888	6,21	210
6	Alpha-2-Makroglobulin	Equus Caballus	XP_001499173	164888	6,21	164
7	Ceruloplasmin	Equus Caballus	XP_001491539	121950	5,36	245
8	Ceruloplasmin	Equus Caballus	XP_001491539	121950	5,36	201
9	Alpha-2-Makroglobulin	Equus Caballus	XP_001499173	164888	6,21	237
10	Alpha-2-Makroglobulin	Equus Caballus	XP_001499173	164888	6,21	225
11	Komplement C3	Sus Scrofa	NP_9999174	186806	6,09	99
12	Plasminogen	Canis Familiaris	XP_533468	91169	6,75	144
13	Komplement reg. Faktor H	Equus Caballus	XP_001491754	140741	7,52	132
14	Plasminogen	Canis Familiaris	XP_533468	91169	6,75	182
15	Inter-alpha-Trypsin Inhibitor	Equus Caballus	IATR_HORSE	14401	7,38	154
16	Serotransferrin	Equus Caballus	TREF_HORSE	80268	6,83	523
17	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	586
18	Gelsolin	Equus Caballus	GELS_HORSE	81062	5,58	447
19	Gelsolin	Equus Caballus	NP_001075422	80827	5,58	373
20	Komplementfaktor B	Equus Caballus	XP_001492602	85984	6,75	336
21	Komplementfaktor B	Equus Caballus	XP_001492602	85984	6,75	411
22	Plasminogen	Canis Familiaris	XP_533468	91169	6,75	264
23	Serotransferrin	Equus Caballus	TREF_HORSE	80268	6,83	878
24	Serotransferrin	Equus Caballus	TREF_HORSE	80268	6,83	496
25	Serotransferrin	Equus Caballus	NP_00175415	78094	6,83	622
26	Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	165
27	Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	104
28	Komplement C3 beta chain	Sus Scrofa	NP_999174	71316	6,82	324
29	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	509
30	Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	89
31	Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	101
32	Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	106
33	Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	443
34	Dynein	Equus Caballus	XP_001491008	61485	5,51	94
35	Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	447
36	Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	484
37	Copperaminoxidase	Equus Caballus	XP_001496318	84744	5,93	166
38	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	517
39	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	456
40	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	190
41	Serotransferrin	Canis Familiaris	XP_864119	76128	6,32	202
42	Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	36432	5,95	337
43	Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	218
44	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus Caballus	AAS18414	36269	7,70	392

Ergebnisse

	und					
	Immunglobulin Gamma 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	379
45	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus Cabullus	AAS18414	36269	7,70	509
	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus Caballus	AAS18414	36269	7,70	424
46	und					
	Immunglobulin Gamma 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	421
	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus Caballus	AAS18414	36269	7,70	286
47	und					
	Immunglobulin Gamma 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	264
48	Alpha-1-Antitrypsin	Equus Caballus	XP_001495885	47258	5,36	249
49	Alpha-1-Antitrypsin	Equus Caballus	XP_001495885	47258	5,36	246
50	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	284
	und Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	79
51	Immunglobulin Gamma 2 hc	Equus Caballus	CAC44761	42261	5,36	174
52	Dynein	Equus Caballus	XP_001491008	61485	5,51	321
53	Komplement C4A	Equus Caballus	XP_00142943	192469	6,83	72
54	Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	530
55	Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	566
56	Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	505
57	Alpha-1B-Glykoprotein	Equus Caballus	XP_001495344	53204	6,19	202
	und Dynein	Equus Caballus	XP_001491008	61485	5,51	119
58	Alpha-2-HS-Glykoprotein	Equus Caballus	XP_001499311	38724	5,68	222
59	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	240
60	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	240
61	Albumin	Equus Caballus	ALBU_EQUAS	70490	5,89	179
62	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	297
63	Alpha-2-HS-Glykoprotein	Equus Caballus	XP_001499311	38724	5,68	182
64	Prothrombin	Equus Caballus	XP_001490892	70285	5,56	137
65	Alpha-1-Antitrypsin	Equus Caballus	XP_001495825	47176	5,14	352
66	Alpha-1-Antitrypsin	Equus Caballus	XP_001495825	47176	5,14	340
67	Alpha-1-Antitrypsin	Equus Caballus	XP_001495825	47176	5,14	520
68	Alpha-1-Antitrypsin	Equus Caballus	XP_001495825	47176	5,14	169
69	Vitamin D binding Protein	Equus Caballus	XP_001489400	54327	5,46	457
70	Antithrombin III	Equus Caballus	XP_001497366	52370	6,31	411
71	Antithrombin III	Equus Caballus	XP_001497366	52370	6,31	343
72	Immunglobulin Gamma 1hc	Equus Caballus	XP_001496515	46060	6,10	146
	und Serpin B8	Bos Taurus	SPB8_BOVIN	42772	6,14	85
73	Komplement C3c alpha chain fragment 2	Sus Scrofa	NP_999174	39488	4,79	349
74	Albumin	Equus Caballus	ALBU_EQUAS	70490	5,89	309
75	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	207

Ergebnisse

76	Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	36432	5,95	190
77	Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	36432	5,95	280
78	Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	36432	5,95	353
79	Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	36432	5,95	374
80	Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	36432	5,95	237
81	Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	36432	5,95	282
	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus Caballus	AAS18414	36269	7,70	296
82	und					
	Immunglobulin Gamma 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	295
83	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus Caballus	AAS18414	35721	7,69	190
84	Clusterin	Equus Caballus	CLUS_HORSE	52691	5,77	224
85	Haptoglobin	Canis Familiaris	HPT_CANFA	36457	5,72	486
86	Haptoglobin	Canis Familiaris	HPT_CANFA	36457	5,72	204
87	Haptoglobin	Canis Familiaris	HPT_CANFA	36457	5,72	327
88	Haptoglobin	Canis Familiaris	HPT_CANFA	36457	5,72	442
89	MHC class I Antigen	Equus Caballus	XP_001492443	39862	5,73	287
	Haptoglobin	Canis Familiaris	HPT_CANFA	36457	5,72	160
90	und					
	MHC class I Antigen	Equus Caballus	XP_001492443	39862	5,73	74
91	Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	118
92	Albumin	Equus Asinus	ALBU_EQUAS	70490	5,89	201
93	Albumin	Equus Asinus	ALBU_EQUAS	70490	5,89	380
94	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	327
95	Komplement B/Ba fragment	Equus Caballus	XP_001492602	25982	5,97	120
96	Clusterin	Equus Caballus	CLUS_HORSE	52691	5,77	72
97	Clusterin	Equus Caballus	CLUS_HORSE	52691	5,77	171
98	IGLV3-25 Protein	Equus Caballus	XP_001492872	29005	8,54	118
99	Albumin	Equus Caballus	XP_001075972	68598	6,95	245
100	Komplementfaktor I	Equus Caballus	XP_001502956	66104	7,33	81
101	IGLV3-25 Protein	Equus Caballus	XP_001492872	29005	8,54	109
102	IGLV3-25 Protein	Equus Caballus	XP_001492872	29005	8,54	113
103	Immunglobulin Gamma 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	243
104	Immunglobulin Gamma 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	195
105	Novel LBP / BPI / CETP family N-terminal	Equus Caballus	XP_001500593	65411	5,17	54
106	Immunglobulin J	Canis Familiaris	XP_532398	18120	4,69	274
107	Immunglobulin J	Canis Familiaris	XP_532398	18120	4,69	278
108	Apolipoprotein A-I	Bos Taurus	AAB21444	28432	5,57	170
109	Komplement C3c alpha chain fragment 1	Sus Scrofa	NP_999174	23590	6,89	158
110	Apolipoprotein A-I	Bos Taurus	AAB21444	28432	5,57	268

## Ergebnisse

111	Apolipoprotein A-I	Bos Taurus	AAB21444	28432	5,57	131
112	Apolipoprotein A-I	Bos Taurus	AAB21444	28432	5,57	430
113	IGLV3-25 Protein	Equus Caballus	XP_001492872	29005	8,54	205
114	Immunglobulin Kappa Ic	Equus Caballus	CAA53284	25251	6,08	95
115	Albumin	Equus Asinus	ALBU_EQUAS	70490	5,89	139
	Lambda Immunglobulin	Equus Caballus	AAA50981	22939	6,99	130
116	und					
	Immunglobulin Kappa Ic	Equus Caballus	CAA53284	25251	6,08	118
117	Immunglobulin Kappa Ic	Equus Caballus	CAA53284	25251	6,08	103
118	IGLV3-25 Protein	Equus Caballus	XP_001492872	29005	8,54	287
119	IGLV3-25 Protein	Equus Caballus	XP_001492872	29005	8,54	284
120	Plasma Retinol-Binding Protein	Equus Caballus	RETBP_HORSE	23349	5,28	414
121	Albumin	Equus Asinus	ALBU_EQUAS	70490	5,89	96
122	Albumin	Equus Asinus	ALBU_EQUAS	70490	5,89	193
123	Haptoglobin	Canis Familiaris	HPT_CANFA	36457	5,72	132
124	Transthyretin	Equus Caballus	XP_001495232	15862	5,36	262
125	Transthyretin	Equus Caballus	XP_001495232	15862	5,36	430
126	Hämoglobin subunit beta	Equus Caballus	HBB_HORSE	16055	6,52	561
127	Hämoglobin subunit alpha	Equus Prewalski	HBA_EQUPR	15277	8,74	367
128	Hämoglobin subunit alpha	Equus Prewalski	HBA_EQUPR	15277	8,74	299

**Tab.: 4.1.1.1** Massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifizierte Proteine aus dem Serum eines gesunden Pferdes.

Die hochgestellten Nummern bedeuten:

<sup>a)</sup> Nummer des korrespondierenden Spots in Abb. 4.1.1

<sup>b)</sup> Name des identifizierten Proteins, wie in Swiss-Prot-Datenbank (<http://www.expasy.org>), MSDB-Datenbank (<http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>) oder der NCBI-Datenbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) geführt.

<sup>c)</sup> Spezies, bei der das entsprechende Protein die größte Homologie zum identifizierten Protein aufweist.

<sup>d)</sup> Entry name, wie in Swiss-Prot-Datenbank, MSDB-Datenbank oder in der NCBI Datenbank geführt.

<sup>e)</sup> Theoretisches Molekulargewicht des identifizierten Proteins (Dalton)

<sup>f)</sup> Theoretischer isoelektrischer Punkt des identifizierten Proteins (pI)

<sup>g)</sup> Wahrscheinlichkeitsbasierter MOWSE Score, wie von Mascot gegeben.

Dieser Score ist der negative dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. Die angegebenen Proteine wiesen einen signifikanten Score ( $p < 0,05$ ) auf, wobei Scores größer als 58 signifikant für die Swiss-Prot-Datenbank waren, Scores größer als 67 signifikant für die MSDB-Datenbank und Scores größer als 54 für die Pferdedatenbank signifikant waren.

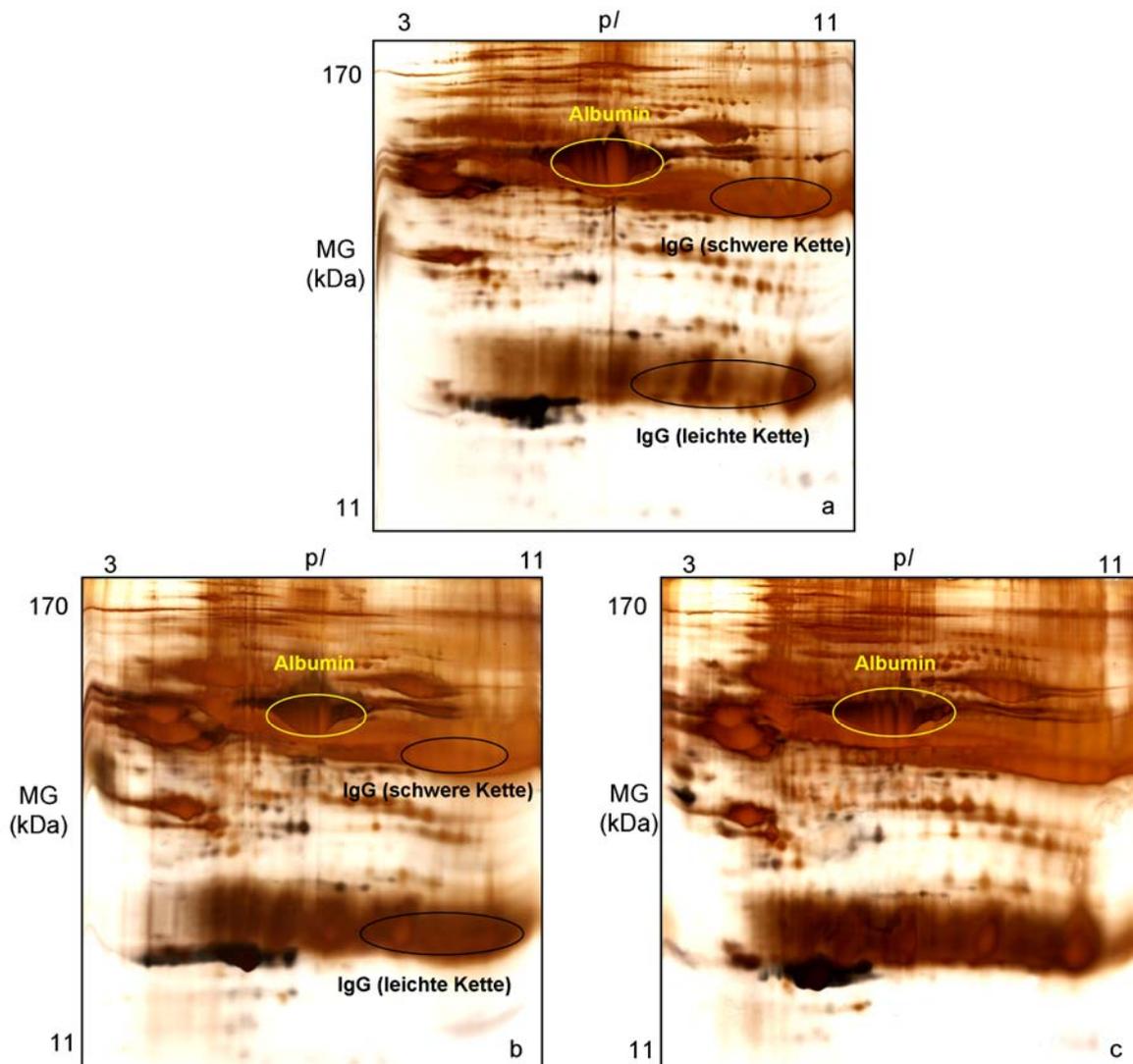
## **4.2 Ermittlung der besten Methode zur Entfernung der abundanten Proteine im Serum**

22 Proteine im Serum machen 99% der Proteinmasse aus (Issaq *et al.* 2007). Zu den in größter Menge vorkommenden Proteinen zählen Albumin und die Immunglobuline. Um eine Detektion der Proteine, die in geringerer Menge im Serum vorkommen mit zweidimensionaler Gelelektrophorese zu ermöglichen, ist eine Entfernung der abundanten Serumproteine notwendig. Mit der Entfernung der abundanten Proteine soll eine Anreicherung der in geringer Konzentration vorkommenden Proteine, die von besonderem Interesse sind, erreicht werden. Zusätzlich darf die Depletionsmethode die Auflösung in der 2D-Gelelektrophorese und die spätere Analyse mit dem Massenspektrometer nicht negativ beeinflussen.

Da es für die Entfernung abundanter Proteine aus dem Pferdeserum kein kommerziell erhältliches Kit gibt, wurden zunächst verschiedene Techniken auf ihre Effektivität und 2D-Kompatibilität überprüft.

### **4.2.1 Vergleich des Albumin- und IgG-Entfernungskits und der Serumdepletion mittels Salzfällung**

Nach der Depletion des Serums mit einem Albumin- und IgG-Entfernungskit und der Entfernung von Albumin mittels Salzfällung und anschließender zweidimensionaler Gelelektrophorese konnte in beiden Fällen keine ausreichende Reduktion der abundanten Serumproteine Albumin und IgG festgestellt werden (Abb. 4.2.1.1 b, c). Zusätzlich war die Auflösung der Spots, besonders im hochmolekularen Bereich der Gele nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese, nicht zufriedenstellend (Abb. 4.2.1.1 b, c).



**Abb 4.2.1.1:** Zweidimensionale Auftrennung der Serumproteine in einem pH-Bereich von 3-11, 12% Polyacrylamidgel, silbergefärbt;

(a) unbehandeltes Vollserum (b) nach der Entfernung von Albumin und IgG mittels Depletionskit (siehe Kap. 3.3.1) (c) nach der Entfernung von Albumin mittels Salzfällung (siehe Kap. 3.3.2)

Bei keiner der beiden Depletionsmethoden ist eine nennenswerte Reduktion der abundanten Proteine wie Albumin und IgG erkennbar. Zusätzlich ist die Auflösung der einzelnen Spots bei beiden Methoden (b, c) nicht ausreichend.

Da beide bisher angewendeten Depletionsmethoden nicht zufriedenstellend waren, wurde eine weitere Methode getestet.

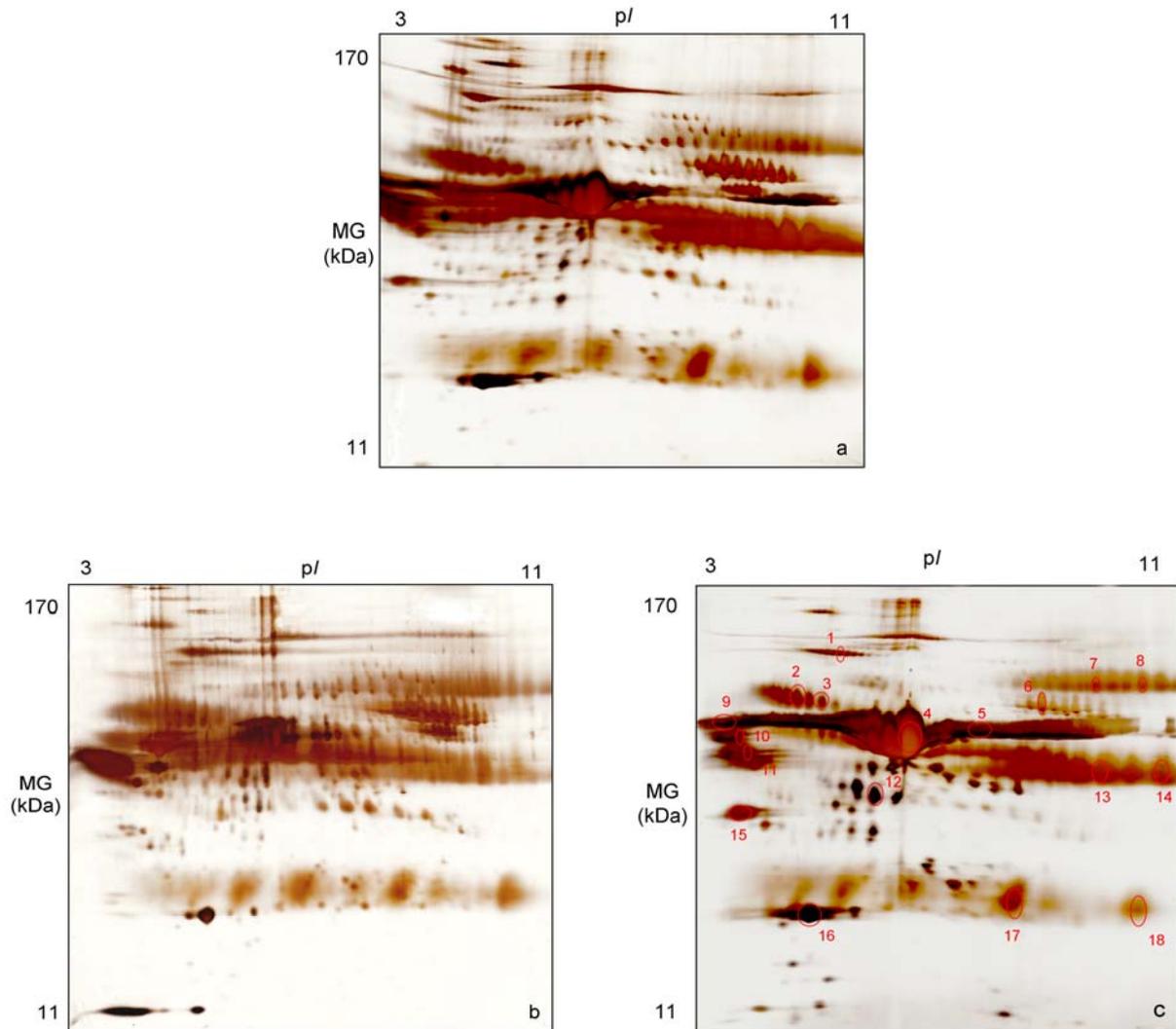
#### **4.2.2 Entfernung abundanter Serumproteine durch polyklonale Antikörper (ProteomeLab IgY-12 Säule)**

Die ProteomeLab IgY-12 Säule wurde dafür konzipiert, die zwölf in größter Menge vorkommenden Serumproteine mit polyklonalen aviären Antikörpern aus humanem Serum, Plasma und Cerebrospinalflüssigkeit bis zu 99% zu entfernen (siehe Kap. 3.3.3).

Insgesamt wurden 30 verschiedene Pferdeseren mit der ProteomeLab IgY-12-Säule depletiert.

Um die Wirksamkeit dieser Depletionsmethode beim Pferdeserum zu überprüfen, wurde von einem Pferd die gleiche Menge Serum (70 µg), depletiertes Serum (70 µg) und das Eluat der Säule (70 µg) zweidimensional aufgetrennt (Abb. 4.2.2.1 a-c).

Nach der Depletion des Pferdeserums konnte eine deutliche Reduktion der hoch abundanten Serumproteine gezeigt werden. Außerdem traten zusätzliche Spots in dem Gel mit depletierten Serum auf (Abb. 4.2.2.1 b), die im Vollserum nicht zu sehen sind. Die mit der ProteomeWeaver 2.2 Software ermittelte Spotzahl für das depletierte Serum (Abb. 4.2.2.1 b) lag mit 1512 Spots deutlich über den 816 ermittelten Spots für das Vollserumgel (Abb. 4.2.2.1 a). Zusätzlich war die Auflösung der depletierten Serumprobe mit zweidimensionaler Gelelektrophorese nach der Depletion zufriedenstellend (Abb. 4.2.2.1 b). Die von der Säule gebundenen Proteine wurden zur Überprüfung zweidimensional aufgetrennt (Abb. 4.2.2.1 c). Insgesamt wurden acht verschiedene Proteine in dem Eluat der Säule massenspektrometrisch identifiziert (Tab. 4.2.2.1.1). Die Proteinidentifikationen Albumin, Immunglobulin G 7 hc, Immunglobulin M hc, Serotransferrin, Apolipoprotein A-I, Haptoglobin, Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-2-Makroglobulin des Eluats entsprechen den abundanten Serumproteinen, die mit der Säule aus dem Serum entfernt werden sollen.



**Abb. 4.2.2.1:** Zweidimensionale Auftrennung von Vollserum, depletiertem Serum und Eluat in einem pH-Bereich von 3-11, 9-15% Gradientengele mit anschließender Silberfärbung. (a) unbehandeltes Serum; (b) depletiertes Serum mittels der ProteomeLab IgY-12-Säule; (c) Eluat, d.h. Proteine, die mit der ProteomeLab IgY-12 Säule gebunden und damit aus dem Serum entfernt wurden.

Bei dem depletierten Serum (b) ist eine deutliche Reduktion der hoch abundanten Proteine zu erkennen. Außerdem treten vor der Depletion noch nicht vorhandene Spots auf. Die nummerierten Spots in dem Eluat der Säule (c) konnten massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Proteinidentifikationen entsprechen den hoch abundanten Serumproteinen, die mittels der Säule aus dem Serum entfernt werden sollen. Die korrespondierenden Proteinidentifikationen sind in der Tabelle 4.2.2.1.1 unter der jeweiligen Nummer aufgeführt.

#### 4.2.2.1 Proteinidentifikationen aus dem Eluat der Serumdepletionssäule ProteomeLab IgY-12

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Accession Nummer <sup>d</sup>	Theoretical		Protein-score <sup>g</sup>
				MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
1	Alpha-2-Makroglobulin family N terminal region	Equus Caballus	XP_001499173	164888	6,21	156
2	Immunglobulin Mu hc	Equus caballus	AAU09792	50091	5,52	204
3	Immunglobulin Mu hc	Equus caballus	AAU09792	50091	5,52	122
4	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	400
5	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	519
6	Serotransferrin	Equus Caballus	TREF_HORSE	80268	6,83	497
7	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus caballus	AAS_18414	36269	7,70	113
8	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus caballus	AAS_18414	36269	7,70	77
9	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	386
10	Alpha-1-Antitrypsin	Equus Caballus	A1AT2_HORSE	47141	5,23	208
11	Alpha-1-Antitrypsin	Equus Caballus	A1AT2_HORSE	47141	5,23	191
12	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	404
13	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus caballus	AAS_18414	36269	7,70	153
14	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus caballus	AAS_18414	36269	7,70	134
15	Haptoglobin	Canis Familiaris	HPT_CANFA	36457	5,72	188
16	Apolipoprotein A-I	Bos Taurus	AAB21444	28432	5,57	419
17	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	145
18	Lambda Immunglobulin	Equus caballus	AAA50978	17651	8,35	78

**Tab. 4.2.2.1.1:** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus dem Eluat der ProteomeLab IgY-12 Serumdepletionssäule. Die hochgestellten Nummern bedeuten:

<sup>a</sup>) Nummer des korrespondierenden Spots in Abb. 4.2.2.1 c

<sup>b</sup>) Name des identifizierten Proteins, wie in Swiss-Prot-Datenbank (<http://www.expasy.org>), MSDB-Datenbank (<http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>) oder der NCBI-Datenbank

(<http://ncbi.nlm.nih.gov>) geführt. <sup>c</sup>) Spezies, bei der das entsprechende Protein die größte Homologie

zum identifizierten Protein aufweist. <sup>d</sup>) Entry name, wie in Swiss-Prot-Datenbank, MSDB-Datenbank

oder in der NCBI Datenbank geführt. <sup>e</sup>) Theoretisches Molekulargewicht des identifizierten Proteins

(Dalton) <sup>f</sup>) Theoretischer isoelektrischer Punkt des identifizierten Proteins (pI)

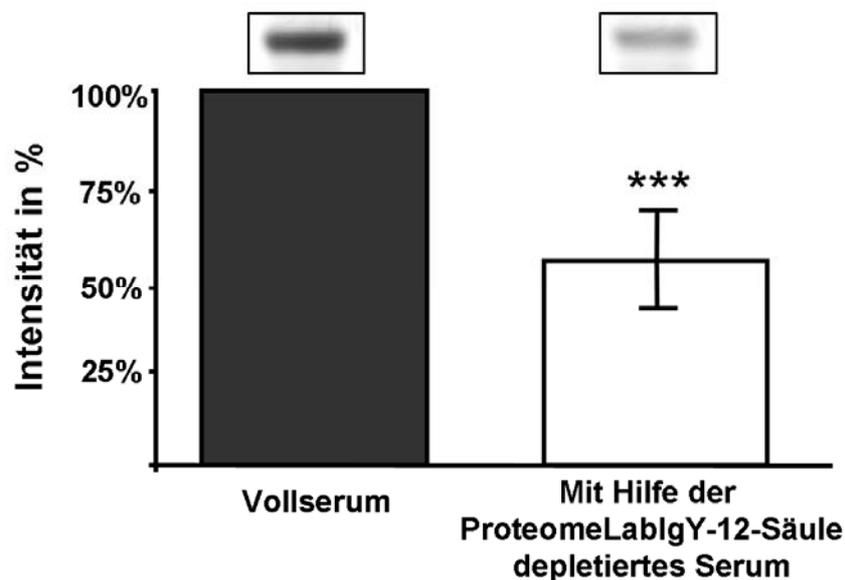
<sup>g</sup>) Wahrscheinlichkeitsbasierter MOWSE Score, wie von Mascot gegeben.

Dieser Score ist der negative dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. Die angegebenen Proteine wiesen einen signifikanten Score ( $p < 0,05$ ) auf, wobei Scores größer als 58 signifikant für die Swiss-Prot-Datenbank waren, Scores größer als 67 signifikant für die MSDB-Datenbank und Scores größer als 54 für die Pferdedatenbank signifikant waren.

