

Aus dem
Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierphysiologie
Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. M. Stangassinger

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

- Equine rezidivierende Uveitis -
Pathogenese assoziierte Faktoren im Glaskörper

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

von
Florian Hofmaier
aus
Marburg/Lahn

München 2010

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Deeg
Korreferent/en:	Priv.-Doz. Dr. Maierl Univ.-Prof. Dr. Köstlin Univ.-Prof. Dr. Göbel Univ.-Prof. Dr. Gehlen

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

**Meinen Eltern
und
Uli und Peter**

1 EINLEITUNG	- 10 -
2 LITERATUR.....	- 12 -
2.1 Equine rezidivierende Uveitis	- 12 -
2.1.1 Klinisches Erscheinungsbild der ERU.....	- 12 -
2.1.2 Veterinärmedizinische Bedeutung der ERU.....	- 13 -
2.1.3 Ätiologie.....	- 14 -
2.1.4 Pathogenese der ERU	- 14 -
2.1.5 Therapie der ERU.....	- 16 -
2.1.5.1 Konservative Therapie.....	- 16 -
2.1.5.2 Operative Therapie der ERU.....	- 17 -
2.2 Uveitis des Menschen und tiermodellbasierte Uveitisforschung	- 19 -
2.2.1 Autoimmune Uveitis des Menschen	- 19 -
2.2.1.1 Therapie der autoimmunen Uveitis des Menschen	- 20 -
2.2.2 Tiermodelle in der Uveitis-Forschung.....	- 21 -
2.2.3 Bedeutung der ERU als spontanes und induzierbares Tiermodell der humanen autoimmunen Uveitis	- 23 -
2.3 Der Glaskörper und seine Bedeutung für die Erforschung vitreo-retinaler Erkrankungen.....	- 24 -
2.4 Differenzielle Proteomanalyse	- 26 -
2.4.1 Differenzielle Proteomanalyse bei der ERU.....	- 27 -
2.4.2 Differenzielle Proteomanalyse der Glaskörper von Ratten mit EAU.....	- 29 -
2.4.3 Differenzielle Proteomanalyse von Glaskörpermaterial bei humanen vitreo-retinalen Erkrankungen	- 30 -
2.4.4 Massenspektrometrie.....	- 31 -
2.4.4.1 LC-MS/MS	- 31 -
2.4.4.2 LTQ Orbitrap	- 32 -
2.4.5 Systembiologie.....	- 33 -
3 MATERIAL UND METHODEN.....	- 36 -
3.1 Probenmaterial	- 36 -
3.1.1 Glaskörperproben.....	- 36 -
3.1.1.1 Gefriertrocknung und Dialyse.....	- 37 -

3.1.2 Präparate für die Immunhistochemie	37 -
3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben nach Bradford.....	38 -
3.3 Puffer und Lösungen	39 -
3.3.1 Puffer und Lösungen für die 1D und 2D Gelelektrophorese	39 -
3.3.2 Puffer und Lösungen für den Western Blot	41 -
3.3.3 Puffer und Lösungen für die Strep/FLAG-Tandem Affinitäts- Aufreinigung	43 -
3.3.4 Puffer und Lösungen für die Expression von SFRP-2 in E. coli	44 -
3.3.5 Puffer und Lösungen für die Ammoniumsulfatfällung von IgY	47 -
3.3.6 Puffer und Lösungen für die Gelatin-Zymographie und reverse Gelatin-Zymographie	48 -
3.3.7 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie.....	49 -
3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50 -
3.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese.....	50 -
3.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese	51 -
3.4.2.1 Rehydrierung der IPG Streifen.....	51 -
3.4.2.2 Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)	52 -
3.4.2.3 Äquilibrierung der IPG-Streifen und zweite Dimension.....	53 -
3.5 Western Blot.....	54 -
3.6 Immunoblot.....	54 -
3.6.1 Densitometrische Bildanalyse der 1D Western Blot Signale.....	56 -
3.6.2 Statistische Auswertung	56 -
3.7 Generierung eines polyklonalen Huhn-anti-human-SFRP-2 Antikörpers.....	56 -
3.7.1 Expression und Aufreinigung von SFRP-2.....	56 -
3.7.1.1 Transformation der E.coli.....	56 -
3.7.1.2 Expression und Aufreinigung	57 -
3.7.2 Immunisierung.....	58 -
3.7.3 Extraktion von IgY aus Eidotter durch Ammoniumsulfatfällung	59 -
3.8 Strep/FLAG-Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (SF-TAP) von SFRP-2....	61 -
3.8.1 Transiente Transfektion der Hek-293T Zellen	61 -
3.8.2 SF-Tandem Affinitäts Aufreinigung von SFRP-2.....	61 -
3.8.2.1 Aufreinigung über Strep-Tactin Superflow Beads.....	62 -

3.8.2.2 Zweite Aufreinigung des Zelllysat-Eluates über Anti-Flag-M2-Agarose-Beads	- 63 -
3.8.2.3 Chloroform-Methanol Fällung	- 63 -
3.9 Gelatin-Zymographie und Reverse Zymographie	- 64 -
3.9.1 Gelatin-Zymographie.....	- 64 -
3.9.2 Reverse Zymographie.....	- 65 -
3.10 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen	- 66 -
3.10.1 In-Lösung-Verdau der Proben.....	- 66 -
3.10.2 LC-MS/MS	- 67 -
3.10.3 Datenbanksuche und Proteinidentifikation.....	- 68 -
3.10.4 Ortholog-/ Paralog-Suche	- 69 -
3.10.5 Datenanalyse mit Scaffold	- 69 -
3.11 Immunhistochemische Untersuchungen.....	- 70 -
3.11.1 Vorbereiten der Paraffinschnitte	- 70 -
3.11.2 Verwendete Antikörper	- 71 -
3.11.3 Einfachfärbung.....	- 73 -
3.11.4 Mehrfachfärbung	- 74 -
3.11.4.1 Doppelfärbung	- 74 -
3.11.4.2 Dreifachfärbung.....	- 74 -
3.12 Protein-Protein Interaktionsnetzwerk-Analyse.....	- 75 -
4 ERGEBNISSE.....	- 77 -
4.1 Qualitative und quantitative massenspektrometrische Protein-Analyse von Glaskörperproben gesunder und an ERU erkrankter Pferdeaugen	- 77 -
4.2 Veränderte Lipocalin 2 Expression in der erkrankten Retina	- 84 -
4.3 Proteine des Wnt-Signalweges und mögliche Interaktoren in der ERU	- 85 -
4.3.1 SFRP-2 Expression in der Pferderetina.....	- 86 -
4.3.2 Verlust der Wnt3a Expression in der von ERU betroffenen Pferderetina.....	- 87 -
4.3.3 Alpha-2-Makroglobulin als potenzieller SFRP-2 Interaktor.....	- 88 -
4.3.4 Erhöhte Alpha-2-Makroglobulin-Expression bei ERU.....	- 89 -

4.3.4.1 Quantifizierung der erhöhten Alpha-2-Makroglobulin Expression in den Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferdeaugen	89 -
4.3.4.2 Zunahme der Alpha-2-Makroglobulin Expression im erkrankten retinalen Gewebe.....	91 -
4.4 Differenzielle Expression von Osteopontin	- 92 -
4.4.1 Quantifizierung der differenziellen Osteopontin Expression im Western Blot.....	92 -
4.4.2 Rückgang der Osteopontin Expression in der Pferderetina bei ERU	93 -
4.5 Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen in Glaskörper und Retina ...	- 94 -
4.5.1 Expression von MMP-2 im untersuchten Probenmaterial.....	95 -
4.5.1.1 Reduzierte MMP-2 Expression in Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden	95 -
4.5.1.2 Veränderung des MMP-2 Expressionsmusters in der Pferderetina bei ERU	95 -
4.5.2 Zymographische Untersuchung der Glaskörperproben	96 -
4.5.3 Erniedrigte MMP-9 Expression in der Retina von an ERU erkrankten Pferden.....	98 -
4.5.4 Verlust der MMP-14 Expression im Netzhautgewebe bei ERU	99 -
4.6 Expression von TIMP-2 in Glaskörper und Retina	- 100 -
4.6.1 Differenzielle Expression von TIMP-2 in den untersuchten Glaskörperproben.....	101 -
4.6.2 Erniedrigte Expression von TIMP-2 in der erkrankten Pferderetina.....	101 -
4.6.3 Nachweis von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren durch reverse Zymographie	102 -
4.7 Zusammenspiel der untersuchten Proteine in der Retina.....	- 104 -
4.7.1 Überschneidung der Expressionsmuster von Lipocalin 2 und MMP-9 in der Retina	104 -
4.7.2 Interaktion von SFRP-2, Wnt3a und Alpha-2-Makroglobulin in der Pferderetina.....	106 -
4.7.3 Koexpression von MMP-2 und Osteopontin mit dem Müller-Gliazellmarker GFAP in gesunder und an ERU erkrankter Pferderetina	108 -
4.7.4 Koexpression der Proteine MMP-14, MMP-2 und TIMP-2 in der Photorezeptorschicht gesunder Retinae	110 -

4.7.5 Datenbankbasierte Netzwerkanalyse der Protein-Protein Interaktionen im Pferdeglaskörper.....	- 112 -
5 DISKUSSION.....	- 117 -
6 ZUSAMMENFASSUNG	- 141 -
7 SUMMARY	- 143 -
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	- 145 -
DANKSAGUNG	- 165 -

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (10 ⁻⁶)
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
A2M	Alpha-2-Makroglobulin
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Engl.: Cluster of differentiation
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
DMEM	Engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EAM	Experimentelle autoimmune Myokarditis
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
EAV	Equines Arteritis Virus
ECL	Engl.: Enhanced chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHV-1	Equines Herpes Virus 1
Engl.	Englisch
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
FBS	Engl.: Fetal bovine serum
FCA	Engl.: Freund's Complete Adjuvant
FIA	Engl.: Freund's Incomplete Adjuvant
FWHM	Engl.: Full width half maximum
g	Gramm

GFAP	Engl. : Glial fibrillary acidic protein
GRP78	Engl.: 78 kDa glucose-regulated protein
H ₂ O	Wasser
hc	Engl.: Heavy chain
HCl	Salzsäure
HLA-A29	Humanes Leukozytenantigen A29
hnRNP	Engl.: Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i.m.	Intramuskulär
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IRBP	Engl.: Interphotoreceptor retinoid-binding protein
kDa	Kilodalton
LC	Engl.: Liquid chromatography
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LRP1	Engl.: Low density lipoprotein related receptor protein 1
Lsg.	Lösung
LTQ	Engl.: Linear trap quadrupole
M	Molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMP-14	Matrix-Metalloproteinase-14/ MT1-MMP
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase-2
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
NL	Nicht linear
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
OPN	Osteopontin
OPN ^{-/-}	Engl.: Osteopontin knock out
p	Signifikanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PEDF	Engl.: Pigment epithelium-derived factor
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
ppm	Engl.: Parts per million
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidone
rcf	Engl. : Relative centrifugal force ; relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Engl.: Revolutions per minute
S-AG	S (Engl.: soluble)-Antigen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF-TAP	Engl.: Strep/FLAG tandem affinity purification
siRNA	Engl.: Short-interfering RNA
STRING	Engl.: Search Tool for the recurring Instances of the Neighborhood of Genes
Tab.	Tabelle
TAP	Engl.: Tandem affinity purification
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung

TEMED	NNNN'-Tetra-methylethylendiamin
TIMP	Engl.: Tissue inhibitor of metalloproteinases
TIMP-2	Engl.: Tissue inhibitor of Matrix-Metalloproteinase-2
U	Engl.: Unit
V	Volt
W	Watt
WB	Western Blot
Zn	Zink

1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU), eine spontane immunmedierte Erkrankung des inneren Pferdeauges ist die vorherrschende Ursache für eine erworbene Blindheit beim Pferd (Gilger and Michau, 2004; Halliwell and Hines, 1985; Rebhun, 1979). Neben der veterinärmedizinischen Bedeutsamkeit steht mit dieser Erkrankung ein spontanes Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis zur Verfügung (Deeg et al., 2007c; Dick, 1998). Die zugrunde liegenden Pathomechanismen dieser T-Zell medierten (Deeg et al., 2002a; Romeike et al., 1998), durch Zerstörung der Retina zum Verlust des Visus führenden Erkrankung, sind nach wie vor noch nicht ausreichend geklärt. Durch seinen unmittelbaren Kontakt zur Retina (Balazs, 1973; Weidman, 1973) stellt der Glaskörper ein wertvolles Probenmaterial bei der Erforschung vitreoretinaler Erkrankungen wie der ERU dar und ermöglicht der Forschung einen indirekten Blick auf die in der Retina ablaufenden pathophysiologischen Prozesse (Garcia-Ramirez et al., 2009; Garcia-Ramirez et al., 2007). Ferner unterstreichen die therapeutischen Erfolge der Vitrektomie (Werry and Gerhards, 1992) die Bedeutung der im Glaskörper enthaltenen Faktoren für das Krankheitsgeschehen. Der vergleichsweise einfache Zugang zu Glaskörperproben von betroffenen Pferdeaugen im Zuge therapeutischer Maßnahmen (Werry and Gerhards, 1992) ermöglicht eine Analyse der im Probenmaterial vorhandenen Proteine in allen Stadien der Erkrankung.

Biologischen Mechanismen liegen eine Vielzahl verschiedener Proteine zugrunde, die sich vorübergehend zu großen funktionalen Interaktionskomplexen (Michaud and Snyder, 2002) oder Zellsignaltransduktionswegen (Souchelnytskyi, 2002) zusammenfinden. Diese Proteine sind im Rahmen dynamischer, ineinandergreifender Interaktionen an vielen biologischen Prozessen beteiligt (Freese et al., 2009; Logan and Nusse, 2004). Die massenspektrometrischen Proteinanalyseverfahren unterliegen einer fortschreitenden Weiterentwicklung (Chen and Pramanik, 2008). Gepaart mit immer umfangreicheren, Spezies spezifischen Peptid-Sequenz-Datenbanken, ist nunmehr sowohl eine umfassende qualitative Analyse (Washburn et al., 2001) als auch eine Quantifizierung der Proteine (Wang et al., 2008; Bantscheff et al., 2007) im Probenmaterial möglich. Aufgrund der so gewonnenen Informationen über die in einem Gewebe im physiologischen und im

pathologischen Zustand exprimierten Proteine ermöglichen datenbankbasierte Interaktionsnetzwerkanalysen die Identifikation der an einer Krankheit beteiligten Signaltransduktionswege (Albrethsen et al., 2010; Wang et al., 2008). Basierend auf umfangreicheren Datensätzen dank verbesserter technischer Analysemethoden war das Ziel dieser Arbeit, Pathogenese assoziierte Glaskörperproteine und deren funktionelle Interaktionsnetzwerke in der ERU zu identifizieren und zu analysieren sowie neue potenzielle Interaktionen zwischen den exprimierten Proteinen aufzudecken. Hierdurch sollte auf Protein-Ebene eine Basis für funktionelle und systembiologische Analysen geschaffen werden, um das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen bei der equinen und humanen autoimmunen Uveitis zu verbessern.

2 LITERATUR

2.1 Equine rezidivierende Uveitis

Bei der equinen rezidivierenden Uveitis handelt es sich um eine immunmedierte Panuveitis (Gilger and Michau, 2004). Aufgrund des progressiven Verlaufes führt diese Erkrankung im chronischen Endstadium zum vollkommenen Verlust der Sehfähigkeit (Deeg, 2009; Gilger et al., 2008; Cook et al., 1983).

2.1.1 Klinisches Erscheinungsbild der ERU

Das typische klinische Erscheinungsbild der ERU ist charakterisiert durch seinen rezidivierenden Verlauf (Gerhards and Wollanke, 2001), bei dem Phasen akuter Uveitisschübe von Ruhephasen unterschiedlicher Länge unterbrochen werden (Gilger et al., 1999; Spiess, 1997; Cook et al., 1983). Obwohl initial oft nur ein Auge betroffen ist, erkrankt im Verlauf der Erkrankung das andere meist auch (Spiess, 1997; Cook et al., 1983). In der akuten Phase sind die Symptome der ERU, abhängig von den in Mitleidenschaft gezogenen anatomischen Strukturen und dem Erkrankungsstadium, sehr variabel (Gerhards and Wollanke, 2001; Spiess, 1997). Die Dauer und das Ausmaß der Entzündung, sowie der vorangegangenen Episoden bestimmen hierbei maßgeblich die zu beobachtenden pathologischen Veränderungen (Rebhun, 1979). Generell kann eine akute Uveitis eine Entzündung der Iris, des Ziliarkörpers und der Choroidea beinhalten, bei gleichzeitig möglicher Beteiligung von vorderer Augenkammer, Kornea, Linse, Retina und Glaskörper (Gilger and Michau, 2004; Gilger et al., 1999).

Eine akute vordere Uveitis ist für die betroffenen Pferde sehr schmerzhaft und äußert sich typischerweise durch Photophobie, Blepharospasmus und Lakrimation sowie durch ödematöse und gerötete Konjunktiven (Gerhards and Wollanke, 2001; Spiess, 1997; Cook et al., 1983; Rebhun, 1979). Eine ebenso zu beobachtende Miosis wird, falls nicht durch chronische Veränderungen wie Synechien verhindert, als Kardinalsymptom der Uveitis angesehen (Cook et al., 1983; Rebhun, 1979). Bei einer hinteren Uveitis fehlt die Schmerzsymptomatik der vorderen Uveitis oder ist nur sehr

milde ausgeprägt (Gilger and Michau, 2004; Gerhards and Wollanke, 2001). Diese für den Laien nur schwer erkennbare Form der Uveitis ist durch Glaskörpertrübung und Netzhautdegeneration mit Ablösung und Narbenbildung gekennzeichnet und betrifft hauptsächlich Retina, Glaskörper und Choroidea (Gilger and Michau, 2004; Gerhards and Wollanke, 2001). Des Weiteren wird vornehmlich bei Appaloosa- und Kaltblutpferden noch eine schleichende Form der ERU beschrieben, bei der eine schwache, unterschwellige Entzündung persistiert und schließlich zu den klinischen Anzeichen einer chronischen ERU führt (Gilger and Michau, 2004). Ophthalmologische Befunde in den Ruhephasen der chronischen ERU wie hintere Synechien, Glaskörpertrübung, peripapilläre Netzhautnarben, fokale Katarakte und Hornhautödeme (Gilger et al., 1999; Spiess, 1997) sind als Spätschäden vorangegangener Entzündungsschübe zu sehen (Frühauf et al., 1998). Mit jedem Rezidiv nehmen die okulären Läsionen an Ausmaß und Schweregrad zu (Gilger and Michau, 2004; Cook et al., 1983). Dieser progressive Verlauf der Krankheit ist verantwortlich für die bei der ERU auftretenden pathologischen Veränderungen wie Phtisis bulbi, Netzhautdegeneration und letztendlich Erblindung (Gilger and Michau, 2004; Gerhards and Wollanke, 2001; Gilger et al., 1999; Cook et al., 1983). Sowohl die charakteristischen klinischen Veränderungen als auch anamnestisch erhobene frühere Entzündungsschübe sind notwendig, um die klinische Diagnose ERU auf eine solide Basis zu stellen (Gilger and Michau, 2004; Spiess, 1997).

2.1.2 Veterinärmedizinische Bedeutung der ERU

Als vorherrschende Ursache für eine erworbene Blindheit bei Pferden (Halliwell and Hines, 1985; Rebhun, 1979) betrifft die ERU ca. 7,6% bis 12% der Pferdepopulation weltweit (Gilger and Michau, 2004; Szemes and Gerhards, 2000; Spiess, 1997) und war in einer Studie des Department für Pferde der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich mit 32% die insgesamt am häufigsten diagnostizierte Augenerkrankung (Spiess, 1997). Erblindete Pferde bergen aufgrund ihrer fluchttierartigen Verhaltensweisen ein erhebliches Gefahrenpotenzial für die mit ihrer Versorgung betrauten Menschen und schließlich für sich selbst. Aus Tierschutz- und Sicherheitsgründen bleibt oft nur noch die Euthanasie der betroffenen, ansonsten körperlich gesunden Tiere (Deeg, 2008; Gilger et al., 1999).

2.1.3 Ätiologie

Trotz eines erheblichen Wissenszuwachses in Bezug auf die immunmedierte Pathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis (Deeg, 2009; Deeg et al., 2008; Deeg et al., 2007b; Deeg et al., 2004a; Deeg et al., 2001; Gilger et al., 1999; Kalsow and Dwyer, 1998; Romeike et al., 1998) ist deren Ätiologie noch weitgehend ungeklärt. Viele virale, bakterielle und parasitäre Infektionen wie EHV-1, EAV Brucellose, Toxoplasmose, Leptospirose, Streptokokkose und Onchocerkose, werden mit dem initialen Auftreten einer akuten Uveitis in Verbindung gebracht (Schwink, 1992; Cook et al., 1983; Matthews and Handsombe, 1983). Insbesondere persistierende Leptospiren werden von einigen Autoren als bakterielle Auslöser für eine ERU in Erwägung gezogen (Brandes et al., 2007; Faber et al., 2000). Da diese Assoziation in anderen Untersuchungen allerdings nicht bestätigt werden konnte (Gilger et al., 2008; Pearce et al., 2007; Matthews et al., 1987), ist die Bedeutung einer bakteriellen Infektion für die ERU weiterhin unklar (Gilger et al., 2008).

2.1.4 Pathogenese der ERU

Die equine rezidivierende Uveitis wird als immunmedierte Erkrankung angesehen (Deeg et al., 2006a; Deeg et al., 2006b; Gilger and Michau, 2004; Deeg et al., 2001; Gilger et al., 1999). Der zellulären Immunantwort kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu (Romeike et al., 1998). Vor allem CD4⁺ Th1-Zellen (Deeg et al., 2001; Gilger et al., 1999) überwinden die Blut-Retina-Schranke, dringen in das betroffene Auge ein und infiltrieren Glaskörper, Retina und Iris (Deeg et al., 2002a; Deeg et al., 2001; Romeike et al., 1998). Die T-Zellen bilden Lymphfollikel-ähnliche Strukturen in der Choroidea und dem Irisstroma, eine für die equine rezidivierende Uveitis charakteristische Besonderheit (Deeg et al., 2002a). Vereinzelt gelang im Zentrum dieser Follikel auch der Nachweis von CD20⁺ Zellen (Romeike et al., 1998). Nur bei einer kleinen Gruppe von an ERU erkrankten Pferden (15%) fand man im Glaskörper überwiegend granulozytäre Zellinfiltrate (Deeg et al., 2001). Die im immunhistologischen Präparat zu beobachtenden Zellinfiltrate der Retina waren im Anfangsstadium der ERU hauptsächlich auf die vaskularisierten Teile der Netzhaut beschränkt und bestanden zum größten Teil aus T-Zellen. Augen, die sich in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der ERU befanden, zeigten eine massive Infiltration

der Retina mit T-Zellen (Deeg et al., 2002a). Somit ist die Retina in allen Stadien der ERU von einer Entzündung betroffen. Pathologische Veränderungen beginnen mit der Zerstörung der Photorezeptoraußensegmente (Deeg et al., 2002a). Bei Fortschreiten der Erkrankung ist auch die Ganglienzellschicht und die innere Körnerschicht betroffen, wohingegen die äußere Körnerschicht und die Müller-Gliazellen erst im Endstadium betroffen sind. Letztendlich führt die ERU zu einer totalen Zerstörung der retinalen Strukturen (Deeg et al., 2002a). In diesem Endstadium der Erkrankung sind kaum noch Entzündungszellinfiltrate in der Retina nachzuweisen (Deeg et al., 2002a). Es konnte gezeigt werden, dass intraokuläre T-Zellen der an ERU erkrankten Pferde nach *in vitro* Stimulation mit verschiedenen in der Retina exprimierten Autoantigenen wie CRALBP und IRBP proliferierten und demnach gegen diese Autoantigene sensibilisiert waren (Deeg et al., 2007b; Deeg et al., 2006b; Deeg et al., 2002b; Deeg et al., 2001). Durch die periphere Applikation von sowohl CRALBP, als auch IRBP konnte in 100% der Fälle eine ERU-ähnliche Erkrankung beim Pferd induziert werden, was einen kausalen Zusammenhang zwischen einer Autoimmunantwort gegen diese Proteine und der Manifestation einer ERU impliziert (Deeg et al., 2006b; Deeg et al., 2002b). Das in der Lewis-Ratte hoch uveitogene Protein S-Ag zeigte hingegen beim Pferd ein nur schwach uveitogenes Potenzial. Lediglich eines der fünf mit S-Ag immunisierten Pferde entwickelte eine monophasische, aber schwere Uveitis, jedoch konnten bei allen fünf Pferden im peripheren Blut autoreaktive T-Zellen gegen S-Ag nachgewiesen werden (Deeg et al., 2004b). Der im Rahmen weiterer Untersuchungen zur autoimmunen Pathogenese der ERU erbrachte Nachweis von intra- und intermolekularem Epitop Spreading im Krankheitsverlauf bietet zudem eine schlüssige Erklärung für die charakteristischen Rezidive dieser Erkrankung (Deeg et al., 2006a; Deeg et al., 2002b). Dies konnte durch *in vitro* T-Zell Proliferationsassays bei Pferden mit ERU nachgewiesen werden, deren Immunreaktion über einen Zeitraum von 22 Monaten beobachtet wurde. Die Pferde wurden im Abstand von zwei Monaten auf reaktive T-Zellen gegen Epitope der in der Retina exprimierten Autoantigene S-Antigen und IRBP untersucht. Bei allen acht Pferden gelang der Nachweis von intermolekularem Epitop Spreading, entweder von S-Ag auf IRBP oder umgekehrt. Für sieben der acht Pferde wurde intramolekulares Epitop Spreading nachgewiesen, bei dem sich die T-Zellreaktion im Krankheitsverlauf gegen andere Epitope desselben Proteins richtete (Deeg et al., 2006a). Ein weiteres Schlüsselereignis in der Pathogenese der ERU

stellt der Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke dar. Einen ersten Hinweis auf den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke im Verlauf der Erkrankung lieferte die intravitreale Detektion von aus dem Blut stammenden Tetanustoxoid-Antikörpern bei an ERU erkrankten Pferden (Deeg et al., 2001). In vergleichenden Analysen der Retina- und Glaskörper-Proteinexpressionsmuster gesunder und an ERU erkrankter Pferdeaugen zeigte sich eine deutliche Zunahme klassischer Serumproteine wie Albumin und, im Falle des Glaskörpers, eine deutlich erhöhte Gesamtproteinkonzentration in den von ERU betroffenen Proben, was ebenfalls einen Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke impliziert (Deeg et al., 2007a; Hauck et al., 2007). In Gewebeschnitten ist der Zusammenbruch der äußeren Blut-Retina-Schranke (gebildet vom retinalen Pigmentepithel) bei der ERU eindeutig nachweisbar (Deeg et al., 2002a). Des Weiteren konnten bei der Untersuchung des Retinaproteoms erstmals auch aktivierte Müller-Gliazellen als potenziell wichtige Faktoren bei der Aufrechterhaltung der entzündlichen Prozesse der ERU identifiziert werden (Hauck et al., 2007).

2.1.5 Therapie der ERU

2.1.5.1 Konservative Therapie

Aufgrund der noch ungeklärten Ätiologie verfolgt die klassische, konservative Therapie der ERU das Ziel, durch Eindämmen der Entzündungsreaktion während einer akuten Uveitis die bleibende Schädigung am Auge so gering wie möglich zu halten und die teilweise erheblichen Schmerzen zu lindern (Gilger and Michau, 2004; Gerhards and Wollanke, 2001; Schwink, 1992; Rebhun, 1979). Dabei kommen lokal oder subkonjunktival Steroide zum Einsatz (Spiess, 1997), um eine Suppression der Immunreaktion zu erreichen (Werry and Gerhards, 1992). Die Anwendung von Mydriatika und Zykloplegika vermindern den durch Spasmus des Ziliarmuskels hervorgerufenen Schmerz und beugen der Bildung einer hinteren Synechie vor (Gerhards and Wollanke, 2001; Schwink, 1992). Am häufigsten findet als Mydriatikum Atropin in Form von Augensalbe oder Augentropfen Verwendung (Schwink, 1992; Rebhun, 1979). Weiter werden systemisch verabreichte Antiphlogistika wie Flunixin Meglumin oder Phenylbutazon bis zum Abklingen der

akuten Entzündungssymptome empfohlen (Gilger and Michau, 2004; Gerhards and Wollanke, 2001).

2.1.5.2 Operative Therapie der ERU

Mit dem Ziel, eine möglichst langfristige Kontrolle der ERU zu gewährleisten und somit die rezidivierenden Entzündungsschübe zu verhindern, finden zwei unterschiedliche chirurgische Ansätze Verwendung (Keller and Hendrix, 2005; Gilger and Michau, 2004).