#### 4.2.2.2 Validierung der Entfernungseffizienz von Albumin

Zur Beurteilung der Effizienz der Serumdepletion mit der ProteomeLab IgY-12-Säule wurde von den fünfzehn verschiedenen Pferden jeweils Vollserum und depletiertes Serum in zehnpromzentigen SDS-Gelen eindimensional aufgetrennt, mit kolloidalem Coomassie gefärbt und mit einem Farbscanner eingescannt. Zur quantitativen Analyse der Banden wurde der Schwärzungsgrad der Banden mit der LabScan 5.0 Software ausgewertet. Albumin wurde, da es in größter Menge im Serum vorkommt, zur Quantifizierung ausgewählt. In die Validierung wurden jeweils alle fünf in dem folgenden 2D-DIGE Experiment 2 verwendeten Vollseren der an ERU erkrankten Pferde sowie der Kontrollen und von allen Proben die entsprechenden depletierten Proben miteinbezogen.

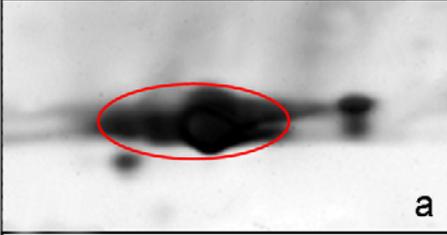
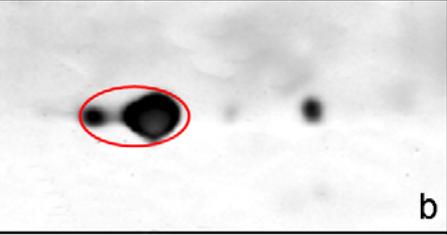
Als Bezugsgröße dienten die Intensitäten der Albuminbanden der Vollseren die gleich 100 % gesetzt wurden. Die Intensitäten der Albuminbanden der depletierten Proben wurde dazu in Relation gesetzt ( $\pm$  Standardabweichung). Es konnte eine Reduktion des Albumins in den depletierten Serumproben im Mittel von 45 % festgestellt werden (\*\*\*) Signifikanz  $p < 0,001$ ).



**Abb.4.2.2.2.1:** Quantifizierung von Albumin in Vollserum und depletiertem Serum (ProteomeLab IgY-12-Säule) nach eindimensionaler Gelelektrophorese. In den Bildausschnitten über den Säulen sind repräsentative Albuminbanden gekennzeichnet, die densitrometrisch ausgewertet wurden. Die Albuminmenge der Vollseren wurde als 100 % gesetzt und die Albuminmenge der depletierten Seren wurde in Relation dazu gesetzt. Es konnte eine Albuminreduktion von 45 % in den depletierten Seren festgestellt werden. Die Sterne geben die Signifikanz der Abweichung an (\*\*\*)  $p < 0,001$

#### 4.2.2.3 Bestimmung der Reduktion des Proteins Apolipoprotein A-I

Zur weiteren Überprüfung der Serumdepletion durch die ProteomeLab IgY-12-Säule wurde die Reduktion von Apolipoprotein A-I (Spot 16 in Abb. 4.2.2.1 c) exemplarisch an einem Kontrollserum überprüft. Vollserum und depletiertes Serum wurden auf zwei verschiedenen Gelen zweidimensional aufgetrennt, silbergefärbt und eingescannt. Mittels der ProteomeWeaver 2.2 Software wurde eine Spotdetektion und Intensitätsbestimmung der einzelnen Spots der Gele durchgeführt. Bei dem Vergleich der Intensitäten von Apolipoprotein A-I im Vollserum zu dem depletierten Serum konnte eine Reduktion von Apolipoprotein A-I im depletierten Serum von 53% festgestellt werden.

Vollserum	Depletiertes Serum
 a	 b
Intensität 21.413851	Intensität 10.120478

**Abb.4.2.2.3.1:** Intensitätsbestimmung von dem massenspektrometrisch identifizierten Spot Apolipoprotein A-I (siehe Spot Nr.16 Abb. 4.2.2.1 c) mit der ProteomeWeaver 2.2 Software in zwei verschiedenen 2D Gelen. Die Menge von Apolipoprotein A-I konnte durch die ProteomeLab IgY-12-Depletionssäule auf 47% reduziert werden.

(a) Spotintensität von Apolipoprotein A-I im Vollserum;

(b) Spotintensität von Apolipoprotein A-I im depletierten Serum (ProteomeLab IgY-12-Säule)

#### **4.3 Vergleich der Vollseren an ERU erkrankter Pferde mit augengesunden Kontrollseren mittels 2D-DIGE Technologie (2D-DIGE Experiment 1)**

Um die Seren der an ERU erkrankten Pferde mit den Kontrollseren zu vergleichen, wurde die 2-D Difference-Gel-Elektrophoresis (2D-DIGE)-Technologie gewählt (siehe Kap. 3.8). Die sehr sensitive 2D-DIGE Technologie erlaubt es komplexe Proteinproben miteinander zu vergleichen und differenziell exprimierte Proteine in den Proben zu quantifizieren.

Die Serumproteine wurden nach dem ‚Minimallabelling-Prinzip‘ mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Farbstoffen (CyDyes<sup>68</sup>), die an die  $\epsilon$ -Aminoreste der Lysine binden, markiert und anschließend mittels klassischer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Es stehen drei verschiedene Farbstoffe zur Verfügung (Cy2/Cy3/Cy5). Jeweils identische Proteinmengen der Seren der ERU-Patienten und der Kontrollen wurden mit Cy3 oder Cy5 entsprechend dem Schema in Tab. 3.8.3.1 und Tab. 3.8.3.2 markiert. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 wurden unter den zu untersuchenden Gruppen ausgetauscht, um eine einseitige Markierungseffizienz der Proben durch einen Farbstoff auszuschließen. Der dritte Farbstoff Cy2 wurde für den internen Standard gewählt. Im internen Standard sind alle im Experiment vorkommenden Proben zu gleichen Teilen vertreten.

Nach der Markierungsreaktion wurden jeweils drei Proben, nämlich jeweils ein ERU-Serum, ein Kontrollserum und ein interner Standard vereinigt, auf IPG-Steifen 3-11 NL rehydratisiert und in der ersten und zweiten Dimension aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele mit Hilfe des Laser-Fluoreszenz Scanner Typhoon Trio<sup>69</sup> in den entsprechenden Wellenlängen der CyDye Fluorochrome eingescannt. Die Gele wurden mit Hilfe der ImageQuant TL Software visualisiert (Abb. 4.3.1.1). Pro Gel entstanden drei Gelbilder, entsprechend der drei verschiedenen Farbstoffe. Um das Proteinmuster der Gele sichtbar zu machen, wurden die Gele nach dem Scannen silbergefärbt (Abb. 4.3.1.2).

---

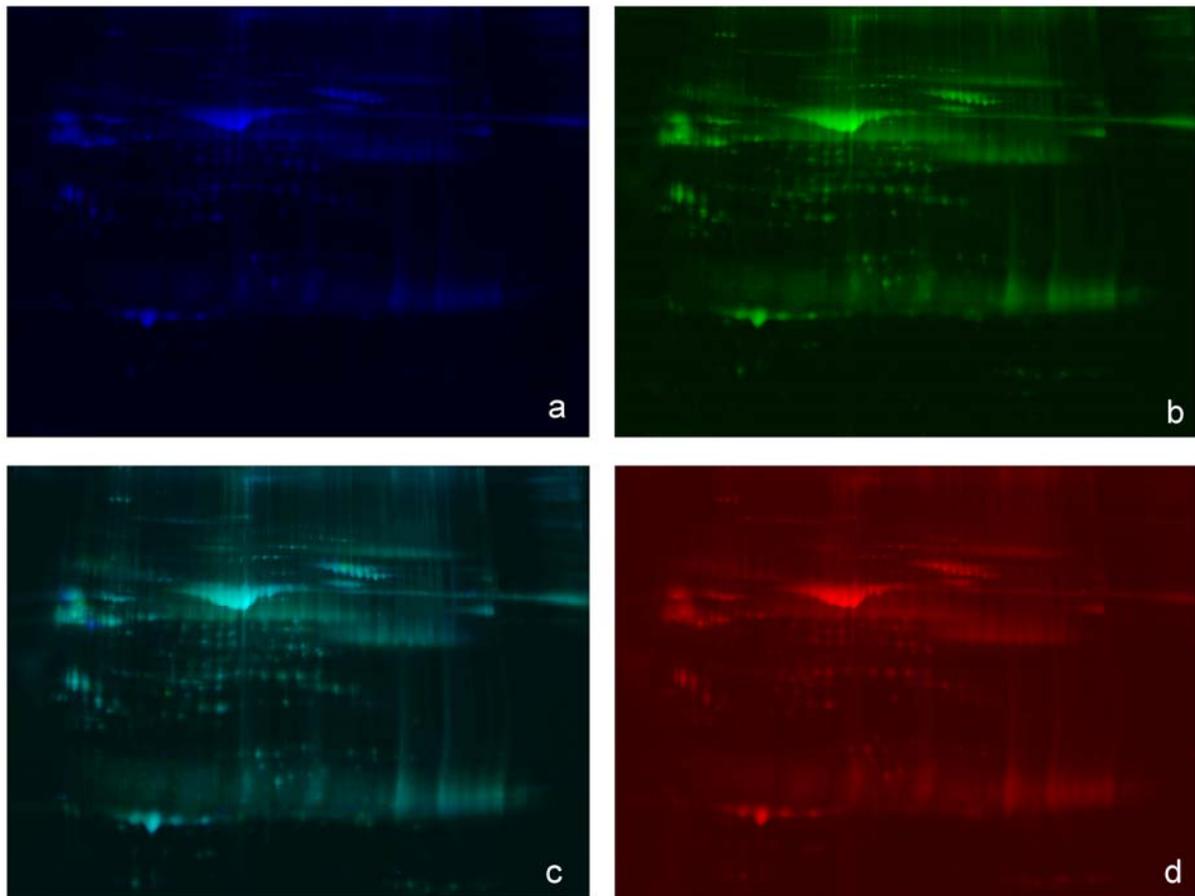
<sup>68</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>69</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

#### **4.3.1 Darstellung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Vollserumgele**

Nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden die Gele mit dem Typhoon Trio Scanner gescannt. Jeder Farbstoff wurde bei einer bestimmten Wellenlänge gescannt und anschließend mit der ImageQuant TL Software visualisiert.

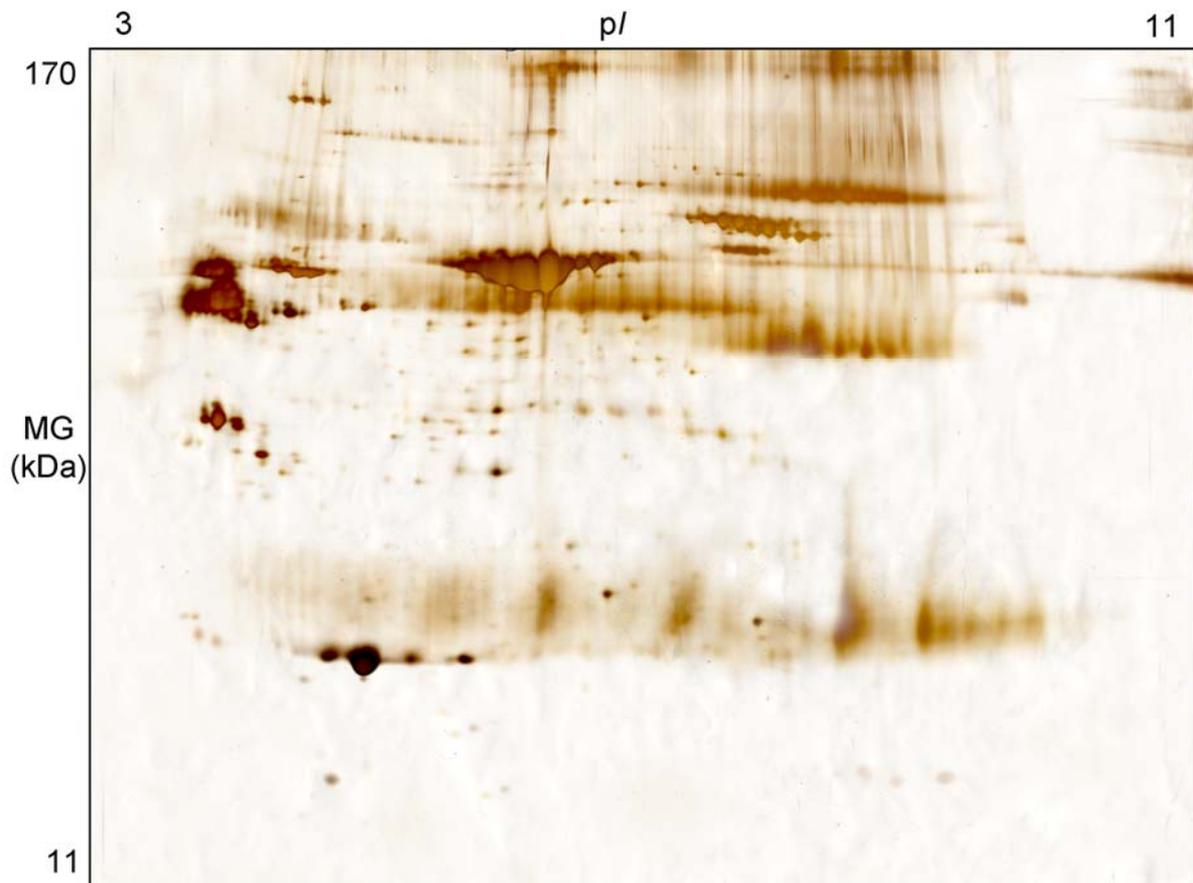
Die Auflösung der Proteine der drei verschiedenen Proben auf dem Gel war gut und das Verteilungsmuster gleichmäßig. Das Kontrollserum mit Cy3 markiert erscheint blau fluoreszierend (Abb. 4.3.1.1 a), das ERU-Serum mit Cy5 markiert grün (Abb. 4.3.1.1 b) und der interne Standard mit Cy2 markiert rot (Abb. 4.3.1.1 d). In dem Überlagerungsbild (Abb. 4.3.1.1 c) des ERU-Serums und des Kontrollserums erscheinen gleich exprimierte Proteine türkis, blau erscheinende Proteine sind im Kontrollserum höher exprimiert, grün erscheinende Proteine im ERU-Serum. Die meisten Proteine überlagerten sich, wobei im sauren, hochmolekularen Bereich (linker oberer Quadrant) einige Spots des Kontrollserums (blau) deutlich hervortreten. Das heißt, dass diese Spots im Kontrollserum höher exprimiert sind. Im basischen, hochmolekularen Bereich (rechter oberer Quadrant) tritt eine Kette grüner Spots (ERU-Serum) auf. Das heißt, dass diese Proteine im ERU-Serum höher exprimiert sind.



**Abb. 4.3.1.1:** Beispielgel aus dem 2D-DIGE Experiment 1. Dargestellt ist ein mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes Gel in den verschiedenen Farbkanälen zum Vergleich der uveitischen Vollseren mit den Kontrollseren. Die Gele wurden nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit dem Typhoon Trio Scanner eingescannt und der ImageQuant TL Software visualisiert.

(a) Kontrollserum (blau) mit dem Farbstoff Cy3 markiert und bei einer Wellenlänge von 532 nm gescannt. (b) Serum eines ERU-Patienten (grün) mit dem Farbstoff Cy5 markiert und bei einer Wellenlänge von 633 nm gescannt. (c) Überlagerungsbild des ERU-Patientenserums (Cy5) und des Kontrollserums (Cy3). Türkis erscheinende Proteine sind in beiden Seren gleich exprimiert. Grün erscheinende Proteine sind im ERU-Serum höher exprimiert, blaue im Kontrollserum. Die meisten Spots überlagern sich. Im sauren, hochmolekularen Bereich (linker oberer Quadrant) treten deutlich ein paar blaue (Kontrollserum) Spots auf, d.h., dass diese Spots im Kontrollserum höher exprimiert sind. Im basischen, hochmolekularen Bereich (rechter oberer Quadrant) tritt eine Kette grüner Spots (ERU-Serum) hervor. (d) Der interne Standard (rot) mit dem Farbstoff Cy2 markiert und bei einer Wellenlänge von 488 nm gescannt.

Nach dem Scannen wurden die Gele silbergefärbt, um das Proteinmuster sichtbar zu machen. Die Auflösung der Proteine war gut und das Verteilungsmuster gleichmäßig. Das silbergefärbte Gel diente als Grundlage zur Identifizierung der differenziell exprimierten Proteine, die mit der DeCyder Auswertung ermittelt werden.



**Abb. 4.3.1.2:** Repräsentatives silbergefärbtes 2D-DIGE Gel mit Vollserum. In diesem Gel wurde das Serum eines an ERU erkrankten Pferdes (50 µg), eines augengesunden Kontrolltieres (50 µg) und der interne Standard (50 µg) mit drei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2/Cy3/Cy5) markiert. Alle drei unterschiedlich markierten Proben wurden nach der Markierungsreaktion zusammengefasst und gemeinsam zweidimensional aufgetrennt, eingescannt und anschließend silbergefärbt. Die Auflösung der Proteine ist gut und das Verteilungsmuster gleichmäßig.

### 4.3.2 Ermittlung differenziell exprimierter Proteine im Vollserum von an ERU erkrankten Pferden

Die 2D-DIGE Gele wurden mit der DeCyder Software Version 6.5 ausgewertet. Insgesamt wurden fünf Gele für die Auswertung ausgewählt (Tab. 4.3.2.1). In dem DIA (Difference in Gel Analysis)-Modul wurde zunächst jedes Gel einzeln bearbeitet. Nach der Detektion der Spots in dem DIA-Modul wurden die Gele in das BVA (Biological Variation Analysis)-Modul importiert. In den verwendeten Vollserumgelen wurden 2038-2468 Spots detektiert (Tab. 4.3.2.1 Spalte 3). Das Gel mit den meisten detektierten Spots, 2468, wurde als Mastergel (Gel E) gesetzt und dient als Grundlage für den Vergleich mit allen weiteren Gelen dieses Experiments. Alle Spots in allen Gelen wurden mit dem Mastergel abgeglichen. In den Gelen A-D konnten 1283-1341 Spots detektiert werden, die auch im Mastergel vorkommen (Tab. 4.3.2.1 Spalte 4). Diese Spots werden im folgenden gepaarte Spots genannt.

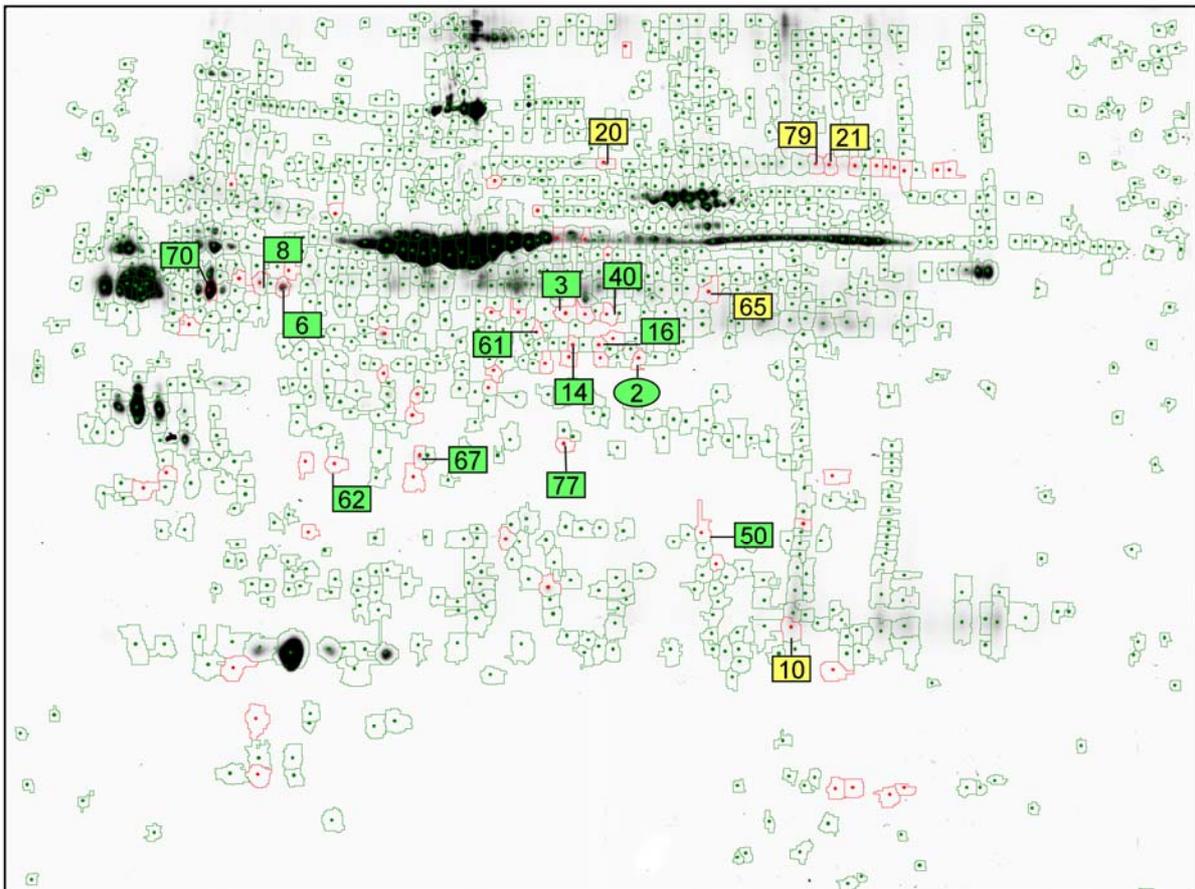
Gel	Seren	Spotanzahl	gepaarte Spots
A	Dominum (ERU) / Kristall (K) / interner Standard	2226	1296
B	Lap Top 3 (ERU) / Lord (K) / interner Standard	2358	1312
C	Perina (ERU) / Fire Lady(K) / interner Standard	2426	1341
D	Santana (ERU) / Calypso (K) / interner Standard	2038	1283
E (M)	R.Löwenherz (ERU) / GranCoeur (K) / interner Standard	2468	2468

**Tab. 4.3.2.1:** Aufteilung der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Vollseren in den verschiedenen Gelen, die mit der Decydersoftware ermittelte Spotanzahl (Spalte 3) für jedes Gel und die in jedem Gel gepaarte Spotzahl (Spalte 4) zum Mastergel (M).

Für die statistische Auswertung wurde der Student's *t*-Test verwendet.

Insgesamt wurden 83 differenziell exprimierte Spots (Student's *t*-Test  $p < 0,05$ ) gefunden. Alle differenziell exprimierten Spots sind in der Tabelle 4.3.2.3 aufgeführt und rot auf der Übersichtskarte (Abb. 4.3.2.2) hervorgehoben. 27 dieser Spots sind bei den ERU Seren höher im Vergleich zu den Kontrollseren exprimiert. 56 Spots sind in den ERU-Seren im Vergleich zu den Kontrollen niedriger exprimiert. Alle 83 (56+27) differenziell exprimierten Spots wurden aus den silbergefärbten Gelen ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Von den analysierten Kandidatenspots konnten 17 Spots mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF)

identifiziert werden (Tab. 4.3.2.1.2). Die identifizierten Spots sind in der Übersichtskarte (Abb. 4.3.2.2) mit den entsprechenden Spotnummern aus der Tabelle 4.3.2.3 gekennzeichnet. Gelb gekennzeichnete Spots sind in den ERU-Seren höher exprimiert, grün gekennzeichnete Nummern sind in den ERU-Seren niedriger exprimiert. Die mit dem Kreis gekennzeichnete Nummer ist exemplarisch eingezeichnet für einen Spot der als differenziell exprimiert ermittelt wurde, aber noch nicht eindeutig massenspektrometrisch identifiziert werden konnte.



**Abb. 4.3.2.2:** Eine mittels der DeCyder BVA Software erstellte Übersichtskarte von zweidimensional aufgetrenntem, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiertem Vollserum.

Die rot markierten Spots zeigen statistisch signifikante Unterschiede (Student's  $t$ -Test  $p \leq 0,05$ ) in der Expression. Insgesamt wurden 83 differenziell regulierte Spots gefunden (Tab. 4.3.2.3). 27 Spots waren bei den ERU-Seren höher exprimiert als bei den Kontrollseren, 56 Spots waren bei den ERU-Seren niedriger exprimiert. Die nummerierten Spots konnten massenspektrometrisch identifiziert werden (Abb. 4.3.2.1.1 und Tab. 4.3.2.1.2).

Gelb nummerierte Spots sind in den ERU-Seren höher exprimiert; grün nummerierte Spots sind bei den ERU-Seren im Vergleich zu den Kontrollseren niedriger exprimiert. Die mit dem Kreis gekennzeichnete Nummer ist exemplarisch dargestellt für einen Spot, der als differenziell exprimiert ermittelt wurde, aber noch nicht identifiziert werden konnte.

Ergebnisse

Spot ID	Vorkommen in den Gelen	Expression bei ERU	Identifikation	Average ratio	Student's t-Test
1	12 (15)	↓	nicht signifikant	1,98	0,00065
2	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,34	0,00070
<b>3</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Kininogen-1</b>	<b>3,27</b>	<b>0,00093</b>
4	15 (15)	↓	nicht signifikant	2,23	0,0013
5	15 (15)	↓	nicht signifikant	3,13	0,0013
<b>6</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Antithrombin III</b>	<b>1,46</b>	<b>0,0014</b>
7	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,44	0,0015
<b>8</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Antithrombin III</b>	<b>1,45</b>	<b>0,0021</b>
9	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,37	0,0023
<b>10</b>	<b>15 (15)</b>	↑	<b>IGLV3-25</b>	<b>-1,28</b>	<b>0,0036</b>
11	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,46	0,0042
12	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,85	0,0045
13	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,77	0,0050
<b>14</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Albumin</b>	<b>1,25</b>	<b>0,0056</b>
15	12 (15)	↑	nicht signifikant	-1,41	0,0064
<b>16</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Albumin</b>	<b>1,29</b>	<b>0,0070</b>
17	12 (15)	↓	nicht signifikant	2,97	0,0074
18	9 (15)	↑	nicht signifikant	-1,23	0,0077
19	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,89	0,0089
<b>20</b>	<b>15 (15)</b>	↑	<b>Immunglobulin Gamma 7 hc</b>	<b>-1,28</b>	<b>0,010</b>
<b>21</b>	<b>15 (15)</b>	↑	<b>Immunglobulin Gamma 4 hc</b>	<b>-1,64</b>	<b>0,010</b>
22	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,28	0,010
23	12 (15)	↑	nicht signifikant	-1,37	0,012
24	15(15)	↓	nicht signifikant	1,28	0,012
25	9 (15)	↓	nicht signifikant	2,43	0,012
26	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,37	0,013
27	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,33	0,013
28	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,79	0,014
29	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,39	0,014
30	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,42	0,014
31	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,48	0,014
32	12 (15)	↑	nicht signifikant	-1,65	0,015
33	12 (15)	↓	nicht signifikant	1,38	0,015
34	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,39	0,016
35	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,20	0,017
36	15 (15)	↓	nicht signifikant	2,17	0,017
37	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,79	0,019
38	12 (15)	↓	nicht signifikant	1,39	0,019

Ergebnisse

39	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,30	0,019
<b>40</b>	<b>12 (15)</b>	↓	<b>Kininogen-1</b>	<b>2,05</b>	<b>0,019</b>
41	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,66	0,019
42	12 (15)	↑	nicht signifikant	-1,34	0,019
43	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,86	0,020
44	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,60	0,021
45	12 (15)	↑	nicht signifikant	-1,60	0,021
46	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,72	0,022
47	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,26	0,022
48	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,72	0,023
49	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,77	0,024
<b>50</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Komplement C4 gamma chain</b>	<b>1,54</b>	<b>0,024</b>
51	15 (15)	↓	nicht signifikant	2,34	0,024
52	12 (15)	↓	nicht signifikant	1,22	0,025
53	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,28	0,025
54	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,54	0,027
55	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,35	0,028
56	12 (15)	↑	nicht signifikant	-1,35	0,030
57	12 (15)	↓	nicht signifikant	1,92	0,032
58	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,48	0,033
59	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,22	0,034
60	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,78	0,034
<b>61</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Pigment epithelium-derived faktor</b>	<b>1,22</b>	<b>0,035</b>
<b>62</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Albumin</b>	<b>1,22</b>	<b>0,036</b>
63	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,29	0,037
64	12 (15)	↑	nicht signifikant	-1,18	0,038
<b>65</b>	<b>15 (15)</b>	↑	<b>Immunglobulin Gamma 7 hc</b>	<b>-1,45</b>	<b>0,038</b>
66	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,35	0,038
<b>67</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Albumin</b>	<b>1,32</b>	<b>0,038</b>
68	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,38	0,038
69	9 (15)	↑	nicht signifikant	1,24	0,040
<b>70</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Vitamin D binding protein</b>	<b>1,36</b>	<b>0,040</b>
71	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,86	0,041
72	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,64	0,042
73	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,80	0,042
74	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,21	0,042
75	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,55	0,045
76	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,51	0,046
<b>77</b>	<b>15 (15)</b>	↓	<b>Komplementfaktor I</b>	<b>1,37</b>	<b>0,046</b>
78	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,91	0,047

<b>79</b>	<b>15 (15)</b>	↑	<b>Immunglobulin Gamma 4 hc</b>	<b>-1,52</b>	<b>0,048</b>
80	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,41	0,049
81	15 (15)	↓	nicht signifikant	2,09	0,049
82	12 (15)	↓	nicht signifikant	1,59	0,050
83	12 (15)	↑	nicht signifikant	-1,33	0,050

**Tab. 4.3.2.3:** Tabellarische Übersicht aller 83 differenziell exprimierten Spots im Vollserum, die mit der DeCyder Software ermittelten wurden, entsprechend nach dem besten Student's *t*-Test aufgeführt. Die Spot IDs (Spalte 1) korrespondieren zu den eingezeichneten Spotnummern in der Übersichtskarte (Abb. 4.4.2.2). In Spalte 2 wird angegeben, in wie vielen der insgesamt 15 Gele der entsprechende Spot zu finden war. In Spalte 3 ist angegeben, ob die Expression des Proteins im ERU-Serum im Vergleich zum Kontrollserum erhöht oder erniedrigt war. In Spalte 4 sind die mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) ermittelten Identifikationen angegeben, soweit vorhanden. In Spalte 5 ist die differenzielle Expression des Spots als Volumenverhältnis gesund/ERU (average ratio) ausgedrückt. Für den Vergleich der ERU-Seren mit den Kontrollseren wurde für statistische Auswertung der Student's *t*-Test (Signifikanz  $p < 0,05$ ) verwendet (Spalte 6).