2.1.5.2.1 Zyklosporin-A Implantat

Das zyklische Peptid Zyklosporin-A hemmt die Transkription von Interleukin-2 (IL 2), blockiert die T-Zell-Aktivierung und führt somit zu einer Unterdrückung der zell-medierten Immunantwort (Ho et al., 1996). Ferner existieren Hinweise auf eine Erhöhung der regulatorischen T-Zell Population peripherer T-Zellen korrelierend mit einer Zyklosporin-A Therapie bei Menschen mit atopischer Dermatitis (Brandt et al., 2009). Aufgrund der Th-1 medierten Immunantwort in der ERU mit hohen IL-2 Spiegeln in chronisch an ERU erkrankten Augen bietet sich Zyklosporin-A zur Therapie der ERU an (Gilger et al., 1999). Die hydrophoben Eigenschaften von Zyklosporin-A bedingen allerdings, abgesehen von der Kornea, eine schlechte Penetration okulärer Strukturen bei topischer Applikation (Mosteller et al., 1985). Im Tierversuch zeigte ein intravitreales Zyklosporin-A Implantat eine deutliche Reduktion der Entzündung, der Gewebeerstörung und der infiltrierenden T-Lymphozytenzahl bei experimentell induzierter Uveitis des Pferdes (Gilger et al., 2001). Für diesen Versuch wurden ein mit H37RA-mTB Antigen, einem Zellwandbestandteil eines attenuierten Mykobakterium tuberculosis Stammes, induzierbares Uveitismodell verwendet. Dafür erfolgte eine zweimalige periphere Immunisierung der Versuchspferde mit dem Antigen. Uveitiden konnten dann durch die intravitreale Injektion von 25 µg H37RA-mTB ausgelöst werden. Dank der Reinduzierbarkeit der Uveitis durch intraokuläre Injektion von H37RA-mTB war es möglich, die Wirkung des Zyklosporin Implantates auf die Entzündungsreaktion im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit einem Zyklosporin freien Implantat zu untersuchen (Gilger et al., 2000). In einer klinischen Studie verhinderte das intravitreale Zyklosporin-A Implantat

ERU-Rezidive bei einem Großteil der behandelten Tiere. Diese Therapie führte jedoch in 13% der Fälle zu einer Netzhautablösung als postoperative Komplikation (Gilger et al., 2001). Die Methode wurde daraufhin durch Verwendung eines suprachoroidalen Zyklusporin-A Implantates verbessert. Es gelang bei 67 an ERU erkrankten Pferden einen signifikanten Rückgang der Uveitis-Rezidive (von durchschnittlich 0,544 Rezidiven pro Monat vor Einsetzen des Implantates auf durchschnittlich 0,096 Rezidive pro Monat im Beobachtungszeitraum nach dem Eingriff) zu erreichen und gleichzeitig die Rate der postoperativen Netzhautablösung auf 1,2% zu reduzieren (Gilger et al., 2006).

2.1.5.2.2 Pars-Plana Vitrektomie beim Pferd

Durch die Pars-Plana Vitrektomie werden Entzündungszellen, Entzündungsmediatoren und Trübungen aus dem Glaskörper beseitigt. Zusätzlich zur Entfernung optisch störender Strukturen resultiert eine Vitrektomie auch in einer Verbesserung der intraokularen Flüssigkeitsdynamik, was zu einem verbesserten Abtransport von Entzündungsprodukten über das Kammerwasser führt (Werry and Gerhards, 1992). Dies verringert das erneute Auftreten von Glaskörpertrübungen bei einer weiteren Entzündungsreaktion (Tóth et al., 2006). Die Pars-Plana Vitrektomie wird empfohlen um die Sehfähigkeit zu erhalten, die Rezidivneigung zu reduzieren und eine Eukleation des Bulbus zu vermeiden (Frühauf et al., 1998; Werry and Gerhards, 1992). Der hierbei ermöglichte Zugang zu Glaskörperprobenmaterial für diagnostische Untersuchungen stellt eine vorteilhafte Begleiterscheinung dieser Technik dar (Werry and Gerhards, 1992). Eine der ersten Langzeitstudien zur Vitrektomie beim Pferd zeigte, dass bei 97,7% der vitrektomierten Pferdeaugen im untersuchten Zeitraum keine Rezidive mehr auftraten und in 72% der Augen die Sehfähigkeit erhalten blieb (Winterberg and Gerhards, 1997). Weitere Studien verweisen ebenfalls auf ein Sistieren der Rezidive bei 85% (Frühauf et al., 1998) bis 94% der therapierten Pferde (von Borstel et al., 2005). Der Rückgang der Rezidivrate nach der Anwendung dieser Therapieform wird mit den, durch die Vitrektomie entfernten, für das Bestehen der Entzündung kritischen Faktoren erklärt (Gilger and Michau, 2004; Werry and Gerhards, 1992).

Postoperative Komplikationen wie Katarakte traten teilweise häufig auf, wie beispielsweise in der von Frühauf und Mitarbeitern durchgeführten Studie mit einer

Rate von 48% (Frühauf et al., 1998), wobei eine vorangegangene Schädigung der Augen dafür verantwortlich gemacht wurde. Berichte über vollständigen Visusverlust aufgrund von Kataraktbildung oder Netzhautablösung reichen von 14% (von Borstel et al., 2005) bis zu 28% (Winterberg and Gerhards, 1997) der operierten Pferde. Eine von einer deutschen Pferdeklinik durchgeführte Studie zu diesem Thema, in die 499 vitrektomierte Augen miteinbezogen wurden, verweist hingegen auf eine niedrige Kataraktrate von 0,4% und eine Retinaablösung in nur 0,6% der Fälle (Tóth et al., 2006).

2.2 Uveitis des Menschen und tiermodellbasierte Uveitisforschung

Etwa 10% der Erblindungsfälle beim Menschen im westlichen Kulturkreis sind durch Uveitis bedingt (Bodaghi et al., 2001; Nussenblatt, 1990). Dabei stellen chronische Uveitiden für eine erworbene und zugleich durch eine Behandlung potenziell vermeidbare Erblindung die Hauptursache in der Bevölkerung dar (Tellier, 2007). Ungefähr 40% der Uveitiden sind mit einer zugrundeliegenden, oft autoimmunmedierten, Erkrankung assoziiert (Jakob et al., 2009) und können die primäre und schwerste klinische Manifestation dieser Erkrankungen darstellen (Tellier, 2007). Humanes Probenmaterial erkrankter Augen ist meist nicht verfügbar (Garcia-Ramirez et al., 2007; Becker et al., 2000) oder kann erst im Endstadium der Erkrankung gewonnen werden. Für die Erforschung der grundlegenden Entzündungsmechanismen muss deshalb vorwiegend auf Tiermodelle zurückgegriffen werden (Forrester, 1991).

2.2.1 Autoimmune Uveitis des Menschen

Der Begriff humane autoimmune Uveitis fasst eine sehr heterogene Gruppe potenziell zu Erblindung führender entzündlicher Augenerkrankungen des Menschen zusammen. Für diese wird aufgrund gemeinsamer Charakteristika wie dem Mangel an einem vorhandenen infektiösen Agens, dem Vorhandensein reaktiver, auf retinale Antigene sensibilisierter T-Zellen, einer MHC-Assoziation und der Besserung der Symptome bei immunsuppressiver Therapie, eine autoimmune Genese angenommen (Caspi et al., 2008; Caspi, 2003). Oft sind diese Erkrankungen okuläre Manifestationen systemischer Erkrankungen. So wird für das Vogt-Koyanagi-Harada

Syndrom, in dessen Verlauf rezidivierende Uveitiden beobachtet werden können, eine T-Zell mediierte Autoimmunantwort gegen ein noch unbekanntes Melanozyten assoziiertes Antigen vermutet (Damico et al., 2005b; Sugita et al., 1996).

Die Behçet'sche Erkrankung ist eine chronische rezidivierende Vaskulitis, die fast alle Organe betreffen kann (Bonfioli and Orefice, 2005a). Sie ist durch rezidivierende ulzerative Hautläsionen, Schleimhautaphten und Uveitiden gekennzeichnet, wobei alle diese charakteristischen Symptome selbstlimitierend sind, ausgenommen die Uveitis (Sakane et al., 1999). Die Erkrankung ist weltweit mit deutlichen regionalen Unterschieden verbreitet und ca. 70% der Betroffenen leiden an Uveitiden (Sakane et al., 1999). Für die Behçet'sche Erkrankung wird ein durch unbekannte Faktoren ausgelöster autoimmuner Prozess bei genetisch prädisponierten Individuen angenommen (Kulaber et al., 2007; Okunuki et al., 2007; Pay et al., 2007; George et al., 1997).

Die Birdshot-Chorioretinopathie, eine autoimmunmedierte Uveitis, ist an das Vorhandensein des HLA-A29-Antigens gekoppelt (de Kozak et al., 2008; Baarsma et al., 1990). Der selten auftretenden sympathischen Ophthalmie, die meist nach okulären Traumata oder chirurgischen Interventionen auftritt (Ozbek et al., 2009; Zhang et al., 2009a), liegt meist eine T-Zell vermittelte Autoimmunreaktion gegen Linsen-Autoantigene zu Grunde (Pleyer and Dutescu, 2009; Damico et al., 2005a; Sugita et al., 1996).

Als bilaterale chronische Uveitis stellt sich die Sarkoidose assoziierte Uveitis dar (Kawaguchi et al., 2007; Bonfioli and Orefice, 2005b), deren Pathogenese ebenfalls eine autoimmune Komponente zugeschrieben wird (Zaba et al., 2010; Mempel et al., 2000).

Begleitende Uveitiden finden sich außerdem bei juveniler idiopathischer Arthritis (Heiligenhaus et al., 2007), bei autoimmuner Hepatitis (Lim et al., 2009) und bei bis zu einem Drittel der Patienten mit autoimmunem Lupus erythematodes (Sivaraj et al., 2007).

2.2.1.1 Therapie der autoimmunen Uveitis des Menschen

Bei der Therapie der immunmedierten humanen Uveitis steht eine Immunsuppression und Entzündungshemmung im Mittelpunkt. Kortikosteroide sind bei den meisten Uveitiden das Mittel der Wahl für das initiale Behandlungsregime

(Sudharshan et al., 2010; Pleyer and Dutescu, 2009; Becker et al., 2005). Unerwünschte Nebenwirkungen wie eine steroidinduzierte Erhöhung des Augeninnendrucks bei lokaler Anwendung (IOP) (Levin et al., 2002) oder systemische Nebenwirkungen schränken ihre Anwendung allerdings ein (Becker et al., 2005). Bei Patienten, die stark auf eine systemische Steroidtherapie reagieren, oder bei Ausbleiben eines Therapieerfolges, wird auf nicht-steroidale Immunsuppressiva zurückgegriffen. Verwendet werden in diesem Falle T-Zell-Hemmer wie Zyklosporin oder Antimetaboliten wie Methotrexat (Sudharshan et al., 2010; Pleyer and Dutescu, 2009; Becker et al., 2005). Eine weitere Therapieoption bietet die intravenöse Gabe von Immunglobulinen (Tellier, 2007; Seider et al., 2001) oder immunmodulierenden, monoklonalen Antikörpern (Mushtaq et al., 2007; Becker et al., 2005; Thureau et al., 1994).

Bei Bestehen einer Uveitis trotz maximal tolerabler Medikation und mit entzündungsbedingter Einschränkung der Sehfähigkeit durch Glaskörperhämorrhagie und –trübung oder Bildung epiretinaler Membranen kann eine Vitrektomie in Betracht gezogen werden (Bansal et al., 2010; Ahn et al., 2005; Becker and Davis, 2005; Becker et al., 2003). Diese ist besonders bei der intermediären Uveitis erfolgversprechend (Becker and Davis, 2005), aber auch Patienten mit persistierender pädiatrischer Uveitis scheinen von einer Vitrektomie zu profitieren (Giuliari et al., 2010). Allerdings ist die Durchführung einer Vitrektomie bei Uveitiden ohne ausgeprägte Glaskörperinfiltrationen kontraindiziert (Becker et al., 2003).

2.2.2 Tiermodelle in der Uveitis-Forschung

Bei der in verschiedenen Tiermodellen induzierbaren experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) handelt es sich um eine T-Zell medierte autoimmune Augenerkrankung (LeHoang et al., 2008; Wildner et al., 2008; Caspi, 2003; Becker et al., 2000; Caspi et al., 1986). Auch wenn in keinem der Tiermodelle das vollständige histopathologische oder klinische Bild der humanen Uveitis reproduzierbar ist (Becker et al., 2000), zeigen sich in einigen Punkten Parallelen zu der autoimmunen Uveitis des Menschen. So nehmen in all diesen Tiermodellen CD4⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle ein (de Smet and Chan, 2001). Aufgrund dessen und der geringen Verfügbarkeit humaner Gewebeproben wird die EAU zur Erforschung der an

Uveitiden beteiligten Mechanismen herangezogen (Agarwal and Caspi, 2004; Caspi, 2003; Becker et al., 2000). Am weitesten verbreitet sind die in der Lewis-Ratte und der Maus etablierten EAU Tiermodelle (Caspi et al., 2008; Wildner et al., 2008; Caspi, 2003). Eine EAU kann in beiden Spezies durch periphere Injektion retinaler Proteine wie IRBP oder S-Antigen, den am besten charakterisierten retinalen Autoantigenen bei EAU, induziert werden (Iwata et al., 2009; Wildner et al., 2008; Suzuki et al., 1989; Caspi et al., 1988). Es bleibt anzumerken, dass im Mausmodell IRBP deutlich uveitogener wirkt als S-Antigen (Caspi et al., 1990) und nur bestimmte Labormauslinien, wie HLA transgene Mäuse, für eine durch S-Antigen induzierte EAU empfänglich sind, wohingegen Wildtyp-Mäuse eine hohe Resistenz zeigen (Pennesi et al., 2003).

Eine weitere Möglichkeit eine EAU auszulösen, ist der adoptive Transfer. Dabei werden aktivierte, gegen retinale Proteine sensibilisierte Lymphozyten auf ein passendes Empfängertier übertragen (Shao et al., 2006; McAllister et al., 1987; Palestine et al., 1986; Mochizuki et al., 1985). In einem Experiment mit radioaktiv markierten, gegen S-Antigen sensibilisierten Lymphozyten konnte dies sehr gut veranschaulicht werden (Palestine et al., 1986). Die Autoren gewannen Lymphozyten aus Lymphknoten von zuvor mit S-Antigen immunisierten Ratten. Die Zellen wurden nach *in vitro* Aktivierung mit S-Antigen und radioaktiver Markierung durch intraperitoneale Injektion auf passende Empfängertiere übertragen, worauf sieben der neun Tiere eine EAU entwickelten. Der größte Anteil der transferierten Zellen, die aufgrund ihrer Radioaktivität nachgewiesen werden konnten, sammelte sich in Leber, Milz, Hoden und Thymus der Tiere an. Nur wenige Zellen waren ins Auge vorgedrungen, was jedoch zur Entstehung einer EAU genügt hatte (Palestine et al., 1986). Mittlerweile ist bekannt, dass T-Zellen funktional für das Auslösen einer EAU durch adoptiven Transfer verantwortlich sind (Wildner et al., 2008; Shao et al., 2005). Diese Lymphozytenfraktion wird gezielt für die neueren Transfermodelle verwendet (Wildner et al., 2008; Shao et al., 2005). Dieses Tiermodell veranschaulicht die zentrale Rolle, die gegen retinale Autoantigene sensibilisierte T-Zellen in der Pathogenese autoimmuner Uveitiden einnehmen. Die EAU Modelle in Ratte und Maus haben zwar zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der autoimmunen Uveitis geführt, für die Untersuchung des rezidivierenden Charakters der humanen Uveitis sind diese Tiermodelle allerdings nur eingeschränkt verwendbar. Denn trotz der erfolgreichen Induktion einer rezidivierenden EAU in

Ratten durch Induktion mit IRBP-Peptiden wie zum Beispiel R14 (Diedrichs-Mohring et al., 2008), verläuft ein Großteil der etablierten EAU Modelle in der Ratte typischerweise akut monophasisch. Des Weiteren kann die IRBP-induzierte EAU im Mausmodell zwar spontane Rezidive hervorrufen, diese lassen sich jedoch nicht beeinflussen oder vorhersagen (Caspi, 2003).

2.2.3 Bedeutung der ERU als spontanes und induzierbares Tiermodell der humanen autoimmunen Uveitis

Schon vor einiger Zeit wurde man auf die Parallelen zwischen der ERU und humaner Uveitis aufmerksam (Dick, 1998; Kalsow and Dwyer, 1998; Romeike et al., 1998; Hines, 1984). Sowohl im klinischen Erscheinungsbild als auch bei den pathologischen Veränderungen im Gewebe gleicht die equine rezidivierende Uveitis der immunmedierten Uveitis des Menschen (Deeg et al., 2002a; Deeg et al., 2001) und stellt das einzig verlässliche, spontane (Deeg et al., 2008) und mittlerweile gut akzeptierte Modell für die humane autoimmune Uveitis dar (Deeg, 2009).

Probenmaterial erkrankter Tiere ist in allen Krankheitsstadien verfügbar und kann zudem im Zuge therapeutischer Maßnahmen (Werry and Gerhards, 1992) gewonnen werden. Der spontane, rezidivierende Verlauf der ERU offenbart den wissenschaftlichen Wert dieses Tiermodells bei der Erforschung der initialen Mechanismen, die zur Etablierung einer autoimmunen Uveitis und der charakteristischen Rezidive führen, und bietet dadurch einen Vorteil gegenüber den klassischen induzierbaren EAU Modellen (Deeg et al., 2008). Die Etablierung eines mittels retinaler Autoantigene wie IRBP und CRALBP induzierbaren, der ERU ähnlichen Uveitismodells im Pferd (Deeg et al., 2008; Deeg et al., 2006b; Deeg et al., 2002b) bietet den entscheidenden Vorteil, in derselben Spezies einen spontanen und induzierten Krankheitsverlauf vergleichend untersuchen zu können. Sowohl bei der IRBP- als auch der CRALBP-induzierten Uveitis des Pferdes können Uveitisschübe mehrere Male gezielt re-induziert werden (Deeg et al., 2006b; Deeg et al., 2002b). Dies hebt sie von den meist monophasischen oder nicht vorhersagbar rezidivierenden EAU Modellen in Ratte und Maus (Caspi, 2003) deutlich ab und macht sie für spätere Studien zur Evaluierung therapeutischer Konzepte für die Kontrolle autoimmuner Rezidive äußerst wertvoll (Deeg et al., 2004b). Für das im

Pferdemodell neu entdeckte und charakterisierte retinale Autoantigen CRALBP konnte bereits eine Bedeutung in der humanen autoimmunen Uveitis nachgewiesen werden (Deeg et al., 2007c; Deeg et al., 2006b).

2.3 Der Glaskörper und seine Bedeutung für die Erforschung vitreoretinaler Erkrankungen

In der hinteren Augenkammer gelegen, nimmt der Glaskörper einen Großteil des Auges ein, steht in Kontakt zu okulären Strukturen wie Retina, Linse und Ziliarkörper und fördert die Anlagerung der Retina an die Choroidea (Carastro, 2004; Balazs, 1973; Weidman, 1973; Hogan, 1963). Als größte anatomische Komponente des Auges besteht der Glaskörper zu 99% aus Wasser und zu etwa einem Prozent aus Hyaluronsäure, Hyalozyten und Kollagenfibrillen (Carastro, 2004). Ein Netzwerk dünner Kollagenfibrillen, bestehend aus Kollagen II, IX, V und XI, sorgt für die Aufrechterhaltung der Gelstruktur des Glaskörpers, wobei die Zwischenräume der Kollagenfibrillen beim Säugetier vor allem von Hyaluronsäure ausgefüllt werden (Bishop, 2000). Okuläre Gewebe wie Ziliarkörperepithel oder retinale Gliazellen sind an der Biosynthese von Glaskörperbestandteilen potenziell beteiligt (Itakura et al., 2005; Carastro, 2004; Bertazolli-Filho et al., 2003; Bishop et al., 2002; Laicine and Haddad, 1994). Es wird davon ausgegangen, dass die Strukturproteine des Glaskörpers wie Kollagen II und Fibrillin zum größten Teil aus dem Ziliarkörper stammen. Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese dieser Strukturproteine während der Embryogenese sehr hoch ist, postnatal jedoch eine deutliche Erniedrigung der Syntheserate erfolgt, welche sich schließlich, der Annahme nach, auf einem minimalen Niveau einpendelt (Halfter et al., 2008; Halfter et al., 2005). Dies führt vermutlich mit fortschreitendem Lebensalter zu einer erniedrigten Abundanz dieser Proteine im Glaskörper (Halfter et al., 2008; Halfter et al., 2005). Die hohe Halbwertszeit vieler dieser Glaskörperstrukturproteine wird als Ursache für deren niedrige Syntheserate im Erwachsenenalter vermutet, da eine anhaltende Expression von sehr langsam abbaubaren Proteinen auf Dauer zu einer Ansammlung dieser Proteine im Glaskörper und dadurch zu einer Einschränkung der Sehfähigkeit führen könnte (Halfter et al., 2008; Halfter et al., 2005). Für die Vorläuferform von Kollagen II, Prokollagen II, wurde nach Vergleich der

Glaskörperkonzentration des Proteins vor und nach einer Vitrektomie eine gleichbleibende Syntheserate im Erwachsenenalter postuliert (Itakura et al., 2005). Allerdings fehlte dieser Studie ein Vergleich mit der embryonalen und postnatalen Syntheserate. Für verschiedene andere Glaskörperproteine konnte ebenfalls eine lokale Sekretion im Auge nachgewiesen werden. So wird das Glaskörperprotein Opticin von nicht pigmentiertem Ziliarkörperepithel sezerniert (Le Goff and Bishop, 2007). Bei Apolipoprotein E handelt es sich um ein Sekretionsprodukt der Müller-Gliazellen (Amaratunga et al., 1996), und das ebenfalls im Glaskörper nachweisbare Protein Transferrin stammt zumindest teilweise aus okulärem Gewebe (Bertazzoli-Filho et al., 2003; Laicine and Haddad, 1994). Im Gegensatz zu den mit dem Alter abnehmenden Konzentrationen der Glaskörperstrukturproteine scheint dies nicht für alle Proteine zuzutreffen (Halfter et al., 2008; Halfter et al., 2005). So wurde für Transferrin und Fibronektin zumindest beim Huhn eine konstante Konzentration im Glaskörper von der Embryogenese bis zum adulten Tier nachgewiesen (Halfter et al., 2008; Halfter et al., 2005). Funktionell wird einem intakten Glaskörper eine zentrale Bedeutung für ein gesundes Auge zugeschrieben (Holekamp, 2010). Diese Aussage basiert unter anderem auf der beobachteten Assoziation von altersbedingter (Harocopos et al., 2004) oder operativer (Melberg and Thomas, 1995) Glaskörperverflüssigung und Kataraktentwicklung (Holekamp, 2010). Eine durch Verflüssigung des Glaskörpers bedingte Alternierung bei der Verteilung molekularen Sauerstoffs im Auge, eine kürzlich für den Glaskörper entdeckte Funktion (Shui et al., 2009), könnte an der Kataraktbildung beteiligt sein (Holekamp, 2010). Aufgrund des engen Kontaktes zwischen Glaskörper und Retina (Balazs, 1973; Weidman, 1973) beeinflussen sowohl physiologische als auch pathologische Zustände der Retina die Zusammensetzung der Proteinkomponenten des Glaskörpers (Shitama et al., 2008). Können keine Retinaprobe für Forschungszwecke gewonnen werden, so wird oft Glaskörpermaterial verwendet, um einen indirekten Blick auf die in der Retina ablaufenden pathophysiologischen Prozesse werfen zu können (Garcia-Ramirez et al., 2009; Garcia-Ramirez et al., 2007). Veränderungen im Proteinexpressionsmuster des Glaskörpers konnten bei verschiedenen vitreoretinalen Erkrankungen nachgewiesen werden (Zipplies et al., 2010a; Gao et al., 2008; Shitama et al., 2008; Deeg et al., 2007a; Garcia-Ramirez et al., 2007; Kim et al., 2007; Funatsu et al., 2003; Yamane et al., 2003).

Des Weiteren stellt der Glaskörper bei verschiedenen Augenerkrankungen ein potenzielles Reservoir für Entzündungsmediatoren dar (Bahk et al., 2007). Die Bedeutung der im Glaskörper enthaltenen Faktoren für die bei einer Uveitis ablaufenden immunologischen Vorgänge veranschaulichte ein im Kaninchen induzierbares Uveitis Modell (Brinkman et al., 1990). Die Autoren induzierten eine primäre Uveitis durch intravitreale Injektion von humanem Serum Albumin. Durch intravenöse Injektion des verwendeten humanen Albumins konnte nach Abklingen der primären Uveitis ein sekundärer Schub ausgelöst werden. Beim Vergleich des Schweregrades der sekundären Uveitis zwischen vitrektomierten und nicht vitrektomierten Augen der jeweils selben Tiere beobachtete man einen milderen Verlauf der Uveitis in den vitrektomierten Augen. Es zeigte sich demnach eine Assoziation zwischen Bestehen des pathologisch veränderten Glaskörpers und der Reaktivierung der sekundären Immunantwort (Brinkman et al., 1990).

2.4 Differenzielle Proteomanalyse

Unter einem Proteom versteht man die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt eines definierten Zustands in einem Organismus oder Gewebe von einem Genom exprimiert werden (Wilkins et al., 1996a; Wilkins et al., 1996b). Das Proteom eines Organismus ist hoch dynamisch und verändert sich je nach funktionalem Zustand, sei er physiologisch oder pathologisch. Diese Effekte auf die Proteinzusammensetzung eines Gewebes oder einer Körperflüssigkeit können charakteristische Veränderungen als Reaktion auf eine Krankheit oder einen sonstigen Reiz darstellen (Apweiler et al., 2009). Die differenzielle Proteomanalyse untersucht durch Vergleichsexperimente Gewebe in gesundem und erkranktem Zustand mit dem Ziel, Änderungen der Proteinexpressionsmuster zu detektieren (Jungblut et al., 1999). Durch diesen nicht-Hypothesen getriebenen Ansatz können somit Moleküle mit einer Schlüsselposition im untersuchten Krankheitsgeschehen und letztendlich die damit zusammenhängenden und mit der Pathogenese assoziierten Signalwege identifiziert werden (Hauck et al., 2007). Die Identifikation und Charakterisierung krankheitsspezifischer Proteine oder Biomarker zur Früherkennung und Prognostik einer Erkrankung ist von zentraler Bedeutung für ein grundlegendes Verständnis pathologischer Prozesse (Apweiler et al., 2009).

2.4.1 Differenzielle Proteomanalyse bei der ERU

Durch die Identifizierung von mit der ERU assoziierten, proteinbasierten Signalübertragungswegen und Biomarker erhofft man sich ein verbessertes Verständnis der Pathomechanismen dieser Erkrankung (Deeg et al., 2007a). Basierend auf 2D-PAGE und 2D-Difference-in-gel-electrophoresis (2D-DIGE) wurden bei der ERU die Proteome betroffener Gewebe wie Retina und Glaskörper sowie Serum und periphere Blutleukozyten im kranken und gesunden Zustand vergleichend analysiert. Basierend auf diesen Untersuchungen konnten neue Erkenntnisse über die der ERU zugrunde liegenden Pathomechanismen gewonnen, und mit PEDF ein potenzieller Serum-Biomarker identifiziert werden (Kramer, 2010; Zipplies et al., 2010a; Zipplies et al., 2009; Deeg et al., 2007a; Hauck et al., 2007). Der Nachweis eines deutlich erhöhten Gesamtproteingehalts in den Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden, der mit einem Durchschnitt von 3,67 mg/ml 24 mal höher lag als der durchschnittliche Proteingehalt der Glaskörper gesunder Pferdeaugen, rückte eine Untersuchung der Proteinzusammensetzung des Glaskörpers in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Durch 2D-PAGE Analyse der Glaskörper konnten bei den Proben erkrankter Tiere im Mittel 522 verschiedene Proteinspots detektiert werden, welche durchschnittlich 482 detektierten Proteinspots der Kontrollproben gegenüberstanden (Deeg et al., 2007a). Insgesamt konnten 139 Proteinspots identifiziert werden, die 42 verschiedene Proteine repräsentierten, von denen neun Proteine bei der ERU differenziell exprimiert waren. Die Abundanz der Proteine Albumin, Komplementfaktor 3, Apolipoprotein A1, IgG, Karboxylesterase D1 sowie SAP18 war in uveitischen Proben deutlich erhöht, wohingegen die Expression des Plasma-Retinol-bindenden Proteins und der an der Blut-Retina-Schranke beteiligten Proteine PEDF und Prostaglandin H2 D-Isomerase deutlich zurückging. Die in der Retina ebenfalls zurückgehende PEDF-Expression korrelierte mit der Zunahme der Expression des Proteins VEGF und der Zerstörung der Blut-Retina-Schranke. Aufgrund dieser Funde wurde eine zentrale Rolle der verminderten PEDF-Expression für die Pathogenese der ERU vermutet (Deeg et al., 2007a). Eine erniedrigte Expression des die Neoangiogenese inhibierenden und gleichzeitig die Blut-Retina-Schranke stabilisierenden Proteins PEDF fand sich auch bei der differenziellen Proteomanalyse der Retina von an ERU erkrankten und Kontrollaugen (Hauck et al.,

2007). Dieselbe Studie zeigte auch eine gravierende Veränderung des Proteinexpressionsmusters von Markerproteinen für den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke im Zuge der Erkrankung, deren Expression in der Retina mit dem Schweregrad der ERU positiv korrelierte. Zu diesen Proteinen zählen Transferrin, Albumin und Hämoglobin. Insgesamt konnten 125 Proteinspots erfolgreich identifiziert werden. Für 17 verschiedene Proteine konnte eine differenzielle Expression in der uveitischen Retina nachgewiesen werden, darunter die vermehrte Expression des glialen fibrillären sauren Proteins (GFAP) sowie Vimentin im erkrankten Gewebe bei gleichzeitig verminderter Expression von Glutaminsynthetase. Dieses Expressionsprofil wurde als Hinweis auf eine Aktivierung von Müller-Gliazellen im Krankheitsgeschehen der ERU gewertet. Nach immunhistochemischem Nachweis der Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IFN-gamma an den Müller-Gliazellen in der an ERU erkrankten Retina wurde für diese Zellen eine entzündungsfördernde Funktion im Pathomechanismus der ERU postuliert (Hauck et al., 2007).

Um potenzielle Biomarker für die Früherkennung der ERU identifizieren zu können folgte eine differenzielle Analyse des Serumproteoms, im Zuge derer 128 Proteinspots 33 verschiedener Proteine eindeutig identifiziert werden konnten. Sieben dieser Proteine waren in Seren von ERU-Pferden im Vergleich zu Kontrollpferden differenziell reguliert. Für IgG konnte eine erhöhte Expression in den Seren erkrankter Pferde detektiert werden, während hingegen die Expression von PEDF, verschiedenen Albuminfragmenten, Antithrombin III, Vitamin D bindendem Protein, Komplementfaktor 1 sowie der leichten Kette von Komplementfaktor 4 deutlich erniedrigt war. Das auch schon in den differenziellen Proteomanalysen des ERU-Zielgewebes als vermindert exprimiert detektierte Protein PEDF wurde aufgrund dessen als vielversprechender Serumbiomarkerkandidat angesehen und konnte in einer Kohorte von 116 ERU- und 115 Kontrollseren mittels Sandwich-ELISA erfolgreich validiert werden (Ziplies et al., 2009). In einem zweiten Experiment untersuchten dieselben Autoren depletierte Seren. Je nach Probe gelang eine Detektion von 1318 bis 1669 Proteinspots, für 34 Spots konnte mittels 2D-DIGE eine differenzielle Expression zwischen ERU und Kontrollgruppe festgestellt werden. Fünfzehn dieser Spots von insgesamt zehn verschiedenen Proteinen wurden eindeutig identifiziert. Für das in dieser Studie erstmals mit Uveitis in Verbindung gebrachte entzündungsassoziierte Protein Kininogen konnte neben der verminderten

Expression im Serum von an ERU erkrankten Pferden eine erhöhte Expression in uveitischen Glaskörpern und Retinae nachgewiesen werden (Zipplies et al., 2010a). Um neue Erkenntnisse über die zellmedierten Pathomechanismen der ERU zu erhalten schloss sich eine differenzielle Untersuchung der in peripheren Blutleukozyten exprimierten Proteine mittels 2D-DIGE an (Kramer, 2010). Für das Lymphozytenproteom wurden 1581 Proteinspots detektiert, wovon 352 Proteinspots, welche 229 verschiedene Proteine repräsentieren, eindeutig identifiziert werden konnten. Unter den 50 differenziell exprimierten Proteinspots dieses Experiments fanden sich Spots von neun eindeutig identifizierten Proteinen. Ein zweites 2D-DIGE Experiment, welches auch Granulozyten mit einbezog, führte zur Detektion von ebenfalls 50 differenziell exprimierten Proteinspots, aus denen 20 differenziell exprimierte Proteine identifiziert werden konnten. Von den differenziell exprimierten Proteinen dieser Analysen erscheinen die funktionell mit der Zellmigration zusammenhängenden und in den Leukozyten der erkrankten Tiere deutlich vermindert exprimierten Proteine Talin1 und Septin 7 für die T-Zell medierte Pathogenese der ERU besonders interessant (Kramer, 2010).

2.4.2 Differenzielle Proteomanalyse der Glaskörper von Ratten mit EAU

Neben der von Deeg et al (siehe Kapitel 2.4.1) durchgeführten differenziellen Analyse des Glaskörperproteoms bei der equinen rezidivierenden Uveitis (Deeg et al., 2007a) finden sich nur spärliche Berichte über die Anwendung dieses proteomischen Ansatzes bei der Untersuchung der Proteinexpression in Glaskörpern anderer Uveitis-Tiermodelle (Pubmed Recherche Stand März 2010). Bahk et al. analysierten Proteine der Glaskörperproben eines IRBP-induzierten EAU Modells in der Ratte und fanden eine vermehrte Expression von betaA4-Kristallin und B2-Kristallin sowie eine posttranslationale Modifikation von alphaA-Kristallin und B-Kristallin in den EAU Glaskörperproben (Bahk et al., 2007). Die Analyse der Proteine erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese mit nachfolgender Identifikation über MALDI-TOF/MS, sowie einer nicht gelbasierten LC/LC-MS/MS-Analyse, wobei durch die letztere mit im Mittel 200 verschiedenen identifizierten Proteinen im Vergleich zur gelbasierten Analyse mit nur 30 identifizierten Proteinspots, eine deutlich höhere Effektivität erreicht wurde. Durch die LC/LC-MS/MS- Analyse konnte zudem eine

vermehrte Expression von Heat-Schock-Proteinen in den EAU Glaskörperproben detektiert werden (Bahk et al., 2007).

2.4.3 Differenzielle Proteomanalyse von Glaskörpermaterial bei humanen vitreoretinalen Erkrankungen

Der durch offensichtliche Gründe bedingte Mangel an humanen Retinaprobe n hat den im Zuge therapeutischer Maßnahmen gewonnenen Glaskörper in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses bei der Erforschung vitreoretinaler Erkrankungen gerückt. Man erhofft sich so indirekt Erkenntnisse über die Pathomechanismen in der Retina gewinnen zu können (Garcia-Ramirez et al., 2009; Garcia-Ramirez et al., 2007). Erstaunlicherweise fehlen bislang systematische Analysen der Glaskörperproteinexpressionsmuster von Uveitispatienten, hingegen wurden differenziell exprimierte Proteine in Glaskörpern von Patienten mit verschiedenen Retinopathieformen von mehreren Autoren untersucht. Mittels 2D-Gelelektrophorese konnten Yamane et al. etwa 600 Proteinspots in Glaskörperproben von Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie (PDR) detektieren, woraus 141 Spots von 38 verschiedenen Proteinen massenspektrometrisch identifiziert werden konnten (Yamane et al., 2003). Die Proteine Katalase und Neuronen spezifische Enolase (NSE) konnten in der Vergleichsgruppe mit Makulaloch nicht nachgewiesen werden, und wurden somit als differenziell und für die untersuchte Erkrankung bedeutsam eingestuft (Yamane et al., 2003). 2007 nutzten Garcia-Ramirez et al. die 2D-DIGE Technik um erstmalig eine systematische quantitative Analyse des Glaskörperproteoms bei PDR-Patienten durchzuführen (Garcia-Ramirez et al., 2007). Sie detektierten annähernd 1400 Proteinspots, aus denen 41 im Vergleich zur Kontrollgruppe differenziell exprimiert waren. Diese Spots konnten 11 verschiedenen Proteinen zugeordnet werden. Eine erhöhte Expression wurde für Proteine der Komplementfaktorfamilie sowie Apolipoprotein A1 und Fibrinogen nachgewiesen, wohingegen die Expression von Inter-alpha-Trypsininhibitor, IRBP und PEDF zurück ging (Garcia-Ramirez et al., 2007). Mittels einer nicht-gelbasierten Methode (2D-nano-LC-MS/MS) gelang Yu et al. die Identifikation von 255 verschiedenen Proteinen aus Glaskörpern von Patienten mit proliferativer Retinopathie (PVR) und Kontrollproben (Yu et al., 2008). Komplementfaktoren und extrazelluläre Proteine waren verstärkt oder exklusiv in PVR-Proben exprimiert, wobei die Autoren das auch

im Serum nachweisbare Kininogen 1 als potenziellen Biomarker postulierten (Yu et al., 2008).

Die stetig steigenden Proteinidentifikationszahlen aus den untersuchten Glaskörperproben der neueren Studien spiegeln die fortschreitenden Verbesserungen auf dem Gebiet der Massenspektrometrie wieder und weisen auf das bisher nicht genutzte Potential dieser Methode bei der Studie der Proteinexpression in Glaskörpern von Uveitis Patienten hin.

2.4.4 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist zu einem unverzichtbaren Werkzeug der biologischen Forschung geworden, ohne deren Hilfe viele wichtige Erkenntnisse über die an biologischen Mechanismen beteiligten Proteine sowie deren post-translationale Modifikationen und Interaktionen mit anderen Proteinen nicht möglich wären (Ahrne et al., 2009; Kocher et al., 2009; Chen and Pramanik, 2008).

2.4.4.1 LC-MS/MS

Die klassisch gebräuchliche Methode um Proteine komplexer biologischer Proben zu identifizieren, zu quantifizieren und zu vergleichen ist die der massenspektrometrischen Analyse vorangestellte zweidimensionale Gelelektrophorese (Hanash, 2000; Langen et al., 2000). Bei dieser Technik werden die Proteine zuerst über ihren isoelektrischen Punkt aufgetrennt, um danach in der zweiten Dimension anhand ihres Molekulargewichts separiert zu werden. Die Analyse komplexerer Proteome wird dabei durch die erforderliche Extraktion, Verdauung und Analyse jedes einzelnen detektierten Proteinspots erheblich erschwert. Ferner birgt diese Methode den Nachteil einer begrenzten Sensitivität und technischer Schwierigkeiten bei der Auftrennung und Identifikation nicht-löslicher, niedrig abundanter, membranständiger Proteine sowie von Proteinen mit sehr hohem oder niedrigem Molekulargewicht und extremen isoelektrischen Punkten (Old et al., 2005; Corthals et al., 2000; Santoni et al., 2000; Fountoulakis et al., 1999). Eine Alternative zu dieser Methode bietet die nicht-gelbasierte, an ein Massenspektrometer gekoppelte Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS) (McDonald and Yates, 2002). Hier wird eine sogenannte bottom-up

Herangehensweise verwendet, bei der die Proteine einer Probe zuerst mittels proteolytischer Spaltung zu kleineren Peptiden verdaut werden, um im Anschluss an Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), mittels einer Elektrospray- oder Nanosprayionisierung ionisiert und schließlich durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) analysiert zu werden. Die MS/MS Spektren einzeln eluierter Peptide werden gewonnen, und die in der Probe vorhandenen Proteine können so über Abgleiche mit vorhergesagten MS/MS Spektren einer Proteinsequenzdatenbank unter Verwendung von Programmen wie Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) identifiziert werden (Chen and Pramanik, 2008; Wang et al., 2008; Craig et al., 2004; McDonald and Yates, 2002). Verschiedene massenspektrometrische Systeme wie beispielsweise lineare Ionenfallen, Orbitrap oder Hybrid MS/MS-Spektrometer können für die LC-MS/MS Analyse verwendet werden (Chen and Pramanik, 2008; Makarov et al., 2006; Scigelova and Makarov, 2006). Die Systeme sind meist on-line gekoppelt, wo bei sich on-line auf ein System bezieht, bei dem die zu analysierenden Fraktionen ohne Unterbrechung des Arbeitsflusses automatisch von Dimension zu Dimension weitergereicht werden (Dixon et al., 2006). Eine Quantifizierung kann dann mittels Label-free Quantifizierung erfolgen, die entweder auf einer Spektrenzählung (spectral count) oder einer Peptidchromatographie-Intensitätsmessung basieren kann (Wang et al., 2008; Bantscheff et al., 2007; Wang et al., 2006; Liu et al., 2004). Da immer komplexere biologische Proben untersucht werden müssen, befindet sich die Massenspektrometrie in einer fortwährenden Weiterentwicklung. Konnten mit der gelbasierten Analyseverfahren bei guten Ergebnissen 500 bis 600 Proteine aus einer Probe identifiziert werden (Zhu et al., 2010; Langen et al., 2000), so erlaubten schon die ersten LC-MS/MS Systeme eine Identifikation von fast 1500 verschiedenen Proteinen (Washburn et al., 2001). Mit neueren LC-MS/MS Systemen sind noch bessere Resultate möglich, Zhang et al. konnten mit dieser Methode 13779 unterschiedliche Peptide von etwa 2982 Proteinen in Mäuseplasma detektieren (Zhang et al., 2008).

2.4.4.2 LTQ Orbitrap

Ein mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie kompatibles Massenspektrometrie-System ist das Hybrid MS/MS-Spektrometer LTQ Orbitrap (Chen and Pramanik, 2008; Scigelova and Makarov, 2006). Das System besteht aus zwei

vollständigen Masseanalysegeräten und setzt sich aus dem ersten Massenanalysegerät, einer linearen Ionenfalle, einer zwischengeschalteten C-Trap und dem Orbitrap Massen Analysator (einer elektrostatischen Ionenfalle) zusammen. Die in der linearen Ionenfalle gesammelten Ionen werden axial ausgeworfen und in die C-Trap übergeleitet, wo sie gespeichert und komprimiert werden, was die Analysekapazitäten des Hybrid MS/MS Systems zusätzlich verbessert. Danach werden die Ionen radial aus der C-Trap ausgeworfen, in die Orbitrap eingespeist und rotieren dort um eine zentrale, spindelförmige Elektrode, wobei sie zusätzlich axial oszillieren. Die Frequenz der Oszillation wird durch das Masse/Ladungs-Verhältnis der Ionen beeinflusst und ermöglicht eine Detektion der Massenspektren (Perry et al., 2008; Scigelova and Makarov, 2006). Die LTQ Orbitrap zeichnet sich durch eine hohe Auflösung von über 100 000 (FWHM) und hohe Massegenauigkeit (2-5 ppm) aus, was die Rate falschpositiver Protein-Identifikationen in bottom-up Versuchen signifikant reduziert und die LTQ Orbitrap zu einem leistungsstarken Instrument für die Analyse komplexer Proteingemische macht (Perry et al., 2008; Makarov et al., 2006).

2.4.5 Systembiologie

Systembiologie ist eine Disziplin der Wissenschaft, die danach strebt, alle molekularen Elemente eines biologischen Systems zu erfassen und zu quantifizieren (Hood et al., 2004). Auf diese Weise können die Interaktionen dieser Elemente beurteilt, eingeschätzt und in graphische Netzwerkmodelle übertragen werden. Diese graphische Netzwerkmodelle dienen als Basis für Hypothesen, um neu auftretende Mechanismen und biologische Prozesse erklären zu können (Hood et al., 2004).

Biologische Mechanismen werden von einer Vielzahl von Proteinen erzeugt, die sich zu temporären funktionalen Gruppen zusammenfinden, wobei ein einzelnes Protein in verschiedenen funktionalen Gruppen und somit bei verschiedenen Mechanismen eine Rolle spielen kann (Monti et al., 2009). Für das Verständnis der auf zellulärer Ebene ablaufenden Mechanismen und die molekulare Funktion einzelner Proteine in Bezug auf diese ist ein weitreichendes Verständnis der Protein-Protein Interaktionen notwendig (von Mering et al., 2007).

Der in den letzten Jahren angewendete systembiologische Ansatz, im Zuge dessen groß angelegte Proteinanalysen durchgeführt wurden, hat neue Aspekte der

Pathogenese vielschichtiger Krankheiten wie neurodegenerativer Erkrankungen ans Licht gebracht. Die proteomische Analyse komplexer biologischer Proben resultiert in einer umfassenden Darstellung und Charakterisierung der Proteinexpressionsmuster (Liu et al., 2010). Diese recht junge Wissenschaftsdisziplin hat in die Uveitisforschung noch nicht Einzug gehalten, findet aber in der Tumorforschung bereits Verwendung. Bei Prostatatumoren spiegeln sich die verschiedenen Krankheitsstadien in den sich dynamisch verändernden Protein-Expressionsmustern der betroffenen Zellen wieder (Hood et al., 2004). In einer Studie zu androgen unabhängigen Prostatakrebs konnte mittels differenzieller Identifizierung exprimierter Phosphoproteine und anschließender Signalweganalyse durch die STRING (Search Tool to find the recurring Instances of the Neighborhood of Genes)-Software (<http://string.embl.de/>, frei im Web zugänglich) der MAPK-Signaltransduktionsweg als potenziell an der Entartung der Zellen beteiligter Vorgang detektiert werden (Wang et al., 2009). Dies rückt den MAPK-Signalweg in den Fokus einer möglichen Therapie für Androgen unabhängigen Prostatakrebs (Wang et al., 2009). Auf der Suche nach einer Verbindung zwischen den pathologischen Befunden von kolorektalen Adenomen und Karzinomen und den zugrunde liegenden Tumor-assoziierten genetischen Mechanismen untersuchte eine Forschergruppe verschiedene Zellkern-Proteinfraktionen, darunter auch die Zellkernmatrixproteine dieser Tumorzellen mittels LC-MS/MS (Albrethsen et al., 2010). Es konnten über 889 Proteine reproduzierbar identifiziert werden. In der datenbankbasierten Protein-Protein Interaktionsanalyse der 158 Proteine der Zellkernmatrixfraktion zeigten sich drei verschiedene funktionale Proteincluster: Eine hnRNP (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins)-Gruppe, ein Gruppe aus Strukturproteinen und eine Gruppe mit Kernporenproteinen. So konnte am Ende ein umfassender funktionaler Überblick über die Proteinfraktion der Zellkernmatrix dieser Tumorzellen erzielt werden, was erste Aufschlüsse über die Veränderungen während der Kanzerogenese an dieser potenziell an der Genregulation beteiligten Struktur ergab (Albrethsen et al., 2010). Diese und ähnliche Studien verdeutlichen das Potenzial der funktionalen Proteomik und der Datenbank gestützten Proteininteraktionsanalyse. Basierend auf dieser Interaktionsanalyse kann in den identifizierten Proteinexpressionsmustern nach funktionalen Modulen gesucht werden, was zu einem umfassenderen, systematischeren Verständnis der zugrunde liegenden Pathomechanismen führt (Pinkert et al., 2010).

Die Medizin von heute ist reaktiv und konzentriert sich auf die Therapie bereits existierender Erkrankungen meist spät in deren Verlauf. Systembiologische Herangehensweisen hingegen könnten auf dem Weg zu einer mehr prädiktiven und letztendlich präventiven Medizin in Zukunft eine entscheidende Rolle spielen (Hood et al., 2004).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

Insgesamt wurden in dieser Arbeit Proben von 87 verschiedenen Pferden untersucht.

3.1.1 Glaskörperproben

In dieser Arbeit fanden 35 Glaskörperproben von 26 augengesunden Pferden und 30 Glaskörperproben von 30 an ERU erkrankten Pferden Verwendung. Alle Proben der an ERU erkrankten Tiere stammten aus dem Patientengut der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand Prof. H. Gerhards). Die Diagnose der equinen rezidivierenden Uveitis wurde anhand klinischer Kriterien gestellt (Werry and Gerhards, 1992). Die Glaskörperproben augengesunder Pferde stammten entweder von Pferden, die aufgrund anderer nicht heilbarer Erkrankungen euthanasiert werden mussten, oder von zur Lebensmittelgewinnung in der Pferdemetzgerei Veit (Deggendorf) geschlachteten Pferden. Für die Experimente erfolgte keine Selektion der Proben.

Die Glaskörperproben der augengesunden Pferde wurden nach der Euthanasie oder der Schlachtung zeitnah entnommen. Die Entnahme wurde unter Verwendung steriler Spritzen und Kanülen durchgeführt. Der Einstich erfolgte im dorsotemporalen Bereich des Bulbus in der Sklera, ca. 0,5 cm entfernt vom Rand der Kornea. Die Glaskörperproben der an ERU erkrankten Pferdeaugen wurden im Rahmen einer therapeutischen Pars-Plana-Vitrektomie gewonnen und lagen danach in BSS¹ Lösung 1:10 verdünnt vor. Um einem Abbau der Proteine in den Glaskörperproben durch Proteasen vorzubeugen, erfolgte die Zugabe eines Proteaseinhibitors². Die Proben wurden nach der Gewinnung aliquotiert, währenddessen bei 4°C auf Eis gekühlt und anschließend bei -20°C gelagert.

¹ Fa. Alcon, Freiburg

² Fa. Roche, Mannheim

3.1.1.1 Gefriertrocknung und Dialyse

Um für die Experimente die erforderlichen Proteinmengen in möglichst kleinen Volumina vorliegen zu haben, erfolgte eine Volumeneinengung der Glaskörperproben durch Gefriertrocknung. Nach Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff konnte den Proben das Wasser durch Sublimation im Vakuum eines Lyophilisators entzogen werden. Das Lyophilisat wurde danach in einer entsprechend geringen Menge Aqua bidest. gelöst.

Da hohe Ionenkonzentrationen bei der Auftrennung der Proteine, insbesondere während der isoelektrischen Fokussierung, potenziell interferieren können, wurden die Glaskörperproben zur Reduktion des Salzgehaltes dialysiert. Die Dialyse erfolgte bei 4°C für 12 Stunden in Slide-A-Lyzer Mini Dialysegefäßen³ (3,5 kDa cut-off) gegen einen Phosphatdialysepuffer. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung der Proben nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford, 1976).

Phosphatdialysepuffer pH 7,6

Na ₂ HPO ₄	7,52 g
----------------------------------	--------

NaH ₂ PO ₄	1,07 g
----------------------------------	--------

gelöst in 1000 ml Aqua bidest.

3.1.2 Präparate für die Immunhistochemie

Für diese Arbeit erfolgte die immunhistochemische Untersuchung von 12 gesunden und 19 an ERU erkrankten Pferdeaugen. Alle Augenpräparate lagen bereits in Paraffin eingebettet vor.

³ Fa .Thermo-Scientific, Bonn

3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Glaskörperproben erfolgte nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford, 1976). Diese beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 von 470 nm auf 595 nm nach der Komplexbildung des Farbstoffes mit Proteinen. Die Absorption verhält sich dabei proportional zu der in der Probe vorhandenen Proteinmenge. Durch Abgleich mit der Eichkurve eines Standardproteins kann dann die Proteinmenge in der Probe bestimmt werden.

In zwei Vertiefungen einer 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte⁴ wurden je 5 µl der zu bestimmenden Probe pipettiert, und anschließend je 250 µl Bradford-Reagenz⁵ zugegeben. Als Eichkurve diente ein BSA⁶-Standard der in den Konzentrationen 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1 und 2 mg/ml auf derselben 96-Lochplatte in derselben Art und Weise wie die zu bestimmende Probe gemessen wurde. Nach Zugabe des Bradford-Reagenz und ca. 30 sekundiger Inkubation der Platte auf einem Schüttler erfolgte nach zehn weiteren Minuten die photometrische Bestimmung der Absorption bei 595 nm. Zur Messung der Lichtabsorption diente ein vollautomatisch arbeitendes Mikroprozessor gesteuertes Lesegerät⁷. Die Probenproteinmenge wurde dann durch Abgleich der erhaltenen Nettoabsorption der Probe (Durchschnittswert der Doppelbestimmung) mit der Eichkurve berechnet.

Lösungen für die Proteinbestimmung

Bradford –Reagenz⁸, gebrauchsfertig

BSA-Standard Lösung, 2 mg/ml

⁴ Fa. Sarstedt, Nümbrecht

⁵ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁶ Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien: Fa. Applichem, Darmstadt

⁷ Fa. Tecan, Crailsheim

⁸ Fa. Sigma, Deisenhofen

3.3 Puffer und Lösungen

3.3.1 Puffer und Lösungen für die 1D und 2D Gelelektrophorese

Acrylamid-Lösung

Acrylamide-Bis Lösung, 33%⁹ gebrauchsfertig.

Tris-HCl-Puffer 1 M, pH 6,8

Tris (1 M) 12,11 g
mit 5 M HCl auf pH 6,8 titrieren,
ad 100 ml Aqua bidest.

Äquibrierungslösung

1 M Tris-HCl pH 6,8 50,00 ml
Glycerin 300,00 ml
Harnstoff¹⁰ (6 M) 360,00 g
SDS (1,8%) 18,00 g
ad 1000 ml Aqua bidest.

Agarose Lösung:

Agarose¹¹ (0,5%) 0,25 g
ad 50 ml Elektrophoresepuffer.
Nach dem Aufkochen die Lösung auf 58°C temperieren.
Vor der Verwendung wurden zusätzlich 0,5 ml SDS-Lösung 20%
zugesezt.

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung 10%

Ammoniumpersulfat (10%) 0,10 g
ad 1 ml Aqua bidest.

⁹ Fa. Serva, Heidelberg

¹⁰ Fa. GE Healthcare, Freiburg

¹¹ 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 für die Elektrophorese 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

Gelpuffer, pH 8,8

Tris (1,5 M)	18,15 g
--------------	---------

mit 5 M HCl auf pH 8,8 titrieren.

Ad 100 ml Aqua bidest.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10%

Na-dodecylsulfat (35 mM)	10,00 g
--------------------------	---------

ad 100ml Aqua bidest. Lösung bei Raumtemperatur lagern.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 20%

Na-dodecylsulfat (70 mM)	20,00 g
--------------------------	---------

ad 100 ml Aqua bidest. Lösung bei Raumtemperatur lagern.

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 ¹²	0,40 ml

ergibt 8,00 ml Probenpuffer.

Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris (0,5 M)	6,00 g
--------------	--------

ad 100 ml Aqua bidest.

Mit 5 M HCl auf pH 6,8 einstellen.

¹² Fa. BioRad, München

Lysepuffer

Harnstoff ¹³ (9M)	27,00 g
Thioharnstoff ¹⁴ (2M)	7,60 g
CHAPS ¹⁵ (4%)	2,00 g
DTT ¹⁶ (65 mM)	0,50 g

Ad 50 ml Aqua bidest.

Bei Raumtemperatur fünf Stunden rühren, dann zu je 1 ml aliquotieren und bei -20 °C lagern. Vor Gebrauch 100 µl Aqua bidest. zugeben.

3.3.2 Puffer und Lösungen für den Western Blot

Anodenpuffer I 0,3 M, pH 10,4

Tris	36,33 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Anodenpuffer II 25 mM, pH 10,4

Tris	3,03 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Kathodenpuffer, pH 9,4

Tris	3,03 g
ε-Aminocaprinsäure ¹⁷	5,25 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

¹³ Fa. GE Healthcare, Freiburg

¹⁴ Fa. Sigma, Deisenhofen

¹⁵ Fa. Sigma, Deisenhofen

¹⁶ Fa. Serva, Heidelberg

¹⁷ Fa. Merck, Darmstadt

Ponceau-Färbelösung

Ponceau-S ¹⁸ (0,2%)	0,20 g
Trichloressigsäure (3%)	3,00 g
ad 100 ml Aqua bidest.	

PBS-Tween Lösung (PBS-T)

NaCl (136,9 mM)	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ (1,4 mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (8,1 mM)	1,45 g
Tween-20 (0,05%)	0,50 ml
ad 1000 ml Aqua dest.	

PBS-Tween-Polyvinylpyrrolidone (PBS-T-PVP) Lösung, pH 7,2

Polyvinylpyrrolidone ¹⁹ (PVP40)	10,00 g
ad 1000 ml PBS-T.	

ECL Lösung A

Tris-HCl (0,1 M), pH 8,6	2,42 g
Luminol ²⁰	0,05 g
ad 200 ml Aqua bidest.	
Lagerung bei 4 °C.	

ECL Lösung B

Para-Hydroxycoumarinsäure ²¹	110,00 mg
in 100 ml DMSO lösen.	
Dunkel und bei RT lagern.	

H₂O₂ (30%)

¹⁸ Fa. Sigma, Deisenhofen

¹⁹ Fa. Sigma, Deisenhofen

²⁰ Fa. Sigma, Deisenhofen

²¹ Fa. Sigma, Deisenhofen

ECL-Gebrauchslösung

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

Lsg. A	1,00 ml
Lsg. B	0,10 ml
H ₂ O ₂	3,00 µl

3.3.3 Puffer und Lösungen für die Strep/FLAG-Tandem Affinitäts-Aufreinigung

PEI-Transfektionsreagenz

Polyethylenimine²² 100 µg

In 900 ml NaCl-Lösung (150 mM) pH 5,5 lösen, bei 80 °C im Wasserbad vier Stunden inkubieren, auf Raumtemperatur abkühlen lassen, mit NaCl-Lösung (50 mM) auf einen Liter auffüllen, pH-Wert mit HCl auf 7,8 einstellen, steril filtrieren.

TBS (10fach konzentriert)

Tris 3,63 g

NaCl 8,76 g

ad 100 ml Aqua bidest. und mit HCl auf pH 7,4 einstellen.

Zell-Lysepuffer (20 ml)

TBS (10x) 2 ml

Phosphatase Inhibitor 1²³ 200 µl

Phosphatase Inhibitor 2²⁴ 200 µl

Proteaseinhibitor Roche

Complete EDTA frei (50x)²⁵ 400 µl

Nonidet P40²⁶ 110 µl

ad 20 ml Aqua bidest.

²² Fa. Polysciences Europe GmbH, Eppelheim

²³ Fa. Sigma, Deisenhofen

²⁴ Fa. Sigma, Deisenhofen

²⁵ Fa. Roche, Mannheim

²⁶ Fa. Roche, Mannheim

Wasch Puffer (15 ml)

TBS (10x)	1,5 ml
Phosphatase Inhibitor 1 ²⁷	150 µl
Phosphatase Inhibitor 2 ²⁸	150 µl
Proteaseinhibitor Complete	
EDTA frei (50x) ²⁹	300 µl
Nonidet P40 ³⁰	18 µl
ad 15 ml Aqua bidest.	

FLAG-Elutions Puffer

200 µg/ml FLAG-Peptid³¹ in TBS (1x).

Strep-Elutionspuffer

D-Desthiobiotin (10x)³², 1:10 in Aqua bidest. verdünnen.

3.3.4 Puffer und Lösungen für die Expression von SFRP-2 in E. coli

L-Arabinose³³ (20%)

4 g mit Aqua bidest. auf 20 ml auffüllen und steril filtrieren.

Ampicillin³⁴ (100 mg/ml)

In Aqua bidest lösen und steril filtrieren.

Glucoselösung (50%)

50 g Glucose mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen und steril filtrieren.

²⁷ Fa. Sigma, Deisenhofen

²⁸ Fa. Sigma, Deisenhofen

²⁹ Fa. Roche, Mannheim

³⁰ Fa. Roche, Mannheim

³¹ Fa. Sigma, Deisenhofen

³² Fa. IBA GmbH, Göttingen

³³ Fa. Sigma, Deisenhofen

³⁴ Fa. Sigma, Deisenhofen

Hefe-Glyzerol Medium

Glyzerol	12,00 g
Hefe Extrakt ³⁵	20,00 g
NaCl	5,00 g
ad 1000 ml Aqua dest. , bei 121 °C autoklavieren und anschließend	
Ampicillin (100 mg/ml)	1,00 l
Glucose (50% Lösung)	2,00 ml
zugeben.	