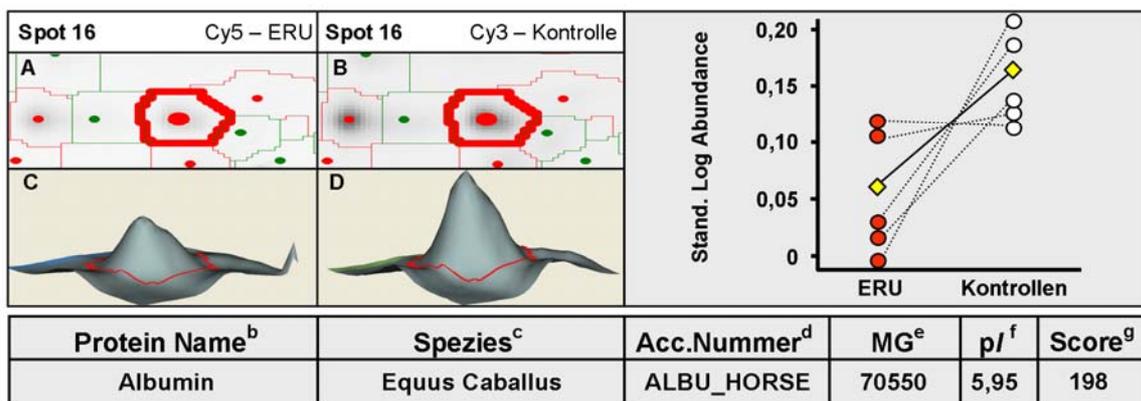
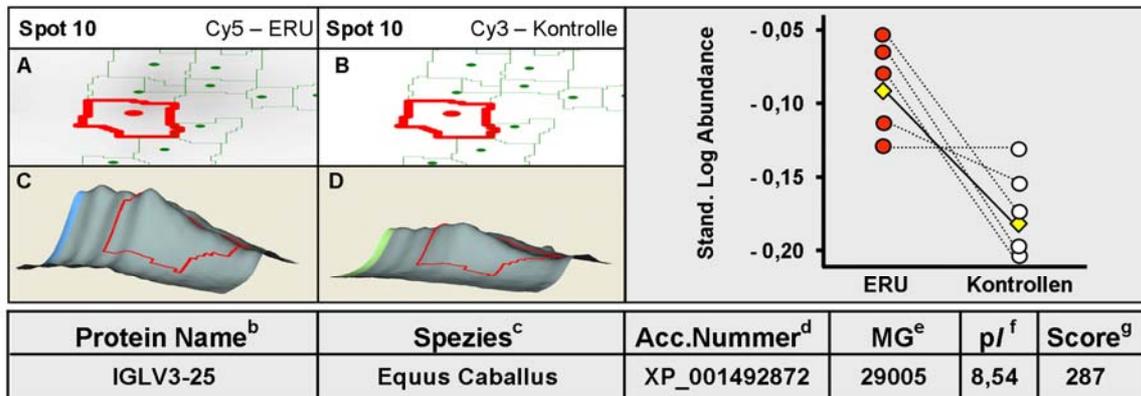
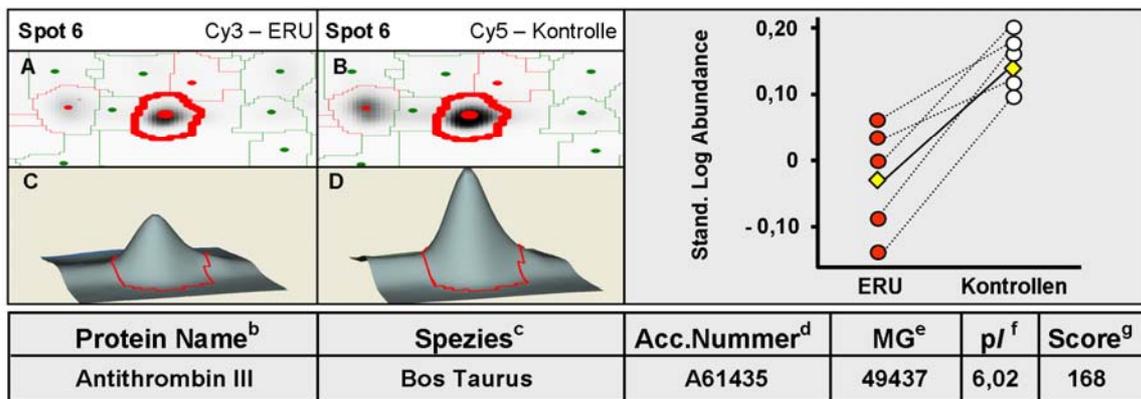
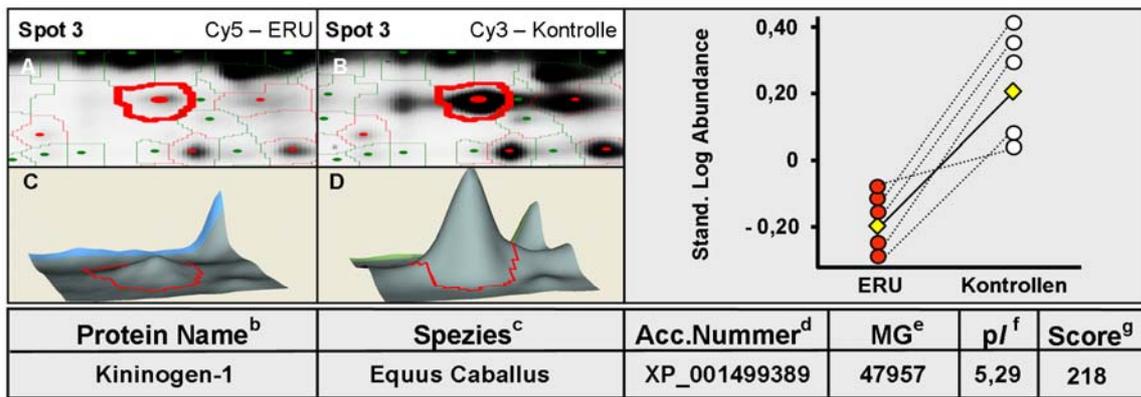
#### **4.3.2.1 Differenziell exprimierte und identifizierte Proteine im Vollserum**

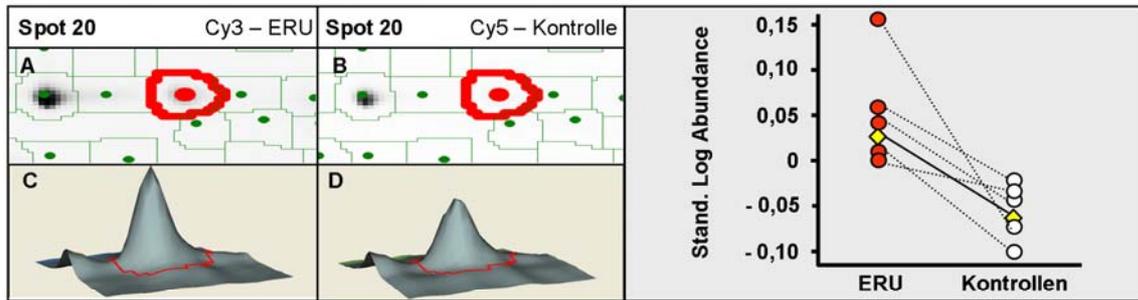
Anhand der vergleichenden Proteomanalyse mit der 2D-DIGE Minimal Labelling Technologie (Lilley and Friedman 2004) von Vollserum gesunder Kontrollpferde und an ERU erkrankter Pferde konnten 17 differenziell exprimierte Spots detektiert, quantifiziert und massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifiziert werden (Abb. 4.3.2.1.1 und Tab. 4.3.2.1.2). Es wurden jeweils fünf verschiedene Vollseren in die Auswertung miteinbezogen. Die Proben wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, zweidimensional aufgetrennt, eingescannt und anschließend silbergefärbt. Unterschiedlich exprimierte Kandidaten wurden auf den eingescannten Gelen mit der DeCyder Software quantitativ erfasst. Für den Vergleich der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteine der ERU-Seren mit den Kontrollseren wurde der Student's *t*-Test angewendet (Signifikanz  $p < 0,05$ ). In der Grafik der Abbildung 4.3.2.1.1 wurde eine Übersicht des Expressions- und des Verteilungsmusters des entsprechenden identifizierten Spots in allen Gelen dargestellt. Das Expressionsmuster der verschiedenen Spots in den verschiedenen Gelen war sehr einheitlich.

Die 17 massenspektrometrisch identifizierten Spots repräsentieren zehn verschiedene Proteine (Tab. 4.3.2.1.2).

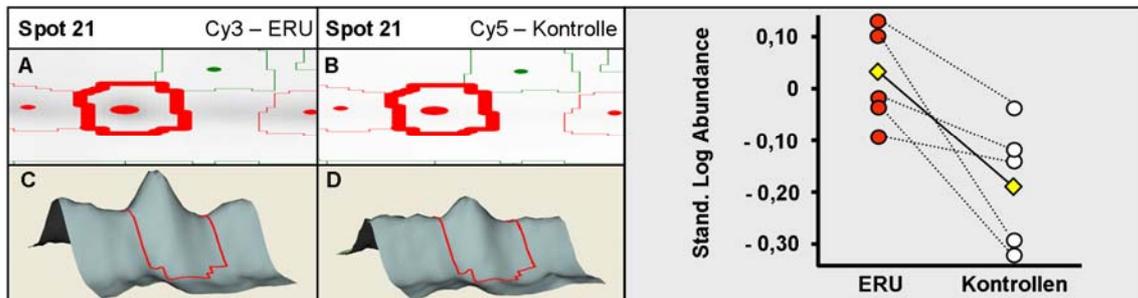
Drei verschiedene Proteine, IgG 7 hc (Spot 20 und 65), IgG 4 hc (Spot 21 und 79) und IGLV3-25 (Spot 10), repräsentiert durch fünf Spots, waren in den ERU-Seren höher exprimiert. Dagegen wurden sieben Proteine identifiziert, die in den ERU-Seren geringer exprimiert waren. Dazu gehören Albumin (Spots 14, 16, 62, 67), Antithrombin III (Spot 6 und 8), Kininogen-1 (Spot 3 und 40), Komplement C4 (Spot 50), Komplementfaktor I (Spot 77), Vitamin D bindendes Protein (Spot 70) und Pigment epithelium-derived factor (PEDF) (Spot 61).

Da jedoch von insgesamt 66 Spots die Proteine nicht identifiziert werden konnten wurde Spotnummer 2 exemplarisch für die differenziell exprimierten Spots aufgeführt, die detektiert, aber massenspektrometrisch noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten.

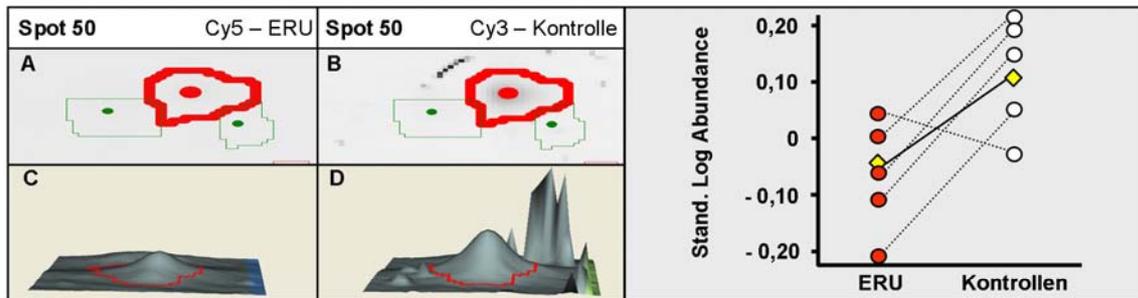




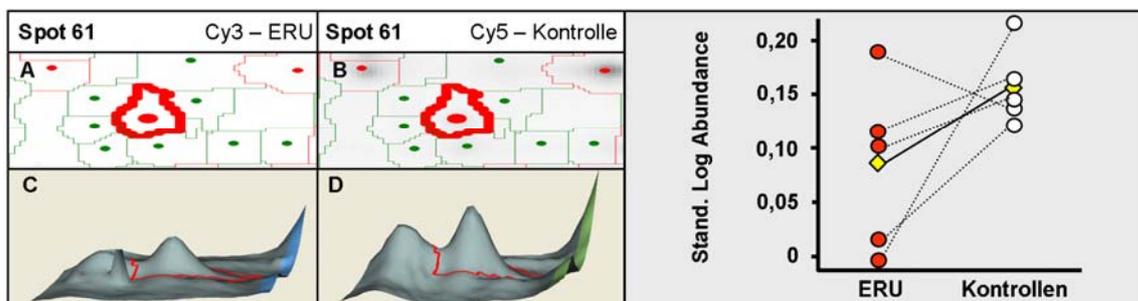
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Immunglobulin $\gamma$ 7 hc	Equus Caballus	AAS18414	35721	7,69	49*



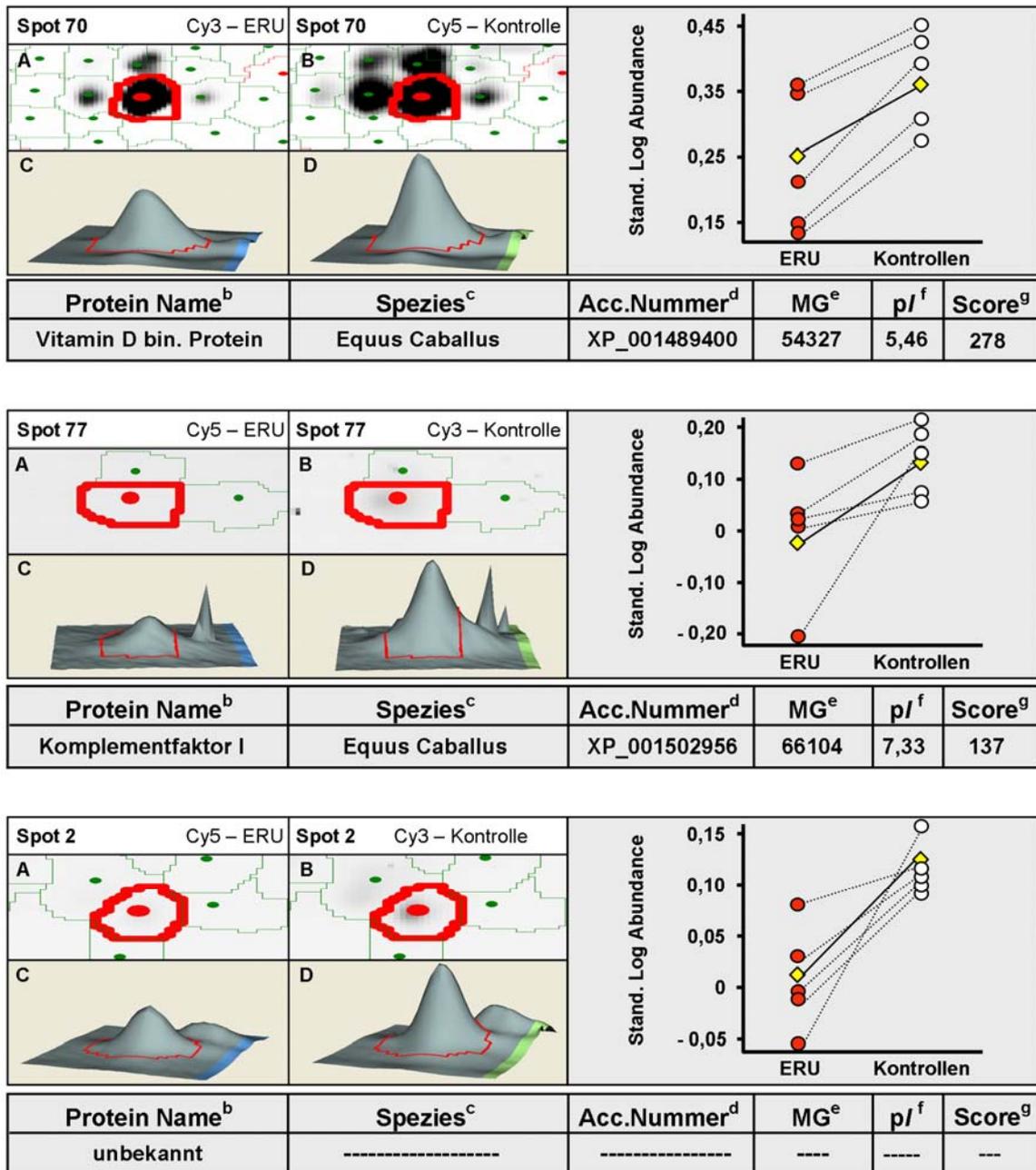
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Immunglobulin $\gamma$ 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	66*



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Komplement C4	Equus Caballus	XP_001492943	32856	6,68	95



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
PEDF	Homo Sapiens	PEDF_HUMAN	46342	5,97	142



**Abb. 4.3.2.1.1:** DeCyder Auswertung. Exemplarische Darstellung der differenziell exprimierten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifizierten (außer Spot 2) Proteine im Serum. (A, B) Zweidimensionale, vergrößerte Darstellung des differenziell exprimierten Spots aus der Übersichtskarte; Vergleich des unterschiedlich fluoreszenz-markierten Spots im ERU- Serum zum Kontrollserum (C, D) Vergleichende 3D-Darstellung des differenziell exprimierten Spots (Grafik) Expressions- und Verteilungsmuster des entsprechenden Proteins in allen Gelen. Spotnummer zwei ist exemplarisch für die differenziell exprimierten Spots aufgeführt, die detektiert, aber massenspektrometrisch noch nicht identifiziert wurden. Die hochgestellten Nummern sind in der Legende der Tabelle 4.3.2.1.2 erläutert.

Ergebnisse

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Accession Nummer <sup>d</sup>	Theoretical		Protein-score <sup>g</sup>
				MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
20	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus Caballus	AAS18414	35721	7,69	49*
79	Immunglobulin Gamma 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	70
21	Immunglobulin Gamma 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	66*
70	Vitamin D binding Protein	Equus Caballus	XP_001489400	54327	5,46	278
8	Antithrombin III	Pongo Pygmaeus	ANT3_PONPY	53061	6,32	335
6	Antithrombin III	Bos Taurus	A61435	49437	6,02	168
61	Pigment epithelium-derived factor	Homo Sapiens	PEDF_HUMAN	46342	5,97	142
3	Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	218
40	Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	187
14	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	103
16	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	198
65	Immunglobulin Gamma 7 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	91
62	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	67
67	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	151
77	Komplementfaktor I	Equus Caballus	XP_001502956	66104	7,33	137
50	Komplement C4 gamma chain	Equus Caballus	XP_001492943	32856	6,68	95
10	IGLV3-25	Equus Caballus	XP_001492872	29005	8,54	287

**Tab.: 4.3.2.1.2:** Massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifizierte Proteine im 2D-DIGE Experiment 1 mit Vollserum. Die hochgestellten Nummern bedeuten:

<sup>a)</sup> Nummer des korrespondierenden Spots in Abb. 4.3.2.2, Tab. 4.3.2.3 und Abb. 4.3.2.1.1

<sup>b)</sup> Name des identifizierten Proteins, wie in Swiss-Prot-Datenbank (<http://www.expasy.org>), MSDB-Datenbank (<http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>) oder der NCBI-Datenbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) geführt.<sup>c)</sup> Spezies, bei der das entsprechende Protein die größte Homologie zum identifizierten Protein aufweist.<sup>d)</sup> Entry name, wie in Swiss-Prot-Datenbank, MSDB-Datenbank oder in der NCBI Datenbank geführt.<sup>e)</sup> Theoretisches Molekulargewicht des identifizierten Proteins (Dalton)<sup>f)</sup> Theoretischer isoelektrischer Punkt des identifizierten Proteins (pI)

<sup>g)</sup> Wahrscheinlichkeitsbasierter MOWSE Score, wie von Mascot gegeben.

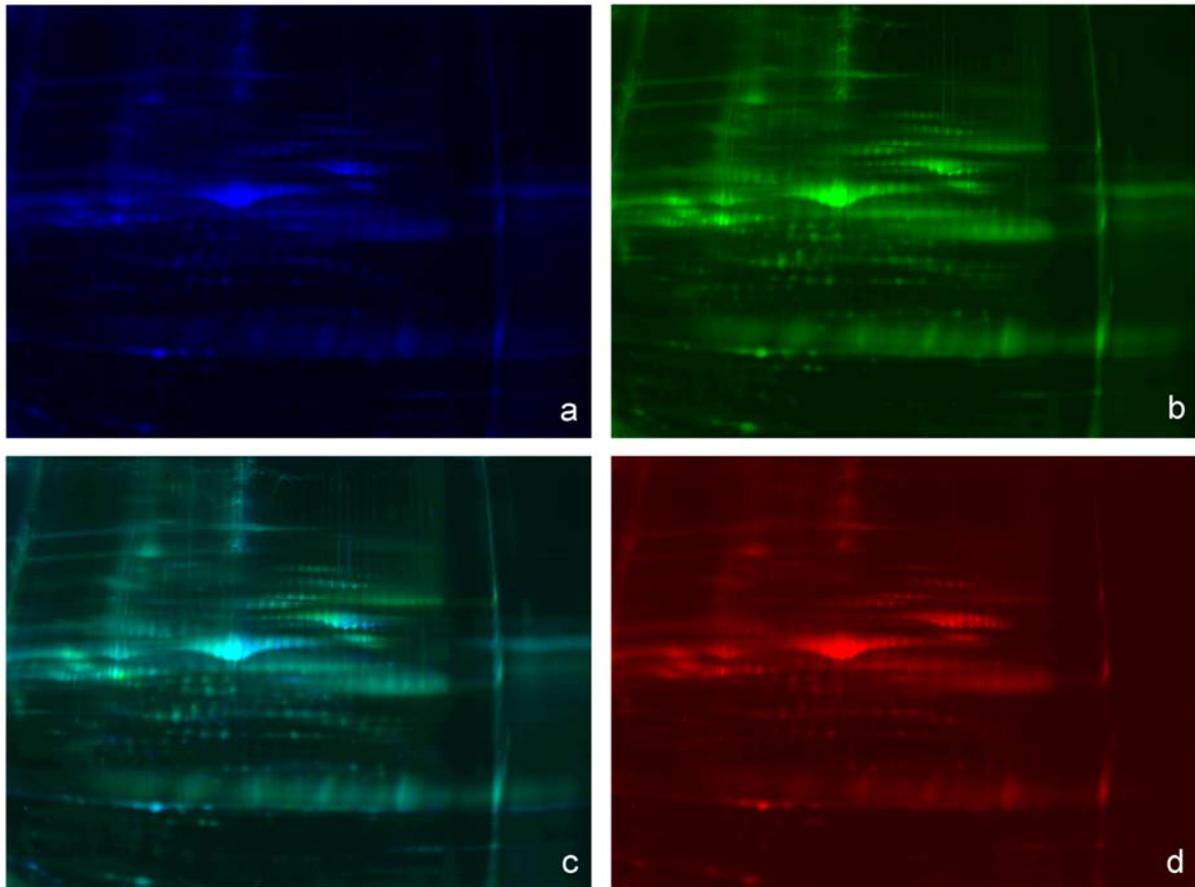
Dieser Score ist der negative dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. Die angegebenen Proteine wiesen einen signifikanten Score ( $p < 0,05$ ) auf, wobei Scores größer als 58 signifikant für die Swiss-Prot-Datenbank waren, Scores größer als 67 signifikant für die MSDB-Datenbank und Scores größer als 54 für die Pferdedatenbank signifikant waren. Das mit \*gekennzeichnete Protein wies einen Score auf, der unterhalb der Signifikanzgrenze lag. Nach manueller Beurteilung der Massenspektren und der ermittelten Peptidsequenzen wurde das Protein jedoch als identifiziert betrachtet.

#### **4.4 Vergleich der depletierten Seren an ERU erkrankter Pferde mit augengesunden depletierten Kontrollseren mittels 2D-DIGE Technologie (2D-DIGE Experiment 2)**

##### **4.4.1 Darstellung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Gele mit depletiertem Serum**

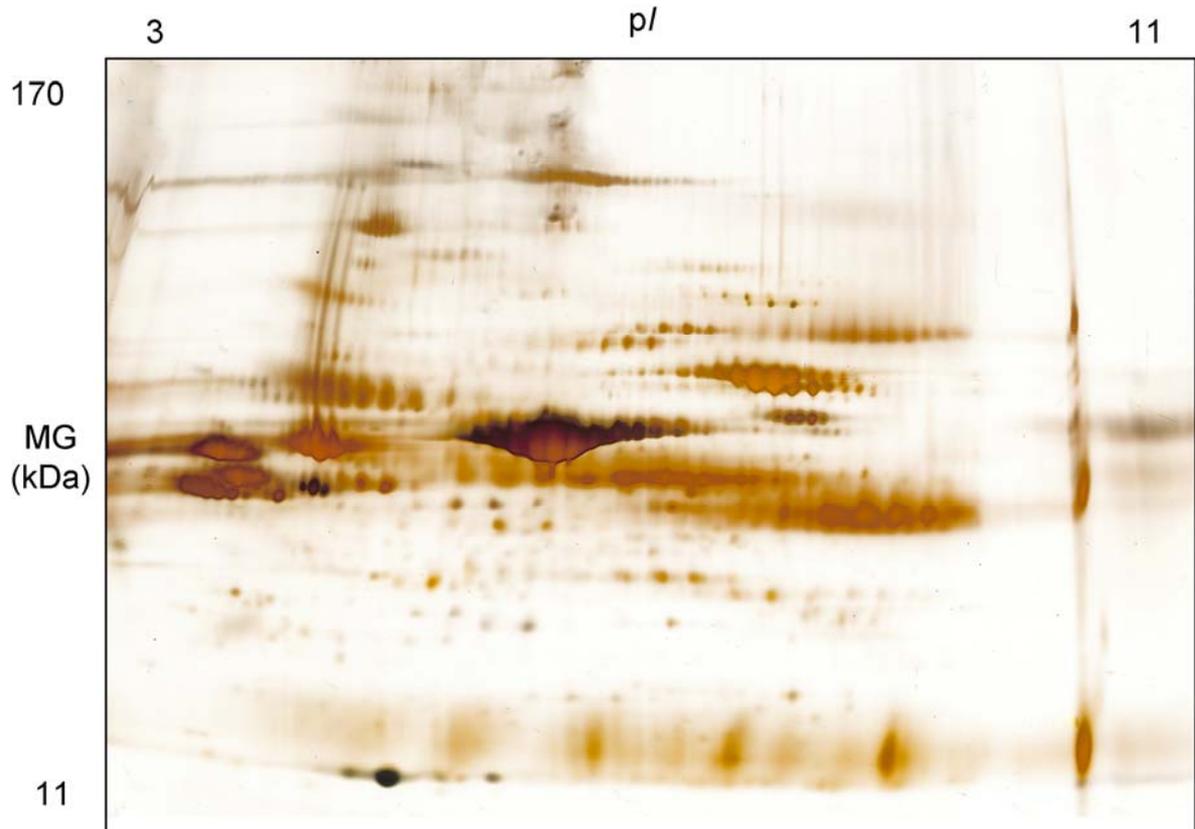
Nach der zweidimensionalen Auftrennung der depletierten und mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Seren wurden die Gele in den entsprechenden Wellenlängen eingescannt und mit der Image Quant TL Software visualisiert.

Die Auflösung der Proteine der verschiedenen depletierten Seren auf dem Gel ist höher im Vergleich zum Vollserum und das Verteilungsmuster gleichmässig. Das depletierte und mit Cy3 markierte Kontrollserum erscheint blau fluoreszierend (Abb. 4.4.1.1 a), das mit Cy5 markierte depletierte ERU-Serum grün (Abb. 4.4.1.1 b) und der mit Cy2 markierte interne Standard rot (Abb. 4.4.1.1 d). In dem Überlagerungsbild (Abb. 4.4.1.1 c) des depletierten ERU-Serums und des depletierten Kontrollserums erscheinen gleich exprimierte Proteine türkis, blau erscheinende Proteine sind im depletierten Kontrollserum höher exprimiert, grün erscheinende Proteine im depletierten ERU-Serum. Im höher-molekularen, basischen Bereich (= rechter oberer Quadrant in dem Überlagerungsbild (Abb. 4.4.1.1 c)) sind deutlich mehr grüne Spots (depletiertes ERU-Serum) sichtbar. Dass heißt, dass diese Spots im depletierten ERU-Serum höher exprimiert sind.



**Abb 4.4.1.1:** Beispielgel aus dem 2D-DIGE Experiment 2. Dargestellt ist ein mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes Gel in den verschiedenen Farbkanälen zum Vergleich der uveitischen depletierten Seren mit den depletierten Kontrollseren. Nach der zweidimensionalen Auftrennung der Proteine auf dem Gel wurde dieses mit dem Typhoon Trio Scanner eingescannt und mit der Image Quant TL Software visualisiert. (a) Kontrollserum (blau), mit dem Farbstoff Cy3 markiert und bei einer Wellenlänge von 532 nm gescannt. (b) Serum eines ERU-Patienten (grün), mit dem Farbstoff Cy5 markiert und bei einer Wellenlänge von 633 nm gescannt. (c) Überlagerungsbild des ERU-Patientenserums (Cy5) und des Kontrollserums (Cy3). Türkis erscheinende Proteine sind in beiden Seren gleich exprimiert. Grün erscheinende Proteine sind im ERU-Serum höher exprimiert, blaue im Kontrollserum. Im rechten oberen Quadranten sind deutlich mehr grüne Spots (depletiertes ERU-Serum) sichtbar. Diese Spots sind im depletierten ERU-Serum höher exprimiert. (d) Interner Standard (rot), mit dem Farbstoff Cy2 markiert und bei 488 nm gescannt.

Nach dem Scannen wurden die Gele silbergefärbt, um das Proteinmuster sichtbar zu machen. Die Auflösung der Proteine bei den depletierten Seren war höher im Vergleich zum Vollserum. Das Verteilungsmuster war ebenfalls gleichmässig. Das silbergefärbte Gel diente als Grundlage zur Identifizierung der differenziell exprimierten Proteine, die mit der DeCyder Auswertung ermittelt wurden.



**Abb. 4.4.1.2** : Repräsentatives silbergefärbtes 2D-DIGE Gel. In diesem Gel wurde depletiertes Serum eines an ERU erkrankten Pferdes (50 µg), eines augengesunden Kontrolltieres (50 µg) und der interne Standard (50 µg) mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2/Cy3/Cy5) markiert. Alle drei unterschiedlich markierten Proben wurden nach der Markierungsreaktion zusammengefasst und gemeinsam zweidimensional aufgetrennt, eingescannt und anschließend silbergefärbt.

#### 4.4.2 Ermittlung differenziell exprimierter Proteine im depletierten Serum

Insgesamt sind fünf 2D-DIGE Gele mit depletierten Serum ausgewertet worden. Alle Seren wurden mit der ProteomLablgY-12 Säule depletiert. Die mit der ImageQuant TL Software erstellten Gelbilder, die den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen entsprechen, wurden mit der DeCyder Software in dem DIA-Modul und anschließend im BVA-Modul entsprechend den Vollserumgelen bearbeitet.

Bei einer gesetzten Spotzahl von 2500 wurden in den fünf Gelen zwischen 1318-1669 Spots detektiert (Tab. 4.4.2.1 Spalte 3). Gel G mit der höchsten Spotanzahl von 1669 wurde als Mastergel definiert. Alle Gele wurden mit dem Mastergel abgeglichen. In den Gelen F, H, I und J konnten 827-1535 Spots detektiert werden, die auch im Mastergel vorkommen (Tab. 4.4.2.1, Spalte 4).

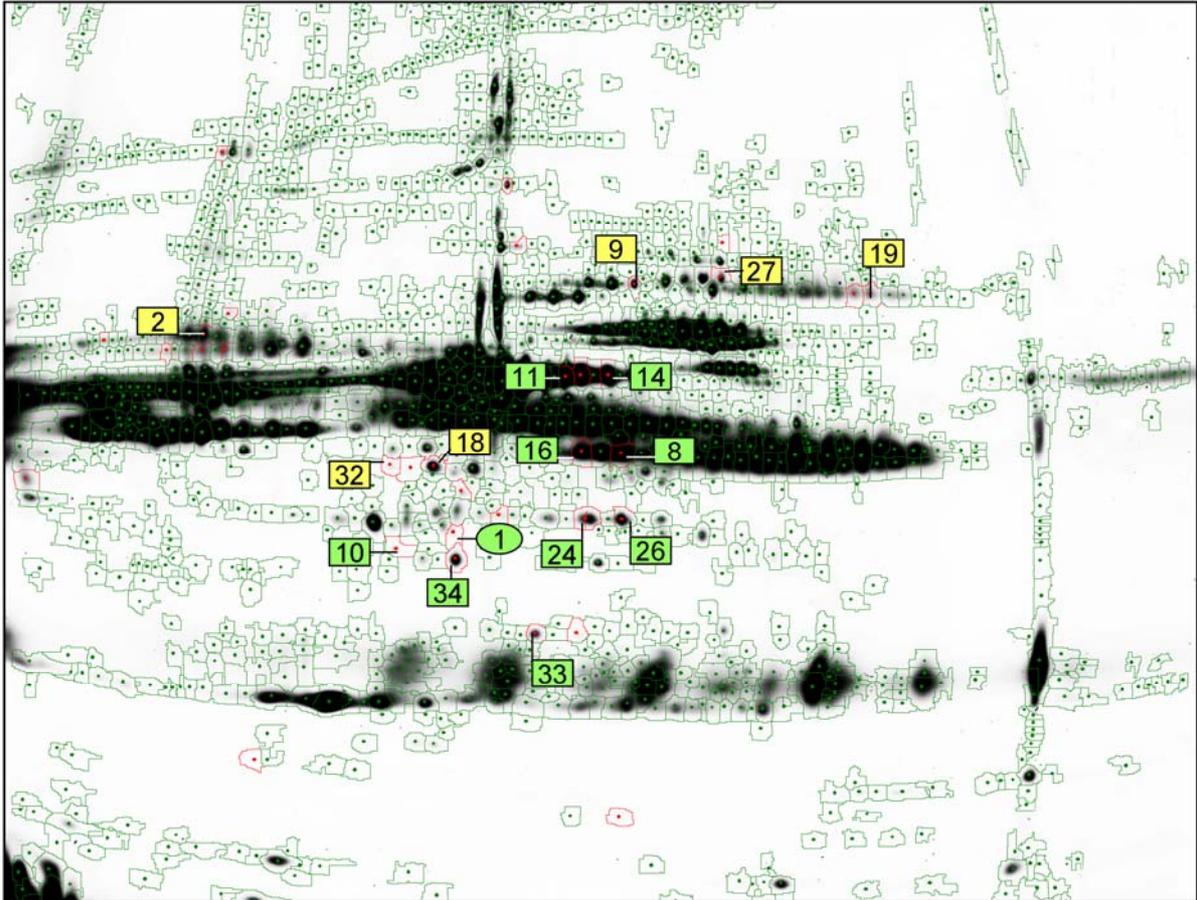
Gel	Seren	Spotanzahl	Gepaarte Spots
F	Dominum (ERU) / Kristall (K) / interner Standard	1633	1024
G (M)	Lap Top 3 (ERU) / Lord (K) / interner Standard	1669	1669
H	Perina (ERU) / Fire Lady (K) / interner Standard	1535	1535
I	Santana (ERU) / Calypso (K) / interner Standard	1410	827
J	Gigolo (ERU) / Quidditch (K) / interner Standard	1318	834

**Tab. 4.4.2.1:** Aufteilung der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten depletierten Seren in den verschiedenen Gelen, die mittels der Decydersoftware ermittelte Spotanzahl für jedes Gel und die in jedem Gel gepaarte Spotzahl zum Mastergel (M).

Für die statistische Auswertung wurde der Student's *t*-Test verwendet.

Es wurden 34 differenziell exprimierte Spots (Student's *t*-Test  $p < 0,05$ ) mit der DeCyder Software ermittelt (Tab. 4.4.2.3). Alle differenziell exprimierten Spots sind in der Tabelle aufgeführt und rot auf der Übersichtskarte (Abb. 4.4.2.2) hervorgehoben. 14 dieser Spots waren bei den depletierten ERU Seren höher als in den depletierten Kontrollseren exprimiert. 20 Spots waren in den depletierten ERU-Seren im Vergleich zu den Kontrollen niedriger exprimiert. Die entsprechenden Spots wurden aus den silbergefärbten Gelen ausgeschnitten und massenspektrometrisch bestimmt. Von den analysierten Kandidatenspots konnten 15 Spots massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifiziert werden (Tab. 4.4.2.1.2). Die identifizierten Spots sind in der Übersichtskarte (Abb. 4.4.2.2) mit den entsprechenden Spotnummern gekennzeichnet. Grün gekennzeichnete Spots sind in den ERU-Seren niedriger

exprimiert, gelb gekennzeichnete Nummern sind in den ERU-Seren höher exprimiert. Die mit dem Kreis gekennzeichnete Nummer ist exemplarisch eingezeichnet für einen Spot, der als differenziell exprimiert ermittelt wurde, aber massenspektrometrisch noch nicht identifiziert werden konnte.



**Abb. 4.4.2.2:** Eine mittels der DeCyder BVA Software erstellte Übersichtskarte von zweidimensional aufgetrennten, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten depletiertem Serumproben eines ERU-Patienten, einer Kontrolle und eines internen Standards.

Die rot markierten Spots zeigen statistisch signifikante Unterschiede in der Expression (Student's  $t$ -Test =  $p < 0,05$ ). Insgesamt wurden 34 differenziell exprimierte Spots gefunden. 14 Spots waren bei den depletierten ERU-Seren höher exprimiert als bei den depletierten Kontrollseren, 20 Spots waren bei den depletierten ERU-Seren niedriger exprimiert. Die nummerierten Spots konnten massenspektrometrisch identifiziert werden. Grün nummerierte Spots sind in den depletierten ERU-Seren niedriger exprimiert; gelb nummerierte Spots sind bei den depletierten ERU-Seren im Vergleich zu den depletierten Kontrollseren höher exprimiert. Die mit dem Kreis gekennzeichnete Nummer ist exemplarisch dargestellt für einen Spot, der als differenziell exprimiert ermittelt wurde, aber noch nicht identifiziert werden konnte.

Ergebnisse

Spot ID	Vorkommen in den Gelen	Expression Bei ERU	Identifikation	Average ratio	Student's t-Test
1	12 (15)	↓	nicht signifikant	1,62	0,00013
2	12 (15)	↑	<b>Immunglobulin Mu hc</b>	<b>-1,62</b>	<b>0,0014</b>
3	6 (15)	↓	nicht signifikant	1,55	0,0024
4	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,93	0,0032
5	12 (15)	↓	nicht signifikant	2,00	0,0034
6	9 (15)	↓	nicht signifikant	1,70	0,0039
7	15 (15)	↓	nicht signifikant	2,50	0,0058
8	15 (15)	↓	<b>Apolipoprotein H und Kininogen-1</b>	<b>1,75</b>	<b>0,0073</b>
9	12 (15)	↑	<b>Komplementfaktor B</b>	<b>-1,58</b>	<b>0,016</b>
10	9 (15)	↓	<b>Apolipoprotein A-IV</b>	<b>1,43</b>	<b>0,016</b>
11	15 (15)	↓	<b>Albumin</b>	<b>1,85</b>	<b>0,017</b>
12	12 (15)	↑	nicht signifikant	-1,78	0,019
13	9 (15)	↓	nicht signifikant	2,42	0,020
14	15 (15)	↓	<b>Albumin</b>	<b>1,44</b>	<b>0,022</b>
15	12 (15)	↓	nicht signifikant	1,66	0,022
16	15 (15)	↓	<b>Kininogen-1</b>	<b>1,95</b>	<b>0,023</b>
17	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,69	0,024
18	15 (15)	↑	<b>Alpha-2-HS Glykoprotein</b>	<b>-1,37</b>	<b>0,026</b>
19	9 (15)	↑	<b>Immunglobulin Gamma 4 hc</b>	<b>-2,80</b>	<b>0,027</b>
20	12 (15)	↓	nicht signifikant	1,59	0,028
21	9 (15)	↑	nicht signifikant	-1,44	0,028
22	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,53	0,029
23	12 (15)	↑	nicht signifikant	-2,44	0,030
24	15 (15)	↓	<b>Immunglobulin Gamma 5 hc</b>	<b>1,44</b>	<b>0,030</b>
25	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,55	0,035
26	15 (15)	↓	<b>Immunglobulin Gamma 5 hc</b>	<b>1,32</b>	<b>0,036</b>
27	12 (15)	↑	<b>Serotransferrin</b>	<b>-1,59</b>	<b>0,038</b>
28	9 (15)	↑	nicht signifikant	-1,74	0,040
29	15 (15)	↑	nicht signifikant	-1,47	0,040
30	15 (15)	↓	nicht signifikant	1,81	0,041
31	15 (15)	↓	nicht signifikant	2,21	0,043
32	15 (15)	↑	<b>Alpha-2-HS Glykoprotein</b>	<b>-1,46</b>	<b>0,046</b>
33	12 (15)	↓	<b>Albumin</b>	<b>1,84</b>	<b>0,049</b>
34	15 (15)	↓	<b>Albumin</b>	<b>1,53</b>	<b>0,051</b>

**Tab. 4.4.2.3:** Tabellarische Übersicht aller 34 differenziell exprimierten Spots im depletierten Serum, die mit der DeCyder Software ermittelt wurden, aufgelistet entsprechend dem besten Student's *t*-Test. Die Spot IDs korrespondieren zu den eingezeichneten Spotnummern in der Übersichtskarte (Abb. 4.4.2.2). In Spalte 2 wird angegeben, in wie vielen der insgesamt 15 Gele der entsprechende Spot zu finden war. In Spalte 3 ist angegeben, ob die Expression des Proteins im depletierten ERU-Serum im Vergleich zum depletierten Kontrollserum erhöht oder erniedrigt war. In Spalte 4 sind die mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) ermittelten Identifikationen angegeben, soweit vorhanden. In Spalte 5 ist die differenzielle Expression des Spots als Volumenverhältnis (average ratio) ausgedrückt. Für den Vergleich der depletierten ERU-Seren mit den Kontrollseren wurde für statistische Auswertung der Student's *t*-Test (Signifikanz  $p < 0,05$ ) verwendet (Spalte 6).

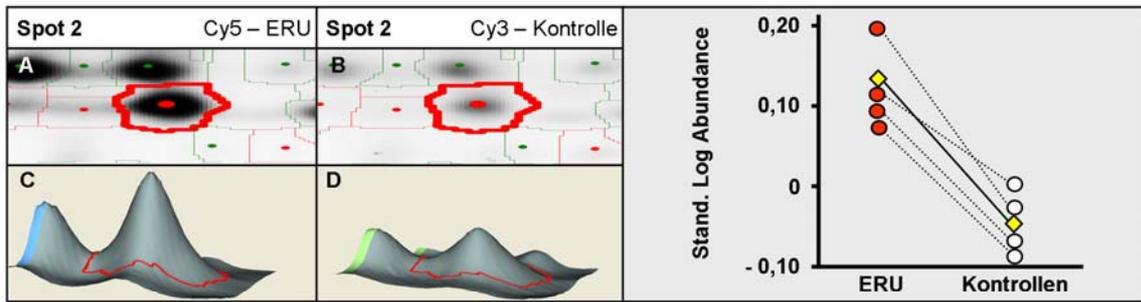
#### **4.4.2.1 Differenziell exprimierte und identifizierte Proteine im depletierten Serum**

Anhand der vergleichenden Proteomanalyse mit der 2D-DIGE Minimal Labelling Technologie von depletiertem Serum gesunder Kontrollpferde und an ERU erkrankter Pferde konnten 15 differenziell exprimierte Spots detektiert, quantifiziert und mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) identifiziert werden (Abb. 4.4.2.1.1 und Tab. 4.4.2.1.2). Mit den depletierten Seren wurde bei der Auswertung entsprechend zu den Vollseren verfahren. Für den Vergleich der depletierten ERU-Seren mit den depletierten Kontrollseren wurde für die statistische Auswertung der Student's *t*-Test (Signifikanz  $p < 0,05$ ) verwendet. In der Grafik der Abbildung 4.4.2.1.1 wurde eine Übersicht des Expressions- und des Verteilungsmusters des entsprechenden identifizierten Spots in allen Gelen dargestellt. Das Expressionsmuster der verschiedenen Spots in den verschiedenen Gelen war sehr einheitlich.

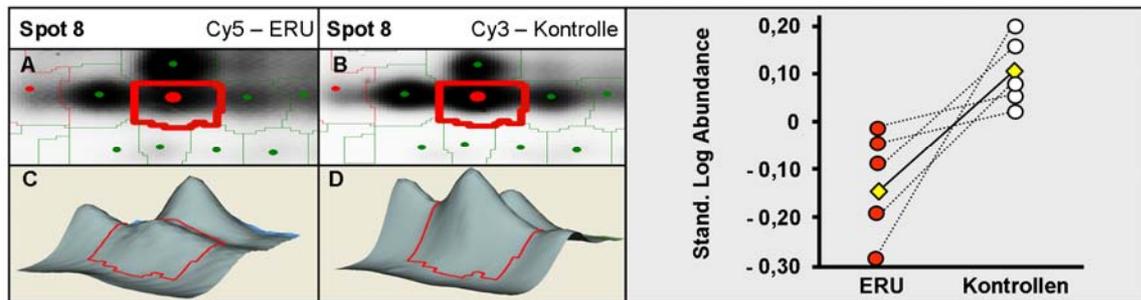
Die 15 differenziell exprimierten Spots repräsentieren zehn verschiedene Proteine. Sechs Spots, die fünf verschiedene Proteine repräsentieren, waren in den depletierten ERU-Seren höher exprimiert. Die klassischen Serumproteine IgM hc (Spot 2), IgG 4 hc (Spot 19), Komplementfaktor B (Spot 9), Serotransferrin (Spot 27) und Alpha-2-HS-Glykoprotein (18 und 32) sind in den depletierten Serumproben uveitischer Patienten höher exprimiert.

Neun Spots, die fünf verschiedenen Proteinidentifikationen entsprechen, waren in den depletierten ERU Seren niedriger exprimiert, nämlich Albumin (Spot 11, 14, 33, 34), IgG 5 hc (Spot 24 und 26), Apolipoprotein A-IV (Spot 10) und Apolipoprotein H (Spot 8) und Kininogen-1 (Spot 8 und 16).

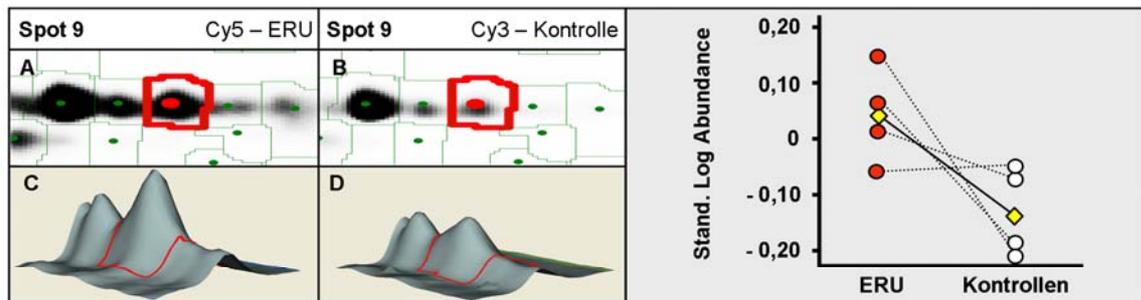
Weil von 19 Spots die Proteine massenspektrometrisch noch nicht identifiziert werden konnten, ist Spotnummer 1 exemplarisch für die differenziell exprimierten Spots aufgeführt, die detektiert, aber massenspektrometrisch noch nicht identifiziert werden konnten.



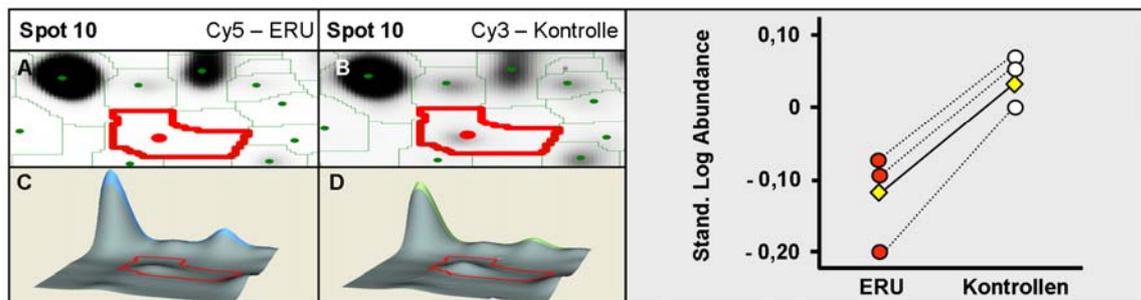
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	93



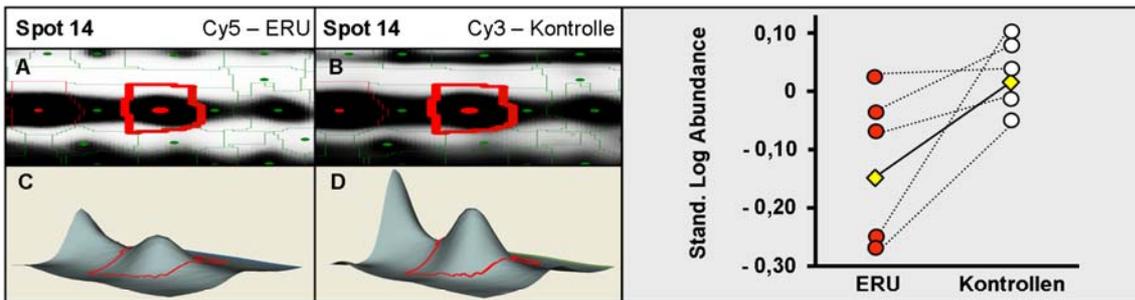
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Apolipoprotein H und Kininogen-1	Equus Caballus Equus Caballus	XP_001499728 XP_001499389	38536 47987	8,45 5,29	130 63



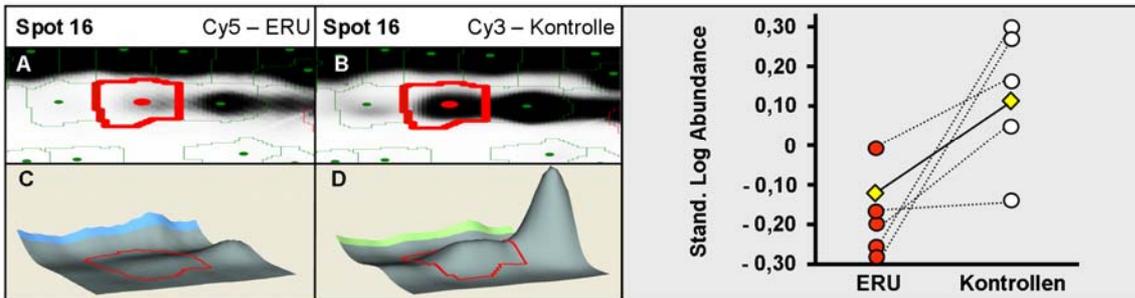
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Komplementfaktor B	Equus Caballus	XP_001492602	85984	6,75	65



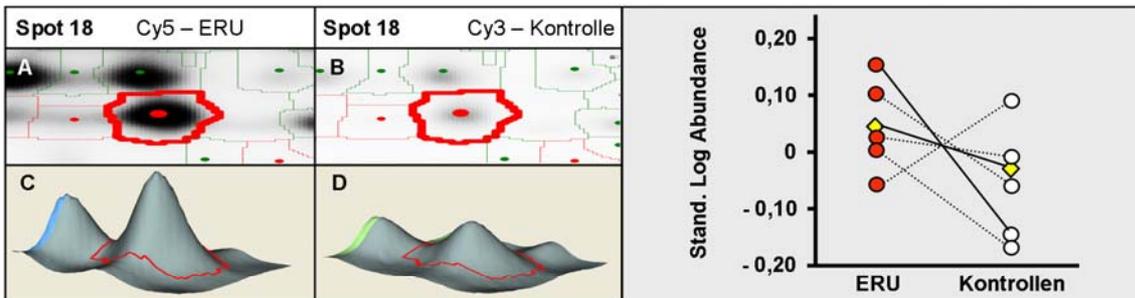
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Apolipoprotein A-IV	Equus Caballus	XP_001502503	43251	5,54	255



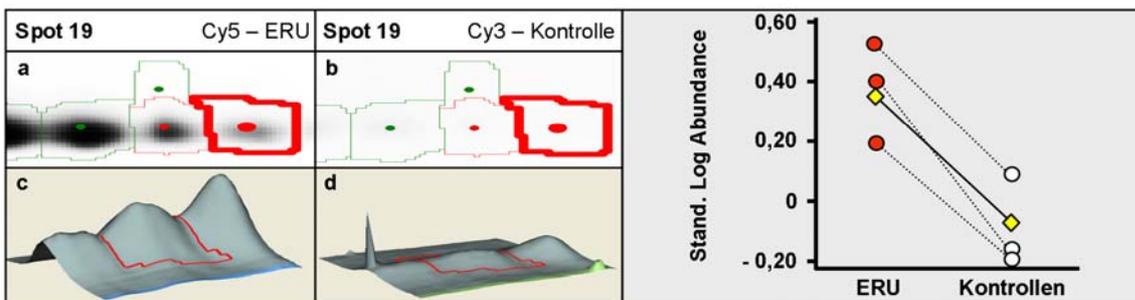
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	103



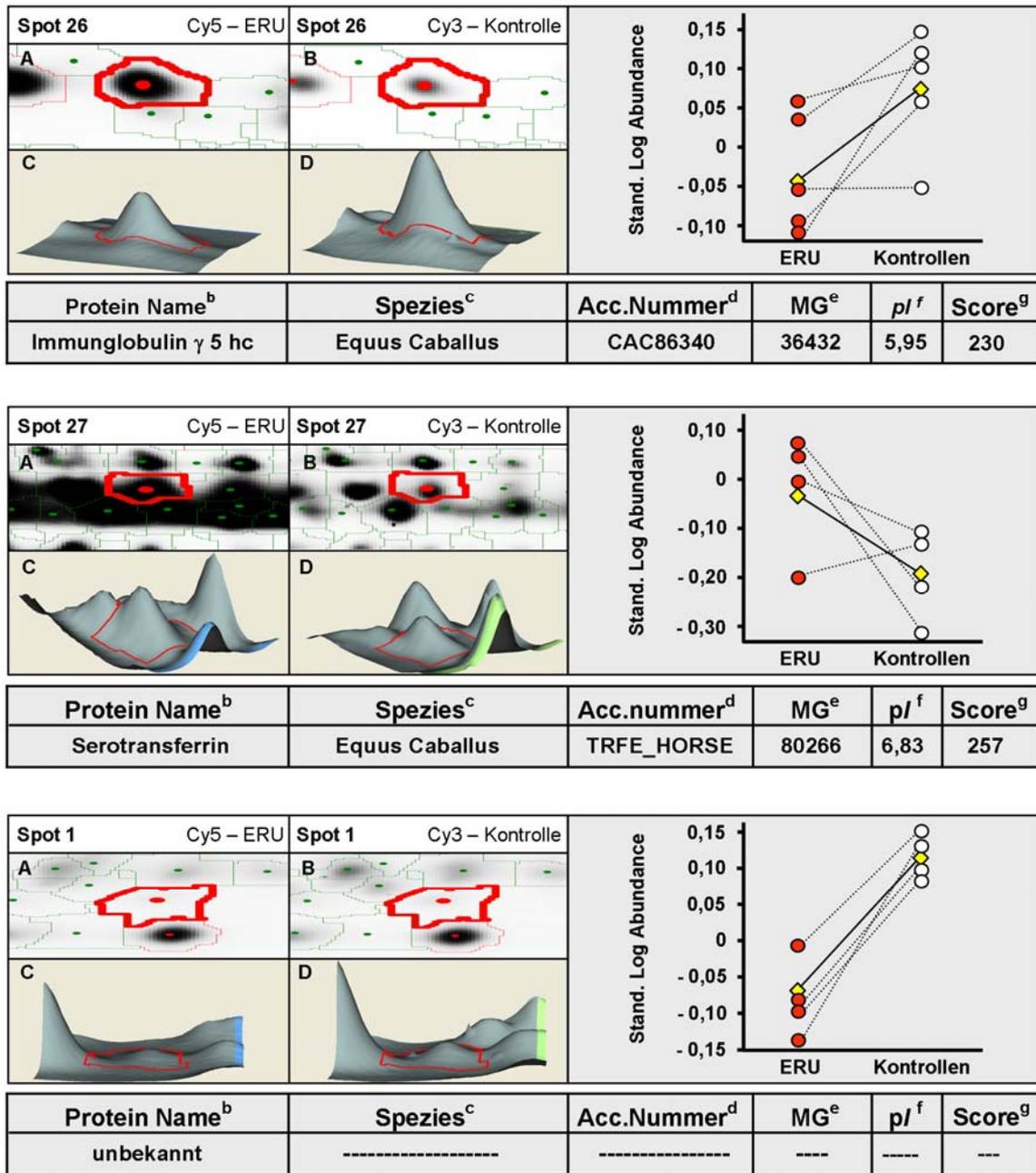
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Kininogen-1	Equus Caballus	XP_00149939	47957	5,29	135



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
$\alpha$ -2-HS-Glykoprotein	Equus Caballus	XP_001499311	38724	5,68	230



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Immunglobulin $\gamma$ 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	65*



**Abb. 4.4.2.1.1:** DeCyder Auswertung. Darstellung der differenziell exprimierten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifizierten Proteine (außer Spot 1) im depletierten Serum.