Bakterien-Lysepuffer

Tris (50 mM)	3,00 g
Nonidet P40 ³⁶	250 µl
DTT ³⁷ (1 M Lösung)	50 µl
Proteaseinhibitor Complete	
EDTA frei ³⁸	1 Tablette
ad 50 ml Aqua bidest.	

Lysozym aus Hühner Eiweiß³⁹

50 mg/ml in PBS.

Benzonase Nuklease-Lösung

Benzonase ⁴⁰ (250 U/µl)	1,3 µl
Glycerin	500 µl
Tris-HCl (1 M Lösung) pH 8	20 µl
MgCl ₂ (1 M Lösung)	2 µl
NaCl	120 µl
ad 1 ml Aqua bidest.	

³⁵ Fa. Sigma, Deisenhofen

³⁶ Fa. Roche, Mannheim

³⁷ Fa. Serva, Heidelberg

³⁸ Fa. Roche, Mannheim

³⁹ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁴⁰ Fa. Sigma, Deisenhofen

Äquilibrierungspuffer

Tris (1 M Lösung) pH 7,4	1,00 ml
NaCL (1 M Lösung)	1,50 ml
Nonidet P40 ⁴¹	250 µl
β-Mercaptoethanol	35 µl
ad 50 ml Aqua bidest.	

Puffer B

Tris (10 mM)	0,12 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (100 mM)	1,38 g
Proteaseinhibitor ⁴²	zwei Tabletten
ad 100 ml Aqua bidest.	

Pro 10 ml Puffer B 4,8 g Urea (8 M)
und mit NaOH auf pH 8 einstellen.

Puffer C

Tris (10 mM)	0,12 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (100 mM)	1,38 g
ad 100 ml Aqua bidest.	

Pro 10 ml Puffer C 4,8 g Urea (8 M)
und mit HCl auf pH 6,3 einstellen.

Puffer D

Tris (10 mM)	0,12 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (100 mM)	1,38 g
ad 100 ml Aqua bidest.	

Pro 10 ml Puffer D 4,8 g Urea (8 M)
mit HCl auf pH 5,9 einstellen.

⁴¹ Fa. Roche, Mannheim

⁴² Fa. Roche, Mannheim

Puffer E

Tris (10 mM)	0,12 g
NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O (100 mM)	1,38 g
ad 100 ml Aqua bidest.	

Pro 10 ml Puffer E 4,8 g Urea (8 M)
mit HCl auf pH 4,5 einstellen.

3.3.5 Puffer und Lösungen für die Ammoniumsulfatfällung von IgY

TBS

Tris	6,05 g
NaCl	43,50 g
ad 5000 ml Aqua bidest., mit HCl auf pH 7,3 einstellen.	

Dextransulfatlösung (10%)

Dextransulfat-Natriumsalz	30,00 g
ad 300 ml TBS (pH 7,3)	

Calciumchloridlösung

CaCl ₂ · 2H ₂ O (1 M)	14,76 g
ad 100 ml Aqua bidest.	

Dialysepuffer (pH 7,8)

NaCl	45,00 g
KH ₂ PO ₄	1,65 g
Na ₂ HPO ₄	29,03 g
ad 5000 ml Aqua bidest.	

3.3.6 Puffer und Lösungen für die Gelatin-Zymographie und reverse Gelatin-Zymographie

Gelatine-Vorratslösung

Gelatine⁴³ 100 mg unter Wärmezufuhr in 10 ml Aqua bidest. vollständig lösen.

Zymographie-Probenpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,50 ml
Glyzerin	2,00 ml
SDS-Lösung (10%)	4,00 ml
0,1% Bromphenolblau	0,50 ml
ad 10 ml Aqua bidest.	

Renaturierungspuffer

Triton X-100⁴⁴ 2,5 ml ad 100 ml Aqua bidest.

Entwicklungspuffer

Tris	6,05 g
NaCl	11,68 g
CaCl ₂	0,73 g
Brij 35 ⁴⁵	200 µl
ad 1000 ml Aqua bidest.	
Mit HCl auf einen pH von 7,6 einstellen.	

⁴³ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁴⁴ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁴⁵ Fa. Sigma, Deisenhofen

Kolloidale Coomassiefärbung nach Kang et al.

Die Sensitivität dieser kolloidalen Coomassie-Färbemethode liegt bei 1 ng Protein (Kang et al., 2002). Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

	Zeit	Lösung
Waschen	3 x 10 Min	H ₂ O bidest.
Inkubieren	Über Nacht	0,02% Coomassie Brilliant Blue G250 2% Phosphorsäure 5% Aluminiumsulfat ⁴⁶ 10% Ethanol In Aqua bidest. gelöst.
Waschen	2 x 10 Min	H ₂ O bidest
Entfärben	beliebig	10% Ethanol 2% Phosphorsäure In Aqua bidest. gelöst.
Waschen		H ₂ O bidest.

3.3.7 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

EDTA-Puffer 0,1 M, pH 8,0

EDTA⁴⁷ 29,22 g
ad 1000 ml Aqua dest.

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) pH 7,3

Tris 1,21 g
NaCl 8,76 g
ad.1000 ml Aqua dest.

Zur Herstellung von TBS-Tween (TBS-T) pH 7,3 wurden zusätzlich 0,05% Tween-20 (0,5 ml/1000 ml TBS) zugesetzt.

⁴⁶ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁴⁷ Fa. Merck, Darmstadt

3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Die eindimensionale Auftrennung der Glaskörperproteine erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). In einer Mini Protean II Cell Gießkammer⁴⁸ wurden Gele mit einer Größe von 8 x 7 cm und einer Geldicke von 1 mm gegossen. Dabei wurde ein Trenngel mit einer Trennstrecke von 5 cm und einer Acrylamidkonzentration von 8%, 10% oder 12% mit einem Sammelgel von 2 cm Länge und einer Acrylamidkonzentration von 4% überschichtet. Zur Herstellung von je zwei Gelen mit der für den jeweiligen Versuch gewünschten Acrylamidkonzentration fanden folgende Lösungen Verwendung:

	Sammelgel 4%	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Trenngel 12%
Aqua bidest.	6,17 ml	4,84 ml	4,20 ml	3,50 ml
Gelpuffer pH 8,8	--	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml
Sammelgelpuffer pH 6,8	2,50 ml	--	--	--
Acrylamidlösung 30%	1,33 ml	2,66 ml	3,30 ml	4,00 ml
SDS-Lösung 10%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Unmittelbar vor dem Gießen erfolgte die Zugabe von jeweils 50 µl APS 10% sowie 20 µl TEMED. Das Trenngel wurde bis zu seiner Polymerisierung mit Isopropanol überschichtet. Nach Entfernen des Isopropanols folgte die Überschichtung des Trenngels mit dem Sammelgel. Um eine Auftrennung mehrerer Proben in einem Gel zu ermöglichen, wurde vor der Polymerisierung in das Sammelgel ein Kamm zur Vorformung von Probestaschen eingelassen. Die aufzutrennende Proteinpräparation

⁴⁸ Fa. BioRad, München

wurde im Verhältnis 1:3 mit reduzierendem Probenpuffer gemischt und fünf Minuten bei 96°C erhitzt. Um später die Bandenhöhe ablesen zu können, wurde in einer der vorgeformten Taschen ein Molekulargewichtsmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder)⁴⁹ aufgetrennt. Nach Bestückung der restlichen Taschen mit der benötigten Menge des Probengemisches konnten die Gele in die Elektrophoresekammern eingesetzt werden. Diese wurden dann mit Elektrophoresepuffer befüllt. Während der ersten zehn Minuten erfolgte die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 10 mA pro Gel, danach wurde schrittweise auf eine konstante Stromstärke von 25 bis 30 mA pro Gel erhöht (Power Pac 300 Power Supply⁵⁰). Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront das Ende des Trenngels erreichte.

3.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

3.4.2.1 Rehydrierung der IPG Streifen

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden auf 11 cm langen Kunststoffstreifen fixierte, getrocknete Polyacrylamidgele mit einem immobilisierten, nichtlinearen pH-Gradienten von 3-11 eingesetzt (Immobiline DryStrip pH 3-11 NL⁵¹ IPG-Strip). Mittels Rehydrierung wurden die Proteine auf die Streifen übertragen, indem die Proben mit Lysepuffer zu einem konstanten Volumen aufgefüllt (das Gesamtvolumen bestimmt die Dicke des zu rehydrierenden Gels) und mit Trägersubstanzen für die isoelektrische Fokussierung (Pharmalyte) versetzt wurden.

Die Rehydrierungslösung für die 11 cm Streifen setzte sich folgendermaßen zusammen:

Probe mit Lysepuffer	210,00 µl
Pharmalyte 3-10 ⁵²	2,20 µl
Bromphenolblau ⁵³	2,00 µl

Nach der Verteilung der Rehydratationslösung in die Vertiefung einer Quellkammer wurde die Schutzfolie vom trockenen IPG-Streifen abgezogen und dieser unter Vermeidung von Luftblasenbildung mit der Gelfläche auf die Probe aufgelegt. Um zu

⁴⁹ Fa. Fermentas, St. Leon-Rot

⁵⁰ Fa. BioRad, München

⁵¹ Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁵² Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁵³ Fa. Merck, Darmstadt

verhindern, dass der im Lysepuffer enthaltene Harnstoff auskristallisiert, folgte eine Überschichtung der Streifen mit entgastem Paraffinöl. Die Rehydrierung der trockenen Streifen durch Aufnahme der Probe erfolgte innerhalb von 12 Stunden (In-Gel Hydrations-Methode).

3.4.2.2 Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer Multiphor II Elektrophoreseeinheit⁵⁴. Beim Aufbau der Elektrophoreseeinheit wurde zwischen Kühlplatte und Wanne sowie zwischen Wanne und Streifenhalter möglichst luftblasenfrei Paraffinöl pipettiert, um während der Fokussierung eine gleichmäßige Temperatur von 20°C aufrechtzuerhalten. Die rehydrierten Streifen wurden mit der gequollenen Gelseite nach oben so auf dem Streifenhalter positioniert, dass ihre saure Seite zur Kathode und die basische Seite zur Anode zeigte. Nach dem Auflegen der angefeuchteten Elektrodenstreifen⁵⁵ wurden die Elektroden platziert und die IPG-Streifen mit entgastem Paraffinöl überschichtet. Durchgeführt wurde die isoelektrische Fokussierung der 11 cm langen IPG-Streifen mit Hilfe eines EPS 3501 XL Electrophoresis Power Supply⁵⁶ nach folgendem Programm:

Phase	1	2	3
Spannung (V)	150	300	1000
Max. Stromstärke (mA)	2	2	2
Max. Wirkleistung (W)	5	5	5
Zeit (h)	2	3	13

Am Ende des Programms erfolgte entweder die sofortige Verwendung der IPG Streifen für die zweite Dimension, oder alternativ die Lagerung der Streifen bei -20°C bis zu ihrem weiteren Gebrauch.

⁵⁴ Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁵⁵ Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁵⁶ Fa. GE Healthcare, Freiburg

3.4.2.3 Äquilibrierung der IPG-Streifen und zweite Dimension

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-Streifen jeweils zehn Minuten nacheinander in folgenden Lösungen äquibriert:

Reduktionslösung: Äquilibrierungslösung + DTT⁵⁷ (0,3 g/30 ml),

Carbamylierungslösung: Äquilibrierungslösung + Jodacetamid⁵⁸ (1,44 g/30 ml).

Der Carbamylierungspuffer enthielt außerdem 0,01% Bromphenolblau⁵⁹, um die Lauffront bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese sichtbar zu machen. 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. Um das Auftreten elektroosmotischer Effekte während des Proteintransfers zu reduzieren, war in der Äquilibrierungslösung Harnstoff und Glycerin enthalten.

Nach der Äquilibrierung wurden die Streifen unter Vermeidung von Luftblasenbildung zwischen Gel und Streifen auf ein Polyacrylamidlaufgel aufgelegt und anschließend mit in Laufpuffer aufgekochter und auf 56 °C temperierter Agarose (0,5%) überschichtet. Nach Aushärtung der Agarose wurden die Gele in die Elektrophoresekammern eingesetzt und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Gele liefen 45 Minuten bei konstant 1,5 Watt pro Gel ein und wurden dann auf konstante 15 Watt pro Gel erhöht (BP 500 Plus Power Supply⁶⁰).

Um eine Überhitzung der Gele zu vermeiden, erfolgte die Elektrophorese bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C. Sobald die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf beendet und die Gele für den Western Blot weiterverwendet.

⁵⁷ Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁵⁸ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁵⁹ Fa. Merck, Darmstadt

⁶⁰ Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

3.5 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in einem Semi-dry-Elektroblotter (Blue Flash-L)⁶¹ vom Gel auf eine PVDF Transfer Membran⁶² überführt. Die Blot-Papiere⁶³ und die PVDF Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und übereinander geschichtet. Auf die anodische Platte des Elektroblotters wurden zwei in Anodenpuffer I getränkte Blot-Papiere und ein in Anodenpuffer II getränktes Blot-Papier gelegt. Es folgte die zuvor in Methanol und Aqua bidest. getränkte PVDF Membran und anschließend das SDS-Gel. Den Abschluss bildeten drei in Kathodenpuffer getränkte Blot-Papiere auf dem Gel. Nach der Eliminierung von für den Proteintransfer störenden Luftblasen mittels einer sauberen Glaspipette konnte die kathodische Platte aufgesetzt werden. Der Transfer der Proteine erfolgte mit Hilfe eines BP 500 Plus Power Supply⁶⁴ bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm² und einer Transferzeit von 40 Minuten. Die PVDF Membran wurde nun kurz in Aqua bidest. von Gelresten befreit, daraufhin für zehn Minuten in Ponceau-S-Färbelösung gefärbt und anschließend, um die Proteinbanden sichtbar zu machen, dreimal kurz mit Aqua bidest. gewaschen. Die Sensitivität der Ponceau Färbung liegt bei 250-500 ng Protein (Salinovich and Montelaro, 1986). Zum Entfärben der Membran diente PBS-T.

3.6 Immunoblot

Nach Blockierung der Membran mit einer PBS-Tween-Polyvinylpyrrolidone-Lösung (PBS-T-PVP siehe Kapitel 3.3.2, Inkubationszeit: eine Stunde bei RT) wurde diese dreimal je zehn Minuten mit PBS-T gewaschen und bei 4 °C über Nacht mit einem Antigen-spezifischen, primären Antikörper in geeigneter Verdünnung inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS-T gewaschen. Um die gebundenen Antikörper später visualisieren zu können, folgte nun die Inkubation der Membran mit einem zweiten, in PBS-T verdünnten, Peroxidase (POD)-konjugierten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde die Membran sechsmal zehn

⁶¹ Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

⁶² Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁶³ Fa. Machery-Nagel, Düren

⁶⁴ Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

Minuten lang mit PBS-T gewaschen. Das Signal der POD-markierten Proteinbanden wurde durch die Enhanced-Chemilumineszenz (ECL)-Entwicklung visualisiert. Zu diesem Zweck wurde die ECL-Lösung, wie bereits beschrieben, angesetzt, auf die Membran aufgetragen und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte anschließend mit einem Röntgenfilm (SUPER-2000G, Ortho, FUJI)⁶⁵ bei einer je nach Signalstärke variablen Belichtungszeit. Als primäre Antikörper wurden in dieser Arbeit für den Immunoblot folgende Antikörper verwendet:

Antikörper	Produziert in	Klonalität (Klon)	Firma/Herkunft	Verdünnung in PBS-T
Anti-Pferd-Alpha-2-Makroglobulin	Ziege	polyklonal	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach	1:1000
Anti-human-MMP-2	Maus	monoklonal (42-5D11)	Millipore, Schwalbach	1:500
Anti-Maus-Osteopontin	Ziege	polyklonal	R&D Systems, Wiesbach	1:500
Anti-human-TIMP-2	Maus	monoklonal (3A4)	Biozol, Erding	1:500

Als sekundäre Antikörper fanden folgende POD gekoppelte Antikörper Verwendung:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung in PBS-T
Anti-Maus-IgG (H+L)	Ziege	polyklonal	Sigma, Deisenhofen	1:5000
Anti-Ziegen-IgG (H+L)	Pferd	polyklonal	Linaris GmbH, Wertheim	1:10 000

⁶⁵ Fa. Christiansen, Planegg

3.6.1 Densitometrische Bildanalyse der 1D Western Blot Signale

Zur Quantifizierung der eindimensionalen Signale erfolgte die densitometrische Analyse des Schwärzungsgrades der detektierten Banden. Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem Scanner (ImageScanner)⁶⁶ unter Verwendung der Software LabScan 5.0⁶⁷ mit einer Auflösung von 600 dpi eingescannt. Die densitometrische Auswertung der Signale erfolgte mit Hilfe des 1D-Analyseprogramms ImageQuantTL⁶⁸. Dabei entspricht die Intensität der Signalstärke der Pixelintensität der jeweiligen Bande.

3.6.2 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der im Western Blot detektierten Banden wurden über Imagequant⁶⁹ die Schwärzungsgrade der jeweiligen Banden ermittelt und diese, ERU- und Kontrollproben vergleichend, mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf ihre Normalverteilung geprüft. Bei statistischer Signifikanz des Kolmogorov-Smirnov Tests lag keine Normalverteilung vor und der Mann-Whitney Test wurde zur statistischen Auswertung herangezogen. Lag eine Normalverteilung vor, wurde der Student's *t*-Test verwendet.

3.7 Generierung eines polyklonalen Huhn-anti-human-SFRP-2 Antikörpers

3.7.1 Expression und Aufreinigung von SFRP-2

3.7.1.1 Transformation der E.coli

Chemisch kompetente Escherichia coli (Stamm BL21-AI⁷⁰) wurden mit einem SFRP-2 Plasmid⁷¹ (human, kloniert in pDEST17, N-terminaler His-Tag) mittels Hitzeschock

⁶⁶ Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁶⁷ Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁶⁸ Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁶⁹ Fa. GE Healthcare, Freiburg

⁷⁰ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

⁷¹ Plasmid kloniert und zur Verfügung gestellt von Dr. S. Hauck, Helmholtz-Zentrum München

transformiert. Aus einer Kultur der so gewonnenen SFRP-2 exprimierenden Bakterien konnte ein Glycerol-Stock angelegt werden, welcher bei -80°C gelagert wurde.

3.7.1.2 Expression und Aufreinigung

Die Aufreinigung des SFRP-2 aus den Bakterien erfolgte mittels Affinitäts-Chromatographie (Bindung des Polyhistidin-Motivs an NI-NTA-Agarose⁷²).

Die mit SFRP-2 transformierten Bakterien wurden in 5 ml Hefe-Glycerol-Medium (Puffer und Lösungen siehe Kapitel 3.3.4) bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 (bei 600 nm) bei 37°C und 200 rpm inkubiert, anschließend in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml YG-Medium überführt und bis zu einer OD (bei 600 nm) von 0,4 weiter bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml Arabinoselösung (20%), wonach die Bakterienkultur bei 30°C und 200 rpm für 12 Stunden geschüttelt wurde. Die Bakteriensuspension konnte nun in zwei 50 ml Zentrifugationsröhrchen⁷³ überführt und bei 3500 rcf und 4°C zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, die gewonnenen Pellets in je 5 ml Bakterien-Lysepuffer gelöst und in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen⁷⁴ zusammengeführt. Nach Zugabe von 80 µl Lysozym⁷⁵ folgte eine Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer⁷⁶. Die Bakterienlösung wies nun eine schleimige Konsistenz auf. Benzonase (80 µl) und Magnesiumchlorid (bis zu einer Endkonzentration von 2 nM) wurden zugesetzt, die Lösung bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde auf dem Rollenmischer inkubiert und im Anschluss bei 3500 rcf und 4°C abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes konnte das so gewonnene Pellet in 4 ml Lysepuffer resuspendiert werden. Es folgte eine zweimalige Ultraschallbehandlung (je 10 Sekunden, 30% Amplitude) und ein anschließender Zentrifugationsschritt bei 4°C und 8000 rcf. Dieser Arbeitskomplex (Resuspension, Ultraschall, Zentrifugation) wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt erfolgte die Resuspension des Pellet in einem Milliliter Puffer B. Diese Lösung wurde gut gemischt und für zehn Minuten bei

⁷² Fa. Quiagen, Hilden

⁷³ Fa. Sarstedt, Nürnberg

⁷⁴ Fa. Sarstedt, Nürnberg

⁷⁵ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁷⁶ Fa. NeoLab, München

15000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde mit in Äquilibriumspuffer gewaschener Ni-NTA Agarose⁷⁷ (0,5 ml) für eine Stunde bei 4°C auf einem Überkopfmischer⁷⁸ bei 20 rpm inkubiert. Nach Überführen des Gemisches in eine Poly-Prep-Säule⁷⁹ konnte der Durchfluss aufgefangen werden. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 2 ml Puffer C, und je 3 Elutionsschriffe mit je 0,5 ml Puffer D und E. Jede Fraktion wurde getrennt aufgefangen. Um den Erfolg der SFRP-2 Aufreinigung zu bestimmen, wurden je 10 µl pro Eluat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend Coomassie (Kang et al., 2002) gefärbt. Das aufgereinigte SFRP-2 zeigte sich als blaue Bande auf einer Höhe von ca. 34 kDa. Der Proteingehalt der entsprechenden Eluate wurde bestimmt (Kapitel 3.2). Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung des gereinigten SFRP-2 bei -20°C.

3.7.2 Immunisierung

Die Gewinnung eines polyklonalen Anti-SFRP-2 Antikörpers erfolgte im Rahmen des Projekts mit der Anzeigennummer 55.2-1-54-2531.6-6-08 (Regierung von Oberbayern).

Ein Huhn (Interne Nr. 294) wurde mit gereinigtem, rekombinantem, humanem, in E.coli exprimiertem SFRP-2 (siehe Kapitel 3.7.1) immunisiert:

Um später die erfolgreiche Antikörperproduktion nachvollziehen zu können, wurde dem Huhn vor der ersten Immunisierung ca. 10 ml Blut zur Gewinnung von Serum abgenommen (Serum Tag 0). Nach Desinfektion der Einstichstelle mit 70% Ethanol erfolgte die Entnahme von Blut aus der Vena jugularis. Das Blut wurde bei Raumtemperatur für vier Stunden in Serumröhrchen⁸⁰ inkubiert und anschließend für zehn Minuten bei 300 rcf abzentrifugiert. Danach konnte das Serum abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden. Im Anschluss an die Blutentnahme erfolgte nach Desinfektion der Einstichstelle die intramuskuläre Injektion von 200 µg gereinigtem SFRP-2 mit 0,2 ml FCA⁸¹ in die Pectoralismuskulatur. 29 Tage später wurden erneut 200 µg gereinigtes SFRP-2, diesmal mit 0,2 ml FIA⁸², injiziert. Nach weiteren 7 Tagen konnte wieder ca. 10 ml Blut zur Serumgewinnung (Serum Tag 36) entnommen werden. Mittels Western Blot

⁷⁷ Fa. Quiagen, Hilden

⁷⁸ Fa. NeoLab, München

⁷⁹ Fa. Biorad, München

⁸⁰ Fa Fa. Sarstedt, Nürnberg. Sarstedt, Nürnberg

⁸¹ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁸² Fa. Sigma, Deisenhofen

wurde das gewonnene Serum auf Antikörper gegen SFRP-2 untersucht. Gereinigtes, rekombinantes SFRP-2 wurde zu diesem Zweck mittels SDS-PAGE (Kap. 3.4.1) aufgetrennt, auf eine PVDF Membran⁸³ überführt (Kap. 3.5), jeweils mit Serum von Tag 0 und Tag 36 (1:100 in PBS-T verdünnt) inkubiert und über einen POD gekoppelten, sekundären polyklonalen Kaninchen-anti-Huhn-IgY-Antikörper⁸⁴ mittels ECL detektiert.

Während im Serum von Tag 0 (Abb. 3.1a) keine Anti-SFRP-2 Antikörper nachgewiesen werden konnten, zeigte das an Tag 36 gewonnene Serum bei gleicher Verdünnung ein deutliches Signal für SFRP-2 (Abb. 3.1b).

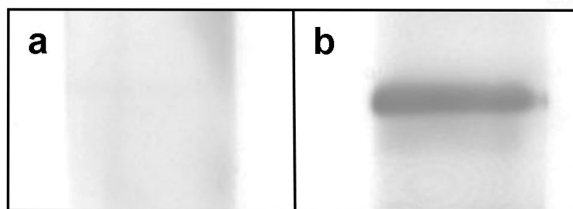


Abb. 3.1: Nachweis SFRP-2 spezifischer Antikörper in Serum von Huhn 294. Western Blot mit je 1 µg rekombinatem SFRP-2. (a) Serum Huhn 294 Tag 0; keine Anti-SFRP-2 Antikörper detektierbar (b) Serum Tag 36 mit deutlichem Signal für SFRP-2.

Aufgrund der so nachgewiesenen erfolgreichen Anti-SFRP-2 Antikörperbildung wurde nach weiteren sieben Tagen mit dem Sammeln von Eiern des immunisierten Huhns für die IgY-Aufreinigung begonnen.

3.7.3 Extraktion von IgY aus Eidotter durch Ammoniumsulfatfällung

Aus den gesammelten Eiern des immunisierten Huhns wurde IgY durch Ammoniumsulfatfällung nach folgendem Protokoll extrahiert (Lösungen und Puffer siehe Kapitel 3.3.5):

Dotter von drei Eiern wurden vom Eiweiß getrennt, mit TBS (im Verhältnis 1:10) verdünnt und 30 Minuten bei Raumtemperatur verrührt. Nach dem Umfüllen in 50 ml Röhrchen⁸⁵ und der Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rcf für 15 Minuten konnte der Überstand vorsichtig abgenommen werden. Der so gewonnene Überstand wurde mit 0,4 ml Dextranlösung (10%) pro Gramm Dotter versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur verrührt. Anschließend folgte die Zugabe von je einem Milliliter Calciumchlorid-Lösung (1 M) pro Gramm Dotter und weitere 15 Minuten auf dem

⁸³ Fa. GE-Healthcare, Freiburg

⁸⁴ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁸⁵ Fa. Sarstedt, Nürnberg

Rührgerät bei Raumtemperatur, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 4 °C und 5000 rcf. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und durch einen Faltenfilter⁸⁶ filtriert. Das gewonnene Filtrat wurde in Dialyseschläuche⁸⁷ (cut-off 14 kDa) überführt und über Nacht bei 4 °C gegen fünf Liter TBS dialysiert.

Das Gewicht des Dialysates wurde bestimmt, massenanteilig 26% Ammoniumsulfat zugegeben und bei Raumtemperatur eine halbe Stunde verrührt. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 7500 rcf und 4 °C wurde das Sediment in 15 ml TBS gelöst und über Nacht bei 4 °C gegen fünf Liter TBS dialysiert. Es folgten zwei weitere Dialyseschritte für je 12 Stunden bei 4 °C in jeweils fünf Liter Dialysepuffer.

Um möglichst reines IgY zu erhalten wurde eine weitere Aufreinigung des Dialysates mit der HiTrap-IgY-Purification-HP⁸⁸-Säule gemäß den Angaben des Herstellers angeschlossen. Die Proteinkonzentration des aufgereinigten IgY konnte durch die Methode von Bradford (Bradford, 1976) ermittelt werden (Kapitel 3.2). Abschließend erfolgte der Beweis der Detektion von SFRP-2 durch das aufgereinigte IgY im Western Blot. Während die IgY-Fraktion eines unimmunisierten Huhnes rekombinantes SFRP-2 nicht nachzuweisen vermochte (Abb. 3.2a, Kontroll-IgY), ermöglichte das aufgereinigte IgY des mit SFRP-2 immunisierten Huhnes einen Nachweis von rekombinatem, gereinigtem SFRP-2 (Abb. 3.2b).

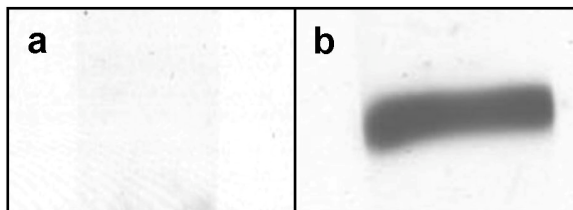


Abb. 3.2: Nachweis SFRP-2 spezifischer Antikörper in aufgereinigtem Dotter-IgY von Huhn 294. Western Blot mit je 1 µg rekombinatem SFRP-2. (a) Kontroll Dotter-IgY; (b) Dotter-IgY Huhn 294 Tag 46.

⁸⁶ Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe

⁸⁷ Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe

⁸⁸ Fa. GE-Healthcare, Freiburg

3.8 Strep/FLAG-Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (SF-TAP) von SFRP-2

Es wurde die von Glöckner et al. beschriebene SF-TAP zur Untersuchung von Proteininteraktionen angewendet (Gloeckner et al., 2009b; Gloeckner et al., 2007). Verwendet wurde humanes SFRP-2 kloniert in das SF-Tag-Plasmid⁸⁹ (C terminal), Puffer und Lösungen siehe Kapitel 3.3.3.

3.8.1 Transiente Transfektion der Hek-293T Zellen

Hek-293T Zellen wurden auf 14 cm Platten⁹⁰ (1×10^7 Zellen pro Platte) in DMEM⁹¹ (+ 10% FBS⁹², 1% Pen/Strep⁹³) ausgesät, über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag mit dem SF-TAP-SFRP-2⁹⁴ Plasmid nach folgendem Protokoll transient transfiziert:

Pro 14 cm Platte wurden 8 µl Plasmid mit 1000 µl PEI-Lösung versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen konnte das alte DMEM von der Platte abgenommen und durch 15 ml frisches Medium ersetzt werden. Die PEI-Plasmidlösung wurde vorsichtig auf der Platte verteilt und sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von weiteren 10 ml Medium und eine Inkubation von 48 Stunden bei 37°C. Nach Ende der 48 Stunden wurden die Zellen zweimal in DMEM ohne FBS gewaschen und für weitere 24 Stunden bei 37°C in FBS-freiem DMEM inkubiert.

3.8.2 SF-Tandem Affinitäts Aufreinigung von SFRP-2

Für die Aufreinigung wurden drei 14 cm Platten mit transient transfizierten HEK-293T Zellen verwendet. Als Negativkontrolle diente eine 14 cm Platte untransfizierter HEK-293T Zellen, die analog aufgearbeitet und analysiert wurde. Das SFRP-2 wurde nach folgendem Protokoll aufgereinigt.

⁸⁹ Plasmid kloniert und zur Verfügung gestellt von Dr. S.Hauck, Helmholtz-Zentrum München

⁹⁰ VWR International GmbH, Darmstadt

⁹¹ Fa. Biochrom, Berlin

⁹² Fa. Biochrom, Berlin

⁹³ Fa. Biochrom, Berlin

⁹⁴ Plasmid kloniert und zur Verfügung gestellt von Dr. S.Hauck, Helmholtz-Zentrum München

Der Zellkulturüberstand (Medium) wurde gründlich von den Platten abgesaugt und steril filtriert, um ihn von Zellen und Zellbruchstücken zu befreien, und auf 4°C gekühlt. Danach wurde direkt mit der Aufreinigung der Proteinkomplexe aus dem Überstand begonnen.

Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer pro 14 cm Platte mit Hilfe eines sterilen Plastischabers⁹⁵ von der Platte abgekratzt und die Zellen der verschiedenen Platten in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen zusammengeführt. Es folgte eine 40-minütige Inkubation unter Schütteln (30 rpm) bei 4°C. Das Zelllysate wurde abzentrifugiert (13000 rcf, 10 min, 4°C), der Überstand vorsichtig abgenommen und steril filtriert (0,22 µm Spritzenfilter⁹⁶). Das erhaltene Pellet wurde verworfen.

3.8.2.1 Aufreinigung über Strep-Tactin Superflow Beads

Strep-Tactin-Superflow-Beads⁹⁷ wurden drei Mal mit TBS (600 µl pro 100 µl komprimierte Beads) gewaschen. Dem steril filtrierten Zelllysate und dem Zellkulturüberstand wurden je 100 µl komprimierte Strep-Tactin-Beads zugegeben, danach erfolgte ein Inkubationsschritt von zwei Stunden auf einem Überkopfschüttler⁹⁸ bei 4°C. Im Anschluss wurde sowohl das Zelllysate als auch der Zellkulturüberstand abzentrifugiert (5000 rcf, 4°C, 1 min Zelllysate, 5 min Zellkulturüberstand). Der Überstand der jeweiligen Fraktion wurde bis ca. zwei Zentimeter über den abzentrifugierten Beads verworfen, die Beads mit dem restlichen Überstand aufgeschwemmt und auf je eine Säule pipettiert (Illustra Microspin-Column⁹⁹). Nach Öffnen der Säule und Abfluss der Flüssigkeit erfolgte ein dreimaliger Waschschrift der in der Säule zurückgehaltenen Beads mit je 500 µl Waschpuffer. Nachdem der Waschpuffer durch vorsichtiges Abzentrifugieren vollständig entfernt worden war, wurden die Säulen wieder verschlossen und die Beads mit 400 µl eines Strep-tag-Elutionspuffer¹⁰⁰ für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Beads immer wieder vorsichtig aufgeschwemmt. Die Säulen wurden anschließend wieder geöffnet und das Eluat durch Zentrifugation

⁹⁵ Fa. Sarstedt, Nürnberg

⁹⁶ Fa. Millipore, Schwalbach

⁹⁷ Fa. IBA GmbH, Göttingen

⁹⁸ Fa. NeoLab, München

⁹⁹ Fa. GE Healthcare, Freiburg

¹⁰⁰ Fa. IBA GmbH, Göttingen

(1000 rcf, 1 min) in je ein 2 ml Reaktionsgefäß¹⁰¹ überführt. Das Eluat des Zellkulturüberstandes wurde nun auf Eis bis zur Beendigung des Protokolls gelagert.

3.8.2.2 Zweite Aufreinigung des Zelllysate-Eluates über Anti-Flag-M2-Agarose-Beads

Anti-Flag-M2-Agarose-Beads¹⁰² wurden dreimal mit TBS (600 µl pro 50 µl komprimierte Beads) gewaschen. Die Beads (50 µl) wurden mit 300 ml TBS vorsichtig aufgeschwemmt und auf eine neue Säule pipettiert (Illustra Microspin-Column¹⁰³). Durch vorsichtiges Zentrifugieren (5 s, bei 100 rcf) wurde nach Öffnen der Säule das TBS entfernt. Die Säule wurde wieder verschlossen und das Zelllysate-Eluat auf die Beads pipettiert. Es folgte die Inkubation bei 4°C auf einem Überkopfschüttler¹⁰⁴.

Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit durch vorsichtiges Abzentrifugieren (5 s, bei 100 rcf) entfernt und die Beads dreimal mit 500 µl Waschpuffer und anschließend einmal mit 500 µl TBS gewaschen. Das TBS wurde erneut durch vorsichtiges Abzentrifugieren entfernt. Die Säule wurde wieder verschlossen, 200 µl FLAG-Elutionspuffer hinzugegeben und mit den Beads unter gelegentlichem, vorsichtigem Aufschwemmen für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Eluat durch Zentrifugation (1000 rcf, 1 min) aus der geöffneten Säule in je ein 2 ml Reaktionsgefäß¹⁰⁵ überführt.

3.8.2.3 Chloroform-Methanol Fällung

Im Anschluss an die SF-TAP-Aufreinigung erfolgte eine Chloroform-Methanol-Fällung der Proteine der jeweiligen Eluate:

Je 200 µl Eluat wurden mit 800 µl Methanol (100%) versetzt und gemischt. Die Mixtur wurde abzentrifugiert (9000 rcf, 30 s, Raumtemperatur), danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben und erneut vorsichtig gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (9000 rcf, 30 s, Raumtemperatur) erfolgte die Zugabe von 600

¹⁰¹ Fa. Sarstedt, Nürnberg

¹⁰² Fa. Sigma, Deisenhofen

¹⁰³ Fa. GE Healthcare

¹⁰⁴ Fa. NeoLab, München

¹⁰⁵ Fa. Sarstedt, Nürnberg

µl LiChrosolv Wasser für die Chromatographie¹⁰⁶ und eine anschließende gründliche Vermischung, so lange bis eine milchige Lösung vorlag. Diese Lösung wurde wiederum abzentrifugiert (2 min, 9000 rcf, Raumtemperatur). Es bildeten sich zwei Phasen, wobei die Proteine in der Interphase angereichert waren. Der Überstand wurde bis auf 2 mm vor der Interphase abgenommen und verworfen. Es folgte eine weitere Zugabe von 600 µl Methanol. Nach gründlicher Mischung wurde die Lösung abzentrifugiert (2 min, 9000 rcf, Raumtemperatur). Es bildete sich ein weißes, flockiges Präzipitat. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Präzipitat unter einem Abzug getrocknet und bis zur massenspektrometrischen Analyse (siehe Kapitel 3.10) bei -20°C gelagert.

3.9 Gelatin-Zymographie und Reverse Zymographie

Die Gelatin-Zymographie ist eine elektrophoretische Technik, welche die Möglichkeit bietet, Matrix-Metalloproteinasen aufgrund ihrer gelatinolytischen Wirkung zu detektieren (Troeborg and Nagase, 2004; Leber and Balkwill, 1997; Heussen and Dowdle, 1980). Die Matrix-Metalloproteinasen stellen sich in der Zymographie als helle Banden vor dunklem Hintergrund dar. Es kann zwischen der latenten (Pro-) Form des Proteins (welche im Zuge der Zymographie ebenfalls aktiviert wird) und der jeweils ca. 10 kDa kleineren, aktivierten Form unterschieden werden (Oliver et al., 1997; Woessner, 1995; Springman et al., 1990).

3.9.1 Gelatin-Zymographie

Für die Gelatin-Zymographie wurden je 10 µg Glaskörper pro Probe mit Zymographie-Probenpuffer (diese und alle weiteren Lösungen siehe Kapitel 3.3.6) zu gleichen Teilen versetzt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE unter Verwendung eines 8% Trenngels (Kapitel 3.4), in das Gelatine¹⁰⁷ bis zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml eingebracht worden war. Im Gegensatz zu der in Kapitel 3.4 beschriebenen Methode erfolgt bei der Zymographie die Separation der Proteine unter denaturierenden (SDS), aber nicht unter reduzierenden Bedingungen.

¹⁰⁶ Fa Merck, Darmstadt

¹⁰⁷ Fa. Sigma, Deisenhofen

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Zymographie-Gel für 45 Minuten unter leichtem Schütteln mit 100 ml Renaturierungspuffer gewaschen, wobei nach der Hälfte der Zeit ein Austausch des Puffers erfolgte. Anschließend wurde der Renaturierungspuffer abgegossen, durch 100 ml Entwicklungspuffer ersetzt und das Gel für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Entwicklungspuffer wurde erneut ausgetauscht und das Gel bei 37°C für zwölf Stunden inkubiert. Es folgte die Färbung des Zymographie-Gels mit Coomassie (Kang et al., 2002). Gelatinolytische Aktivität erschien nun als helle Bande vor dunklem Hintergrund an Stellen, an denen die Matrix-Metalloproteinasen die Gelatine verdaut hatten. Als Positivkontrolle diente rekombinantes, humanes (Pro-) MMP-9¹⁰⁸ (0,5 ng) und (Pro-) MMP-2¹⁰⁹ (4 ng) Protein, das analog zu den Glaskörperproben elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Zur Abschätzung der molekularen Masse der beobachteten Banden diente ein Molekulargewichtsmarker¹¹⁰. Um Serinproteasen als potenzielle Verursacher der gelatinolytischen Aktivität auszuschließen, wurde ein Zymographie-Gel in Gegenwart des Serinproteaseinhibitors PMSF (2 mM) entwickelt. PMSF hemmt Serinproteasen, die Matrix-Metalloproteaseaktivität bleibt davon aber unbeeinträchtigt. Ein identisches Zymographie-Gel wurde unter Zugabe des spezifischen Matrix-Metalloproteaseinhibitors EDTA (20 mM) entwickelt. Als Referenz diente ein Zymographie-Gel mit den gleichen Glaskörperproben, welches ohne Zugabe von Inhibitoren nach dem Standardprotokoll entwickelt wurde.

3.9.2 Reverse Zymographie

Die Reverse Zymographie dient der Detektion von Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (TIMPs) (Hawkes et al., 2001; Oliver et al., 1997). Für die Reverse Zymographie wurde je 10 µg der jeweiligen Glaskörperprobe unter den in Kapitel 3.9.1 beschriebenen Bedingungen in einem gelatinhaltigen 12% Trenngel aufgetrennt und in der dort beschriebenen Weise entwickelt und gefärbt. Im Unterschied zur Gelatin-Zymographie erfolgte jedoch zusätzlich die Zugabe von 0,8 µg rekombinantem¹¹¹, humanem (Pro-) MMP-2 Protein zum Trenngel. Dies bedingte den Verdau der Gelatine im gesamten Gel, mit Ausnahme der Areale, an denen eine Hemmung der MMP-2 durch Inhibitoren der aufgetrennten Probe zum Tragen kam.

¹⁰⁸ Fa. Protealimmun GmbH, Berlin

¹⁰⁹ Fa. Protealimmun GmbH, Berlin

¹¹⁰ Fa. Fermentas, St. Leon-Rot

¹¹¹ Fa. Protealimmun GmbH, Berlin

Die Zonen der Matrix-Metalloproteinase Hemmung konnten als blaue (da durch Coomassie anfärbbare) Banden vor hellem Hintergrund detektiert werden. Um in Coomassie anfärbbare Proteine als Ursprung der beobachteten Banden auszuschließen, wurden Glaskörperproben unter denselben Bedingungen wie für die Reverse Zymographie aufgetrennt. Im Unterschied kam ein normales SDS-Gel ohne Zugabe von Gelatine oder MMP-2 zum Einsatz. Dieses Gel wurde ebenfalls mit Coomassie gefärbt, und danach die für die MMP-2 Hemmung in der Reversen Zymographie relevanten Areale mit dem Färbemuster der Reversen Zymographie verglichen.

3.10 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen

Je 10 µg Glaskörperprotein aus Proben von acht gesunden und acht uveitischen Pferdeaugen wurden mittels LC-MS/MS massenspektrometrisch analysiert. Für jede Probe wurde eine Messung durchgeführt.

3.10.1 In-Lösung-Verdau der Proben

Die Proben wurden mit einer 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 60 µl gebracht. Es folgte die Zugabe von 3 µl Rapigest¹¹² und nach gründlicher Mischung die Zugabe von 3 µl DTT¹¹³ (100 mM). Nach erneuter gründlicher Durchmischung erfolgte eine zehninütige Inkubation bei 60 °C unter Schütteln. Im Anschluss wurden je 3 µl Iodacetamid¹¹⁴ (300 mM) hinzugegeben, und die Probe für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Als Nächstes erfolgte die Zugabe von je 4 µl Trypsin¹¹⁵ (0,5 µg/µl in 50 mM Ammoniumbicarbonat) und die Inkubation bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Rapigest mit je 4 µl konzentrierter HCl (32%) ausgefällt und mittels 30-minütiger Zentrifugation (16000 rcf) bei Raumtemperatur entfernt. Von dem so gewonnenen Überstand (ca. 70 ml) wurden je 20 µl pro Probe direkt für die LC-MS/MS verwendet.

¹¹² Fa. Waters GmbH, Eschborn

¹¹³ Fa. Merck, Darmstadt

¹¹⁴ Fa. Sigma, Deisenhofen

¹¹⁵ Fa. Promega, Mannheim

3.10.2 LC-MS/MS

Die Liquid-Chromatographie Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Analyse wurde mit einem Ultimate3000 nano HPLC System durchgeführt, welches online an ein LTQ OrbitrapXL¹¹⁶ Massenspektrometer mittels einer Nano Spray Ionenquelle gekoppelt ist.

Das HPLC System ist mit einer Nano Trap Säule¹¹⁷ (100 µm i.d. x 2 cm, gepackt mit Acclaim PepMap100C18, 5 µm, 100Å Material) und einer analytischen Säule¹¹⁸ (75 µm i.d. x 15 cm, Acclaim PepMap 100 C18, 3 µm, 100Å Material) ausgestattet.

Die Proben aus dem in-Lösung-Verdau (je 20 µl) wurden automatisch injiziert und mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/Minute in 5% Puffer B (98% Acetonitril, 0,1% FA in HPLC reinem Wasser) und 95% Puffer A (2% Acetonitril und 0,1% FA in HPLC reinem Wasser) auf die Nano Trap Säule geladen.

Nach fünf Minuten wurden die Peptide eluiert und auf der analytischen Säule aufgetrennt. Diese Auftrennung fand durch einen Gradienten von 5-50% Puffer B bei einer Flussrate von 300 nl/Minute über eine Zeit von 140 Minuten statt. Auf der Säule verbleibende Peptide wurden durch einen kurzen Gradienten von 50-100% Puffer B innerhalb 5 Minuten eluiert. Die eluierten Peptide wurden direkt mittels Nano Spray Ionisierung ionisiert und in einem LTQ OrbitrapXL Massenspektrometer analysiert. Dazu wurden die zehn intensivsten Peptidionen aus dem Orbitrap MS Vorscan für die Fragmentanalyse in der linearen Ionenfalle ausgewählt. Als Auswahlkriterien wurden eine Intensität von mindestens 100 sowie eine minimal doppelte Ladung des Peptides festgesetzt. Die normalisierte Kollisionsenergie für CID (Collision induced dissociation) wurde auf einen Wert von 35 festgesetzt und die sich daraus ergebenden Fragmente mit einer normalen Auflösung in der linearen Ionenfalle detektiert. Während der Fragmentanalyse wurde in der Orbitrap ein hochauflösendes MS-Spektrum (60000 FWHM) mit einer Massenbandbreite von 200 bis 2000 Da aufgenommen. Um jedes Spektrum kalibrieren zu können wurde die lock mass Option aktiviert und ein Hintergrund-Ion aus der Umgebungsluft mit einer Masse von 445,120020 Da als interne Kalibrierung genutzt. Dieses Ion wird in der C-Trap gelagert und dann zusammen mit den Proben-Ionen in die Orbitrap injiziert. Jedes

¹¹⁶ Thermo Scientific, Dreieich

¹¹⁷ Dionex GmbH, Idstein

¹¹⁸ Dionex GmbH, Idstein

Spektrum wurde automatisch auf dieses Ion kalibriert um eine höchstmögliche Massengenauigkeit zu erreichen. Jedes Ion, das für die Fragmentierung selektiert wurde, wurde 30 Sekunden durch dynamischen Ausschluss von einer erneuten Fragmentierung ausgeschlossen.

Die anschließende quantitative Auswertung (label free) und ANOVA (Analysis of variance) der LC-MS/MS Rohdaten mittels Progenesis-Software¹¹⁹ erfolgte durch Dr. S. Hauck (Helmholtz Zentrum München).

3.10.3 Datenbanksuche und Proteinidentifikation

Für die Datenbanksuche wurden die aufgenommenen MS/MS-Spektren aus der Progenesis-Software¹²⁰ als Mascot Generic file (mgf) exportiert und für die Peptid – Identifikation mit Mascot¹²¹ (Version 2009) in der Ensembl-Pferde-Datenbank¹²² (Equus caballus, Version 56, 2009, 20436 proteinkodierende Sequenzen) verwendet. Dazu wurde eine Peptidtoleranz von 10 ppm und die Fragmentionentoleranz von 1 Da festgelegt. Für die Analyse der Fragmentspektren wurde Cystein Carbamidomethylierung als feste, Methionin Oxidierung sowie Tyrosin-, Serin-, und Threonin-Phosphorylierung als variable Modifikationen angegeben, maximal eine nicht geschnittene Spaltstelle wurde erlaubt. Die in Mascot integrierte Decoy-Datenbanksuche berechnete bei der Suche in dem angehängten mgf-Datensatz (bei einer minimalen Ionen-Punktzahl von 30, und einem Signifikanzgrenzwert von $p < 0,01$) eine falschpositive Rate von weniger als 15%. Nur Peptide mit einer Ionen-Punktzahl von mehr als 30 und Proteine mit mindestens einem Peptid, dessen Fragmentspektrum das Protein als bestmögliche Übereinstimmung ergab, wurden in Betracht gezogen und in die Progenesis-Software reimportiert.

Um eine größtmögliche Identifikationssicherheit zu gewährleisten, wurde bei Proteinen, die nur über ein Peptid identifiziert werden konnten, als letzter Schritt der minimale Wert der Ionen-Punktzahl von 30 auf 50 erhöht. Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte der quantitativen LC-MS/MS Datenauswertung ist in folgender Grafik dargestellt (Abb. 3.3):

¹¹⁹ Fa. Nonlinear Dynamics

¹²⁰ Fa. Nonlinear Dynamics

¹²¹ <http://www.matrixscience.com/>

¹²² <http://www.ensembl.org/index.html>

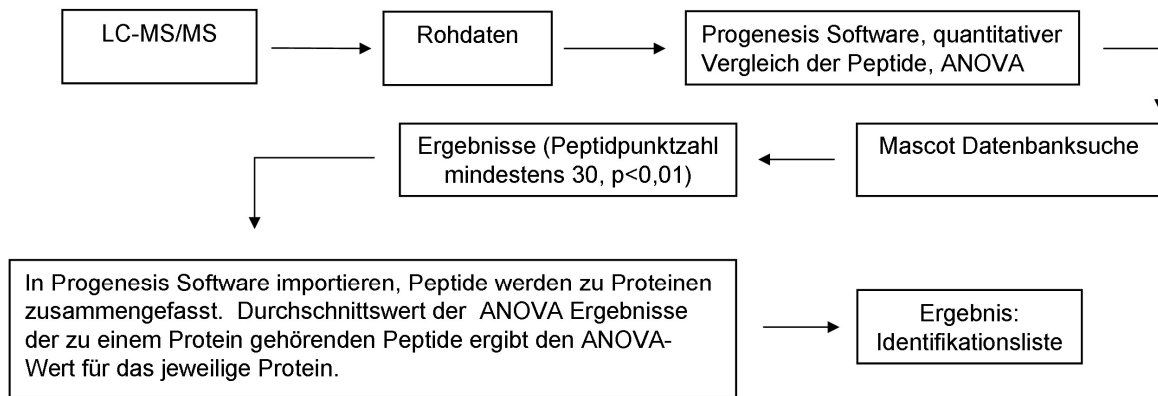


Abb. 3.3: Schema LC-MS/MS Datenauswertung (quantitativ).

3.10.4 Ortholog-/ Paralog-Suche

Einige identifizierte Einträge der Ensembl-Datenbank konnten nicht direkt einem validierten Pferdeprotein zugeordnet werden, sondern ergaben nur vorhergesagte Proteine aufgrund der Sequenzübereinstimmung zwischen dem Pferdegenom und anderen Genomen (siehe Ensembl Datenbank¹²³). Für diese wurde unter dem Menüpunkt Comparative Genomics in der frei verfügbaren Ensembl Datenbank¹²⁴ (Version 56, 2009) nach einem entsprechenden Ortholog oder Paralog gesucht und der Eintrag dem Protein mit dem besten Suchergebnis zugeordnet.

3.10.5 Datenanalyse mit Scaffold

Die Aufreinigungsfractionen der SF-Tandem-Affinitäts-Aufreinigung von SFRP-2 wurden analog zu den Kapiteln 3.10.1 und 3.10.2 analysiert und mit der Scaffold-Software¹²⁵ ausgewertet. Die Mascot-Ergebnisdateien (Peptidpunktzahl >30, p<0,05) wurden mit der Scaffold-Software analysiert. Diese Software nutzt den PeptideProphet⁶⁸⁻⁷⁰ Algorithmus, um aus den Mascot Ergebnissen eine einfache Wahrscheinlichkeit für die Peptididentifikationen zu berechnen. Die Suchergebnisse wurden in die Scaffold Software importiert und analysiert, wobei die gleichen Datenbanken und Modifikationen benutzt wurden wie für die Datenbanksuche. Nach

¹²³ <http://www.ensembl.org/index.html>

¹²⁴ <http://www.ensembl.org/index.html>

¹²⁵ <http://www.proteomesoftware.com/>

der Datenanalyse wurden folgende Minimalanforderungen für die Proteinidentifikationen festgelegt: Die Wahrscheinlichkeit für die korrekte Peptididentifizierung lag mindestens bei 80%, es mussten mindesten zwei Peptide pro Protein identifiziert werden und die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Proteinidentifizierung sollte mindestens 99% betragen. Das Schema der Arbeitsschritte der nicht quantitativen Datenauswertung mit der Scaffold-Software ist in folgender Grafik dargestellt (Abb. 3.4):

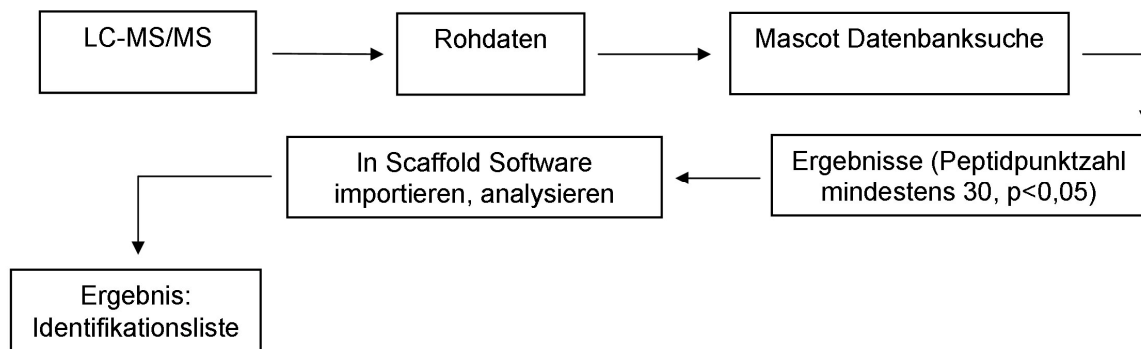


Abb. 3.4: Schema LC-MS/MS Datenauswertung (nicht quantitativ).

3.11 Immunhistochemische Untersuchungen

3.11.1 Vorbereiten der Paraffinschnitte

Von den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM360)¹²⁶ Schnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt. Diese wurden im Wasserbad auf beschichtete Objektträger¹²⁷ gezogen und anschließend auf einer Wärmeplatte (40 °C) getrocknet. Um ein Abschwimmen der Präparate während der histologischen Färbeprozesse zu verhindern, wurden die Objektträger für mindestens 24 Stunden im Trockenschrank bei 39 °C gelagert.

Nach ausreichender Trocknungszeit wurden die Schnitte in folgender absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert:

¹²⁶ Fa. Microm, Walldorf

¹²⁷ Super Frost Plus, Fa. Neo Lab, Heidelberg

Xylol	2 x 5 Minuten
Isopropanol	1 x 5 Minuten
Ethanol 96%	2 x 10 Minuten
Ethanol 70%	5 Minuten
Aqua dest.	5 Minuten

3.11.2 Verwendete Antikörper

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden folgende primäre Antikörper verwendet (verdünnt in TBS-T + 1% BSA):

Antikörper	Entwickelt in	Klonalität	Verdünnung in TBS-T+ 1% BSA	Firma
Anti-human-MMP-2	Maus	monoklonal	1:50	Millipore, Schwalbach
Anti-human-MMP-9	Kaninchen	polyklonal	1:100	Biomol, Hamburg
Anti-human-MMP-14	Kaninchen	polyklonal	1:100	SantaCruz, Heidelberg
Anti-human-TIMP-2	Maus	monoklonal	1:25	Biozol, Erding
Anti-human-SFRP-2	Huhn	polyklonal	50 µg/ml	Eigen- produktion
Anti-Pferd-Alpha-2- Makroglobulin	Ziege	polyklonal	1:1000	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Anti-human-Wnt3a	Kaninchen	monoklonal	1:50	Biomol, Hamburg
Anti-human-GFAP	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus-Osteopontin	Ziege	polyklonal	1:50	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-human-Lipocalin 2	Kaninchen	polyklonal	1:500	Abcam, Cambridge (UK)

Tab. 3.1: Für die Immunhistochemie verwendete primäre Antikörper.

Für die Detektion der entsprechenden primären Antikörper wurden folgende farbstoffgekoppelte, sekundäre Antikörper verwendet (verdünnt in TBS-T + 1% BSA):

Antikörper	Entwickelt in	Gekoppelter Farbstoff	Verdünnung in TBS-T+ 1% BSA	Firma
Anti-Maus-IgG	Ziege	Alexa488	1:500	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus-IgG	Ziege	Alexa568	1:500	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Alexa488	1:500	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Alexa568	1:500	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Huhn-IgY	Ziege	Alexa488	1:500	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Huhn-IgY	Ziege	Alexa568	1:500	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Ziege-IgG	Esel	Alexa488	1:500	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Ziege-IgG	Esel	Alexa546	1:500	Fa. Invitrogen, Karlsruhe

Tab 3.2: Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte sekundäre Antikörper.

In der immunhistochemischen Dreifachfärbung kamen noch folgende an Biotin gekoppelte sekundäre Antikörper zum Einsatz (verdünnt in TBS-T + 1% BSA):

Antikörper	Entwickelt in	Gekoppelt an	Verdünnung in TBS-T+ 1% BSA	Firma
Anti-Maus-IgG	Ziege	Biotin	1:1000	Linaris GmbH, Wertheim
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Biotin	1:1000	Linaris GmbH, Wertheim
Anti-Ziege-IgG	Kaninchen	Biotin	1:1000	Linaris GmbH, Wertheim

Tab3.3: An Biotin gekoppelte sekundäre Antikörper für die immunhistochemische Dreifachfärbung.

Die Biotin gekoppelten sekundären Antikörper wurden mit an Streptavidin gekoppeltem Cy5¹²⁸ (verdünnt 1:500 in TBS-T + 1% BSA) detektiert.

Die Kernfärbung erfolgte mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)¹²⁹ (1:1000 verdünnt in TBS-T + 1% BSA).

3.11.3 Einfachfärbung

Die Epitope wurden in folgenden Puffern für die immunhistochemische Färbung demaskiert:

0,1 M EDTA-Puffer (pH 8,0)	15 Minuten kochen
TBS-T	3 x 10 Minuten umpuffern

Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA in TBS-T + 0,5% FCS¹³⁰ für 40 min bei Raumtemperatur.

Daraufhin konnte der gewünschte primäre Antikörper (siehe Tab 3.1) in der entsprechenden Verdünnung aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert werden.

Der Schnitt wurde für 3 x 5 Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (siehe Tab 3.2) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte gleichzeitig mit dem sekundären Antikörper mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)¹³¹. Nach Ende der Inkubationszeit wurde erneut für 3 x 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit Dako Fluorescent Mounting Medium¹³² eingedeckelt. Die Färbung wurde mit dem Mikroskop Axio Imager M1¹³³ und der Software AxioVision 4.10¹³⁴ beurteilt und dokumentiert.

¹²⁸ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

¹²⁹ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

¹³⁰ Fa. Biochrom, Berlin

¹³¹ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

¹³² Fa. DAKO, Hamburg

¹³³ Carl Zeiss AG, Oberkochen

¹³⁴ Carl Zeiss AG, Oberkochen

3.11.4 Mehrfachfärbung

Für Koexpressionsstudien, bei denen mehrere verschiedene Antikörper auf einem histologischen Schnitt Verwendung fanden, kamen folgende Protokolle zur Anwendung.