(A, B) Zweidimensionale, vergrößerte Darstellung des differenziell exprimierten Spots aus der Übersichtskarte; Vergleich des markierten Spots im ERU- Serum zum Kontrollserum

(C, D) Vergleichende 3D-Darstellung des differenziell exprimierten Spots

(Grafik) Expressions- und Verteilungsmuster des entsprechenden Proteins in allen Gelen.

Spotnummer zwei ist exemplarisch für die differenziell exprimierten Spots die detektiert, aber massenspektrometrisch noch nicht identifiziert wurden, aufgeführt.

Die hochgestellten Nummern sind in der Legende der Tabelle 4.4.2.1.2 erläutert.

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Accession Nummer <sup>d</sup>	Theoretical		Protein score <sup>g</sup>
				MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
2	Immunglobulin Mu hc	Equus Caballus	AAU09792	50091	5,52	93
9	Komplementfaktor B	Equus Caballus	XP_001492602	85984	6,75	65
27	Serotransferrin	Equus Caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	257
19	Immunglobulin Gamma 4 hc	Equus Caballus	AAS18415	36211	7,71	65*
32	Alpha-2-HS-Glykoprotein	Equus Caballus	XP_001499311	38724	5,68	96
18	Alpha-2-HS-Glykoprotein	Equus Caballus	XP_001499311	38724	5,68	230
11	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	564
14	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	103
16	Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	135
	Apolipoprotein H	Equus Caballus	XP_001499728	38536	8,45	130
8	und					
	Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	47957	5,29	63
10	Apolipoprotein A-IV	Equus Caballus	XP_001502503	43251	5,54	255
34	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	114
33	Albumin	Equus Caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	100
24	Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	36432	5,95	216
26	Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	36432	5,95	230

**Tab. 4.4.2.1.2:** Massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifizierte Proteine im 2D-DIGE Experiment 2 mit depletiertem Serum. Die hochgestellten Nummern bedeuten:

<sup>a</sup>) Nummer des korrespondierenden Spots in Abb. 4.4.2.2 und Tab. 4.4.2.3 und Abb. 4.4.2.1.1

<sup>b</sup>) Name des identifizierten Proteins, wie in Swiss-Prot-Datenbank (<http://www.expasy.org>), MSDB-Datenbank (<http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>) oder der NCBI-Datenbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) geführt.

<sup>c</sup>) Spezies, bei der das entsprechende Protein die größte Homologie zum identifizierten Protein aufweist.

<sup>d</sup>) Entry name, wie in Swiss-Prot-Datenbank, MSDB-Datenbank oder in der NCBI Datenbank geführt.

<sup>e</sup>) Theoretisches Molekulargewicht des identifizierten Proteins (Dalton)

<sup>f</sup>) Theoretischer isoelektrischer Punkt des identifizierten Proteins (pI)

<sup>g</sup>) Wahrscheinlichkeitsbasierter MOWSE Score, wie von Mascot gegeben.

Dieser Score ist der negative dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. Die angegebenen Proteine wiesen einen signifikanten Score ( $p < 0,05$ ) auf, wobei Scores größer als 58 signifikant für die Swiss-Prot-Datenbank waren, Scores größer als 67 signifikant für die MSDB-Datenbank und Scores größer als 54 für die Pferdedatenbank signifikant waren. Das mit \*gekennzeichnete Protein wies einen Score auf, der unterhalb der Signifikanzgrenze lag. Nach manueller Beurteilung der Massenspektren und der ermittelten Peptidsequenzen wurde das Protein jedoch als identifiziert betrachtet.

#### 4.5 Auflistung und Expressionsmuster aller identifizierten differenziell exprimierten Proteine im Serum von Pferden mit ERU

Proteinname	Spezies	Accessionnummer	Expression bei ERU
Immunglobulin gamma 4 hc und 7 hc	Equus caballus	AAS18415 und AAS18415	↑
Immunglobulin Gamma 5 hc	Equus Caballus	CAC86340	↓
Immunglobulin M hc	Equus Caballus	AAU09792	↑
Albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	↓
IGLV3-25	Equus Caballus	XP_001492872	↑
Serotransferrin	Equus Caballus	TRFE_HORSE	↑
Antithrombin III	Bos taurus	A61435	↓
Vitamin D binding Protein	Equus Caballus	XP_001489400	↓
Komplementfaktor I	Equus Caballus	XP_001502956	↓
Komplementfaktor C4 gamma chain	Equus Caballus	XP_001492943	↓
Komplementfaktor B	Equus Caballus	XP_001492602	↑
Apolipoprotein H	Equus Caballus	XP_001499728	↓
Apolipoprotein A-IV	Equus Caballus	XP_001502503	↓
Alpha-2-HS- Glykoprotein	Equus Caballus	XP_001499311	↑
Pigment epithelium- derived factor	Homo Sapiens	PEDF_HUMAN	↓
Kininogen-1	Equus Caballus	XP_001499389	↓

**Tab. 4.5.1:** Übersicht der identifizierten differenziell exprimierten Proteine im Serum von Pferden mit ERU ( $p < 0,05$ ). Das Expressionsmuster wird durch die Pfeile veranschaulicht (↑ das Protein ist in den ERU-Seren im Vergleich zu den gesunden Kontrollseren höher exprimiert; ↓ das Protein ist in den ERU-Seren im Vergleich zu den gesunden Kontrollseren niedriger exprimiert).

## 5 Diskussion

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist die häufigste Augenerkrankung bei Pferden (Rebhun 1999). Die immer wiederkehrenden Entzündungsschübe führen im Verlauf der Erkrankung zur Zerstörung der intraokulären Strukturen und damit zur Erblindung des Pferdes (Spiess 1997). Sowohl die Ätiologie, als auch die Pathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis ist trotz zahlreicher Untersuchungen noch nicht eindeutig geklärt.

Proteine stellen die aktiven Komponenten im Organismus dar. Die Kenntnis über die Funktion und das Expressionsmuster von Proteinen in verschiedenen Geweben, Zellen und Körperflüssigkeiten ist essenziell für die Aufklärung von molekularen Prozessen, die physiologisch und unter krankhaften Bedingungen in einem Organismus ablaufen. Die Auftrennung komplexer Proteingemische mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese in Verbindung mit der Massenspektrometrie bietet die Möglichkeit, das Expressionsmuster von Proteinen und ihrer Modifikationen unter verschiedenen Bedingungen zu vergleichen (Carrette *et al.* 2006).

Bei den dieser Arbeit vorausgegangenen vergleichenden proteomischen Untersuchungen der Zielorgane Retina und Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden und gesunden Kontrollen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese konnten mehrere differenziell exprimierte Proteine identifiziert werden (Deeg *et al.* 2007a; Hauck *et al.* 2007). Diese stehen funktionell mit dem Immunsystem und der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke in Verbindung. In beiden Untersuchungen konnten deutliche Hinweise für den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke im Krankheitsverlauf gezeigt werden, wodurch vermehrt Plasmaproteine in Glaskörper und in der Netzhaut auftreten. Dies lässt die Vermutung zu, dass auch Proteine aus dem Auge ins Plasma und damit in die Zirkulation übertreten. Außerdem ist aus der EAU bekannt, dass die autoreaktiven T-Zellen unmittelbar vor den uveitischen Schüben von der Milz über das Blut ins Auge wandern (Caspi 2006, 1999). Es ist davon auszugehen, dass dieser immunologische Vorgang mit der Expression von bestimmten Proteinen verbunden ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch den Vergleich des Serumproteoms gesunder und an ERU erkrankter Pferde differenziell regulierte Proteine im Serum zu identifizieren, die zur Aufklärung der Pathogenese beitragen oder sogar als Marker fungieren können.

Das Blut steht mit allen Zellen des Körpers ständig in Kontakt und repräsentiert den Zustand des Körpers sehr genau. Konventionelle Blutuntersuchungen sind ein zentrales Element für die klinische Diagnostik (Issaq *et al.* 2007). Für klinische Untersuchungen ist Serum die am häufigsten verwendete Probe, da sie gering invasiv zu gewinnen ist (Anderson and Anderson 2002). Die geringe Invasivität der Probengewinnung ist wichtig für eine unkomplizierte, langfristige Überwachung des Patienten. Die Analyse von Serum mittels proteomischer Methoden birgt große Hoffnung bezüglich der Identifizierung verschiedener Biomarker (Anderson and Anderson 2002). Die Unterschiede der Proteine im Serum bezüglich ihrer Menge, Struktur und Funktion können als Indikatoren für pathologische Prozesse dienen und sowohl für die Diagnose, als auch für die Prognose verwendet werden (Issaq and Veenstra 2007). Diese Unterschiede treten häufig schon vor einer klinischen Manifestation der Erkrankung auf und können wenn sie entsprechend früh festgestellt werden, entscheidend für den weiteren Krankheitsverlauf, die therapeutischen Möglichkeiten und damit für die Prognose sein.

Die Identifikation von Markern im Serum von an ERU erkrankten Pferden könnte es ermöglichen, Tiere mit einer Krankheitsdisposition zu identifizieren. Dies ist von besonderem Interesse, da die Prävalenz der spontanen Erkrankung bei 10% liegt (Spiess 1997). Bei Tieren mit einer klinisch manifesten Erkrankung wäre es wichtig, die Rezidive vorherzusagen, um therapeutisch rechtzeitig zu intervenieren und damit die Zerstörung der intraokulären Strukturen zu verhindern. Da das Blut das Transportmedium des Körpers darstellt, ist davon auszugehen dass es Hinweise in Form von Proteinen oder deren Modifikationen enthält, die weiteren Aufschluss über die immunologischen Prozesse liefern könnten, die während einer ERU ablaufen.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit einer hochauflösenden Auftrennung komplexer Proteingemische und einer anschließenden Identifikation der Proteine mit dem Massenspektrometer (Carrette *et al.* 2006; Gorg *et al.* 2004; Rabilloud 2002) Diese Methode bietet auch die Möglichkeit der Identifikation posttranslationaler Modifikationen, die häufig für die Funktion der Proteine ausschlaggebend sind (Meri and Baumann 2001). Die Messung der Proteinexpression mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese spiegelt die Menge der aktiven Proteine genauer wider als die Bestimmung der mRNA. Bei der Messung der Genexpression auf der Ebene der mRNA konnte gezeigt werden, dass die

Menge der gemessenen mRNA nicht mit den funktionell aktiven Proteinen korreliert (Gygi *et al.* 1999; Anderson and Seilhamer 1997).

Bei dem Vergleich des zweidimensional aufgetrennten Proteinmusters von an ERU erkrankten Pferde-Seren und gesunden Kontrollen konnten zunächst mit der konventionellen 2D-Gelelektrophorese keine Unterschiede festgestellt werden. Deshalb war die Wahl einer sensitiveren Methode nötig. Um den direkten Vergleich von Serumproben von an ERU erkrankten Pferden und den gesunden Kontrollseren zu ermöglichen, wurde die 2D-DIGE (2D-Difference-gel-electrophoresis) Minimal Labelling Technologie angewendet, die sensitiver als die bei der konventionellen 2D-Gelelektrophorese verwendete Silberfärbung ist (Miller *et al.* 2006). Die Detektionsgrenze für Proteine liegt beim 2D-DIGE Minimal Labelling in einem Bereich von 0,1-0,2 ng im Vergleich zu 1-5 ng bei der Silberfärbung (Sitke 2006). Außerdem ermöglicht die Markierung der Serumproteine mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zwei verschiedene Proben in einem Gel aufzutrennen und damit direkt zu vergleichen und gleichzeitig zu quantifizieren. Dies bietet den Vorteil, Variationen von Gel zu Gel auszuschließen, die methodisch bedingt sind und reduziert die Anzahl der Gele in einem Experiment (Tannu and Hemby 2006; Tonge *et al.* 2001). Die Integration des internen Standards in den Versuchsaufbau ermöglicht dann zusätzlich den quantitativen Vergleich zwischen mehreren Gelen (Alban *et al.* 2003) und dient als Qualitätskontrolle. Der größte Vorteil der DIGE-Methode besteht in dem direkten quantitativen Vergleich der markierten Proteine (Tannu and Hemby 2006; Lilley and Friedman 2004; Tonge *et al.* 2001), allerdings ist der sehr hohe finanzielle Aufwand für die Fluoreszenzfarbstoffe bei dieser Methode nicht zu vernachlässigen.

Auf den ersten Blick stellt Serum wegen seiner hohen Proteinkonzentration (mg/ml) für proteomische Analysen die ideale Probe dar (Issaq *et al.* 2007). Serum als Probe für die Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese stellt aber auch gleichzeitig eine besondere Herausforderung dar, weil sich die dynamische Bandbreite der Proteinkonzentrationen über eine Größenordnung von  $10^9$  bis  $10^{10}$  erstreckt (Kim and Kim 2007; Anderson *et al.* 2004; Pieper *et al.* 2003). Das in größter Menge im Serum vorkommende Protein Albumin kommt im mg/ml Bereich vor, während dazu im Vergleich Zytokine nur in pg/ml vorkommen (Issaq *et al.* 2007; Linke *et al.* 2007; Hinerfeld *et al.* 2004). Nur 22 verschiedene Proteine im Serum machen 99% der Proteinmasse aus. In dem verbleibenden einen Prozent werden die

Proteine vermutet, die wahrscheinlich bei Erkrankungen von Interesse sind (Issaq *et al.* 2007). Diese Problematik verdeutlicht die Notwendigkeit für die Serumdepletion, um die abundanten Proteine wie Albumin und Immunglobuline zu entfernen und damit eine Anreicherung der niedriger konzentrierten Proteine zu ermöglichen.

Da die Serumdepletion auch mit Nachteilen verbunden sein kann, wurde in dieser Arbeit sowohl ein Experiment mit Vollserum, als auch ein Experiment mit depletiertem Serum durchgeführt.

Für die Depletion von Pferdeserum gibt es bislang keinen kommerziellen Depletionskit mit spezifischen Antikörpern. Deshalb wurde zunächst eine von der Spezies unabhängige, einfach durchzuführende und kostengünstige Methode für die Serumdepletion getestet. Dies ist die Entfernung des Albumins mittels Salzfällung (Kap. 3.3.2). Bei der Anwendung dieser Methode bei Pferdeserum konnte keine ausreichende Entfernung des Albumins erreicht werden und die Auflösung der Probe in der anschließenden zweidimensionalen Gelelektrophorese war nicht zufriedenstellend (Abb. 4.2.1.1 c). Ein Grund für die schlechte Auflösung kann in der unzureichenden Reduktion des Salzgehaltes der Probe liegen. Deshalb wurde ein kommerzielles Kit für humanes Serum zur Entfernung von Albumin und IgG mittels Antikörpern getestet (Kap. 3.3.1). Auch mit dieser Methode konnte keine ausreichende Depletion erreicht werden (Abb. 4.2.1.1 b). In diesem Fall lag es eventuell an der hohen Spezifität der Antikörper für humanes Albumin und IgG, so dass keine ausreichende Entfernung von Pferde-Albumin und IgG erreicht werden konnte. Ein großer Fortschritt in der Serumdepletion wurde durch die Einführung von Depletionssäulen erreicht, bei denen polyklonale Hühner-Antikörper an Trägerkugeln gekoppelt sind. Diese Depletionsmethode kann bei Säugetierseren verschiedener Spezies angewendet werden (Linke *et al.* 2007; Hinerfeld *et al.* 2004). Der große Vorteil der Hühner-Antikörper gegenüber den Säugetier-Antikörpern liegt in der evolutionsgeschichtlichen Distanz zwischen Huhn und Säugetier, die eine größere Immunogenität gegenüber den konservierten Säugerproteinen wie Albumin bedeuten (Hinerfeld *et al.* 2004). Ein weiterer Vorteil der ProteomeLab IgY-12 Depletionssäule besteht darin, dass diese Säule polyklonale Hühner-Antikörper gegen zwölf abundante Serumproteine enthält (Kap. 3.3.3). Mit dieser Depletionsmethode konnte eine zufriedenstellende Depletion und anschließende Auflösung des Pferdeserums erreicht werden (Abb. 4.2.2.1). Die Selektivität der Depletionsmethode für Pferdeserum wurde überprüft. In dem zweidimensional aufgetrennten Eluat konnten

neun von den zwölf Proteinen, die mittels der Säule entfernt werden sollen, nachgewiesen werden, aber es konnten keine Proteine nachgewiesen werden, die durch unspezifische Bindungen entfernt wurden (Abb. 4.2.2.1 und Tab. 4.2.2.1.1). Um alle Proben unter gleichen Bedingungen zu depletieren, wurde für die Depletion eine Säule verwendet und immer zwischen den Proben von gesunden und erkrankten Tieren abgewechselt. Die Reproduzierbarkeit der Depletionseffizienz für jede einzelne Probe wurde durch die Auftrennung aller Proben mittels eindimensionaler Gelelektrophorese und anschließender Quantifizierung der Albuminbanden überprüft (Kap. 3.6 und Abb. 4.2.2.2.1). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Depletionseffizienz von 55% für Pferdealbumin festgestellt werden (Abb. 4.2.2.2.1). Die Entfernung von Albumin ermöglichte eine höhere Auflösung der Probe, d.h. es sind bei der anschließenden zweidimensionalen Auftrennung der depletierten Probe zusätzliche Spots aufgetreten (Abb. 4.2.2.1 b).

Bei einer entsprechenden Überprüfung dieser Depletionsmethode mit humanem Plasma mit gespikten Proben wurde eine hohe Reproduzierbarkeit und Selektivität nachgewiesen und die Anwendung für quantitativ vergleichende Proteomanalysen als für geeignet erklärt (Liu *et al.* 2006). Eine erfolgreiche Anwendung der Serumdepletion mittels polyklonaler Hühner-Antikörper konnte für die Anwendung bei Ratten-, Maus-, Ziegen- und Schweineserum gezeigt werden (Huang *et al.* 2006; Linke *et al.* 2006; Huang *et al.* 2005). Bei der Depletion von Mäuseserum konnte eine Effizienz von 50% mittels polyklonalen IgY-Hühner-Antikörpern nachgewiesen werden (Huang *et al.* 2005).

Obwohl die Notwendigkeit der Depletion der abundanten Serumproteine naheliegend ist, sind die Bedenken groß, durch die Depletion wichtige Proteine zu verlieren (Issaq *et al.* 2007; Tirumalai *et al.* 2003). Einerseits wird ein Verlust von Proteinen durch unspezifische Bindungen der Proteine bei der Depletion vermutet. In einer Untersuchung konnte bei LPS-stimulierten Blutproben durch die Depletion von Albumin mittels Cibacron blue, einem Farbstoff, ein deutlicher Verlust von Zytokinen festgestellt werden (Granger *et al.* 2005). Bei einer anderen Untersuchung konnte die Entfernung von unspezifisch gebundenen Proteinen bestätigt werden, jedoch nur im Fall der Entfernung von Albumin durch die Bindung an Cibacron blue und nicht bei der Entfernung mittels polyklonaler Hühner-Antikörper (Hinerfeld *et al.* 2004). Andererseits gibt es die Hypothese, dass die abundanten Serumproteine, im besonderen Albumin, als Transportprotein für niedrig molekulare Proteine oder

Spaltprodukte fungieren (Oetl and Stauber 2007) und mit der Entfernung von Albumin auch diese Proteine entfernt werden (Lowenthal *et al.* 2005; Tirumalai *et al.* 2003).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Auflösung des Pferdeserums mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese sowohl bei den Vollseren (Abb. 4.3.1.2), als auch bei den depletierten Seren (Abb. 4.4.1.2) sehr gut war. Beide Experimente durchzuführen hat sich als richtig erwiesen, da in beiden Experimenten unterschiedliche Kandidaten gefunden wurden (Tab. 4.3.2.1.2 und Tab. 4.4.2.1.2). In dem Vollserumexperiment und in dem Experiment mit depletiertem Serum, konnten jeweils zehn differenziell exprimierte Proteine identifiziert werden (Abb. 4.3.2.1.1 und Abb. 4.4.2.1.1). Dabei wurden drei Proteine in beiden Experimenten identifiziert und das Expressionsmuster dieser drei Proteine zeigte in beiden Experimenten den gleichen Verlauf. Insgesamt war das Expressionsverhalten aller identifizierten Kandidaten sehr homogen. Die meisten Kandidaten waren in allen fünf der untersuchten Seren vorhanden und zeigen für die entsprechenden Kandidaten in den verschiedenen Seren ein einheitliches Expressionsmuster.

Einen großen Fortschritt für die Proteinidentifikation hat die Freistellung der Pferdedatenbank gebracht (<http://www.genome.uscs.edu>). Die meisten Proteine in diesem Projekt konnten nur mittels dieser Datenbank identifiziert werden. Dennoch konnten im Vollserumexperiment von 83 differenziell exprimierten Proteinen 66 und im depletierten Serum von 34 differenziell exprimierten Proteinen 19 Proteine nicht identifiziert werden. Besonders durch die sensitive Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen ist bei einigen Spots wahrscheinlich die Proteinmenge für eine massenspektrometrische Identifikation zu gering. Dies bestätigt Hortin, da die meisten Proteine die im Serum identifiziert werden in Konzentrationen im Bereich von  $\mu\text{mol/l}$  vorkommen (Hortin 2006). Nur mit der Anwendung von speziellen Präfraktionierungsmethoden können entsprechende Proteine angereichert und identifiziert werden (Hortin 2006; Pieper *et al.* 2003). Mit speziellen Präfraktionierungsmethoden gelang es Pieper *et al.* Proteine wie IL-6, Cathepsine und Peptidhormone die in Konzentrationen unter 10 ng/ml vorkommen zu identifizieren (Pieper *et al.* 2003). In dieser Arbeit konnten ungefähr 25% Proteine erst durch Spiken, d.h. nach der Beladung der IPG-Streifen mit einer Proteinmenge von bis zu 1 mg identifiziert werden. Für manche Spots hat diese Methode immer noch nicht ausgereicht. Obwohl die Depletion des Serums mittels der polyklonalen

Hühnerantikörper schon sehr zufriedenstellend war, besteht die Hoffnung mit der Entwicklung noch spezifischerer Methoden für Pferdeserum Proteine mit geringerer Konzentration noch effektiver anzureichern, um sie dann identifizieren zu können. Ein weiterer Grund für die noch nicht identifizierten Proteine liegt eventuell an den nicht vollständigen Einträgen in der Pferdedatenbank, sowie an verbliebenen Fehlern in dieser Datenbank. Die erhaltenen Massedaten der Proteine, die keine signifikanten Identifikationen ergeben haben, werden in Zukunft weiterhin mit der aktualisierten Pferdedatenbank abgeglichen.

Vergleichende Serumproteomanalysen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese bei Tieren finden bislang wenig Anwendung (Pubmedrecherche, Stand März 2008). Bei den Modelltieren Ratte und Maus gibt es einige Serumproteomuntersuchungen zu Tumorerkrankungen und Entzündungen (Chatterji and Borlak 2007; Li *et al.* 2007a; Li *et al.* 2007b; Ren *et al.* 2007; Duan *et al.* 2005) und der Auswirkung bestimmter Medikamente (Guipaud *et al.* 2007; Santos-Gonzalez *et al.* 2007; Merrick *et al.* 2006). Beim Rind gibt es zwei Untersuchungen bezüglich der Veränderung des Serumproteinmusters während der Trächtigkeit (Cairolì *et al.* 2006), Stress und viraler Infektionen (Aich *et al.* 2007). Für das Pferd konnte eine vergleichende Serumproteomanalyse bei Fohlen mit Magenulcus gefunden werden (Taharaguchi *et al.* 2007). In dieser Untersuchung wurde eine Isoform von Alpha-1-Antitrypsin als potenzieller Marker im Serum von Fohlen mit Magenulcus identifiziert. Die meisten publizierten Studien, die vergleichende Serumproteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese und 2D-DIGE durchführten, versuchten Biomarker für verschiedene Tumorerkrankungen in humanen Seren nachzuweisen (Dowling *et al.* 2007; Kakisaka *et al.* 2007; Maurya *et al.* 2007; Reymond and Schlegel 2007; Huang *et al.* 2006; Yu *et al.* 2005). In 20 verschiedenen Untersuchungen konnten bislang nur Proteine als potenzielle Marker identifiziert werden, die von abundanten Plasmaproteinen abgeleitet sind wie Apolipoprotein A-I und A-II, Komplementfaktor C3 und Fibrinogen (Hortin 2006). Nur in einigen wenigen Studien konnten Peptide, die in geringer Konzentration im Serum vorkommen als potenzielle Marker identifiziert werden (Sun *et al.* 2007; Rui *et al.* 2003). Im Serum von Patientinnen mit Brusttumoren wurden zwei differenziell exprimierte Proteine identifiziert. HSP27 war in den Seren der Tumorpatienten im Vergleich zu den gesunden Seren höher exprimiert, während 14-3-3-Sigma niedriger exprimiert war (Rui *et al.* 2003).

In dieser Arbeit konnten beim Vergleich des gesunden Vollserumproteoms mit dem von an ERU erkrankten Pferden 83 differenziell exprimierte Spots ermittelt werden (Tab. 4.3.2.3). Von diesen 83 Spots wurden 17 Spots massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) eindeutig identifiziert (Tab. 4.3.2.1.2). Diese 17 Identifikationen repräsentieren 10 verschiedene Proteine. Drei Proteine, nämlich Immunglobulin G 4 und 7 hc und IGLV3-25, waren in den ERU-Seren höher exprimiert, während sieben Proteine, Albumin, Vitamin D binding Protein, Antithrombin III, Komplementfaktor I Protein, Complement C4, Kininogen-1 und Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in den ERU-Seren im Vergleich zu den gesunden Kontrollseren niedriger exprimiert waren (Abb. 4.3.2.1.1). In dem Experiment mit den depletierten Seren wurden insgesamt 34 differenziell exprimierte Spots ermittelt (Tab. 4.4.2.3), von denen 15 massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) eindeutig identifiziert wurden (Tab. 4.4.2.1.2). Diese 15 identifizierten Spots repräsentieren 10 verschiedene Proteine. Fünf Proteine, Immunglobulin G 4 hc, Immunglobulin M, Serotransferrin, Komplementfaktor B und Alpha-2-HS-Glykoprotein waren in den ERU-Seren höher exprimiert, während die fünf Proteine Albumin, Immunglobulin G 5 hc, Apolipoprotein A-IV und H und Kininogen-1, in den ERU-Seren im Vergleich zu den gesunden depletierten Kontrollseren niedriger exprimiert waren (Abb. 4.4.2.1.1). Drei Proteine Albumin, Immunglobulin G 4 hc und Kininogen-1 wurden in beiden Experimenten identifiziert. Alle drei Proteine zeigen in beiden Experimenten das gleiche Expressionsverhalten.