3.11.4.1 Doppelfärbung

Für den ersten primären Antikörper (siehe Tab 3.1) sowie den an den entsprechenden Farbstoff gekoppelten sekundären Antikörper (siehe Tab. 3.2) wurde analog zu Kapitel 3.11.3 verfahren.

Nach Ende der Inkubationszeit des ersten sekundären Antikörpers wurde 3 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. War der nun verwendete primäre Antikörper von derselben Spezies gewonnen worden wie der zuerst verwendete, wurde ein Blockierungsschritt mit einem serumfreien Proteinblocker¹³⁵ für 30 Minuten bei Raumtemperatur eingeschoben. Anschließend konnte der nächste primäre Antikörper (siehe Tab. 3.1) aufgetragen werden. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei Raumtemperatur folgte ein weiterer 3 x 5 minütiger Waschschrift in TBS-T. Nun konnte ein entsprechender sekundärer Antikörper (gekoppelt an einen auf dem Schnitt noch nicht verwenden Fluoreszenzfarbstoff) aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Kernfärbung erfolgte gleichzeitig mit dem letzten sekundären Antikörper mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)¹³⁶.

Nach einem erneuten Waschschrift für 3 x 5 Minuten in TBS-T wurde der Schnitt mit Dako Fluorescent Mounting Medium¹³⁷ eingedeckelt und die Färbung unter Verwendung des Mikroskop Axio Imager M1¹³⁸ und der Software AxioVision 4.10¹³⁹ beurteilt und dokumentiert.

3.11.4.2 Dreifachfärbung

Sollten drei verschiedene primäre Antikörper auf demselben Präparat verwendet werden, so erfolgte die Färbung mit den ersten beiden primären sowie den zugehörigen sekundären Antikörpern analog zu Kapitel 3.11.3 und 3.11.4.1.

¹³⁵ Fa. DAKO, Hamburg

¹³⁶ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

¹³⁷ Fa. DAKO, Hamburg

¹³⁸ Carl Zeiss AG, Oberkochen

¹³⁹ Carl Zeiss AG, Oberkochen

Nach Ende der Inkubationszeit des zweiten verwendeten sekundären Antikörpers wurde 3 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. War der nun zu verwendende primäre Antikörper von derselben Spezies gewonnen worden wie einer der zuerst verwendeten, wurde ein Blockierungsschritt mit einem serumfreien Proteinblocker¹⁴⁰ für 30 Minuten bei Raumtemperatur eingeschoben, anschließend nun der dritte primäre Antikörper (siehe Tab. 3.1) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift von 3 x 5 Minuten in TBS-T. Ein entsprechender an Biotin gekoppelter sekundärer Antikörper (siehe Tab. 3.3) wurde aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in TBS-T für 3 x 5 Minuten folgte die Detektion des biotinierten sekundären Antikörpers durch 30 minütige Inkubation mit an Streptavidin gekoppeltem Cy5¹⁴¹ (siehe Kapitel 3.11.2). Die Kernfärbung erfolgte gleichzeitig mit der Inkubation des an Streptavidin gekoppelten Cy5. Hierfür fand 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)¹⁴² Verwendung. Nach einem abschließenden Waschschrift in TBS-T konnten die Schnitte mit Dako Fluorescent Mounting Medium¹⁴³ eingedeckelt und die Färbung mit dem Mikroskop Axio Imager M1¹⁴⁴ und der AxioVision 4.10¹⁴⁵ Software beurteilt und dokumentiert werden.

3.12 Protein-Protein Interaktionsnetzwerk-Analyse

Die Gensymbolnamen (wie in der frei zugänglichen Ensembl-Datenbank (Version 56, 2009) <http://www.ensembl.org> oder dem dazugehörigen frei zugänglichen Eintrag der UniProt-Datenbank angegeben, <http://www.uniprot.org/>) der im Pferdeglaskörper differenziell exprimierten Proteine zuzüglich der in dieser Arbeit in der Retina untersuchten Proteine Wnt3a und MMP-14 wurden in eine datenbankbasierte Suchmaschine für Protein-Protein Interaktionen eingespeist. War kein Gensymbol für das Pferdeprotein angegeben, wurde auf das dem Pferdeprotein entsprechende humane Ortholog zurückgegriffen und dessen Gensymbol verwendet. Das

¹⁴⁰ Fa. DAKO, Hamburg

¹⁴¹ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

¹⁴² Fa. Invitrogen, Karlsruhe

¹⁴³ Fa. DAKO, Hamburg

¹⁴⁴ Carl Zeiss AG, Oberkochen

¹⁴⁵ Carl Zeiss AG, Oberkochen

Softwareprogramm generierte daraus Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke mit verifizierten und vorhergesagten Protein-Protein-Interaktionen.

Es wurde die STRING¹⁴⁶-Suchmaschine (Version 8.2, frei zugänglich, mit 2590259 Proteinen aus 630 Organismen) verwendet. STRING ist eine Datenbank für bekannte und vorhergesagte, sowohl direkte (physische) als auch indirekte (funktionale) Protein-Protein Interaktionen (siehe <http://string.embl.de/>, frei zugänglich). Das Programm bezieht Informationen aus verschiedenen Quellen mit ein und wertet diese nach ihrer Relevanz. Diese Datenbank beinhaltet einen Großteil der zurzeit verfügbaren Informationen über Protein-Protein-Assoziationen mit über 50 Millionen gespeicherten Interaktionen (Jensen et al., 2009). Das Programm berechnet aufgrund der ihm zur Verfügung stehenden Daten (siehe <http://string.embl.de/>) mittels bestimmter Algorithmen (von Mering et al., 2007; von Mering et al., 2003) einen numerischen Aussagewahrscheinlichkeitswert zur Vorhersage einer funktionellen Assoziation zwischen Proteinen, was eine Gewichtung der Assoziation erlaubt. Je höher dieser Wert ist, desto aussagekräftiger sind die Daten auf denen die angezeigte Protein-Protein-Assoziation basiert, und umso wahrscheinlicher ist die Richtigkeit der angezeigten Interaktion (Jensen et al., 2009; von Mering et al., 2007; von Mering et al., 2003). Für die Darstellung des Netzwerks wurde die Option confidence-view gewählt, die Option Textminig wurde nicht als Datengrundlage zugelassen und der Aussagewahrscheinlichkeitswert für die Richtigkeit der vorhergesagten Interaktion wurde mit einem Wert von 0,6 zwischen mittlerer (0,4) und hoher (0,7) Sicherheit angesetzt. Im confidence view werden stärkere, d.h. durch mehr oder bessere Daten gestützte Protein-Assoziationen mittels dickerer Linien dargestellt (siehe <http://string.embl.de/>).

¹⁴⁶ <http://string.embl.de/>

4 ERGEBNISSE

4.1 Qualitative und quantitative massenspektrometrische Protein-Analyse von Glaskörperproben gesunder und an ERU erkrankter Pferdeaugen

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die massenspektrometrische Proteinanalyse von acht Glaskörperproben von an ERU erkrankter Pferdeaugen sowie von acht Glaskörperproben augengesunder Kontrollpferde mittels LTQ-OrbitrapXL.

Die Analyse der Proben erfolgte sowohl qualitativ als auch quantitativ. Es konnten nach Anwendung stringenter Identifikationskriterien 119 Proteine identifiziert werden.

Proteinname ^a	Accession Nummer ^b	Identifizierte Peptide ^c	Aussagewahrscheinlichkeit ^d
Alpha-1-Antichymotrypsin (SERPINA3)	ENSECAP00000011686	5	338
Alpha-1-Antiproteinase 2	ENSECAP00000009723	5	513
Alpha-1B-Glycoprotein	ENSECAP00000013223	13	1217
Alpha-2-HS-Glycoprotein	ENSECAP00000012774	7	700
Alpha-Crystallin A Chain	ENSECAP00000016847	5	379
Alpha-Enolase ^e	ENSECAP00000004949	1	129
Apolipoprotein A-IV	ENSECAP00000003670	1	59
Beta-Crystallin A3	ENSECAP00000001721	5	321
Beta-Crystallin A4	ENSECAP00000018607	2	104
Beta-Crystallin B2	ENSECAP00000013554	10	839
Beta-Crystallin B3	ENSECAP00000018355	3	225
Carboxylesterase D1 ^e	ENSECAP00000011386	3	310
Ceruloplasmin	ENSECAP00000010483	11	886
Fetuin-B (Gugu)	ENSECAP00000003687	11	731
Fibrinogen Beta Kette	ENSECAP00000008406	1	80
Hämoglobin Untereinheit beta	ENSECAP00000008056	11	907

Ergebnisse

Haptoglobin ^e	ENSECAP00000019071	11	940
Histidine-rich Glycoprotein	ENSECAP00000011089	9	691
Immunglobulin Gamma-2C Kette C Region ^e	ENSECAP00000004297	3	182
Immunglobulin Kappa Kette C Region ^e	ENSECAP00000001296	4	485
Immunglobulin Lambda Kette C Region ^e	ENSECAP00000003384	4	506
Immunglobulin Gamma 1 hc konstante Region ^e	ENSECAP00000007455	5	473
Inter-alpha-Inhibitor H1 (ITIH1)	ENSECAP00000022393	1	87
Kininogen-1	ENSECAP00000012466	4	218
Komplement C3	ENSECAP00000005652	18	1277
Komplement C4 ^e	ENSECAP00000007506	8	800
Komplement Faktor B ^e	ENSECAP00000010339	9	532
Lactotransferrin	ENSECAP00000019516	2	110
Plasma protease C1 Inhibitor	ENSECAP00000008891	5	264
Plasminogen	ENSECAP00000006627	8	557
Protocadherin-21	ENSECAP00000007629	1	73
Putative V-set and immunoglobulin domain- containing Protein 6 ^e	ENSECAP00000001751	1	222
S-Antigen	ENSECAP00000012776	5	328
Serotransferrin-like ^e	ENSECAP00000015051	5	331
SERPINA1 ^e	ENSECAP00000012399	14	1270
Serum Albumin	ENSECAP00000009171	51	6579
Serum Amyloid P-component (SAP)	ENSECAP00000005925	1	68
Versican core Protein	ENSECAP00000017347	1	77
Vitamin D-binding Protein	ENSECAP00000008681	15	1437
Vitronectin	ENSECAP00000013752	1	78

Tab. 4.1: Die aufgeführten Proteine konnten in allen untersuchten Glaskörperproben mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden, ohne quantitative Unterschiede sowohl in den Glaskörperproben der Kontrollgruppe als auch in den Glaskörperproben der an ERU erkrankten Pferdeaugen.

a) Name. b) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 56, 2009) geführt (<http://www.ensembl.org/index.html>). c) Anzahl der Peptide, die für das entsprechende Protein identifiziert werden konnten. d) Kumulativer Aussagewahrscheinlichkeitswert (Ionen-Punktzahl), wie von Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) gegeben (addiert für alle signifikant identifizierten Peptide des Proteins). Dieser Wert ist der negativ dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. In diesem Fall war ein Wert von mehr als 30 für ein einzelnes Peptid signifikant ($p < 0,01$). Um eine größtmögliche Identifikationssicherheit zu gewährleisten, wurde bei Proteinen, die nur über ein Peptid identifiziert werden konnten, der als signifikant geltende Wert auf 50 erhöht. e) Die identifizierte Sequenz konnte einem Eintrag in der Ensembl-Datenbank zugewiesen werden, die mittels einer Ortholog- oder Paralogsuche einem bereits bekannten Protein zugeordnet wurde (siehe Kapitel 3.10.4).

Insgesamt 40 Proteine konnten sowohl in der Gruppe der an ERU erkrankten als auch in der Kontrollgruppe ohne signifikante qualitative oder quantitative Unterschiede identifiziert werden (siehe Tab. 4.1). Diese Proteine bilden somit den im Krankheitsverlauf der ERU nicht veränderten Teil des physiologischen Protein-Repertoires des Pferde-Glaskörpers und wurden in allen untersuchten Proben identifiziert.

Die Expression von 17 Proteinen (Tab. 4.2) war in den Glaskörperproben der an ERU erkrankten Pferdeaugen signifikant erhöht. Darunter Proteine wie z.B. Alpha-1-Antitrypsin und Alpha-2-Makroglobulin mit enzymhemmenden Eigenschaften sowie Proteine der Immunglobulinfamilie, außerdem Proteine der Gerinnungskaskade wie Antithrombin III, Gerinnungsfaktor II und Fibrinogen und das Gelatinase assoziierte Protein Lipocalin 2. Eine der in der LC-MS/MS identifizierten Sequenz konnte zwar einem Eintrag in der Ensembl-Datenbank zugewiesen werden, doch gelang für diesen keine Zuordnung zu einem schon bekannten Protein.

Proteinname^a	Accession Nummer^b	Identifizierte Peptide^c	Aussagewahrscheinlichkeit^d	Anova (p)^{*e}	Kontrolle / ERU^f
Alpha-1-Antitrypsin	ENSECAP00000017379	2	182	0,003	0,5
Alpha-2-Makroglobulin	ENSECAP00000010822	20	1467	0,000	0,1
Alpha-Albumin (Afamin)	ENSECAP00000019964	5	264	0,004	0,4
Antithrombin III Protein	ENSECAP00000012335	12	1005	0,001	0,5
Apolipoprotein A-I	ENSECAP00000007649	13	899	0,006	0,3

Apolipoprotein A-II (Apo-AII)	ENSECAP00000008027	2	132	0,007	0,1
BWK3 ^g	ENSECAP00000007504	2	248	0,000	0,0
Fibrinogen gamma- Polypeptid	ENSECAP00000006553	3	240	0,036	0,2
Gerinnungsfaktor II (F2)	ENSECAP00000009701	6	350	0,026	0,5
Heparin Kofaktor 2 (SERPIND1)	ENSECAP00000011734	2	143	0,000	0,1
Immunglobulin Gamma 1 c-Region	ENSECAP00000002609	10	1154	0,001	0,4
Immunglobulin heavy variable 3-6	ENSECAP00000000334	9	722	0,000	0,0
Immunglobulin J Kette	ENSECAP00000017509	5	338	0,000	0,0
Lipocalin 2	ENSECAP00000018476	11	778	0,006	0,8
Nicht zuzuordnen ^h	ENSECAP00000012924	1	51	0,034	0,2
NKG2D Ligand 4 (RAET1E) ^g	ENSECAP00000000345	2	69	0,015	0,2
SH2 domain- containing Protein 3C	ENSECAP00000015661	2	72	0,047	0,6

Tab. 4.2: Massenspektrometrisch (LC-MS/MS) identifizierte Proteine mit erhöhter Expression in den uveitischen Glaskörperproben. a) Name. b) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 56, 2009) geführt (<http://www.ensembl.org/index.html>). c) Anzahl der Peptide, die für das entsprechende Protein identifiziert werden konnten. d) Kumulativer Aussagewahrscheinlichkeitswert (Ionen-Punktzahl), wie von Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) gegeben (addiert für alle signifikant identifizierten Peptide des Proteins). Dieser Wert ist der negativ dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. In diesem Fall war ein Wert von mehr als 30 für ein einzelnes Peptid signifikant ($p < 0,01$). Um eine größtmögliche Identifikationssicherheit zu gewährleisten, wurde bei Proteinen, die nur über ein Peptid identifiziert werden konnten, der als signifikant geltende Wert auf 50 erhöht. e) Signifikanz der differentiellen Expression der Proteine in den Proben der Kontrollgruppe im Vergleich zu den an ERU erkrankten Tieren (signifikant ab $p < 0,05$). f) Faktor, der sich aus der Expressionshöhe der kumulativen Peptidintensitäten der gesunden Glaskörper dividiert durch die kumulativen Peptidintensitäten der ERU Glaskörper ergibt (gemäß Quantifizierung in Progenesis). g) Die identifizierte Sequenz konnte einem Eintrag in der Ensembl-Datenbank zugewiesen werden, die mittels einer Ortholog- oder Paralogsuche einem bereits bekannten Protein zugeordnet wurde (siehe Kapitel 3.10.4). Einem Eintrag h) konnte kein Protein zugeordnet werden.

Für 62 weitere Proteine konnte ein signifikanter Rückgang der Expression in den uveitischen Glaskörperproben festgestellt werden (Tab. 4.3). Darunter interessante Vertreter des Wnt-Signaltransduktionswegs und der Matrix-Metalloproteinasefamilie. Zusammen repräsentieren die 79 Proteine aus den Tabellen 4.2 und 4.3 die bei equiner rezidivierender Uveitis im Vergleich zu den Kontrollpferden differenziell exprimierten Glaskörperproteine.

Proteinname^a	Accession Nummer^b	Identifizierte Peptide^c	Aussage-wahrscheinlichkeit^d	Anova (p)^{*e}	Kontrolle / ERU^f
Alpha-Crystallin B Kette	ENSECAP00000010228	7	446	0,039	29,9
Amyloid beta A4 Protein	ENSECAP00000019519	2	94	0,000	15,8
Amyloid-like Protein 2	ENSECAP00000019671	1	59	0,015	4,6
Angiomodulin Fragment	ENSECAP00000010802	2	152	0,000	51,2
Angiotensinogen	ENSECAP00000013428	10	645	0,030	2,4
Apolipoprotein D	ENSECAP00000019509	1	69	0,000	11,1
Beta-2-Glycoprotein 1	ENSECAP00000019727	6	544	0,000	3,8
Beta-2-Microglobulin	ENSECAP00000000811	1	116	0,000	128,0
Beta-Crystallin B1	ENSECAP000000005172	3	172	0,004	49,2
Cadherin 2	ENSECAP000000008264	1	76	0,000	82,6
Calsyntenin-1	ENSECAP000000021044	10	592	0,000	6,2
Cathepsin L2	ENSECAP000000004288	2	162	0,000	165,9
Chromogranin-A	ENSECAP000000016838	4	420	0,000	129,1
Clusterin	ENSECAP000000005450	19	1552	0,043	2,1
Dickkopf-related Protein 3	ENSECAP000000020312	12	932	0,000	31,0
EGF-enthaltendes fibulinähnliches extrazelluläres Matrix Protein 1	ENSECAP000000008615	7	409	0,000	10,0

Ergebnisse

Epididymal secretory Protein E1 (NPC2)	ENSECAP00000015851	1	67	0,032	15,4
Fibronektin (FN)	ENSECAP00000005223	9	727	0,001	6,1
Fibulin-2	ENSECAP00000007213	6	479	0,000	118,2
Gelsolin	ENSECAP00000017333	7	508	0,003	8,1
Hemopexin	ENSECAP00000014242	10	603	0,000	3,0
Insulin-like growth factor binding Protein-5	ENSECAP00000011203	2	109	0,003	17,5
Insulin-like growth factor binding Protein-6	ENSECAP00000017144	3	217	0,000	533,3
Inter-alpha-Trypsin Inhibitor	ENSECAP00000006616	4	252	0,000	3,0
Interphotoreceptor Matrix- Proteoglycan 1	ENSECAP00000016977	1	81	0,000	149,4
Interphotoreceptor retinoid binding Protein	ENSECAP00000011660	23	1566	0,000	51,2
Keratin, Typ I zytoskeletal 10 ^g	ENSECAP00000018005	4	247	0,028	2,4
Keratin, Typ II cytoskeletal 1	ENSECAP00000019935	3	217	0,001	2,9
Keratin, Typ II cytoskeletal 75	ENSECAP00000008235	1	100	0,026	2,5
Kollagen alpha-1(VI) Kette	ENSECAP00000020429	3	206	0,000	64,1
Kollagen, Typ II, alpha 1	ENSECAP00000021294	2	129	0,000	141,2
Komplement Faktor I	ENSECAP00000011803	2	139	0,000	6,3
Matrix-Metalloproteinase-2	ENSECAP00000002955	1	106	0,000	11,0
Metalloproteinase Inhibitor 1 (TIMP-1)	ENSECAP00000011965	1	63	0,001	5,0
Metalloproteinase Inhibitor 2 (TIMP-2)	ENSECAP00000009754	2	143	0,000	75,8

Ergebnisse

N-acetyllactosaminide beta-1,3-N- Acetylglucosaminyl- transferase ^g	ENSECAP00000008867	2	65	0,001	33,9
Neuropeptid VF	ENSECAP00000018510	3	162	0,000	14,4
Opticin	ENSECAP00000015817	5	405	0,000	48,5
Osteopontin (SPP1)	ENSECAP00000014936	11	1015	0,000	11,1
Phosphatidylethanolamine-binding Protein 4	ENSECAP00000021210	4	173	0,000	53,3
Pigment epithelium-derived Faktor	ENSECAP00000019875	18	1415	0,000	14,0
PROS1	ENSECAP00000014541	2	83	0,000	77,2
Prostaglandin-H2 D-Isomerase	ENSECAP00000007190	4	316	0,000	25,8
Protein FAM3C	ENSECAP00000006628	6	472	0,000	150,5
Putative tenascin-XA	ENSECAP00000012129	8	566	0,003	38,5
Reelin	ENSECAP00000019013	8	355	0,000	29,8
Retinoic acid receptor responder Protein 2 ^g	ENSECAP00000012454	3	188	0,000	50,5
Retinol-binding Protein 4	ENSECAP00000013969	5	312	0,000	20,1
Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP-2)	ENSECAP00000014669	3	288	0,001	9,6
Semaphorin-7A	ENSECAP00000000171	3	122	0,000	1380,7
Serotransferrin	ENSECAP00000016524	46	4820	0,000	5,5
SPARC	ENSECAP00000011846	6	403	0,000	5,5
SPARC-like Protein 1	ENSECAP00000007659	8	632	0,000	44,8
Spondin-1	ENSECAP00000018447	1	72	0,001	30,0
Sulfhydryl Oxidase 1	ENSECAP00000014757	4	218	0,000	79,1
Tenascin-R	ENSECAP00000016790	1	79	0,000	1053,1
Tetranectin (CLEC3B)	ENSECAP00000004386	2	162	0,002	3,6

Transforming growth factor-beta-induced Protein ig- h3	ENSECAP00000018140	2	88	0,001	58,5
Transthyretin	ENSECAP00000013533	2	77	0,001	5,3
Tripeptidyl-Peptidase 1	ENSECAP00000006230	2	102	0,003	26,2
Ubiquitin	ENSECAP00000004962	2	121	0,000	22,5
WAP four-disulfide core domain Protein 2	ENSECAP00000015211	2	140	0,000	158,0

Tab. 4.3: Massenspektrometrisch (LC-MS/MS) identifizierte Proteine mit erniedrigter Expression in den uveitischen Glaskörperproben. a) Name. b) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 56, 2009) geführt (<http://www.ensembl.org/index.html>). c) Anzahl der Peptide, die für das entsprechende Protein identifiziert werden konnten. d) Aussagewahrscheinlichkeitswert (Ionen-Punktzahl), wie von Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) gegeben. Dieser Wert ist der negativ dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. In diesem Fall war ein Wert von mehr als 30 signifikant ($p < 0,01$). Um eine größtmögliche Identifikationssicherheit zu gewährleisten, wurde bei Proteinen, die nur über ein Peptid identifiziert werden konnten, der als signifikant geltende Wert auf 50 erhöht. e) Signifikanz der differentiellen Expression der Proteine in den Proben der Kontrollgruppe im Vergleich zu den an ERU erkrankten Tieren (signifikant ab $p < 0,05$). f) Faktor der sich aus der Expressionshöhe der kumulativen Peptidintensitäten der gesunden Glaskörper dividiert durch die kumulativen Peptidintensitäten der ERU Glaskörper ergibt (gemäß Quantifizierung in Progenesis). g) Die identifizierte Sequenz konnte einem Eintrag in der Ensembl-Datenbank zugewiesen werden, die mittels einer Ortholog- oder Paralogsuche einem bereits bekannten Protein zugeordnet wurde (siehe Kapitel 3.10.4).

4.2 Veränderte Lipocalin 2 Expression in der erkrankten Retina

Die massenspektrometrische Proteinanalyse der Glaskörperproben ergab eine erhöhte Expression des Proteins Lipocalin 2 im uveitischen Glaskörper (Tab. 4.2). Lipocalin 2 qualifizierte sich als interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen in der Retina, dem Zielgewebe der ERU, aufgrund seiner Verbindung zu Proteinen aus der Matrix-Metalloproteinasefamilie (Kubben et al., 2007; Triebel et al., 1992), deren Vertreter ebenfalls in der ERU differenziell exprimiert waren (Tab 4.3 und Kapitel 4.5). Pferderetinae (Abb. 4.1a gesund, Abb. 4.1b ERU; Nomarski) wurden immunhistochemisch auf das Expressionsmuster von Lipocalin 2 untersucht. In der gesunden Retina konnte eine gleichmäßige Expression von Lipocalin 2 im Bereich der Nervenfaserschicht, der inneren plexiformen Schicht, und an der äußeren Körnerschicht sowie der äußeren limitierenden Membran nachgewiesen werden (Abb. 4.1c, Lipocalin 2 (grün)). Im Vergleich hierzu zeigte die Lipocalin 2 Expression

im erkrankten Retinagewebe eine über das gesamte Gewebe vitreal der äußeren Körnerschicht ungleichmäßige Verteilung, fokal eine Restexpression im Bereich der äußeren Körnerschicht sowie einzelne, kleine, scharf abgrenzbare Areale choroideal der äußeren Körnerschicht (Abb. 4.2d, Lipocalin 2 (grün)).

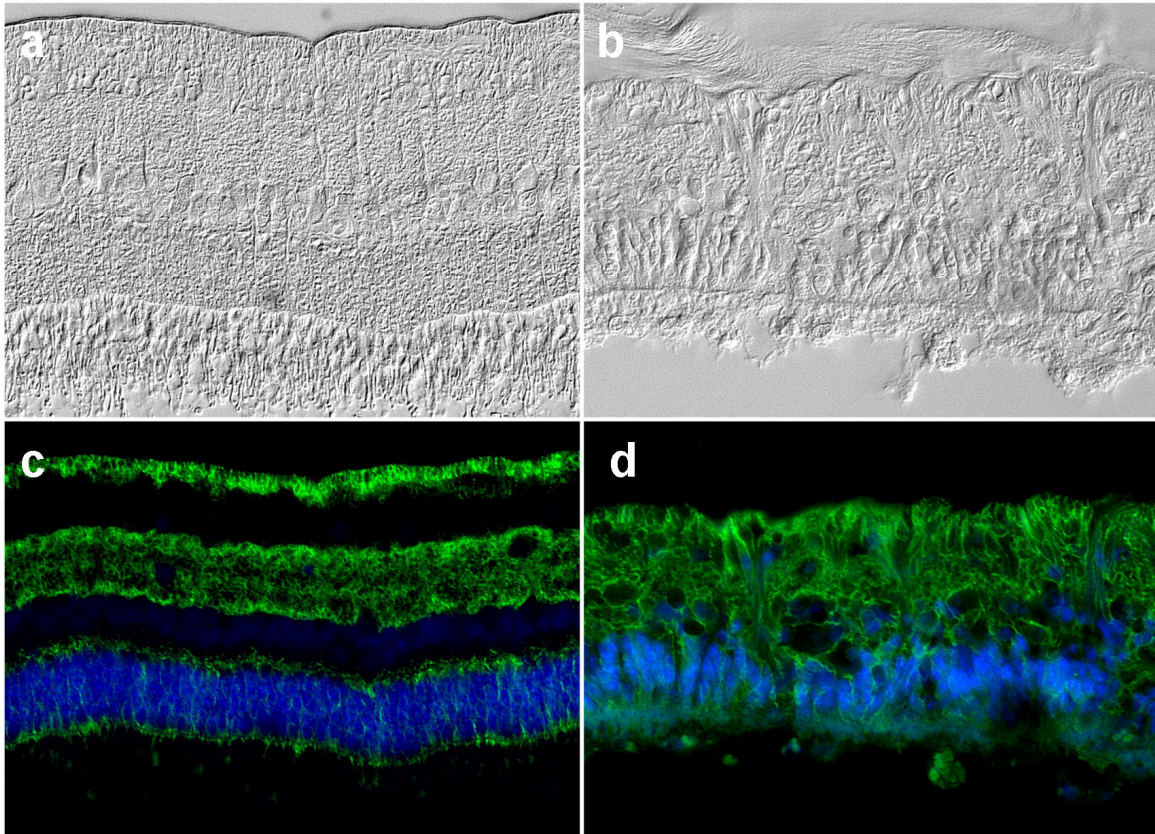


Abb. 4.1: Immunhistochemischer Nachweis der Lipocalin 2 Expression in der Pferde retina (grün). Sichtbare Zerstörung des retinalen Gewebes in der ERU, bei vergleichender Gegenüberstellung des Nomarski Bildes einer augengesunden Retina (a) mit der Retina eines an ERU erkrankten Tieres (b). (c) Gleichmäßiges Lipocalin 2 Expressionsmuster in der Nervenfaserschicht, der inneren plexiformen Schicht und der äußeren Körnerschicht einer augengesunden Retina. (d) Im Vergleich dazu das veränderte Lipocalin 2 Expressionsmuster im erkrankten Netzhautgewebe. Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau).

4.3 Proteine des Wnt-Signalweges und mögliche Interaktoren in der ERU

Bereits Altmann fand in seinen Experimenten Hinweise auf eine potenzielle Beteiligung des Wnt-Signalweges im Krankheitsgeschehen der ERU (Altmann, 2007). Im folgenden Teil der Arbeit wurden dazu weiterführende Untersuchungen durchgeführt.