Eine erniedrigte Expression zeigte Albumin (Abb. 4.3.2.1.1 und Abb. 4.4.2.1.1) in den Seren von an ERU erkrankten Pferden. Albumin ist das in größter Konzentration (35-50 mg/ml) vorkommende Plasmaprotein (Anderson and Anderson 2002). Albumin wird in der Leber synthetisiert und die Hauptfunktion besteht in der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Blut (<http://www.expasy.org/uniprot/P02768>). Zusätzlich besitzt es aber auch eine wichtige Transportfunktion für verschiedenste Moleküle (Oetli and Stauber 2007; Kragh-Hansen 1990). Die verringerte Expression von Albumin in den Seren von an ERU erkrankten Pferden könnte an dem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke und dem damit verbundenen Übertritt des Albumins in das Auge liegen. Im Glaskörper wie auch in der Retina konnte bei Pferden mit ERU im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine deutliche Zunahme von Albumin festgestellt werden (Deeg *et al.* 2007a; Hauck *et al.* 2007). Bei weiterführenden Untersuchungen sollte Albumin in seiner Funktion als

Transportprotein und damit die mit Albumin assoziierten Proteine untersucht werden. Bei einer Untersuchung von Seren von Patientinnen mit Ovarialtumoren konnte gezeigt werden, dass an Albumin Peptide gebunden sind, die als Marker genutzt werden können (Lowenthal *et al.* 2005). Die Protein-Protein Interaktion zwischen Albumin und den daran gebundenen Proteinen müssen für die Analyse aber speziell gelöst werden (Tirumalai *et al.* 2003).

Ein weiteres differenziell exprimiertes Protein war Serotransferrin (Abb. 4.4.2.1.1) (<http://www.expasy.org/uniprot/P02787>). Das Protein war in den Seren der an ERU erkrankten Pferde höher exprimiert im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Serotransferrin gehört zu den abundanten Plasmaproteinen (Anderson and Anderson 2002). Das Protein wird primär in der Leber synthetisiert. Die Hauptfunktion des Proteins besteht im Transport von Eisen (Putnam 1975). Außerdem ist Transferrin ein Wachstumsfaktor und spielt eine Rolle in der Zellproliferation (Gomme *et al.* 2005). Transferrin wird nicht nur für das normale Zellwachstum benötigt, sondern besonders bei einigen Tumorzelllinien, die eine hohe Proliferationsrate aufweisen zeigt sich seine Bedeutung für das Wachstum. Es konnte ein erhöhter Bedarf in Verbindung mit einer erhöhten Expression der Transferrinrezeptoren nachgewiesen werden (Zirvi 1991). Die Anwendung monoklonaler Antikörper gegen den Transferrinrezeptor konnte eine Hemmung bei der Tumorzellproliferation sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* bewirken (Whitcup and Nussenblatt 1997). Für das *in vitro* Wachstum von Lymphozyten wurde Serotransferrin als ein essenzieller Mediumbestandteil nachgewiesen (Tormey *et al.* 1972). Lum *et al.* zeigten, dass die T-Zellproliferation von dem Vorhandensein von Transferrin und IL-2 und der Expression der Rezeptoren abhängig ist, die auf ruhenden T-Lymphozyten nicht exprimiert sind. Transferrin und dessen Rezeptor sind in einen autokrinen Pfad, der funktionell mit IL-2 und seinem Rezeptor in Verbindung steht involviert (Lum *et al.* 1986). Zusätzlich konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass aktivierte T-Zellen Transferrin synthetisieren und sezernieren, wobei diese Funktion noch nicht geklärt ist (Lum *et al.* 1986; Soltys and Brody 1970). Da bei der ERU autoreaktive T-Zellen, die die Blut-Retina-Schranke überwinden eine zentrale Rolle spielen (Deeg *et al.* 2001) ist es interessant, dass ein Protein das für die T-Zellproliferation wichtig ist in den Seren der an ERU erkrankten Pferden erhöht vorkommt. In der Netzhaut von an ERU erkrankten Pferden konnte ebenfalls eine erhöhte Expression für Serotransferrin festgestellt werden (Hauck *et al.* 2007). Ob die erhöhte Expression

von Serotransferrin in der Netzhaut nur auf den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke zurückzuführen ist, oder auch mit der Aktivierung der T-Zellen in Verbindung steht ist noch unklar. Weiterführende Untersuchungen um den Zusammenhang von Transferrin und der T-Zellproliferation bei der ERU aufzuklären stehen noch aus.

Antithrombin III (ATIII) war in den uveitischen Seren niedriger exprimiert als in den gesunden Kontrollseren (Abb. 4.3.2.1.1) (<http://www.expasy.org/uniprot/P01008>). AT III ist der wichtigste Serinproteaseinhibitor, der die Gerinnungskaskade reguliert. Darüberhinaus werden aber immer mehr Funktionen für ATIII entdeckt, die nicht mit der Gerinnungskaskade in Verbindung stehen. Für ATIII konnten antiangiogenetische (O'Reilly 2007; O'Reilly *et al.* 1999) und antiinflammatorische Funktionen (Minnema *et al.* 2000; Dickneite and Leithauser 1999) nachgewiesen werden. Bei der Endotoxin induzierten Uveitis (EIU) der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Applikation von ATIII den Schweregrad der Erkrankung und die Infiltration des Glaskörpers mit Leukozyten deutlich verringerte (Yamashiro *et al.* 2001). Die Bedeutung der differenziellen Expression von ATIII bei der ERU ist noch unklar. Dass die unterschiedliche Expression ein Resultat der Gerinnung ist kann nicht ausgeschlossen werden, aber alle Proben wurden unter gleichen Bedingungen genommen und aufbereitet. Besonders die Funktion der antiinflammatorischen Wirkung von gereinigtem ATIII könnte eine äußerst interessante therapeutische Möglichkeit bei der ERU darstellen und sollte näher untersucht werden.

Im Vollserum war in allen ERU-Seren im Vergleich zu den gesunden Kontrollseren das Vitamin D binding Protein (DBP) niedriger exprimiert (Abb. 4.3.2.1.1). DBP wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert, aber auch von verschiedenen anderen Geweben (White and Cooke 2000). DBP kommt nicht nur im Plasma, sondern auch in der Cerebrospinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Speichel und der Milch vor (White and Cooke 2000). DBP ist ein multifunktionales Protein mit verschiedenen Funktionen, von denen einige noch nicht geklärt sind. Die Hauptfunktion von DBP (<http://www.expasy.org/uniprot/P05937>), auch Calbindin genannt ist der Transport von Vitamin D<sub>3</sub>, um den transzellulären Calciumtransport zu erleichtern. Neben den bekannten und gut beschriebenen Funktionen von DBP im Vitamin D Stoffwechsel, für die Knochenentwicklung, die Bindung von Fettsäuren und die Beseitigung von extrazellulärem Aktin, gibt es immer mehr Hinweise auf die Beteiligung von DBP an immunregulatorischen Prozessen (White and Cooke 2000). Es konnte gezeigt

werden, dass DBP verschiedene Zelltypen vor dem apoptotischen Zelltod schützt (Christakos and Liu 2004), bei der Makrophagenaktivierung eine wichtige Rolle spielt (Yamamoto *et al.* 1996; Yamamoto and Naraparaju 1996; Yamamoto *et al.* 1991) und chemotaktische Eigenschaften besitzt (Shah *et al.* 2006; Kew *et al.* 1995). Außerdem wurde gezeigt, dass DBP sich an membrangebundene Immunglobuline von B-Lymphozyten und darüber hinaus an den membrangebundenen IgG Fc Rezeptor von T-Lymphozyten bindet (Petrini *et al.* 1985). Die Autoren vermuten für DBP eine Vermittlerfunktion zwischen Membranglykoproteinen und spezifisch gebundenen Liganden mit dem Zytoskelett (Petrini *et al.* 1983). Neuere Untersuchungen weisen auf eine Verbindung des Genpolymorphismus von DBP mit IA-2 (Tyrosine phosphatase-like insolinoma associated protein-2) Autoantikörpern bei Typ-1 Diabetes hin (Ongagna *et al.* 2005). Eine erniedrigte Expression für DBP im Serum wurde bei Mäusen mit Lungentumoren beschrieben (Chatterji and Borlak 2007). Beim Menschen wird DBP als potenzieller Marker im Serum bei Prostata Tumoren beschrieben (Hlavaty *et al.* 2003). Eine Deglykosylierung von Serum DBP führte bei Tumorpatienten zur Immunsuppression (Yamamoto *et al.* 1996). Die Rolle von DBP bei der ERU ist noch unklar. Zunächst müssen die biologischen Pfade, in denen DBP involviert ist, beim Pferd genauer untersucht werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Glykosylierung von DBP in den Seren von an ERU erkrankten Pferden und gesunden Kontrollen auftreten. Dafür wäre eine proteomische Untersuchung mit IPG-Streifen geeignet, die die Probe im sauren pH-Bereich mehr aufspaltet, um zusätzlich Spots, die bei einer Glykosylierung auftreten zu lokalisieren.

In beiden Experimenten konnte eine differenzielle Expression für die drei Immunglobulin G Isotypen 4, 5 und 7 festgestellt werden (Abb. 4.3.2.1.1 und Abb. 4.4.2.1.1). Immunglobulin G gehört zu den abundanten Plasmaproteinen (Anderson and Anderson 2002). Anhand von molekularbiologischen Untersuchungen der Gene für die konstante Region der schweren Immunglobulinketten beim Pferd konnten sieben verschiedene Isotypen für IgG nachgewiesen werden (Wagner 2006; Wagner *et al.* 2004). Alle IGHG Gene sind exprimiert, was ihre funktionelle Relevanz impliziert. Die IGHG 4 und IGHG 7 Gene weisen eine hohe Homologie auf sowohl in der Nukleotid-, als auch in der Aminosäuresequenz (Wagner *et al.* 2004). Die Funktionen der verschiedenen Isotypen sind beim Pferd nicht genau bekannt. Interessanterweise ist der Isotyp IgG5 bei den ERU erkrankten Pferden niedriger

exprimiert während IgG4 und IgG7 höher exprimiert sind. Eine erhöhte Expression des Isotyps IgG4 konnte auch in Retinae von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen werden (Hauck *et al.* 2007). Aus Mausmodellen und beim Rind ist bekannt, dass die Zytokinexpressionsmuster der Th1 oder Th2 Immunantwort an bestimmte Immunglobulin G Isotypen gekoppelt sind (Estes and Brown 2002; Snapper *et al.* 1997; Stavnezer 1996). Bei *in vitro* Untersuchungen mit gereinigten bovinen B-Zellen konnte gezeigt werden, dass IL-4 die IgG1 Isotypenexpression induziert, während INF $\gamma$  eine IgG2 Isotypenexpression induziert (Estes and Brown 2002). Die Induktionsversuche mit verschiedenen retinalen Antigenen in komplettem Freundschem Adjuvans (FCA) bei der HEU haben gezeigt, dass diese zu einer Th1 Immunantwort führen und es konnte eine vermehrte Produktion des IgG4 Isotyps nachgewiesen werden, nicht aber des IgG5 Isotyps. Da die Spezifität der in dieser Arbeit identifizierten Isotypen im Serum nicht bekannt ist, kann keine Aussage bezüglich der ERU getroffen werden. Um die Spezifität der Isotypen zu bestimmen sollte mittels Western Blot überprüft werden ob in den Seren der spontan an Uveitis erkrankten Pferde vermehrt antiretinale IgG4 Autoantikörper auftreten. Einen kommerziellen sekundären Antikörper für den Isotypen IgG7 gibt es für das Pferd noch nicht. Die Kenntnis über die Spezifität der Antikörper ermöglicht es bei Typ 1 Diabetes ganz bestimmte Autoantikörper als prädiktive Marker zu nutzen bevor es zur klinischen Symptomatik der Erkrankung kommt (Christie *et al.* 1992; Thivolet *et al.* 1992). Die unterschiedliche Expression von verschiedenen Isotypen ist unter einem anderen Aspekt noch interessant. Bei der dilatativen Cardiomyopathie (DCM) und der rheumatoiden Arthritis wurden verschiedenste Autoantikörper identifiziert, allerdings wurde festgestellt, dass bestimmte Subklassen für die Progression der Erkrankung und den Schweregrad verantwortlich sind (Felix and Staudt 2006; Wong *et al.* 1994). Außerdem konnte bei DCM Patienten durch die Entfernung von IgG3 aus der Zirkulation mittels Immunadsorption eine deutliche hämodynamische Verbesserung erreicht werden, während die Entfernung anderer Subklassen keine Verbesserung zeigte (Staudt *et al.* 2005; Staudt *et al.* 2002). Über die Bedeutung der einzelnen Isotypen bei der Pathogenese der ERU gibt es noch keine Untersuchungen. In den uveitischen Seren konnte außerdem eine erhöhte Expression von Immunglobulin M im Vergleich zu den gesunden Kontrollseren festgestellt werden (Abb. 4.4.2.1.1). Immunglobulin M gehört zu den abundanten Plasmaproteinen (Anderson and Anderson 2002), wird von Plasmazellen der Milz, Lymphknoten und

des Knochenmarks produziert und ist typisch für eine primäre Immunantwort (Tizard 2004). Eine erhöhte Expression von Immunglobulin M in den Seren von an ERU erkrankten Pferden könnte mit gerade abgelaufenen Uveitisschüben in Verbindung stehen. Es gibt noch keine Untersuchungen bezüglich der IgM-Antwort bei der ERU oder HEU. Auch hier muss zunächst eine Überprüfung der Spezifität von IgM erfolgen.

In den depletierten Seren von an ERU erkrankten Pferden konnte eine erhöhte Expression von Alpha 2-HS-Glykoprotein (AHSG) festgestellt werden (Abb. 4.4.2.1.1). AHSG, auch Fetuin A genannt, gehört zur Cystatin Sperfamilie, wird in der Leber synthetisiert und besitzt sehr verschiedene Funktionen, von denen noch nicht alle gänzlich geklärt sind (<http://www.expasy.org/uniprot/P02765>). Das Protein übernimmt Aufgaben bei der Mineralisierung von Knochen. Des Weiteren besitzt AHSG eine Rolle als Proteaseinhibitor und es konnte eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität von Insulinrezeptoren bei Ratten nachgewiesen werden (Arnaud and Kalabay 2002). Außerdem spielt AHSG eine Rolle als Immunmodulator. Einerseits beeinflusst es die Immunantwort durch die Förderung der Phagozytose von apoptotischem Material durch Makrophagen (Lewis and Andre 1980). Andererseits konnten Wang et al. für ASHG zeigen, dass es kationische Makophagen-deaktivierende Moleküle opsoniert und die Sezernierung von Tumornekrosefaktor aus aktivierten Makophagen supprimiert (Wang *et al.* 1998; Wang *et al.* 1997). Eine weitere viel diskutierte Funktion von AHSG ist die als negatives Akute-Phase-Protein (Arnaud and Kalabay 2002; Lebreton *et al.* 1979; Koj 1974). ASHG als negatives Akute-Phase-Protein konnte mit einer reduzierten Expression im Serum bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Sato *et al.* 2007) und bei Patienten mit einem Lungen-Plattenepithelkarzinom festgestellt werden (Dowling *et al.* 2007). Dabei ist die verminderte Menge von ASHG im Serum durch bestimmte Zytokine kontrolliert, die direkt über den Promotor auf das Gen wirken (Daveau *et al.* 1988). Ob dieser Mechanismus beim Pferd auf Grund der entsprechenden Genhomologie entsprechend ablaufen kann ist nicht bekannt. Das Expressionsmuster von ASHG bei den untersuchen Seren von an ERU erkrankten Pferden spricht nicht für die Funktion als negatives Akute-Phase-Protein bei der ERU. Bei der Untersuchung von Plasma von SARS (Servere acute respiratory syndrom) Patienten mit 2D-DIGE konnte eine erhöhte Expression von ASHG festgestellt werden (Wan *et al.* 2006). Die erhöhte Expression in den Seren von an ERU erkrankten Pferden könnte mit der

Funktion von ASHG als Immunmodulator zusammenhängen und eine gegenregulatorische Antwort auf das abgelaufene Entzündungsgeschehen bedeuten. Von besonderem Interesse ist es zunächst das Expressionsverhalten von ASHG im Zielorgan der Erkrankung im Auge mittels immunhistochemischer Untersuchungen zu überprüfen. Außerdem erscheint es wichtig, die Rolle von ASHG als Immunmodulator bezüglich seiner Funktion auf Makrophagen beim Pferd genauer zu untersuchen.

In den depletierten Seren von an ERU erkrankten Pferden war Apolipoprotein A-IV (ApoA-IV) niedriger exprimiert im Vergleich zu den gesunden Kontrollseren (Abb. 4.4.2.1.1). ApoA-IV (<http://www.expasy.org/uniprot/P06727>) besitzt physiologisch im Plasma einen Konzentrationsbereich von 100-200 mg/l (Schwarz *et al.* 1994). Das Protein wird primär von Enterozyten des Dünndarms synthetisiert, verbindet sich mit Chylomikronen und wird in die Lymphe abgegeben (Green *et al.* 1980). Sobald ApoA-IV in Verbindung mit den Chylomikronen ins Plasma sezerniert wird dissoziieren die Verbindungen. Im Plasma kommt ApoA-IV sowohl in der Verbindung mit HDL (Lagrost *et al.* 1989), als auch frei vor (Utermann and Beisiegel 1979). Die Funktionen von ApoA-IV im Lipidmetabolismus und darüber hinaus sind noch nicht ausreichend bekannt. In Verbindung mit Augenerkrankungen konnte wiederum bei Patienten, die an diabetischer Retinopathie erkrankt waren eine reduzierte Expression von ApoA-IV im Glaskörper festgestellt werden, wobei die Bedeutung für die Erkrankung noch nicht geklärt ist (Kim *et al.* 2006). Bei der Untersuchung von Glaskörpern aus an ERU erkrankten Pferden konnte keine differenzielle Expression für ApoA-IV, sondern nur für ApoA-I festgestellt werden (Deeg *et al.* 2007a). Um zu klären welche Rolle ApoA-IV bei der ERU spielt, müssen die biologischen Pfade, in die das Protein involviert ist genauer untersucht werden.

Apolipoprotein H (ApoH) (<http://www.expasy.org/uniprot/P02749>) war in den depletierten Seren von an ERU erkrankten Pferden verringert (Abb. 4.4.2.1.1). ApoH, auch  $\beta$ -2-Glykoprotein 1 genannt, wird in der Leber und der Plazenta synthetisiert (Steinkasserer *et al.* 1991). ApoH stellt bei Säugetieren ein hochkonserviertes Protein dar (Sheng *et al.* 1997). Die genauen physiologischen Funktionen für ApoH sind noch nicht gänzlich geklärt (Miyakis *et al.* 2004). Im Plasma kommt es sowohl frei (70%), als auch in Verbindung mit Lipoproteinpartikeln (30%) vor (Polz and Kostner 1979). ApoH interagiert mit verschiedenen negativ geladenen Partikeln, wie Heparin, Dextran und anionische Phospholipiden, ist in die Gerinnungskaskade

sowohl als Aktivator, als auch als Inhibitor involviert und wird mit der Produktion von Autoantikörpern bei dem Antiphospholipidsyndrom in Verbindung gebracht (Miyakis *et al.* 2004). Des Weiteren wird für ApoH eine Funktion als negatives Akute-Phase-Protein (Sellar *et al.* 1993) und eine Rolle bei der Induktion der Makrophagenphagozytose diskutiert (Lee *et al.* 2000). Eine verringerte Expression von ApoH während einer Entzündung konnte *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (Sellar *et al.* 1993; Mehdi *et al.* 1991). *In vitro* wurde die Expression von ApoH durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 deutlich verringert. In Verbindung mit Augenerkrankungen konnte bei Patienten mit diabetischer Retiopathie eine erhöhte Expression von ApoH im Glaskörper beschrieben werden (Garcia-Ramirez *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu wurde bei der Untersuchung von Glaskörpern von Patienten mit Maculaödem im Vergleich zu gesunden Kontrollglaskörpern ApoH nur in den gesunden Glaskörpern gefunden (Ouchi *et al.* 2005). Bei der ERU wurde ApoH noch nicht beschrieben. In weiterführenden Untersuchungen sollte das Expressionsverhalten von ApoH im Auge bei Uveitis und gesunden Kontrollen mittels immunhistochemischer Methoden verglichen werden. Zusätzlich muss die Funktion von ApoH als negatives Akute-Phase-Protein beim Pferd näher untersucht werden. Dafür könnten Verlaufsuntersuchungen der Serumkonzentration von ApoH während und nach einem Entzündungsschub bei spontan erkrankten Tieren aufschlussreich sein.

Ein weiteres, in beiden Experimenten identifiziertes Protein, das in den uveitischen Seren niedriger exprimiert war, ist High molecular-weight Kininogen-1 (HK) (Abb. 4.3.2.1.1 und Abb. 4.4.2.1.1). HK (<http://www.expasy.org/uniprot/P01042>) ist ein Glykoprotein bestehend aus sechs Domänen, das in der Leber synthetisiert wird und beim Menschen in einer Konzentration von 80  $\mu\text{g/ml}$  im Plasma vorkommt (Guo *et al.* 2002). HK interagiert mit verschiedensten Zellen. Wenn HK an Endothelzellen gebunden ist, kann durch Plasmakallikrein die Domäne 4, die Bradykinin entspricht, abgespalten werden. Das übrige Spaltungsprodukt wird als Kininostatin (HKa) bezeichnet. HKa besteht aus einer leichten (Domäne 1-3) und einer schweren Kette (Domäne 5-6), die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die Abspaltung von Domäne 4 ist mit einer Konformationsänderung des verbleibenden Moleküls verbunden, die eine Freilegung der Domäne 5 zur Folge hat (Guo *et al.* 2002). Die Domäne 5 des neuen HKa wird für ganz neue Funktionen verantwortlich gemacht. Für HKa konnten antiangiogenetische Eigenschaften und die Inhibition der

Zellproliferation und –migration nachgewiesen werden (Zhang *et al.* 2002; Colman *et al.* 2000). Ob die verringerte Expression von HK die Zellproliferation und –migration während der ERU beeinflusst muss noch geklärt werden. Zur weiteren Klärung der Bedeutung von HK bei der ERU muss das Vorkommen von HK und HKa im Auge mittels immunhistochemischer Methoden untersucht werden.

Eine differenzielle Expression konnte des Weiteren für die Komplementfaktoren C1, B und C4 festgestellt werden (Abb. 4.3.2.1.1 und Abb. 4.4.2.1.1). Alle Faktoren sind Teil des Komplementsystems, einem wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Die Komplementfaktoren gehören zu den abundanten Plasmaproteinen (Anderson and Anderson 2002). Die Komplementfaktoren werden hauptsächlich in der Leber synthetisiert (Whaley and Schwaeble 1997), aber auch von Makrophagen (Hartung and Hadding 1983). Das Komplementsystem besteht aus löslichen Proteinen und Oberflächenproteinen, die eine zentrale Rolle bei der Abwehr gegen Infektionen, der Regulation der antigenspezifischen Immunantwort und Entzündungsreaktionen spielen (Frank and Fries 1991; Reid 1986). Die Komplementkaskade kann über drei unterschiedliche Wege aktiviert werden: den klassischen Weg, den alternativen Weg oder den Lektin Weg. Komplementfaktoren und die entsprechenden gegenregulierenden Proteine sind im gesunden Auge exprimiert und wesentlich an dessen Schutz und der Aufrechterhaltung des immunprivilegierten Status beteiligt (Sohn *et al.* 2003; Sohn *et al.* 2000; Bora *et al.* 1993). Es ist bekannt, dass ein Missverhältnis zwischen Aktivierung des Komplementsystems und der Gegenregulierung durch komplementregulierende Proteine an der Pathologie verschiedener Augenerkrankungen wie Keratitis, Uveitis und der altersabhängigen Makuladegeneration beteiligt (AMD) ist (Bora *et al.* 2008). Bei der EAAU der Ratte konnte gezeigt werden, dass bei komplementdepletierten Ratten im Vergleich zu den normalen Lewisratten der Krankheitsverlauf, -dauer und –schwere wesentlich geringer war (Jha *et al.* 2006). Die Aktivierung des Komplementsystems wurde durch den Nachweis des Spaltprodukts iC3b mittels Westernblots überprüft. Dies verdeutlichte die Beteiligung des lokalen Komplementsystems an dem Entzündungsgeschehen. Es ist aber noch nicht geklärt, ob der Anstieg der Komplementfaktoren bei der EAAU lokal stattfindet oder aus der Zirkulation stammt (Bora *et al.* 2008). Die bedeutende Rolle des Komplementsystems konnte auch bei der EAU und EIU gezeigt werden. Bei der EIU wurde für die verschiedenen Komplementfaktoren C1q, C3 und C4 eine erhöhte

Expression während der Entzündung in verschiedenen Bereichen des Auges nachgewiesen (Montalvo *et al.* 2007). Bei der EAU konnten Read *et al.* zeigen, dass transgene Mäuse, die das lösliche komplementregulierende Protein sCrry in der Retina exprimieren, eine geringe Krankheitsinzidenz und –schwere aufwiesen (Read *et al.* 2006). Die Beteiligung des Komplementsystems im Auge konnte auch schon bei der ERU nachgewiesen werden. In den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden wurde eine deutlich erhöhte Expression des Komplementfaktors C3 im Vergleich zu den gesunden Kontrollglaskörpern nachgewiesen (Deeg *et al.* 2007a). Aber nicht nur die Aktivierung des Komplementsystems, sondern auch bestimmte Genvarianten der Komplementfaktoren werden in Verbindung mit gewissen Augenkrankheiten gebracht. Bei der AMD konnten ein Risikoallel und zwei protektive Allele für den Komplementfaktor B und C2 identifiziert werden (Maller *et al.* 2006; Gold *et al.* 2006). Eine besonders bedeutende Allelvariante wurde für den Faktor H bei der AMD entdeckt. Der Polymorphismus der diese Variante verursacht resultiert in dem Austausch von Tyrosin mit Histidin an Position 402. Die höchste Risikogruppe, d.h. diejenigen die homozygot Histidin in der Position 402 besitzen haben ein 5-7 fach höheres Risiko an AMD zu erkranken (Hageman *et al.* 2005; Haines *et al.* 2005; Klein *et al.* 2005). Dies verdeutlicht die Bedeutung von Genpolymorphismen der Komplementfaktoren für die Krankheitsprädisposition. Bei der ERU gibt es noch keine Untersuchungen von Genvariationen bezüglich der Krankheitsprädisposition. Die Identifizierung der Komplementfaktoren C1 und C4 in den Seren weist auf die Beteiligung des klassischen Wegs hin, der identifizierte Komplementfaktor B dagegen ist Bestandteil des alternativen Weges. Einen Hinweis auf die Beteiligung des Lektinweges bei der ERU gibt es damit noch nicht. Die Komplementfaktoren C1 und C4 sind in den Seren von an ERU erkrankten Pferden niedriger exprimiert im Vergleich zu den gesunden Kontrollseren. Aus Untersuchungen der Humanmedizin ist bekannt, dass Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) erniedrigte Serumwerte für bestimmte Komplementfaktoren aufweisen. Es konnte festgestellt werden, dass eine Defizienz der Komplementfaktoren des klassischen Wegs (C1q, C4 und C2) mit der Empfänglichkeit SLE zu entwickeln, assoziiert ist (Truedsson *et al.* 2007). Diese verschiedenen Untersuchungen verdeutlichen, dass das Komplementsystem bei der Uveitis eine bedeutende Rolle spielen könnte und die Komponenten, die die Komplementkaskade auslösen bzw. die entsprechenden gegenregulatorischen Komponenten genauer bestimmt werden müssen. Die

Tatsache, dass bestimmte komplementregulatorische Proteine die Entzündungsreaktionen im Auge unterbinden können unterstreicht deren Bedeutung und stellt eine interessante Möglichkeit für therapeutische Ansätze dar.