4.3.1 SFRP-2 Expression in der Pferderetina

SFRP-2, ein Inhibitor des Wnt-Signalweges, zeigte in der massenspektrometrischen Analyse der Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden in dieser Arbeit eine signifikant erniedrigte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 4.3). Als Basis für weitere Koexpressionsstudien mit anderen Proteinen des Wnt-Signalwegs wurde das SFRP-2 Expressionsmuster in der Retina verifiziert. Verwendung fand ein polyklonaler Huhn–anti-human–SFRP-2-Antikörper aus Eigenproduktion. Die Abbildung 4.2 zeigt eine Differenzial-Interferenzkontrastaufnahme nach Nomarski einer gesunden Pferderetina (Abb. 4.2a) und der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes (Abb. 4.2b). Bei den für diese Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen bestätigte sich die von Altmann (Altmann, 2007) gezeigte SFRP-2 Expression im Bereich der Photorezeptorschicht im gesunden Retinagewebe des Pferdes (Abb. 4.2c, SFRP-2 Expression grün). Diese Expression ist bei an ERU erkrankten Augen deutlich reduziert und auf eine minimale Restexpression im Bereich der äußeren limitierenden Membran beschränkt (Abb. 4d, grün).

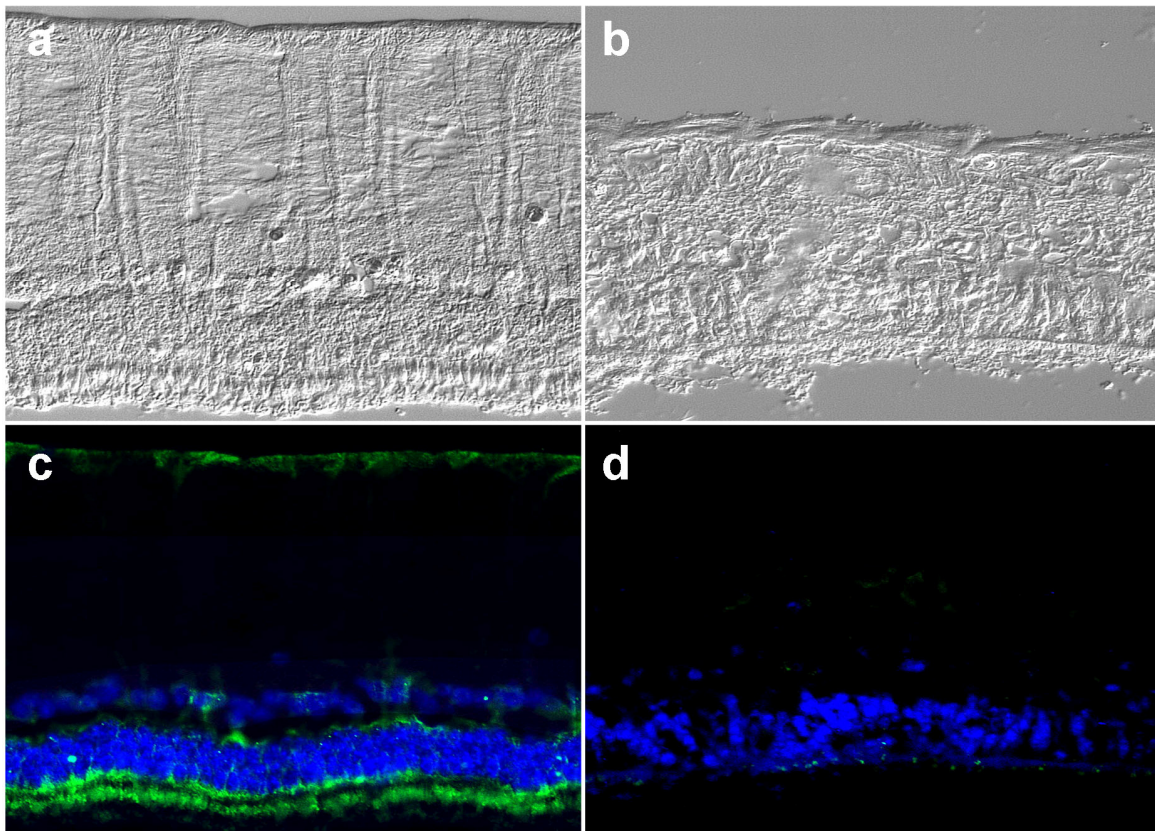


Abb. 4.2: SFRP-2 Expression in der Pferderetina ((a) gesund, (b) an ERU erkrankt; Nomarski). DAPI Färbung der Zellkerne (blau). (c) Expression von SFRP-2 (grün) in den Photorezeptoraußensegmente, der äußeren Körnerschicht, der äußeren limitierenden Membran sowie an Teilen der äußeren plexiformen Schicht im gesunden Netzhautgewebe. (d) Nahezu keine SFRP-2 Expression in der Netzhaut eines an ERU erkrankten Pferdes.

4.3.2 Verlust der Wnt3a Expression in der von ERU betroffenen Pferderetina

Der Rückgang der SFRP-2 Expression im erkrankten Retinagewebe (Abb. 4.2d) legt eine potenzielle Beteiligung des an SFRP-2 gekoppelten Abschnitts des Wnt-Signalwegs im Krankheitsgeschehen der ERU nahe. Aus der Literatur ist die Interaktion von SFRP-2 mit dem Wnt-Protein Wnt3a bekannt (Zhang et al., 2009b). Daraufhin erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung histologischer Retinapräparate augengesunder (Abb. 4.3a, Nomarski) und an ERU erkrankter Pferdeaugen (Abb. 4.3b, Nomarski) auf ihre Wnt3a Expression. Es konnte ein Immunfluoreszenz-Signal im Bereich der Photorezeptorschicht und der äußeren limitierenden Membran gesunder Pferderetinae detektiert werden (Abb. 4.3c, Wnt3a (rot)). Im Vergleich dazu war das Wnt3a Signal in den von ERU betroffenen Retinae nicht mehr nachweisbar (Abb. 4.3d, Wnt3a (rot)).

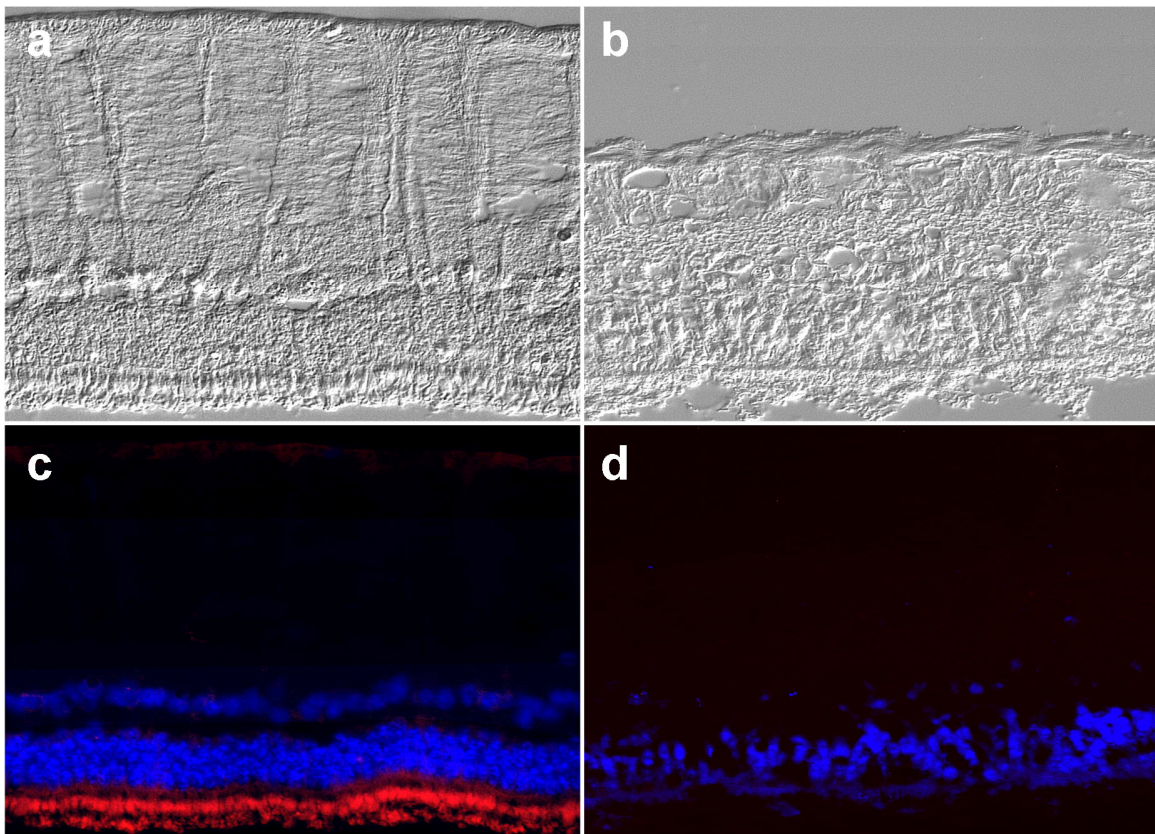


Abb. 4.3: Wnt3a Expression in der Pferdenetzhaut. Differential-Interferenzkontrastaufnahme nach Nomarski einer gesunden Pferderetina (a) und der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes (b). (c) Wnt3a Expression (rot) an den Außensegmenten der Photorezeptoren und im Bereich der äußeren limitierenden Membran einer gesunden Pferderetina. (d) Wnt3a (rot) wird in der erkrankten Netzhaut nicht mehr exprimiert. DAPI-Färbung der Zellkerne (blau).

4.3.3 Alpha-2-Makroglobulin als potenzieller SFRP-2 Interaktor

Um potenzielle Interaktoren für SFRP-2 beim Pferd zu finden, wurden eine von Glöckner et al. beschriebene Strep/FLAG-Tandem Affinitäts Aufreinigung (SF-TAP) durchgeführt (Gloeckner et al., 2007). Nach massenspektrometrischer (mittels LC-MS/MS) Proteinanalyse der Aufreinigungsfractionen einer erfolgreichen SFRP-2-SF TAP aus Zelllysat und Zellkulturüberstand von mit SF-SFRP-2 Fusions-Plasmid transient transfizierten Hek-293T Zellen sowie entsprechender Negativkontrollen konnten folgende potenzielle Interaktoren für SFRP-2 identifiziert werden (Tab. 4.4): 78 kDa Glucose-regulated Protein, Heat shock 70 kDa Protein 1A, Tubulin alpha 6 Variante, Tubulin beta Polypeptid, Methylosom Protein 50, Heat shock 70 kDa Protein 8 Isoform 2, Alpha-2-Makroglobulin und Hämoglobin alpha-2 Globin (mutiert). Die erfolgreiche Expression von SFRP-2 in den transfizierten Zellkulturen bestätigte sich durch den Nachweis von SFRP-2 mittels LC-MS/MS (Tab. 4.4). In Zellkulturüberstand und Zelllysat der Negativkontrollen war SFRP-2 nicht nachweisbar. Alpha-2-Makroglobulin, eines der in diesem Versuch als potenzieller SFRP-2 Interaktor identifizierten Proteine, zeigte zugleich auch eine differenzielle Expression in den untersuchten Glaskörperproben (Tab. 4.2).

Proteinname ^a	Accession Nummer ^b	MG ^c	Aufreinigungsfraction Zellkulturüberstand ^d	Aufreinigungsfraction Zelllysat ^e
Secreted frizzled-related Protein 2	Q96HF1	33	100% (13)	100% (8)
78 kDa glucose-regulated Protein	P11021	72	-	100% (10)
Heat shock 70 kDa Protein 1A	Q59EJ3	77	-	100% (7)
Tubulin alpha 6 Variante	Q53GA7	50	-	100% (7)
Tubulin beta Polypeptid	Q5JP53	48	-	100% (7)

Methylosom Protein 50	Q9BQA1	37	-	100% (3)
Heat shock 70kDa Protein 8 Isoform 2	Q53HF2	54	-	100% (3)
Alpha-2-Makroglobulin	P01023	163	100% (2)	-
Hämoglobin alpha-2 Globin (mutiert)	Q4ZGM8	11	99% (2)	-

Tab. 4.4: Als potenzielle SFRP-2 Interaktoren identifizierte (mittels LC-MS/MS, Scaffold-Softwareanalyse) Proteine, aus den Aufreinigungsfractionen einer SF-TAP von SFRP-2 aus HEK-293T Zellen (transfiziert mit Strep-Tactin/Flag-SFRP-2 Fusions-Plasmid). Kein Nachweis dieser Proteine in den entsprechenden Negativkontrollen. a) Proteinname wie in der UniProt-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) geführt. b) Protein Identifikationsnummer wie in der UniProt-Datenbank geführt. c) Theoretisches Molekulargewicht des identifizierten Proteins, angegeben in kDa d) Identifikation des Proteins aus der SFRP-2 Aufreinigungsfraction des Zellkulturüberstands und e) des Zellysates von mit SFRP-2 transfizierten Hek-293T Zellen. Die Prozentzahl gibt die Identifizierungswahrscheinlichkeit an, wobei 100% und 99% als sicher identifiziert anzunehmen sind, die Zahl in Klammern verweist auf die Anzahl der identifizierten Peptide.

4.3.4 Erhöhte Alpha-2-Makroglobulin-Expression bei ERU

4.3.4.1 Quantifizierung der erhöhten Alpha-2-Makroglobulin Expression in den Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferdeaugen

Alpha-2-Makroglobulin wurde als potenzieller Bindungspartner für SFRP-2 identifiziert (Tab. 4.4) und zeigte bei der massenspektrometrischen Analyse eine erhöhte Expression in allen Glaskörperproben uveitischer Pferdeaugen (Tab. 4.2). In der daraufhin durchgeführten Untersuchung der Glaskörperproben (Kontrolle n=17, ERU n=15) im eindimensionalen Western Blot konnten drei Signale für Alpha-2-Makroglobulin auf verschiedenen Höhen detektiert werden (Abb. 4.4a). Die densitometrische Auswertung der Western Blot Signale ergab eine Zunahme der mittleren Signalstärke in den uveitischen Glaskörperproben um das 5,99fache bei der Bande über 200 kDa, um das 5,98fache bei der mittleren Bande (ca. 180 kDa Bande), sowie um das 16,85fache bei der ca. 95 kDa Bande (Abb. 4.4a). Mehrere Signale auf verschiedenen Höhen und mit unterschiedlichem pH, die in der

uveitischen Glaskörperprobe im zweidimensionalen Western Blot detektiert (Abb. 4.4b) werden konnten, weisen zusätzlich auf potentielle posttranslationale Modifikationen von Alpha-2-Makroglobulin hin.

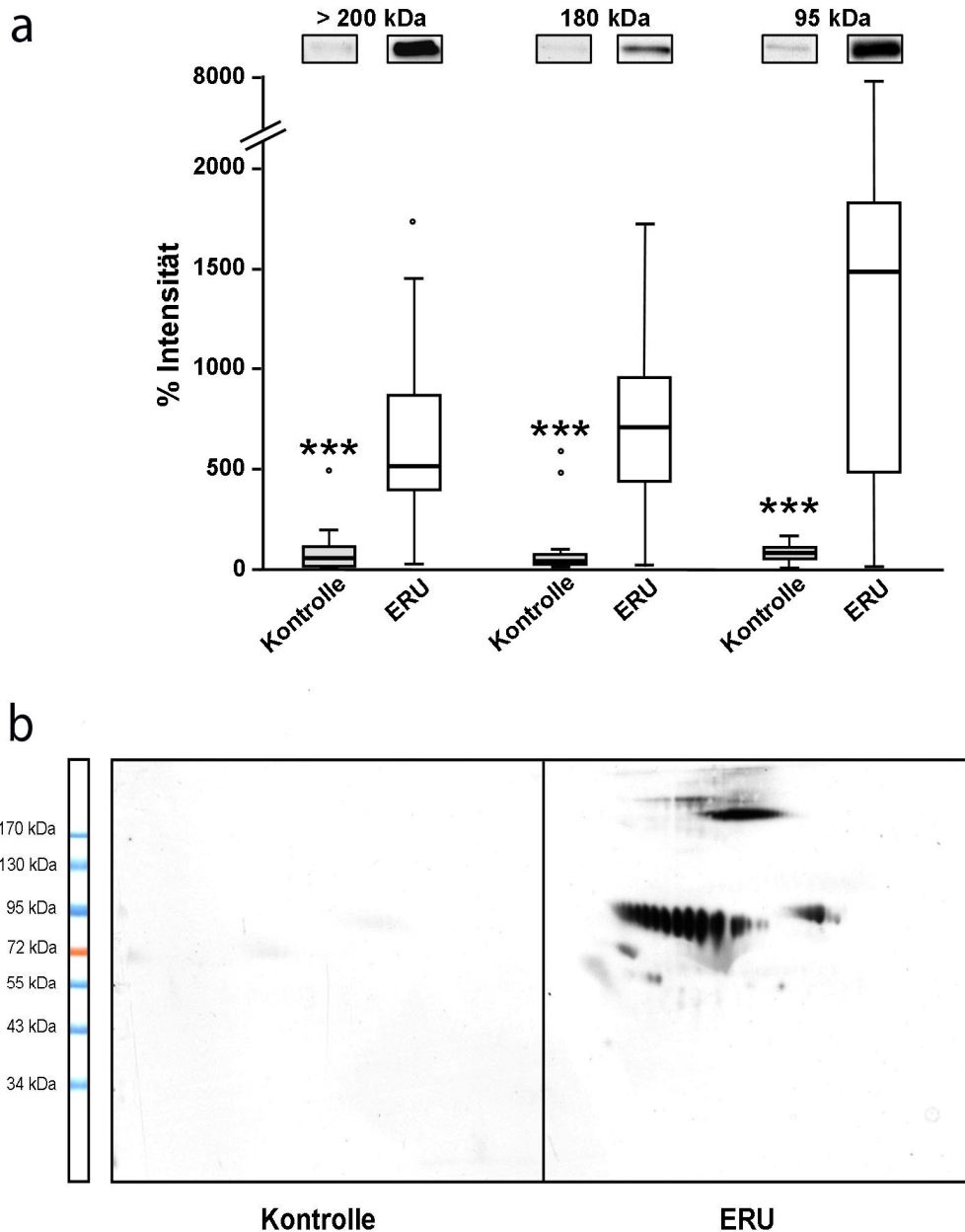


Abb. 4.4: (a) Erhöhte Alpha-2-Makroglobulin Expression im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden. Densitometrische Auswertung der im eindimensionalen Western Blot detektierten Banden. Zunahme der mittleren Signalstärke um 599% (Bande > 200 kDa), um 598% (180 kDa Bande) und um 1685% (95 kDa Bande) (***) $p < 0,001$). Im Box Plot ist die Kontrollgruppe ($n=17$, graue Säule) der untersuchten ERU Gruppe ($n=15$, weiße Säule) vergleichend gegenübergestellt. Darüberliegend ist eine repräsentative Bande des jeweils detektierten Western Blot Signals exemplarisch dargestellt. (b) Vergleichender, zweidimensionaler Western Blot (erste Dimension pH 3-11); Kontrollglaskörperprobe (links), kein Signal detektiert. Glaskörperprobe eines an ERU erkrankten Pferdes (rechts), es sind mehrere Signale auf verschiedenen Höhen und mit unterschiedlichem pH zu erkennen.

4.3.4.2 Zunahme der Alpha-2-Makroglobulin Expression im erkrankten retinalen Gewebe

In den untersuchten histologischen Retinapräparaten (Abb. 4.5a gesund, Abb. 4.5b ERU; Nomarski) konnte die Expression von Alpha-2-Makroglobulin im gesunden Gewebe (Abb. 4.5c, Alpha-2-Makroglobulin (magenta)) für den Bereich der inneren Photorezeptorzellsegmente, im Bereich der äußeren Körnerschicht zur äußeren limitierenden Membran hin stärker werdend, und am vitrealen Rand der Nervenfaserschicht nachgewiesen werden. Im erkrankten retinalen Gewebe (Abb. 4.5d, Alpha-2-Makroglobulin (magenta)) zeigte sich zusätzlich eine Expression im Bereich der Ganglienzellschicht und der Nervenfaserschicht sowie eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzfärbung am choroidealen Rand der äußeren Körnerschicht.

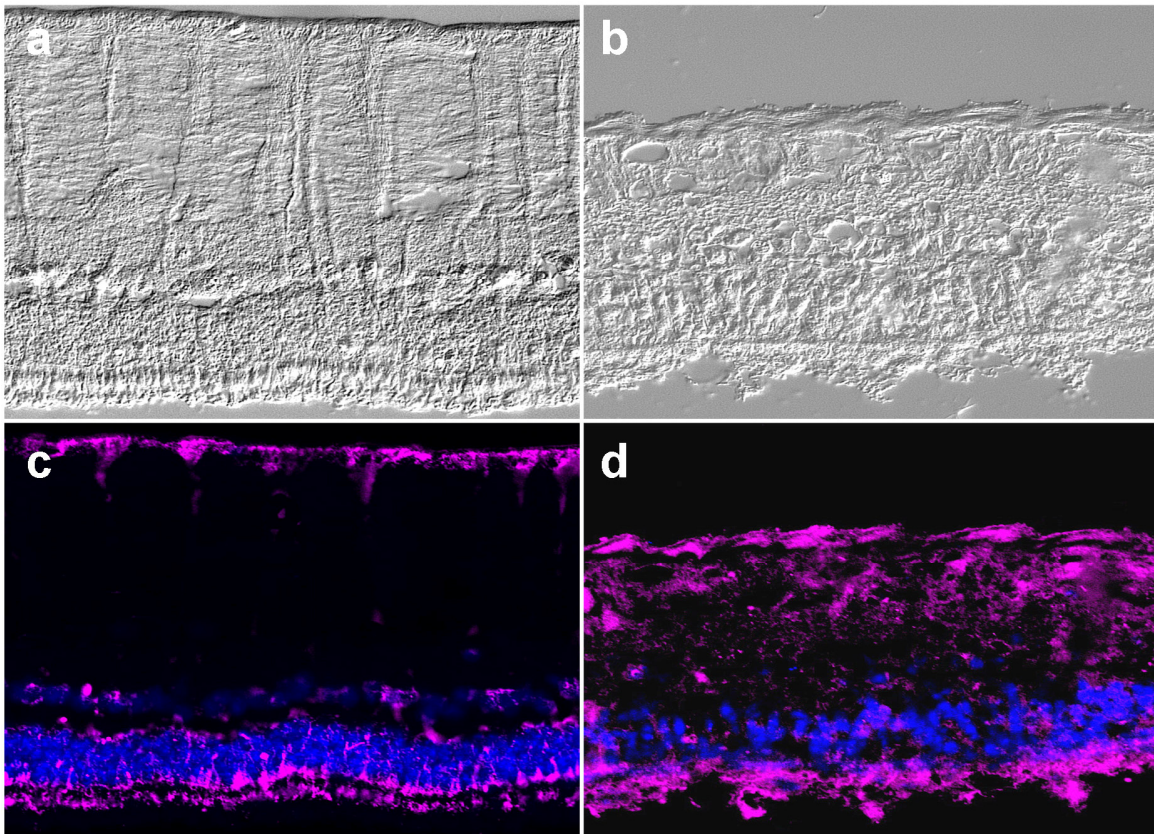


Abb. 4.5: Alpha-2-Makroglobulin-Expressionsmuster (magenta) in der Pferderetina. (a) Retina eines augengesunden Pferdes, Nomarski. (b) Retina eines an ERU erkrankten Pferdes, Nomarski. (c) Alpha-2-Makroglobulin Expression an den Photorezeptorsegmenten, an der äußeren Körnerschicht sowie am vitrealen Rand der Nervenfaserschicht einer gesunden Pferderetina. (d) Dem gegenübergestellt die im Vergleich vermehrte Expression im Bereich der Ganglienzellschicht und der Nervenfaserschicht sowie am choroidealen Rand der äußeren Körnerschicht eines an ERU erkrankten Pferdes. Zellkerne DAPI gefärbt (blau).

4.4 Differenzielle Expression von Osteopontin

Die massenspektrometrische Proteinanalyse der Pferdeglasskörperproben zeigte einen deutlichen Rückgang der Osteopontin-Expression in der equinen rezidivierenden Uveitis (Tab. 4.3). Hingegen schreiben einige Autoren Osteopontin (OPN) eine proinflammatorische Wirkung in autoimmunen Uveitismodellen zu (Kitamura et al., 2007; Hikita et al., 2006). Aufgrund dieser zur Literatur gegenläufigen Ergebnisse erschien Osteopontin als interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen.

4.4.1 Quantifizierung der differentiellen Osteopontin Expression im Western Blot

Durch eindimensionalen Western Blot konnten sowohl bei gesunden als auch bei uveitischen Glaskörperproben gleichermaßen zwei Signale für Osteopontin auf Höhe von ca. 72 kDa (Bandentriplett) und auf Höhe von ca. 30 kDa (Doppelbande) detektiert werden. In den uveitischen Glaskörperproben zeigte sich ein Rückgang der Osteopontinexpression (Abb. 4.6a) bei dem ca. 72 kDa großen Signal (Bandentriplett) auf 12,8% (\pm 4,8%) und bei dem ca. 30 kDa großen Signal (Doppelbande) auf 2,7% (\pm 1,25%).

Im zweidimensionalen Western Blot konnte eine Osteopontin-Expression im Kontrollglaskörper in Form von zwei Signalen auf unterschiedlicher Höhe im sauren Bereich (Abb. 4.6b) nachgewiesen werden. Diese Signale waren in der uveitischen Glaskörperprobe (Abb. 4.6c) nicht detektierbar.

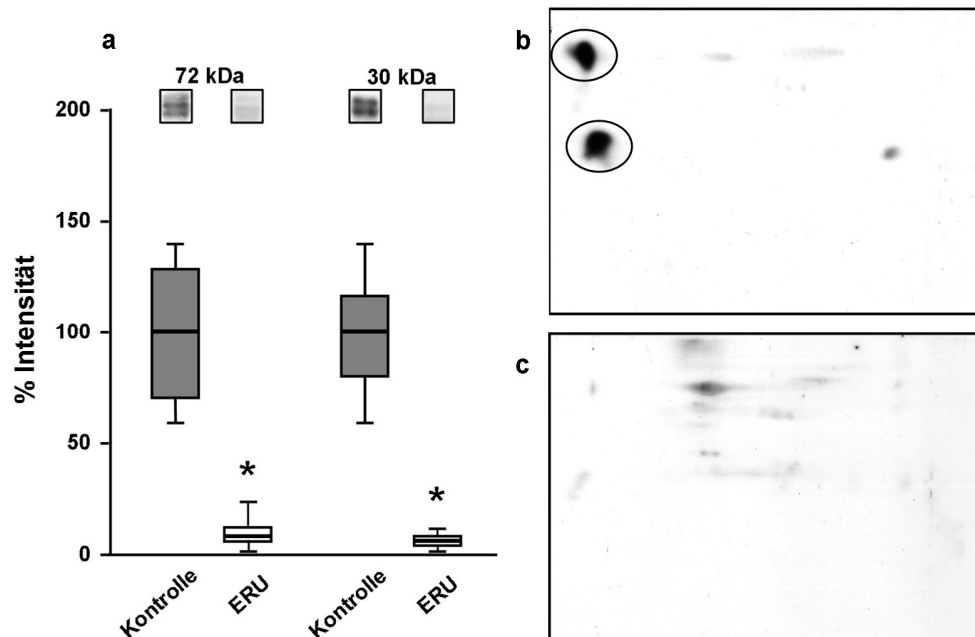


Abb. 4.6: Erniedrigte Osteopontin Expression in den uveitischen Glaskörperproben. (a) Densitometrische Quantifizierung der im eindimensionalen Western Blot detektierten Banden. Rückgang der mittleren Signalstärke bei 72 kDa (Bandentriplett) auf 12,8% , Rückgang der mittleren Signalstärke bei 30 kDa (Doppelbande) auf 2,7%. Im Box Plot ist die Kontrollgruppe (n=4, graue Säule) der untersuchten ERU Gruppe (n=5, weiße Säule) gegenübergestellt. Darüberliegend die exemplarische Darstellung repräsentativer Banden (* p<0,05). Vergleichender zweidimensionaler Western Blot (erste Dimension pH 3-11); Glaskörperprobe der Kontrollgruppe (b) mit deutlichem Osteopontinsignal (ca. 30 kDa und ca. 72 kDa, umrandet). (c) Glaskörperprobe eines an ERU erkrankten Pferdes. Osteopontin ist nicht nachweisbar.

4.4.2 Rückgang der Osteopontin Expression in der Pferderetina bei ERU

Die Expression von Osteopontin in der Pferderetina bei ERU wurde immunhistochemisch mit der Retina von augengesunden Pferden verglichen (Abb. 4.7a gesund, Abb. 4.7b ERU; Nomarski). In gesunden Retinae konnte eine Expression im Bereich der Ganglienzellschicht und der Nervenfaserschicht sowie der Photorezeptorschicht und der äußeren limitierenden Membran nachgewiesen werden. Beginnend in der Ganglienzellschicht verlief das Immunfluoreszenzsignal entlang länglicher, vertikaler Strukturen zur Nervenfaserschicht und nahm an deren vitrealen Rand an Stärke zu (Abb. 4.7c, OPN (magenta)). Im erkrankten Gewebe war ein deutlicher Rückgang der OPN-Expression zu erkennen. Nur in der

Photorezeptorschicht konnte eine geringe Restexpression an einzelnen, kleinen, rundlichen Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 4.7d, OPN (magenta)).