In dem Vollserumexperiment konnte eine erniedrigte Expression für das Protein PEDF bei den an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (Abb. 4.3.2.1.1). PEDF gehört zur Familie der Serine Protease Inhibitoren (<http://www.expasy.org/uniprot/P36955>) (Steele *et al.* 1993). Das Protein kommt physiologischerweise im Auge (Karakousis *et al.* 2001), Gehirn, Rückenmark, den meisten Geweben (Tombran-Tink *et al.* 1996) und im Plasma (Petersen *et al.* 2003) vor. Es hat neurotrophe und neuroprotektive Funktionen und gilt als potenter Angiogeneseinhibitor (Dawson *et al.* 1999; Steele *et al.* 1993). Zusätzlich werden PEDF antiinflammatorische und antivasopermeable Eigenschaften zugeschrieben (Zhang *et al.* 2006). Bei der EIU der Ratte konnte sowohl in der Retina, als auch im Plasma eine erniedrigte Expression von PEDF nachgewiesen werden. Gleichzeitig waren die proinflammatorischen Zytokine Monozyten chemoattraktives Protein-1 (MCP-1) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowohl in der Retina, als auch im Plasma deutlich erhöht. Obwohl die Mechanismen für die Erniedrigung des PEDF bei Entzündungen noch unbekannt sind, legen sie nahe, dass PEDF ein negatives Akute-Phase-Protein ist (Zhang *et al.* 2006). Die systemische verringerte Expression von PEDF kann ein Grund für die Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens bei der ERU sein. Bei der Untersuchung von humanem Plasma konnte PEDF in einer Konzentration von 100 nM (5  $\mu$ g/ml) gemessen werden, die ausreichend für eine funktionelle Aktivität des Proteins in der Zirkulation ist (Petersen *et al.* 2003). Eine erniedrigte PEDF Expression im Serum wurde bereits im Zusammenhang mit Uveamelanomen beobachtet (Pardo *et al.* 2007). Die Bedeutung von PEDF bei der ERU konnte schon bei der Untersuchung von Glaskörpermaterial von an ERU erkrankten Pferden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Deeg *et al.* 2007a). PEDF war in den Glaskörpern der an ERU erkrankten Pferde deutlich niedriger exprimiert, als in den gesunden Kontrollglaskörpern. Die erniedrigte PEDF Expression konnte histologisch auch in der Retina bestätigt werden. Gleichzeitig mit der reduzierten PEDF Expression konnte eine erhöhte Expression von VEGF festgestellt werden (Deeg *et al.* 2007a). Die verringerten PEDF-Spiegel im Auge bei der ERU tragen vermutlich zu dem Entzündungsgeschehen und in Verbindung mit der erhöhten VEGF Expression zum

Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke im Verlauf der Erkrankung bei. Bei weiterführenden immunhistochemischen Untersuchungen der Retina konnte in aktivierten Müller Gliazellen von an ERU erkrankten Pferden eine Expression des proinflammatorischen Zytokins INF $\gamma$  festgestellt werden, jedoch nicht in den Gliazellen der gesunden Kontrollretinae (Hauck *et al.* 2007). In denselben Zellen wurden gleichzeitig deutlich reduzierte PEDF Spiegel gefunden. Der Nachweis der reduzierten PEDF Expression im Glaskörper, der Retina und auch im Serum von an ERU erkrankten Pferden zeigt, dass die verringerte PEDF Expression während einer Entzündung nicht nur auf das Auge beschränkt ist. Bei der EIU der Ratte konnte die erniedrigte PEDF Expression nur auf Proteinebene nachgewiesen werden, was eine Regulation des Proteins auf translationaler oder posttranslationaler Ebene vermuten lässt (Zhang *et al.* 2006). Die Untersuchung von gereinigtem Plasma PEDF bestätigt das Vorkommen von posttranslationalen Modifikationen und postuliert deren funktionelle Bedeutung nach der Sekretion des Proteins (Petersen *et al.* 2003). Weiterführende Untersuchungen bezüglich der posttranslationalen Modifikationen von PEDF und ihrer funktionellen Bedeutung bei der ERU stehen noch aus. Erste Hinweise bei Untersuchungen mittels Western Blot auf posttranslationale Modifikationen durch das Auftreten einer unterschiedlichen Anzahl von Spots für PEDF in den Seren gibt schon. Des Weiteren erscheint es wichtig, einen möglichen Zusammenhang zwischen der erniedrigten PEDF Expression und der gleichzeitig erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ ) im Serum zu untersuchen. Außerdem könnte die Wirkung auf das Entzündungsgeschehen durch die systemische Applikation von PEDF vor und während eines Entzündungsschubs bei der HEU oder ERU überprüft werden. Durch die intravitreale Injektion von PEDF bei der sauerstoffinduzierten Retinopathie der Ratte konnte eine Reduktion der Entzündungsfaktoren wie ICAM-1, TNF- $\alpha$  und VEGF bewirkt werden (Zhang *et al.* 2006).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 2D-DIGE eine geeignete Methode ist, um Unterschiede in der Proteinexpression in Seren von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrollseren zu detektieren. Mittels der 2D-DIGE Technologie konnten insgesamt 117 differenziell exprimierte Spots im Serum lokalisiert werden. Davon wurden 17 differenziell exprimierte Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert, wovon einige in Verbindung mit der ERU noch nicht beschrieben wurden. Die identifizierten Proteine müssen nun auf ihre

Bedeutung bei der ERU überprüft und auf ihre Verwertbarkeit als prädiktive Marker validiert werden. Die noch nicht identifizierten differenziell exprimierten Spots stellen noch ein grosses Reservoir für weitere potenzielle Marker dar. Mit der voranschreitenden Entwicklung der Depletionsmethoden für Serum verschiedener Säugetierspezies und dem Ausbau der Pferdedatenbank stellt die vergleichende Serumproteomanalyse in Verbindung mit der Massenspektrometrie eine vielversprechende Methode zur Identifizierung von Markern zur Diagnosestellung, der Aufklärung der Pathogenese und für die Entwicklung therapeutischer Ansätze nicht nur bei der ERU dar.

## 6 Zusammenfassung

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine schubweise auftretende Augenentzündung, die 10% der Pferdepopulation betrifft. Die Entzündungsschübe führen im Verlauf der Erkrankung zur Erblindung des Pferdes. Die intraokuläre Entzündung ist durch autoreaktive T-Zellen gekennzeichnet. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind weder die Ätiologie noch die Pathogenese dieser häufigen Erkrankung bislang eindeutig geklärt.

Das Blut zirkuliert ständig im Körper und spiegelt dessen Zustand sehr genau wider. Deshalb stellt das Serum-/Plasmaproteom eine sehr vielversprechende Probe zur Entdeckung von Biomarkern dar, obwohl die Komplexität und enorme dynamische Bandbreite der Probe hohe Ansprüche an die Aufbereitungsmethode stellt. Die Unterschiede der Proteine im Serum bezüglich ihrer Menge, Struktur und Funktion können Hinweise auf pathologische Prozesse liefern.

Ziel dieser Arbeit war es, durch quantitative Serumproteomanalyse mittels 2D-DIGE, Seren von an ERU erkrankten Pferden mit gesunden Kontrollseren zu vergleichen und differenziell exprimierte Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren.

Die Serumproben wurden vor der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um einen direkten quantitativen Vergleich der Proteine zu ermöglichen. Es wurde ein Experiment mit Vollserum und ein Experiment mit depletiertem Serum mit jeweils fünf Seren von an ERU erkrankten Pferden und fünf Kontrollseren durchgeführt. Die Serumdepletion der abundanten Serumproteine erfolgte mittels polyklonaler, an Trägerkugeln gekoppelter Hühnerantikörper. Insgesamt wurden 117 differenziell exprimierte Protein-Spots gefunden, von denen 32 Spots eindeutig massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF) identifiziert wurden. Die 32 identifizierten Spots repräsentieren 17 verschiedene Proteine. Sieben der Proteine, nämlich Immunglobulin G4 und 7 hc, IGLV3-25, Immunglobulin M, Komplementfaktor B, Serotransferrin und Alpha-2HS-Glykoprotein waren in den ERU Seren deutlich höher exprimiert als in den gesunden Kontrollseren. Die anderen zehn Proteine, Pigment epithelium-derived factor (PEDF), Komplementfaktor 1 und C4, Kininogen-1, Apolipoprotein H und A-IV, Immunglobulin G5 hc, Albumin, Vitamin D binding Protein und Antithrombin III waren in den Seren von an ERU erkrankten Pferden niedriger exprimiert. Einige der differenziell exprimierten Proteine stehen funktionell mit dem Immunsystem und

Entzündungsprozessen in Verbindung. Alle hier identifizierten differenziell exprimierten Proteine wurden bislang noch nicht im Serum von ERU oder humaner Uveitis beschrieben und sind damit potenzielle Kandidaten, die zur Aufklärung der Pathogenese auf molekularer Ebene beitragen oder als Marker fungieren können. Darüber hinaus stimmt die verringerte Expression von PEDF im Serum mit dem Expressionsmuster des Proteins im Zielorgan der Erkrankung, dem Auge, bei an ERU erkrankten Pferden überein. Da PEDF nun in dieser Studie auch in der Peripherie der erkrankten Tiere signifikant erniedrigt gefunden wurde, ist PEDF ein vielversprechender Marker. Es bedarf weiterer Validierung, um zu prüfen, ob PEDF als diagnostischer Marker genutzt werden kann.

## 7 Summary

Equine recurrent uveitis (ERU) is a relapsing inflammation of the inner eye, which affects up to 10% of the equine population. In the course of disease, the relapsing inflammatory attacks lead to blindness in horses. The intraocular inflammation is characterized by autoreactive T-cells. In spite of numerous studies neither the etiology, nor the pathogenesis of this frequently occurring disease are fully understood so far.

Blood circulates perpetually through the body and represents its condition very precisely. Therefore the plasma-/serumproteome constitutes a promising sample for the discovery of biomarkers, although the complexity and enormous dynamic range puts high demands on the method of preparation. The differences of proteins in serum regarding their abundance, structure and function can give hints to pathological processes.

The goal of this study was to compare sera of ERU-diseased horses and healthy controls, by the use of quantitative serumproteome analysis with 2D-DIGE, and to identify differentially expressed proteins by mass spectrometry.

The samples were labeled with different fluorescence dyes prior to two-dimensional gelelectrophoresis to perform direct quantitative analysis of the proteins afterwards. One experiment with serum and one experiment with depleted serum were performed including five sera of ERU-diseased horses and five healthy controls each. The serum depletion of abundant proteins was accomplished by polyclonal avian antibodies immobilized on resin.

Overall, 117 differentially expressed protein spots were identified. 32 of those spots could be identified unambiguously by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). The 32 identified spots represent 17 different proteins. Seven proteins, namely immunoglobulin G4 and 7 hc, IGLV3-25, immunoglobulin M, complementfactor B, serotransferrin, and alpha-2HS-glycoprotein were upregulated in the sera of ERU diseased horses compared to the healthy controls. The other ten proteins, pigment epithelium-derived factor (PEDF), complementfactor 1 and C4, kininogen-1, apolipoprotein H and A-IV, immunoglobulin G5 hc, albumin, vitamin D binding protein (DBP) and Antithrombin III were downregulated in the sera of ERU-diseased horses. Most of the proteins are functionally related to immune response and inflammation. All of the differentially expressed proteins identified have not been described in sera

of ERU or human uveitis and can be considered as potential markers, who can contribute to elucidate the pathogenesis on molecular basis or serve as biomarkers. Furthermore is the downregulated expression of PEDF in sera consistent with the expression pattern in the target organ, the eye, in ERU-diseased horses. Since PEDF was found to be significantly downregulated in the periphery in this study it seems to be a promising marker. Further validation is needed to prove, whether PEDF can serve as diagnostic marker.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aich, P., Jalal, S., Czuba, C., Schatte, G., Herzog, K., Olson, D.J., Ross, A.R., Potter, A.A., Babiuk, L.A. and Griebel, P. (2007). Comparative approaches to the investigation of responses to stress and viral infection in cattle. *OMICS* 11, 413-434.
- Alban, A., David, S.O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S. and Currie, I. (2003). A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 3, 36-44.
- Anderson, L. and Seilhamer, J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18, 533-537.
- Anderson, N.L. and Anderson, N.G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1, 845-867.
- Anderson, N.L., Polanski, M., Pieper, R., Gatlin, T., Tirumalai, R.S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Adkins, J.N., Pounds, J.G., Fagan, R. and Lobley, A. (2004). The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics* 3, 311-326.
- Arnaud, P. and Kalabay, L. (2002). Alpha2-HS glycoprotein: a protein in search of a function. *Diabetes Metab Res Rev* 18, 311-314.
- Becker, M.D., Adamus, G., Davey, M.P. and Rosenbaum, J.T. (2000). The role of T cells in autoimmune uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 8, 93-100.
- Bora, N.S., Gobleman, C.L., Atkinson, J.P., Pepose, J.S. and Kaplan, H.J. (1993). Differential expression of the complement regulatory proteins in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 3579-3584.
- Bora, N.S., Jha, P. and Bora, P.S. (2008). The role of complement in ocular pathology. *Semin Immunopathol*. Epub ahead of print. PMID: 18299835.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brandes, K., Wollanke, B., Niedermaier, G., Brem, S. and Gerhards, H. (2007). Recurrent uveitis in horses: vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospire. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54, 270-275.
- Cairolì, F., Battocchio, M., Veronesi, M.C., Brambilla, D., Conserva, F., Eberini, I., Wait, R. and Gianazza, E. (2006). Serum protein pattern during cow pregnancy: Acute-phase proteins increase in the peripartum period. *Electrophoresis* 27, 1617-1625.

- Carrette, O., Burkhard, P.R., Sanchez, J.C. and Hochstrasser, D.F. (2006). State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nat Protoc* 1, 812-823.
- Caspi, R.R., Roberge, F.G., Chan, C.C., Wiggert, B., Chader, G.J., Rozenszajn, L.A., Lando, Z. and Nussenblatt, R.B. (1988). A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 140, 1490-1495.
- Caspi, R.R. (1999). Immune mechanisms in uveitis. *Springer Semin Immunopathol* 21, 113-124.
- Caspi, R.R. (2006). Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev* 213, 23-35.
- Chan, C.C., Mochizuki, M., Palestine, A.G., BenEzra, D., Gery, I. and Nussenblatt, R.B. (1985). Kinetics of T-lymphocyte subsets in the eyes of Lewis rats with experimental autoimmune uveitis. *Cell Immunol* 96, 430-434.
- Chatterji, B. and Borlak, J. (2007). Serum proteomics of lung adenocarcinomas induced by targeted overexpression of c-raf in alveolar epithelium identifies candidate biomarkers. *Proteomics* 7, 3980-3991.
- Christakos, S. and Liu, Y. (2004). Biological actions and mechanism of action of calbindin in the process of apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 401-404.
- Christie, M.R., Tun, R.Y., Lo, S.S., Cassidy, D., Brown, T.J., Hollands, J., Shattock, M., Bottazzo, G.F. and Leslie, R.D. (1992). Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64K antigen as distinct markers for development of IDDM. Studies with identical twins. *Diabetes* 41, 782-787.
- Colman, R.W., Jameson, B.A., Lin, Y., Johnson, D. and Mousa, S.A. (2000). Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood* 95, 543-550.
- Cook, P.R.L., Harling D.E. (1983). Equine recurrent uveitis. *Equine Vet J Suppl.* 15, 57-60.
- Daveau, M., Christian, D., Julen, N., Hiron, M., Arnaud, P. and Lebreton, J.P. (1988). The synthesis of human alpha-2-HS glycoprotein is down-regulated by cytokines in hepatoma HepG2 cells. *FEBS Lett* 241, 191-194.
- Dawson, D.W., Volpert, O.V., Gillis, P., Crawford, S.E., Xu, H., Benedict, W. and Bouck, N.P. (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285, 245-248.
- de Kozak, Y., Sakai, J., Thillaye, B. and Faure, J.P. (1981). S antigen-induced experimental autoimmune uveo-retinitis in rats. *Curr Eye Res* 1, 327-337.

- de Smet, M.D. and Chan, C.C. (2001). Regulation of ocular inflammation--what experimental and human studies have taught us. *Prog Retin Eye Res* 20, 761-797.
- Deeg, C.A., Kaspers, B., Gerhards, H., Thurau, S.R., Wollanke, B. and Wildner, G. (2001). Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 393-398.
- Deeg, C.A., Ehrenhofer, M., Thurau, S.R., Reese, S., Wildner, G. and Kaspers, B. (2002a). Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* 75, 127-133.
- Deeg, C.A., Thurau, S.R., Gerhards, H., Ehrenhofer, M., Wildner, G. and Kaspers, B. (2002b). Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* 32, 2598-2606.
- Deeg, C.A., Reese, S., Gerhards, H., Wildner, G. and Kaspers, B. (2004). The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2286-2292.
- Deeg, C.A., Amann, B., Raith, A.J. and Kaspers, B. (2006a). Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 652-656.
- Deeg, C.A., Pompetzki, D., Raith, A.J., Hauck, S.M., Amann, B., Suppmann, S., Goebel, T.W., Olazabal, U., Gerhards, H., Reese, S., Stangassinger, M., Kaspers, B. and Ueffing, M. (2006b). Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 5, 1462-1470.
- Deeg, C.A., Altmann, F., Hauck, S.M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M. and Ueffing, M. (2007a). Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* 7, 1540-1548.
- Deeg, C.A., Hauck, S.M., Amann, B., Kremmer, E., Stangassinger, M. and Ueffing, M. (2007b). Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Mol Immunol* 44, 3291-3296.
- Dickneite, G. and Leithauser, B. (1999). Influence of antithrombin III on coagulation and inflammation in porcine septic shock. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1566-1572.
- Domon, B. and Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312, 212-217.
- Donoso, L.A., Merryman, C.F., Sery, T.W., Shinohara, T., Dietzschold, B., Smith, A. and Kalsow, C.M. (1987). S-antigen: characterization of a pathogenic epitope which mediates experimental autoimmune uveitis and pinealitis in Lewis rats. *Curr Eye Res* 6, 1151-1159.

- Dowling, P., O'Driscoll, L., Meleady, P., Henry, M., Roy, S., Ballot, J., Moriarty, M., Crown, J. and Clynes, M. (2007). 2-D difference gel electrophoresis of the lung squamous cell carcinoma versus normal sera demonstrates consistent alterations in the levels of ten specific proteins. *Electrophoresis* 28, 4302-4310.
- Duan, X., Yarmush, D., Berthiaume, F., Jayaraman, A. and Yarmush, M.L. (2005). Immunodepletion of albumin for two-dimensional gel detection of new mouse acute-phase protein and other plasma proteins. *Proteomics* 5, 3991-4000.
- Dubielzig, R.R. (1997). Distinctive morphologic features of the ciliary body in equine recurrent uveitis. *Vet Comp Ophthalmol*, 163-167.
- Dwyer, A.E., Crockett, R.S. and Kalsow, C.M. (1995). Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993). *J Am Vet Med Assoc* 207, 1327-1331.
- Elschnig, A. (1910). Studien zur sympathischen ophthalmitis. Die antigene Wirkung des Augenpigmentes. *Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol* 76, 509.
- Estes, D.M. and Brown, W.C. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 90, 1-10.
- Felix, S.B. and Staudt, A. (2006). Non-specific immunoadsorption in patients with dilated cardiomyopathy: mechanisms and clinical effects. *Int J Cardiol* 112, 30-33.
- Fiehn, C. (2003). Differentialdiagnose der Uveitis. *Deutsches Ärzteblatt* Jg. 100, 2514-2522.
- Forrester, J.V. (1991). Uveitis: pathogenesis. *Lancet* 338, 1498-1501.
- Frank, M.M. and Fries, L.F. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 12, 322-326.
- Fruhauf, B., Ohnesorge, B., Deegen, E. and Boeve, M. (1998). Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy. *Vet Ophthalmol* 1, 137-151.
- Fujinami, R.S., von Herrath, M.G., Christen, U. and Whitton, J.L. (2006). Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev* 19, 80-94.
- Garcia-Ramirez, M., Canals, F., Hernandez, C., Colome, N., Ferrer, C., Carrasco, E., Garcia-Arumi, J. and Simo, R. (2007). Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 50, 1294-1303.
- Gerhards, H. and Wollanke, B. (2001). Uveitis bei Pferden - Diagnose und Therapie. *Pferdeheilkunde* 17, 319-329.

- Gery, I., Wiggert, B., Redmond, T.M., Kuwabara, T., Crawford, M.A., Vistica, B.P. and Chader, G.J. (1986). Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27, 1296-1300.
- Gery, I., Chanaud, N.P., 3rd and Anglade, E. (1994). Recoverin is highly uveitogenic in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3342-3345.
- Gery, I. and Streilein, J.W. (1994). Autoimmunity in the eye and its regulation. *Curr Opin Immunol* 6, 938-945.
- Gevaert, K. and Vandekerckhove, J. (2000). Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 21, 1145-1154.
- Gianazza, E., Eberini, I., Villa, P., Fratelli, M., Pinna, C., Wait, R., Gemeiner, M. and Miller, I. (2002). Monitoring the effects of drug treatment in rat models of disease by serum protein analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 771, 107-130.
- Gilger, B.C., Malok, E., Cutter, K.V., Stewart, T., Horohov, D.W. and Allen, J.B. (1999). Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 17-28.
- Gilger, B.C., Malok, E., Stewart, T., Horohov, D., Ashton, P., Smith, T., Jaffe, G.J. and Allen, J.B. (2000). Effect of an intravitreal cyclosporine implant on experimental uveitis in horses. *Vet Immunol Immunopathol* 76, 239-255.
- Gilger, B.C. and Michau, T.M. (2004). Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract* 20, 417-427, vii.
- Gold, B., Merriam, J.E., Zernant, J., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Gehrs, K., Cramer, K., Neel, J., Bergeron, J., Barile, G.R., Smith, R.T., Hageman, G.S., Dean, M. and Allikmets, R. (2006). Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38, 458-462.
- Gomme, P.T., McCann, K.B. and Bertolini, J. (2005). Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* 10, 267-273.
- Gorg, A., Postel, W. and Gunther, S. (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Gorg, A., Weiss, W. and Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.
- Granger, J., Siddiqui, J., Copeland, S. and Remick, D. (2005). Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics* 5, 4713-4718.

- Green, P.H., Glickman, R.M., Riley, J.W. and Quinet, E. (1980). Human apolipoprotein A-IV. Intestinal origin and distribution in plasma. *J Clin Invest* 65, 911-919.
- Greenwood, J. and Calder, V.L. (1993). Lymphocyte migration through cultured endothelial cell monolayers derived from the blood-retinal barrier. *Immunology* 80, 401-406.
- Greenwood, J., Howes, R. and Lightman, S. (1994). The blood-retinal barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. Leukocyte interactions and functional damage. *Lab Invest* 70, 39-52.
- Guipaud, O., Holler, V., Buard, V., Tarlet, G., Royer, N., Vinh, J. and Benderitter, M. (2007). Time-course analysis of mouse serum proteome changes following exposure of the skin to ionizing radiation. *Proteomics* 7, 3992-4002.
- Guo, Y.L., Wang, S. and Colman, R.W. (2002). Kininostatin as an antiangiogenic inhibitor: what we know and what we do not know. *Int Immunopharmacol* 2, 1931-1940.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R. and Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19, 1720-1730.
- Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L.V., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Hardisty, L.I., Hageman, J.L., Stockman, H.A., Borchardt, J.D., Gehrs, K.M., Smith, R.J., Silvestri, G., Russell, S.R., Klaver, C.C., Barbazetto, I., Chang, S., Yannuzzi, L.A., Barile, G.R., Merriam, J.C., Smith, R.T., Olsh, A.K., Bergeron, J., Zernant, J., Merriam, J.E., Gold, B., Dean, M. and Allikmets, R. (2005). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7227-7232.
- Haines, J.L., Hauser, M.A., Schmidt, S., Scott, W.K., Olson, L.M., Gallins, P., Spencer, K.L., Kwan, S.Y., Noureddine, M., Gilbert, J.R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E.A. and Pericak-Vance, M.A. (2005). Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308, 419-421.
- Hartung, H.P. and Hadding, U. (1983). Synthesis of complement by macrophages and modulation of their functions through complement activation. *Springer Semin Immunopathol* 6, 283-326.
- Hauck, S.M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M., Gerhards, H., Ueffing, M. and Deeg, C.A. (2007). Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 6, 2121-2131.
- Haynes, P., Miller, I., Aebersold, R., Gemeiner, M., Eberini, I., Lovati, M.R., Manzoni, C., Vignati, M. and Gianazza, E. (1998). Proteins of rat serum: I. Establishing a reference two-dimensional electrophoresis map by immunodetection and microbore high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Electrophoresis* 19, 1484-1492.

- Heusser, H. (1948). Die periodische Augenentzündung eine Leptospirose? *Schweiz Arch Tierheilkd* 90, 287-312.
- Hinerfeld, D., Innamorati, D., Pirro, J. and Tam, S.W. (2004). Serum/Plasma depletion with chicken immunoglobulin Y antibodies for proteomic analysis from multiple Mammalian species. *J Biomol Tech* 15, 184-190.
- Hines, M.T. (1984). Immunologically mediated ocular disease in the horse. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 6, 501-512.
- Hines, M.T. (1990). Equine Recurrent Uveitis: Immunisation of ponies with retinal S Antigen. *Prog. in Veterinary & Comperative Ophthalmology* 2, 3-11.
- Hirose, S., Wiggert, B., Redmond, T.M., Kuwabara, T., Nussenblatt, R.B., Chader, G.J. and Gery, I. (1987). Uveitis induced in primates by IRBP: humoral and cellular immune responses. *Exp Eye Res* 45, 695-702.
- Hlavaty, J.J., Partin, A.W., Shue, M.J., Mangold, L.A., Derby, J., Javier, T., Kelley, S., Stieg, A., Briggman, J.V., Hass, G.M. and Wu, Y.J. (2003). Identification and preliminary clinical evaluation of a 50.8-kDa serum marker for prostate cancer. *Urology* 61, 1261-1265.
- Hortin, G.L. (2006). The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem* 52, 1223-1237.
- Huang, H.L., Stasyk, T., Morandell, S., Dieplinger, H., Falkensammer, G., Griesmacher, A., Mogg, M., Schreiber, M., Feuerstein, I., Huck, C.W., Stecher, G., Bonn, G.K. and Huber, L.A. (2006). Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/ MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays. *Electrophoresis* 27, 1641-1650.
- Huang, L., Harvie, G., Feitelson, J.S., Gramatikoff, K., Herold, D.A., Allen, D.L., Amunngama, R., Hagler, R.A., Pisano, M.R., Zhang, W.W. and Fang, X. (2005). Immunoaffinity separation of plasma proteins by IgY microbeads: meeting the needs of proteomic sample preparation and analysis. *Proteomics* 5, 3314-3328.
- Issaq, H.J. and Veenstra, T.D. (2007). The role of electrophoresis in disease biomarker discovery. *Electrophoresis* 28, 1980-1988.
- Issaq, H.J., Xiao, Z. and Veenstra, T.D. (2007). Serum and plasma proteomics. *Chem Rev* 107, 3601-3620.
- Jensen, O.N., Mortensen, P., Vorm, O. and Mann, M. (1997). Automation of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using fuzzy logic feedback control. *Anal Chem* 69, 1706-1714.
- Jha, P., Sohn, J.H., Xu, Q., Nishihori, H., Wang, Y., Nishihori, S., Manickam, B., Kaplan, H.J., Bora, P.S. and Bora, N.S. (2006). The complement system plays

- a critical role in the development of experimental autoimmune anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 1030-1038.
- Kakisaka, T., Kondo, T., Okano, T., Fujii, K., Honda, K., Endo, M., Tsuchida, A., Aoki, T., Itoi, T., Moriyasu, F., Yamada, T., Kato, H., Nishimura, T., Todo, S. and Hirohashi, S. (2007). Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in pancreatic cancer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 852, 257-267.
- Kalsow, C.M. and Wacker, W.B. (1978). Pineal gland involvement in retina-induced experimental allergic uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 774-783.
- Kalsow, C.M. and Dwyer, A.E. (1998). Retinal immunopathology in horses with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 6, 239-251.
- Kalsow, C.M., Dubielzig, R.R. and Dwyer, A.E. (1999). Immunopathology of pineal glands from horses with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1611-1615.
- Karakousis, P.C., John, S.K., Behling, K.C., Surace, E.M., Smith, J.E., Hendrickson, A., Tang, W.X., Bennett, J. and Milam, A.H. (2001). Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis* 7, 154-163.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60, 2299-2301.
- Kew, R.R., Fisher, J.A. and Webster, R.O. (1995). Co-chemotactic effect of Gc-globulin (vitamin D binding protein) for C5a. Transient conversion into an active co-chemotaxin by neutrophils. *J Immunol* 155, 5369-5374.
- Kim, M.R. and Kim, C.W. (2007). Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 849, 203-210.
- Kim, S.J., Kim, S., Park, J., Lee, H.K., Park, K.S., Yu, H.G. and Kim, Y. (2006). Differential expression of vitreous proteins in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 31, 231-240.
- Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.Y., Sackler, R.S., Haynes, C., Henning, A.K., SanGiovanni, J.P., Mane, S.M., Mayne, S.T., Bracken, M.B., Ferris, F.L., Ott, J., Barnstable, C. and Hoh, J. (2005). Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308, 385-389.
- Klose, J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243.
- Koj, A. (1974) Acute Phase reactants. In Structure and Function of Plasma Proteins, Ed: A.C. Allison, Plenum Publishing Corp, New York.

- Kragh-Hansen, U. (1990). Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull* 37, 57-84.
- Lagrost, L., Gambert, P., Boquillon, M. and Lallemand, C. (1989). Evidence for high density lipoproteins as the major apolipoprotein A-IV-containing fraction in normal human serum. *J Lipid Res* 30, 1525-1534.
- Lebreton, J.P., Joisel, F., Raoult, J.P., Lannuzel, B., Rogez, J.P. and Humbert, G. (1979). Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J Clin Invest* 64, 1118-1129.
- Lee, A.T., Balasubramanian, K. and Schroit, A.J. (2000). beta(2)-glycoprotein I-dependent alterations in membrane properties. *Biochim Biophys Acta* 1509, 475-484.
- Lewis, J.G. and Andre, C.M. (1980). Effect of human alpha 2HS glycoprotein on mouse macrophage function. *Immunology* 39, 317-322.
- Li, S.Q., Yun, J., Xue, F.B., Bai, C.Q., Yang, S.G., Que, H.P., Zhao, X., Wu, Z., Wang, Y. and Liu, S.J. (2007a). Comparative proteome analysis of serum from acute pulmonary embolism rat model for biomarker discovery. *J Proteome Res* 6, 150-159.
- Li, Z.G., Zhao, L., Liu, L. and Ding, Y.Q. (2007b). [Monitoring changes of serum protein markers in metastatic colorectal carcinoma model]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 36, 48-52.
- Lilley, K.S. and Friedman, D.B. (2004). All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics* 1, 401-409.
- Linke, T., Ross, A.C. and Harrison, E.H. (2006). Proteomic analysis of rat plasma by two-dimensional liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1123, 160-169.
- Linke, T., Doraiswamy, S. and Harrison, E.H. (2007). Rat plasma proteomics: effects of abundant protein depletion on proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 849, 273-281.
- Liu, T., Qian, W.J., Mottaz, H.M., Gritsenko, M.A., Norbeck, A.D., Moore, R.J., Purvine, S.O., Camp, D.G., 2nd and Smith, R.D. (2006). Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 5, 2167-2174.
- Lottspeich, F. (2006) *Bioanalytik*, 2. nd edn., Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lowenthal, M.S., Mehta, A.I., Frogale, K., Bandle, R.W., Araujo, R.P., Hood, B.L., Veenstra, T.D., Conrads, T.P., Goldsmith, P., Fishman, D., Petricoin, E.F., 3rd

- and Liotta, L.A. (2005). Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. *Clin Chem* 51, 1933-1945.
- Lum, J.B., Infante, A.J., Makker, D.M., Yang, F. and Bowman, B.H. (1986). Transferrin synthesis by inducer T lymphocytes. *J Clin Invest* 77, 841-849.
- Maller, J., George, S., Purcell, S., Fagerness, J., Altshuler, D., Daly, M.J. and Seddon, J.M. (2006). Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38, 1055-1059.
- Marouga, R., David, S. and Hawkins, E. (2005). The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 382, 669-678.
- Matthews, A.G., Waitkins, S.A. and Palmer, M.F. (1987). Serological study of leptospiral infections and endogenous uveitis among horses and ponies in the United Kingdom. *Equine Vet J* 19, 125-128.
- Maurya, P., Meleady, P., Dowling, P. and Clynes, M. (2007). Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. *Anticancer Res* 27, 1247-1255.
- Maxwell, S.A. (1991). Humoral responses to retinal proteins in horses with recurrent uveitis. *Progress in Veterinary & Comperative Ophthalmology* 1, 155-162.
- McRae, B.L., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C. and Miller, S.D. (1995). Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 182, 75-85.
- Medzihradzsky, K.F., Campbell, J.M., Baldwin, M.A., Falick, A.M., Juhasz, P., Vestal, M.L. and Burlingame, A.L. (2000). The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* 72, 552-558.
- Mehdi, H., Nunn, M., Steel, D.M., Whitehead, A.S., Perez, M., Walker, L. and Peeples, M.E. (1991). Nucleotide sequence and expression of the human gene encoding apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *Gene* 108, 293-298.
- Meri, S. and Baumann, M. (2001). Proteomics: posttranslational modifications, immune responses and current analytical tools. *Biomol Eng* 18, 213-220.
- Merrick, B.A., Bruno, M.E., Madenspacher, J.H., Wetmore, B.A., Foley, J., Pieper, R., Zhao, M., Makusky, A.J., McGrath, A.M., Zhou, J.X., Taylor, J. and Tomer, K.B. (2006). Alterations in the rat serum proteome during liver injury from acetaminophen exposure. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 792-802.
- Miller, I., Friedlein, A., Tsangaris, G., Maris, A., Fountoulakis, M. and Gemeiner, M. (2004). The serum proteome of *Equus caballus*. *Proteomics* 4, 3227-3234.
- Miller, I., Crawford, J. and Gianazza, E. (2006). Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 6, 5385-5408.

- Minnema, M.C., Chang, A.C., Jansen, P.M., Lubbers, Y.T., Pratt, B.M., Whittaker, B.G., Taylor, F.B., Hack, C.E. and Friedman, B. (2000). Recombinant human antithrombin III improves survival and attenuates inflammatory responses in baboons lethally challenged with *Escherichia coli*. *Blood* 95, 1117-1123.
- Miyakis, S., Giannakopoulos, B. and Krilis, S.A. (2004). Beta 2 glycoprotein I--function in health and disease. *Thromb Res* 114, 335-346.
- Mochizuki, M., Kuwabara, T., McAllister, C., Nussenblatt, R.B. and Gery, I. (1985). Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26, 1-9.
- Montalvo, V., Campos, M.M., Chan, C.C., Wawrousek, E.F., Bush, R.A., Lambris, J.D. and Gery, I. (2007). Complement deposits on ocular tissues adjacent to sites of inflammation. *Curr Eye Res* 32, 917-922.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Nussenblatt, R.B., Kuwabara, T., de Monasterio, F.M. and Wacker, W.B. (1981). S-antigen uveitis in primates. A new model for human disease. *Arch Ophthalmol* 99, 1090-1092.
- Nussenblatt, R.B. (1990). The natural history of uveitis. *Int Ophthalmol* 14, 303-308.
- Nussenblatt, R.B. (1991). Proctor Lecture. Experimental autoimmune uveitis: mechanisms of disease and clinical therapeutic indications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 3131-3141.
- Nussenblatt, R.B. and Gery, I. (1996). Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease. *J Autoimmun* 9, 575-585.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.
- O'Reilly, M.S., Pirie-Shepherd, S., Lane, W.S. and Folkman, J. (1999). Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 285, 1926-1928.
- O'Reilly, M.S. (2007). Antiangiogenic antithrombin. *Semin Thromb Hemost* 33, 660-666.
- Oettl, K. and Stauber, R.E. (2007). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 151, 580-590.
- Omenn, G.S., States, D.J., Adamski, M., Blackwell, T.W., Menon, R., Hermjakob, H., Apweiler, R., Haab, B.B., Simpson, R.J., Eddes, J.S., Kapp, E.A., Moritz, R.L.,

- Chan, D.W., Rai, A.J., Admon, A., Aebersold, R., Eng, J., Hancock, W.S., Hefta, S.A., Meyer, H., Paik, Y.K., Yoo, J.S., Ping, P., Pounds, J., Adkins, J., Qian, X., Wang, R., Wasinger, V., Wu, C.Y., Zhao, X., Zeng, R., Archakov, A., Tsugita, A., Beer, I., Pandey, A., Pisano, M., Andrews, P., Tammen, H., Speicher, D.W. and Hanash, S.M. (2005). Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 5, 3226-3245.
- Omenn, G.S. (2006) Exploring the Human Plasma Proteome, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Ongagna, J.C., Pinget, M. and Belcourt, A. (2005). Vitamin D-binding protein gene polymorphism association with IA-2 autoantibodies in type 1 diabetes. *Clin Biochem* 38, 415-419.
- Ouchi, M., West, K., Crabb, J.W., Kinoshita, S. and Kamei, M. (2005). Proteomic analysis of vitreous from diabetic macular edema. *Exp Eye Res* 81, 176-182.
- Paglia, D.T., Miller, P.E. and Dubielzig, R.R. (2004). James Wardrop and equine recurrent uveitis. *Arch Ophthalmol* 122, 1218-1223.
- Pandey, A. and Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837-846.
- Pardo, M., Garcia, A., Antrobus, R., Blanco, M.J., Dwek, R.A. and Zitzmann, N. (2007). Biomarker discovery from uveal melanoma secretomes: identification of gp100 and cathepsin D in patient serum. *J Proteome Res* 6, 2802-2811.
- Parma, A.E., Santisteban, C.G., Villalba, J.S. and Bowden, R.A. (1985). Experimental demonstration of an antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. *Vet Immunol Immunopathol* 10, 215-224.
- Parma, A.E., Fernandez, A.S., Santisteban, C.G., Bowden, R.A. and Cerone, S.I. (1987). Tears and aqueous humor from horses inoculated with *Leptospira* contain antibodies which bind to cornea. *Vet Immunol Immunopathol* 14, 181-185.
- Parma, A.E., Cerone, S.I. and Sansinanea, S.A. (1992a). Biochemical analysis by SDS-PAGE and western blotting of the antigenic relationship between *Leptospira* and equine ocular tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 33, 179-185.
- Parma, A.E., Cerone, S.I., Sansinanea, S.A. and Ghezzi, M. (1992b). C3 fixed in vivo to cornea from horses inoculated with *Leptospira interrogans*. *Vet Immunol Immunopathol* 34, 181-187.
- Parma, A.E., Sanz, M.E., Lucchesi, P.M., Mazzone, J. and Petrucci, M.A. (1997). Detection of an antigenic protein of *Leptospira interrogans* which shares epitopes with the equine cornea and lens. *Vet J* 153, 75-79.

- Pearce, J.W., Galle, L.E., Kleiboeker, S.B., Turk, J.R., Schommer, S.K., Dubielzig, R.R., Mitchell, W.J., Moore, C.P. and Giuliano, E.A. (2007). Detection of *Leptospira interrogans* DNA and antigen in fixed equine eyes affected with end-stage equine recurrent uveitis. *J Vet Diagn Invest* 19, 686-690.
- Petersen, S.V., Valnickova, Z. and Enghild, J.J. (2003). Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. *Biochem J* 374, 199-206.
- Petrini, M., Emerson, D.L. and Galbraith, R.M. (1983). Linkage between surface immunoglobulin and cytoskeleton of B lymphocytes may involve Gc protein. *Nature* 306, 73-74.
- Petrini, M., Galbraith, R.M., Emerson, D.L., Nel, A.E. and Arnaud, P. (1985). Structural studies of T lymphocyte Fc receptors. Association of Gc protein with IgG binding to Fc gamma. *J Biol Chem* 260, 1804-1810.
- Pieper, R., Gatlin, C.L., Makusky, A.J., Russo, P.S., Schatz, C.R., Miller, S.S., Su, Q., McGrath, A.M., Estock, M.A., Parmar, P.P., Zhao, M., Huang, S.T., Zhou, J., Wang, F., Esquer-Blasco, R., Anderson, N.L., Taylor, J. and Steiner, S. (2003). The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics* 3, 1345-1364.
- Polz, E. and Kostner, G.M. (1979). The binding of beta 2-glycoprotein-I to human serum lipoproteins: distribution among density fractions. *FEBS Lett* 102, 183-186.
- Powell, A.M. and Black, M.M. (2001). Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol* 26, 427-433.
- Prendergast, R.A., Iliff, C.E., Coskuncan, N.M., Caspi, R.R., Sartani, G., Tarrant, T.K., Litty, G.A. and McLeod, D.S. (1998). T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 754-762.
- Pschyrembel, W. (1998) *Klinisches Wörterbuch*, 254. edn., de Gruyter, Berlin.
- Putnam, F.W. (1975) *Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, Academic Press Inc., New York. pp 265-316.
- Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2, 3-10.
- Rao, N.A., Wacker, W.B. and Marak, G.E., Jr. (1979). Experimental allergic uveitis: clinicopathologic features associated with varying doses of S antigen. *Arch Ophthalmol* 97, 1954-1958.
- Read, R.W., Szalai, A.J., Vogt, S.D., McGwin, G. and Barnum, S.R. (2006). Genetic deficiency of C3 as well as CNS-targeted expression of the complement

- inhibitor sCrry ameliorates experimental autoimmune uveoretinitis. *Exp Eye Res* 82, 389-394.
- Rebhun, W.C. (1999) Equine Medicine and Surgery. In: *Immune-Mediated Uveitis* Mosby Verlag, St.Louis. pp 1255-1258.
- Rehm, H. (2002) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics  
In: *Gele*, Spektrum Akademischer Verlag, 4.edition, Heidelberg.
- Reid, K.B. (1986). Activation and control of the complement system. *Essays Biochem* 22, 27-68.
- Ren, Y., Wang, J., Xia, J., Jiang, C., Zhao, K., Li, R., Xu, N., Xu, Y. and Liu, S. (2007). The alterations of mouse plasma proteins during septic development. *J Proteome Res* 6, 2812-2821.
- Reymond, M.A. and Schlegel, W. (2007). Proteomics in cancer. *Adv Clin Chem* 44, 103-142.
- Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85, 9-18; quiz 18, 21.
- Romeike, A., Brugmann, M. and Drommer, W. (1998). Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol* 35, 515-526.
- Rose, N.R. and Bona, C. (1993). Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 14, 426-430.
- Rui, Z., Jian-Guo, J., Yuan-Peng, T., Hai, P. and Bing-Gen, R. (2003). Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. *Proteomics* 3, 433-439.
- Santos-Gonzalez, M., Gomez Diaz, C., Navas, P. and Villalba, J.M. (2007). Modifications of plasma proteome in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet. *Exp Gerontol* 42, 798-806.
- Sato, H., Kazama, J.J., Wada, Y., Kuroda, T., Narita, I., Gejyo, F., Gao, P. and Yamashita, H. (2007). Decreased levels of circulating alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/Fetuin-A (AHSG) in patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med* 46, 1685-1691.
- Schwarz, S., Haas, B., Luley, C., Schafer, J.R. and Steinmetz, A. (1994). Quantification of apolipoprotein A-IV in human plasma by immunonephelometry. *Clin Chem* 40, 1717-1721.
- Schwink, K.L. (1992). Equine uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 8, 557-574.
- Sellar, G.C., Keane, J., Mehdi, H., Peebles, M.E., Browne, N. and Whitehead, A.S. (1993). Characterization and acute phase modulation of canine apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *Biochem Biophys Res Commun* 191, 1288-1293.

- Shah, A.B., DiMartino, S.J., Trujillo, G. and Kew, R.R. (2006). Selective inhibition of the C5a chemotactic cofactor function of the vitamin D binding protein by 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>. *Mol Immunol* 43, 1109-1115.
- Sheng, Y., Herzog, H. and Krilis, S.A. (1997). Cloning and characterization of the gene encoding the mouse beta 2-glycoprotein I. *Genomics* 41, 128-130.
- Sillerud, C.L., Bey, R.F., Ball, M. and Bistner, S.I. (1987). Serologic correlation of suspected *Leptospira interrogans* serovar pomona-induced uveitis in a group of horses. *J Am Vet Med Assoc* 191, 1576-1578.
- Sitke, B. (2006) Proteomics in drug research, Ed: K. Marcus, Wiley-VCH, Weinheim. pp 33-55.
- Snapper, C.M., Marcu, K.B. and Zelazowski, P. (1997). The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility". *Immunity* 6, 217-223.
- Sohn, J.H., Kaplan, H.J., Suk, H.J., Bora, P.S. and Bora, N.S. (2000). Chronic low level complement activation within the eye is controlled by intraocular complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3492-3502.
- Sohn, J.H., Bora, P.S., Suk, H.J., Molina, H., Kaplan, H.J. and Bora, N.S. (2003). Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat Med* 9, 206-212.
- Soltys, H.D. and Brody, J.I. (1970). Synthesis of transferrin by human peripheral blood lymphocytes. *J Lab Clin Med* 75, 250-257.
- Spiess, B.M. (1997). [Equine recurrent uveitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 139, 126-133.
- Staudt, A., Bohm, M., Knebel, F., Grosse, Y., Bischoff, C., Hummel, A., Dahm, J.B., Borges, A., Jochmann, N., Wernecke, K.D., Wallukat, G., Baumann, G. and Felix, S.B. (2002). Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 106, 2448-2453.
- Staudt, A., Dorr, M., Staudt, Y., Bohm, M., Probst, M., Empen, K., Plotz, S., Maschke, H.E., Hummel, A., Baumann, G. and Felix, S.B. (2005). Role of immunoglobulin G3 subclass in dilated cardiomyopathy: results from protein A immunoadsorption. *Am Heart J* 150, 729-736.
- Stavnezer, J. (1996). Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* 8, 199-205.
- Steele, F.R., Chader, G.J., Johnson, L.V. and Tombran-Tink, J. (1993). Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1526-1530.

- Steinkasserer, A., Estaller, C., Weiss, E.H., Sim, R.B. and Day, A.J. (1991). Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta 2-glycoprotein I. *Biochem J* 277 ( Pt 2), 387-391.
- Sun, Z.L., Zhu, Y., Wang, F.Q., Chen, R., Peng, T., Fan, Z.N., Xu, Z.K. and Miao, Y. (2007). Serum proteomic-based analysis of pancreatic carcinoma for the identification of potential cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta* 1774, 764-771.
- Switzer, R.C., 3rd, Merrill, C.R. and Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 98, 231-237.
- Taharaguchi, S., Nagano, A., Okai, K., Miyasho, T., Kuwano, M., Taniyama, H. and Yokota, H. (2007). Detection of an isoform of alpha(1)-antitrypsin in serum samples from foals with gastric ulcers. *Vet Rec* 161, 338-342.
- Tannu, N.S. and Hemby, S.E. (2006). Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc* 1, 1732-1742.
- Thivolet, C.H., Tappaz, M., Durand, A., Petersen, J., Stefanutti, A., Chatelain, P., Vialettes, B., Scherbaum, W. and Orgiazzi, J. (1992). Glutamic acid decarboxylase (GAD) autoantibodies are additional predictive markers of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in high risk individuals. *Diabetologia* 35, 570-576.
- Tirumalai, R.S., Chan, K.C., Prieto, D.A., Issaq, H.J., Conrads, T.P. and Veenstra, T.D. (2003). Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics* 2, 1096-1103.
- Tizard, I.R. (2004) *Veterinary Immunology-An Introduction*, seventh edn., Saunders, Philadelphia. pp 146-147;380-381;468.
- Tombran-Tink, J., Mazuruk, K., Rodriguez, I.R., Chung, D., Linker, T., Englander, E. and Chader, G.J. (1996). Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* 2, 11.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. and Davison, M. (2001). Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1, 377-396.
- Tormey, D.C., Imrie, R.C. and Mueller, G.C. (1972). Identification of transferrin as a lymphocyte growth promoter in human serum. *Exp Cell Res* 74, 163-169.
- Truedsson, L., Bengtsson, A.A. and Sturfelt, G. (2007). Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 40, 560-566.
- Unanue, E.R. and Allen, P.M. (1987). The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236, 551-557.

- Unlu, M., Morgan, M.E. and Minden, J.S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- Utermann, G. and Beisiegel, U. (1979). Apolipoprotein A-IV: a protein occurring in human mesenteric lymph chylomicrons and free in plasma. Isolation and quantification. *Eur J Biochem* 99, 333-343.
- Vanderlugt, C.L., Neville, K.L., Nikcevich, K.M., Eagar, T.N., Bluestone, J.A. and Miller, S.D. (2000). Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 164, 670-678.
- Vanderlugt, C.L. and Miller, S.D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2, 85-95.
- Verma, A., Artiushin, S., Matsunaga, J., Haake, D.A. and Timoney, J.F. (2005). LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. *Infect Immun* 73, 7259-7266.
- Vestal, M.L. and Campbell, J.M. (2005). Tandem time-of-flight mass spectrometry. *Methods Enzymol* 402, 79-108.
- Viswanathan, S., Unlu, M. and Minden, J.S. (2006). Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc* 1, 1351-1358.
- Wacker, W.B. and Lipton, M.M. (1965). Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* 206, 253-254.
- Wagner, B., Miller, D.C., Lear, T.L. and Antczak, D.F. (2004). The complete map of the Ig heavy chain constant gene region reveals evidence for seven IgG isotypes and for IgD in the horse. *J Immunol* 173, 3230-3242.
- Wagner, B. (2006). Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol* 30, 155-164.
- Wait, R., Miller, I., Eberini, I., Cairoli, F., Veronesi, C., Battocchio, M., Gemeiner, M. and Gianazza, E. (2002). Strategies for proteomics with incompletely characterized genomes: the proteome of *Bos taurus* serum. *Electrophoresis* 23, 3418-3427.
- Walsh, D.A. (2007). Pathophysiological mechanisms of angiogenesis. *Adv Clin Chem* 44, 187-221.
- Wan, J., Sun, W., Li, X., Ying, W., Dai, J., Kuai, X., Wei, H., Gao, X., Zhu, Y., Jiang, Y., Qian, X. and He, F. (2006). Inflammation inhibitors were remarkably up-regulated in plasma of severe acute respiratory syndrome patients at progressive phase. *Proteomics* 6, 2886-2894.

- Wang, H., Zhang, M., Soda, K., Sama, A. and Tracey, K.J. (1997). Fetuin protects the fetus from TNF. *Lancet* 350, 861-862.
- Wang, H., Zhang, M., Bianchi, M., Sherry, B., Sama, A. and Tracey, K.J. (1998). Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage-deactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14429-14434.
- Werry, H. and Gerhards, H. (1992). [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax* 20, 178-186.
- Westermeier, R. and Marouga, R. (2005). Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep* 25, 19-32.
- Whaley, K. and Schwaeble, W. (1997). Complement and complement deficiencies. *Semin Liver Dis* 17, 297-310.
- Whitcup, S.M., DeBarge, L.R., Caspi, R.R., Harning, R., Nussenblatt, R.B. and Chan, C.C. (1993). Monoclonal antibodies against ICAM-1 (CD54) and LFA-1 (CD11a/CD18) inhibit experimental autoimmune uveitis. *Clin Immunol Immunopathol* 67, 143-150.
- Whitcup, S.M. and Nussenblatt, R.B. (1997). Immunologic mechanisms of uveitis. New targets for immunomodulation. *Arch Ophthalmol* 115, 520-525.
- White, P. and Cooke, N. (2000). The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab* 11, 320-327.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L. and Hochstrasser, D.F. (1996a). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 14, 61-65.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. and Williams, K.L. (1996b). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19-50.
- Wilkins, M.R. (1997) Proteome Research: New Frontiers in functional Genomics. In: *Proteome: a new word, a new field of biology*, Ed: K.L. Williams, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Wilkins, M.R., Appel, R.D., Van Eyk, J.E., Chung, M.C., Gorg, A., Hecker, M., Huber, L.A., Langen, H., Link, A.J., Paik, Y.K., Patterson, S.D., Pennington, S.R., Rabilloud, T., Simpson, R.J., Weiss, W. and Dunn, M.J. (2006). Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics* 6, 4-8.
- Williams, R.D., Morter, R.L., Freeman, M.J. and Lavignette, A.M. (1971). Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis. *Invest Ophthalmol* 10, 948-954.

- Winterberg, A. (1997) *Langzeitergebnisse der Pars-plana Vitrektomie bei equiner rezidivierender Uveitis*. Inaugural Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Witebsky, E., Rose, N.R., Terplan, K., Paine, J.R. and Egan, R.W. (1957). Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc* 164, 1439-1447.
- Wittmann-Liebold, B., Graack, H.R. and Pohl, T. (2006). Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics* 6, 4688-4703.
- Wollanke (2004). Etiology of equine recurrent uveitis (ERU): autoimmune disease or intraocular leptospiral infection. *Pferdeheilkunde* 20, 327-340.
- Wollanke, B., Gerhards, H., Brem, S., Kopp, H. and Meyer, P. (1998). [Intraocular and serum antibody titers to Leptospira in 150 horses with equine recurrent uveitis (ERU) subjected to vitrectomy]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 111, 134-139.
- Wong, A., Kenny, T.P., Ermel, R. and Robbins, D.L. (1994). IgG3 reactive rheumatoid factor in rheumatoid arthritis: etiologic and pathogenic considerations. *Autoimmunity* 19, 199-210.
- Yamamoto, N., Homma, S. and Millman, I. (1991). Identification of the serum factor required for in vitro activation of macrophages. Role of vitamin D3-binding protein (group specific component, Gc) in lysophospholipid activation of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 147, 273-280.
- Yamamoto, N. and Naraparaju, V.R. (1996). Role of vitamin D3-binding protein in activation of mouse macrophages. *J Immunol* 157, 1744-1749.
- Yamamoto, N., Naraparaju, V.R. and Asbell, S.O. (1996). Deglycosylation of serum vitamin D3-binding protein leads to immunosuppression in cancer patients. *Cancer Res* 56, 2827-2831.
- Yamashiro, K., Kiryu, J., Tsujikawa, A., Honjo, M., Nonaka, A., Miyamoto, K., Honda, Y., Tanihara, H. and Ogura, Y. (2001). Inhibitory effects of antithrombin III against leukocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1553-1560.
- Yu, K.H., Rustgi, A.K. and Blair, I.A. (2005). Characterization of proteins in human pancreatic cancer serum using differential gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 4, 1742-1751.
- Zhang, J.C., Qi, X., Juarez, J., Plunkett, M., Donate, F., Sakthivel, R., Mazar, A.P. and McCrae, K.R. (2002). Inhibition of angiogenesis by two-chain high molecular weight kininogen (HKa) and kininogen-derived polypeptides. *Can J Physiol Pharmacol* 80, 85-90.

Zhang, S.X., Wang, J.J., Gao, G., Shao, C., Mott, R. and Ma, J.X. (2006). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB J* 20, 323-325.

Zirvi, K.A. (1991). Development of serum-free media for the growth of human gastrointestinal adenocarcinoma xenografts as primary tissue cultures. *J Cancer Res Clin Oncol* 117, 515-518.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger, Institut für Tierphysiologie, LMU München, danke ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg, Institut für Tierphysiologie, LMU München, für die Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche Betreuung. Durch ihren Elan, persönlichen Einsatz und ihre strukturierte Arbeitsweise hat sie mich für das wissenschaftliche Arbeiten begeistert und mir geholfen, meine Arbeit effektiv voranzubringen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Barbara Amann, Institut für Tierphysiologie, LMU München dafür, dass sie auf alle Laborfragen immer eine Antwort wusste und mich mit ihren Grafik-Designkünsten am Computer oft unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Stefanie Hauck, Institut für Humangenetik, Helmholtz Zentrum Neuherberg, für die große Hilfe bei vielen proteomischen Fragestellungen und langwierigen Datenbankenanalysen, sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Frau Stephanie Schöffmann Institut für Humangenetik, Helmholtz Zentrum Neuherberg, danke ich für die geduldige Unterstützung und Einweisung in die Laborarbeiten und die massenspektrometrischen Auswertungen, die in Neuherberg ausgeführt wurden.

Herrn Dr. Marius Ueffing, Institut für Humangenetik, Helmholtz Zentrum Neuherberg, danke ich für den am Helmholtz Zentrum zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und das Ermöglichen der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Danken möchte ich Herrn Dr. Kay Teja Junghanns, GE Healthcare München für die fachliche Hilfe und freundliche Unterstützung in allen proteomischen Angelegenheiten.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Hartmut Gerhards, Klinik für Pferde, LMU München, für die Überlassung der Serumproben. Ein grosses Dankeschön an Dr. Anna May und Mirijam Hartmann für das Sammeln der Serumproben.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Chris van der Meijden, Rechnerbetriebsgruppe, Tierärztliche Fakultät, LMU München, für die geduldige Lösung der verschiedensten Computerprobleme.

Frau Marianne Kirsch und Dr. Gabriele Jilg danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und die hilfreichen Anregungen.

Bei meinen Arbeitskollegen Herrn Dr. Frank Altmann, Herrn Dr. Albert Raith, Frau Dr. Christina Buse, Roxy Kramer und Florian Hofmaier bedanke ich mich für das kollegiale und angenehme Arbeitsklima.

Bei Andreas Schneider bedanke ich mich ganz besonders für die Unterstützung und sein Verständnis während des ganzen Studiums und dieser Dissertation.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und die anschließende Promotion durch ihre Unterstützung erst ermöglicht haben.