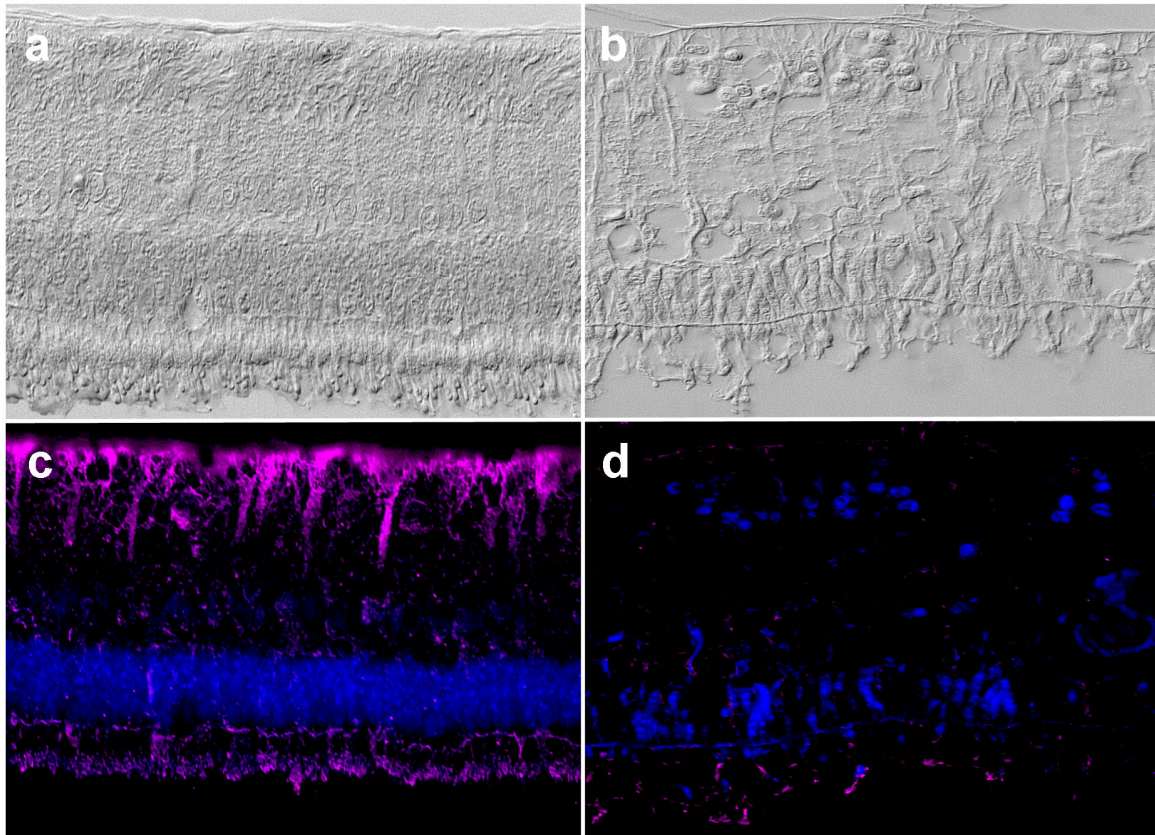


Abb. 4.7: OPN Expression (magenta) in der Pferderetina: Differenzial-Interferenzkontrastaufnahme nach Nomarski einer gesunden Pferderetina (a) und der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes (b). Das Expressionsmuster in einer gesunden Retina (c) zeigte eine vermehrte Signalstärke im Bereich der Müllerzellendfüße. Dem gegenübergestellt das OPN Expressionsmuster in der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes (d) mit deutlichem Rückgang der Expression. DAPI-Färbung der Zellkerne (blau).

4.5 Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen in Glaskörper und Retina

Durch die massenspektrometrische Proteinanalyse der Glaskörperproben konnte ein Mitglied der Matrix-Metalloproteinasefamilie (MMP-2, Tab. 4.3) als differenziell exprimiert identifiziert werden. Da die Beteiligung dieser Protease am Krankheitsgeschehen der ERU bisher noch nicht beschrieben ist, wurden Untersuchungen zur Expression von MMP-2 und weiteren mit MMP-2 funktional verknüpften Proteinen aus der Matrix-Metalloproteinasefamilie durchgeführt.

4.5.1 Expression von MMP-2 im untersuchten Probenmaterial

4.5.1.1 Reduzierte MMP-2 Expression in Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden

In den im eindimensionalen Western Blot untersuchten Glaskörperproben konnte bei den an ERU erkrankten Pferden (n=7) ein statistisch signifikanter Rückgang der durchschnittlichen MMP-2 Expression auf 11% (\pm 4%) der physiologischen Expression in gesunden Glaskörpern von Pferden (n=7) nachgewiesen werden (Abb. 4.8). Die MMP-2 Expression variierte in den gesunden Glaskörperproben deutlich, dagegen stellte sich die Reduktion der MMP-2 Expression in allen erkrankten Glaskörpern eindeutig und homogen dar.

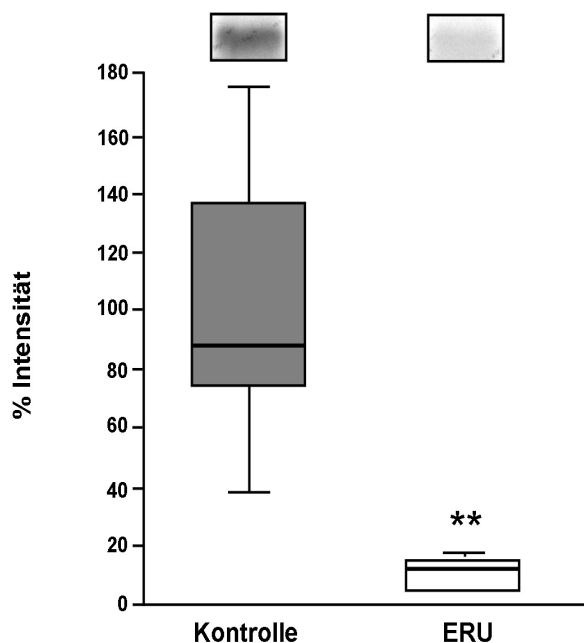


Abb. 4.8: Erniedrigte MMP-2 Expression in uveitischen Glaskörperproben. Rückgang der durchschnittlichen Signalstärke auf 11% (\pm 4%). Densitometrische Quantifizierung der im Western Blot detektierten Bande (ca. 70 kDa). Bandenintensität der Kontrollgruppe (n=7, graue Säule) und der uveitischen Glaskörperproben (n=7, weiße Säule). Darüberliegend die exemplarische Darstellung einer repräsentativen Western Blot Bande von MMP-2 (** p<0,01).

4.5.1.2 Veränderung des MMP-2 Expressionsmusters in der Pferderetina bei ERU

In der Pferderetina (Abb. 4.9a gesund, Abb. 4.9b ERU; Nomarski) konnte eine deutliche MMP-2 Expression im gesunden retinalen Gewebe im Bereich der Photorezeptoren sowie eine etwas schwächere Expression an der äußeren limitierenden Membran nachgewiesen werden (Abb. 4.9c, MMP-2 (grün)).

Die Retinae von an ERU erkrankten Pferdeaugen wiesen eine veränderte Expression mit einem starken Signal an der äußeren limitierenden Membran auf sowie eine diffuse MMP-2 Expression im gesamten retinalen Gewebe (Abb. 4.9d, MMP-2 (grün): Zellkerne (DAPI gefärbt; blau)).

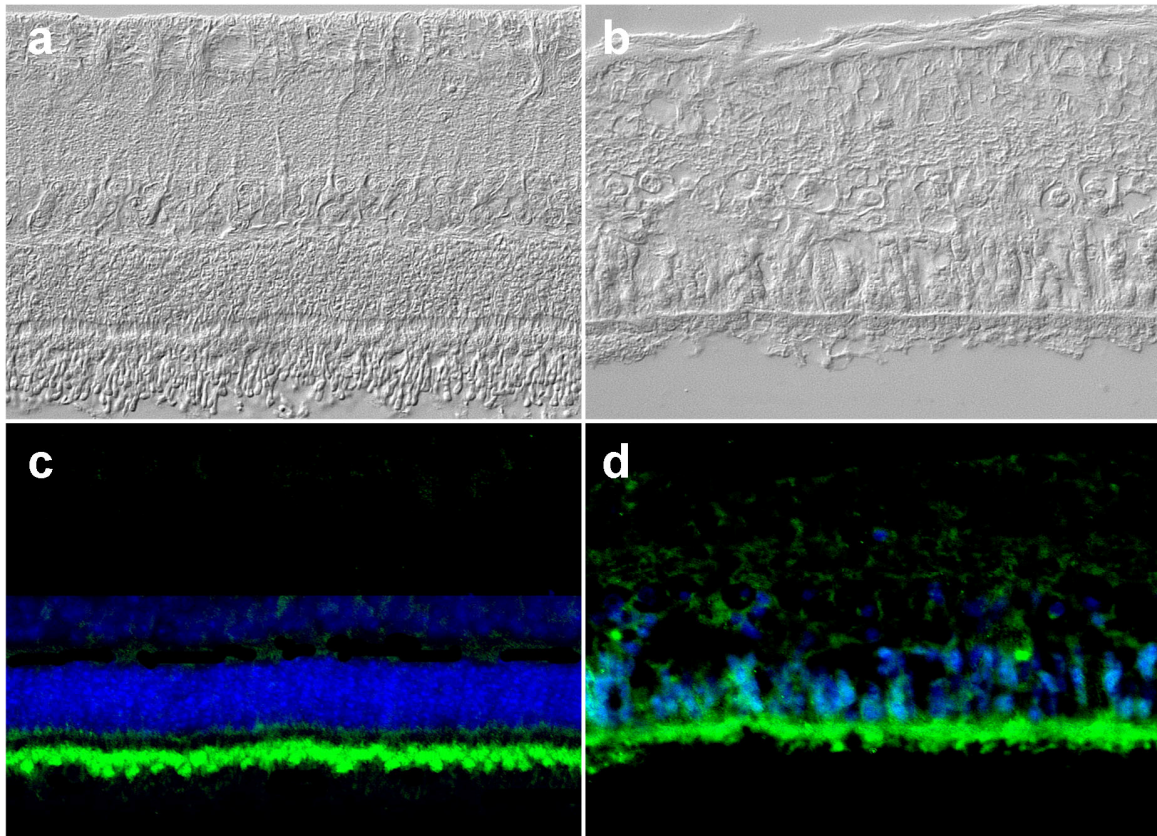


Abb. 4.9: Expression von MMP-2 (grün) in der Pferderetina, DAPI-Färbung der Zellkerne (blau). (a) Gesunde Pferderetina, Nomarski. (b) Pferderetina eines an ERU erkrankten Pferdes, Nomarski. (c) MMP-2 Expressionsmuster in einer gesunden Retina, vornehmlich im Bereich der Photorezeptorschicht und im Bereich der äußeren limitierenden Membran. (d) MMP-2 Expression in der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes. Detektion eines Signals an der äußeren limitierenden Membran und einer diffuse Expression im gesamten retinalen Gewebe.

4.5.2 Zymographische Untersuchung der Glaskörperproben

Durch die Gelatin-Zymographie ergibt sich die Möglichkeit, die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 im Probenmaterial aufgrund ihrer gelatinolytischen Aktivität zu detektieren (Hawkes et al., 2001). Sowohl für MMP-2 als auch für MMP-9 kann in der Zymographie zwischen der latenten (Pro-) Form des Proteins und der jeweils ca. 10 kDa kleineren aktivierten Form unterschieden werden. Aufgrund der Aktivierung der latenten Form im Zuge der Zymographie stellen sich beide Formen

von MMP-2 und MMP-9 als helle, gelatinolytische Banden vor dunklem Hintergrund dar (Oliver et al., 1997; Woessner, 1995). Abbildung 4.10 zeigt ein repräsentatives Gelatin-Zymogramm mit exemplarischen Glaskörperproben augengesunder Pferde (Abb. 4.10, Bahn 1 bis 4) und uveitischen Glaskörperproben (Abb. 4.10, Bahn 5 bis 9). Insgesamt erfolgte in dieser Arbeit die zymographische Untersuchung von 15 Glaskörperproben augengesunder Pferde sowie 20 Glaskörperproben uveitischer Pferdeaugen. In allen 20 uveitischen Glaskörperproben konnte Pro-MMP-9 als helle Bande auf einer Höhe von ca. 95 kDa (Abb. 4.10, Bahn 5 bis 9) detektiert werden. Bei einigen uveitischen Glaskörperproben konnte zusätzlich noch die aktivierte Form von MMP-9 (Abb. 4.10, Bahn 7) als helle Bande auf einer Höhe von ca. 85 kDa detektiert werden. Im Vergleich dazu zeigten 14 von 15 der untersuchten Kontrollglaskörper diese Banden nicht (Abb. 4.10, Bahn 1 bis 4). Alle 35 untersuchten Glaskörperproben zeigten eine Bande für Pro-MMP-2 auf einer Höhe von ca. 68 bis 70 kDa (Abb. 4.10, Bahn 1 bis 9). Die aktivierte Form von MMP-2 zeigte sich sowohl bei einigen gesunden (Abb. 4.10, Bahn 1, 3 und 4) als auch bei uveitischen (Abb. 4.10, Bahn 7 und 8) Glaskörperproben. Während MMP-2 somit in allen untersuchten Glaskörperproben zymographisch nachweisbar war, konnte MMP-9 fast ausschließlich in den Glaskörperproben der an ERU erkrankten Pferdeaugen detektiert werden.

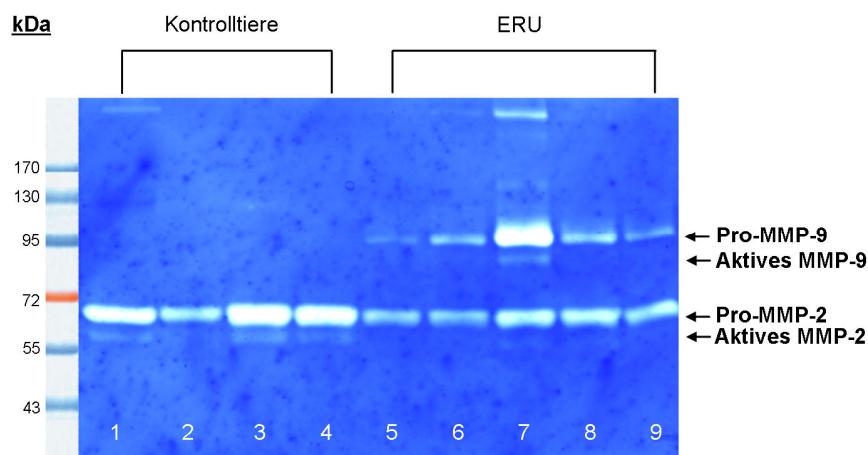


Abb. 4.10: Nachweis von Gelatinasen in Glaskörperproben, repräsentatives Gelatin-Zymogramm, Coomassiefärbung, helle Banden stellen die Bereiche der Gelatinaseaktivität dar. Es sind Banden auf der Höhe von ca. 95 (pro-MMP9, Bahn 5-9) und ca. 85 kDa (aktiviertes MMP-9, Bahn 7) in Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden zu detektieren. Banden auf der Höhe von ca. 68 bis 70 kDa (pro-MMP-2, Bahn 1-9) und ca. 58 kDa (aktiviertes MMP-2, Bahn 1, 3, 4 gesund, 7, 6, ERU) sind sowohl in Proben der ERU- als auch in der Kontrollgruppe nachweisbar.

Die Identifikation der MMP-Banden (Abb. 4.11) erfolgte durch den Abgleich mit einer Positivkontrolle (Abb. 4.11d, Bahn 1 und 2) mittels erfolgreicher spezifischer Hemmung der MMP Aktivität durch EDTA (Abb. 4.11b) und über das Molekulargewicht der detektierten Banden. Gelatinolytische Serinprotease-Aktivität konnte über einen PMSF-Hemmversuch ausgeschlossen werden (Abb. 4.11c).

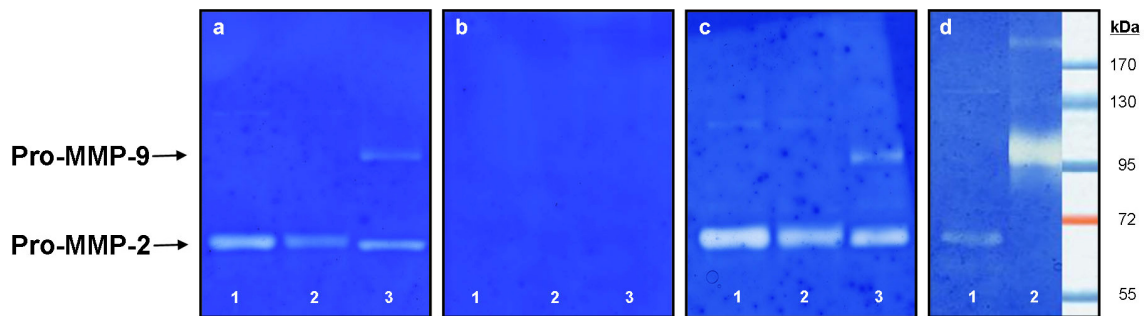


Abb. 4.11: Identifizierung der Gelatinasebanden der Zymographie. (a), (b), (c): In Bahn 1 und 2 Kontrollglaskörperproben, in Bahn 3 Glaskörper eines an ERU erkrankten Pferdes. (a): Zusätzlich zur Bande bei ca. 68 bis 70 kDa (pro-MMP-2) ist bei dem an ERU erkrankten Pferd eine Bande bei ca. 95 kDa (pro-MMP-9) detektierbar. (b, 1-3): Die Gelatinaseaktivität ist mit EDTA in allen Proben vollständig hemmbar; (c, 1-3): Die Aktivität ist mit PMSF nicht hemmbar. (d): Positivkontrolle: Rekombinantes humanes (pro-) MMP-2 (Bahn 1, ca. 68 kDa) und (pro-) MMP-9 (Bahn 2, ca. 95 kDa).

4.5.3 Erniedrigte MMP-9 Expression in der Retina von an ERU erkrankten Pferden

Aufgrund des in der Gelatin-Zymographie gefundenen Hinweises (Abb. 4.10) auf die mögliche Beteiligung von MMP-9 im Krankheitsprozess der ERU erfolgte auch für dieses Protein die Analyse der Expression im ERU-Zielgewebe, der Netzhaut (Abb. 4.12a gesund, Abb. 4.12b ERU; Nomarski).

Die Immunfluoreszenzfärbung gesunder Retina (Abb. 4.12c, MMP-9 (rot)) zeigte eine schwache MMP-9 Expression in allen Retinaschichten vitreal der äußeren Körnerschicht sowie eine deutlichere Expression an der äußeren limitierenden Membran und den Photorezeptoraußensegmenten. Im an ERU erkrankten Gewebe zeigte sich ein deutlicher Rückgang der MMP-9 Expression (Abb. 4.12d). Die detektierte Restexpression war auf wenige, runde, klar abgrenzbare Strukturen choroideal der äußeren Körnerschicht beschränkt (Abb. 4.12d, MMP-9 (rot)).

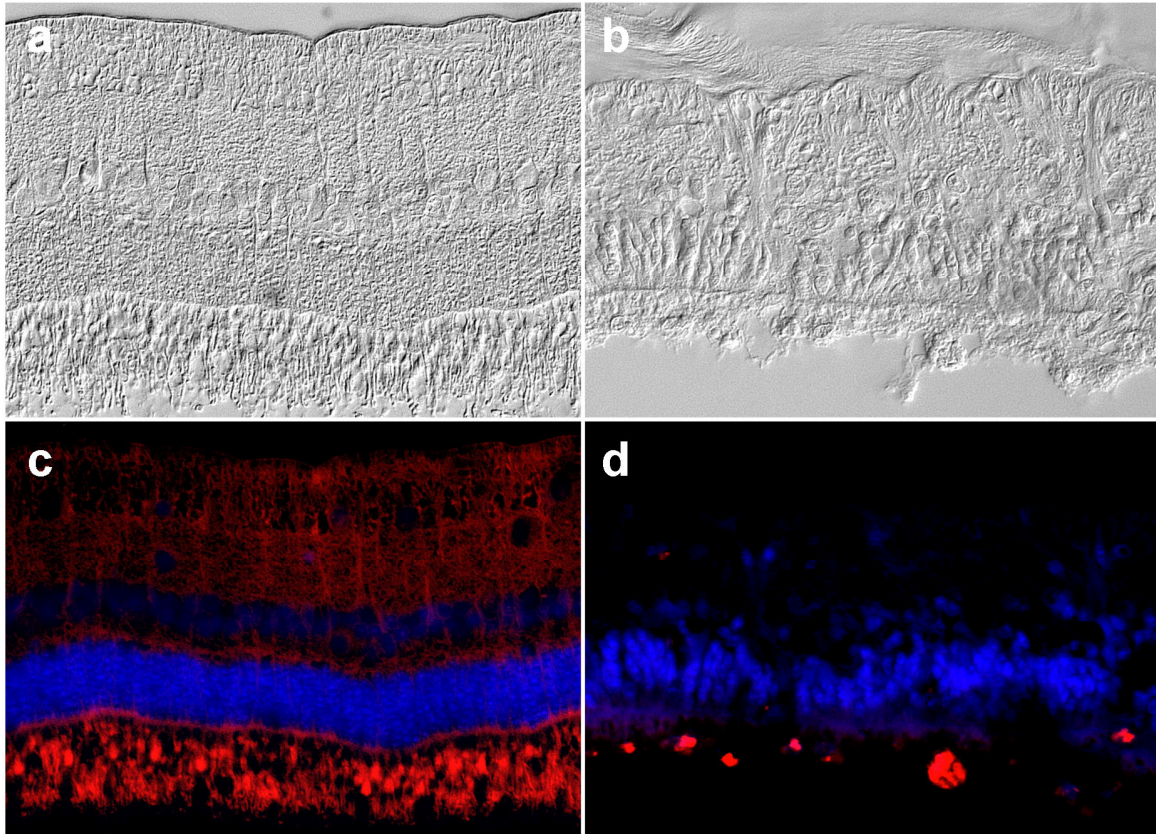


Abb. 4.12: Verminderte MMP-9 Expression (rot) in einer an ERU erkrankten Pferderetina. DAPI-Färbung der Zellkerne (blau). Differenzial-Interferenzkontrastaufnahme nach Nomarski einer gesunden Pferderetina (a) und der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes (b). (c) Nachweis von MMP-9 in der Retina des augengesunden Pferdes. (d) Im Vergleich dazu die auf wenige klar abgegrenzte Areale beschränkte Expression in der Retina des an ERU erkrankten Pferdes.

4.5.4 Verlust der MMP-14 Expression im Netzhautgewebe bei ERU

In der Aktivierungskaskade der MMP-2 (Expression im uveitischen Glaskörper reduziert, s. Tab. 4.3 und Abb. 4.8) spielt die membranständige Matrix-Metalloproteinase 14 (MMP-14) eine zentrale Rolle (Kinoshita et al., 1998; Sato et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine MMP-14 Expression in den Außensegmenten der Photorezeptoren der gesunden Pferderetina (Abb. 4.13a, gesunde Pferdenetzhaut, Nomarski; Abb. 4.13c, MMP-14-Expression (magenta)) nachgewiesen werden. Im erkrankten Gewebe (Abb. 4.13b, ERU, Nomarski; Abb. 4.13d, MMP-14 (magenta)) war die MMP-14 Expression fast vollständig verschwunden.

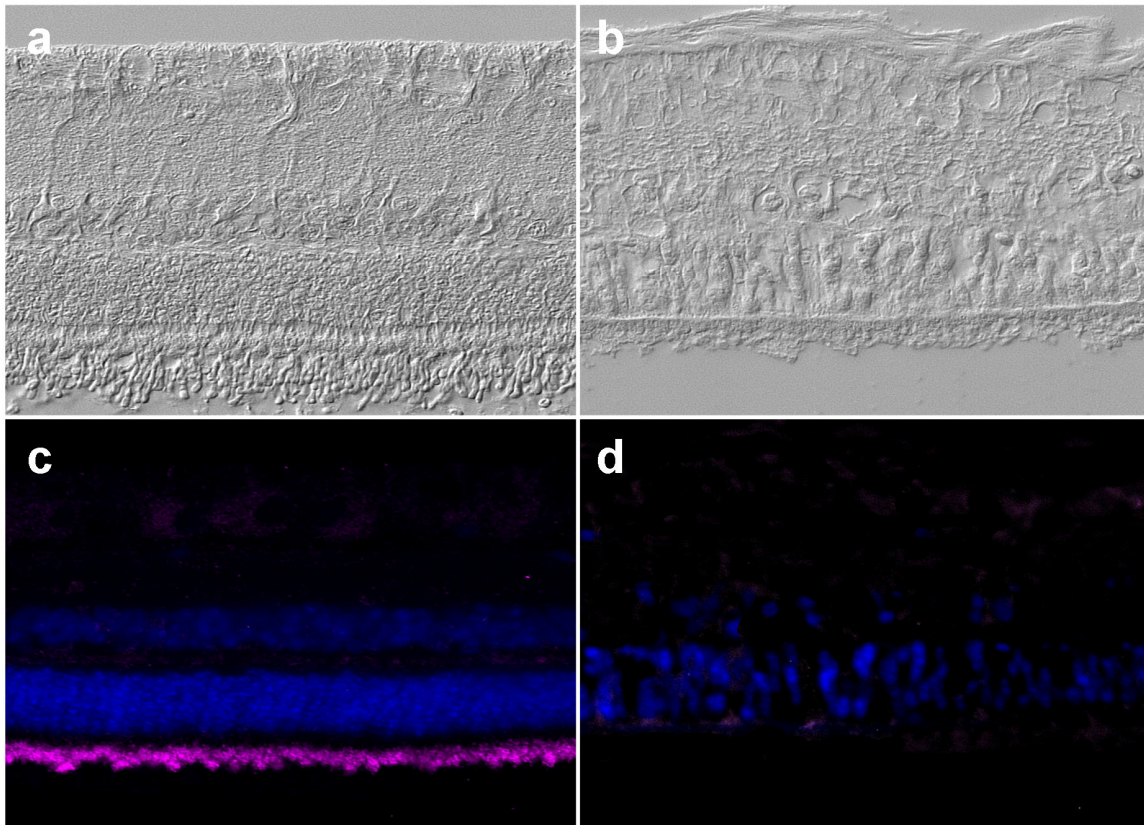


Abb. 4.13: MMP-14 Expression in der Pferderetina. Differential-Interferenzkontrastaufnahme nach Nomarski einer gesunden (a) und einer erkrankten (b) Retina. Die MMP-14 Expression (magenta) in den Außensegmenten der Photorezeptoren einer gesunden Pferderetina (c) und der fast vollständige Rückgang der MMP-14 Expression (magenta) im erkrankten Gewebe (d). Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau).

4.6 Expression von TIMP-2 in Glaskörper und Retina

TIMP-2 spielt im Zusammenhang mit der Aktivierung und Hemmung der bereits näher untersuchten Matrix-Metalloproteinase-2 (Kapitel 4.5.1 und 4.5.2) eine zentrale Rolle (Kinoshita et al., 1998; Stetler-Stevenson et al., 1989a). Um im weiteren Verlauf auf das potenzielle Zusammenwirken von TIMP-2 und MMP-2 in der ERU eingehen zu können, wurde zunächst die Expression von TIMP-2 in physiologischen und an ERU erkrankten Proben von Glaskörper und Retina untersucht.

4.6.1 Differenzielle Expression von TIMP-2 in den untersuchten Glaskörperproben

Zur Quantifizierung der TIMP-2 Expression in den untersuchten Glaskörperproben der an ERU erkrankten Pferdeaugen erfolgte eine densitometrische Analyse der TIMP-2 Signale im Western Blot. Der densitometrische Vergleich der detektierten TIMP-2 Western Blot-Bande (ca. 21 kDa) von 19 augengesunden Glaskörperproben und 16 Glaskörperproben von an ERU erkrankten Augen ergab einen deutlich signifikanten Rückgang (Mann-Whitney Test: $p < 0,001$) der TIMP-2 Expression in den Proben der an ERU erkrankten Pferdeaugen um 94,3% (Abb. 4.14).

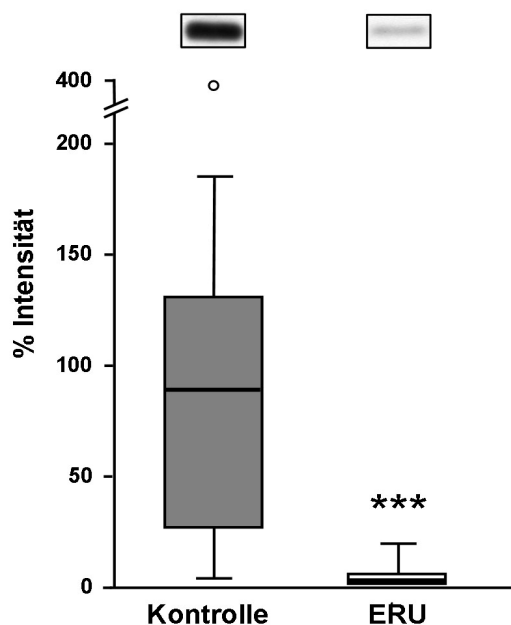


Abb. 4.14: Erniedrigte TIMP-2 Expression um 94,3% in uveitischen Glaskörperproben (***) $p < 0,001$). Intensität des Western Blot Signals in der Kontrollgruppe (n=19, graue Säule) im Vergleich zur Signalintensität in der ERU Gruppe (n=16, weiße Säule). Über dem Box Plot ist exemplarisch eine repräsentative Western Blot Bande von TIMP-2 dargestellt.

4.6.2 Erniedrigte Expression von TIMP-2 in der erkrankten Pferderetina

Pferderetinae augengesunder (Abb. 4.15a, Nomarski) und von an ERU erkrankten Pferdeaugen (Abb. 4.15b, Nomarski) wurden immunhistochemisch auf ihre TIMP-2 Expression untersucht. In der gesunden Retina konnte eine deutliche TIMP-2 Expression vor allem im Bereich der Photorezeptoraußensegmente nachgewiesen werden (Abb. 4.15c, TIMP-2 (rot)). Im Gegensatz dazu ging die TIMP-2 Expression im erkrankten Gewebe fast vollständig zurück (Abb. 4.15d, TIMP-2 (rot)).

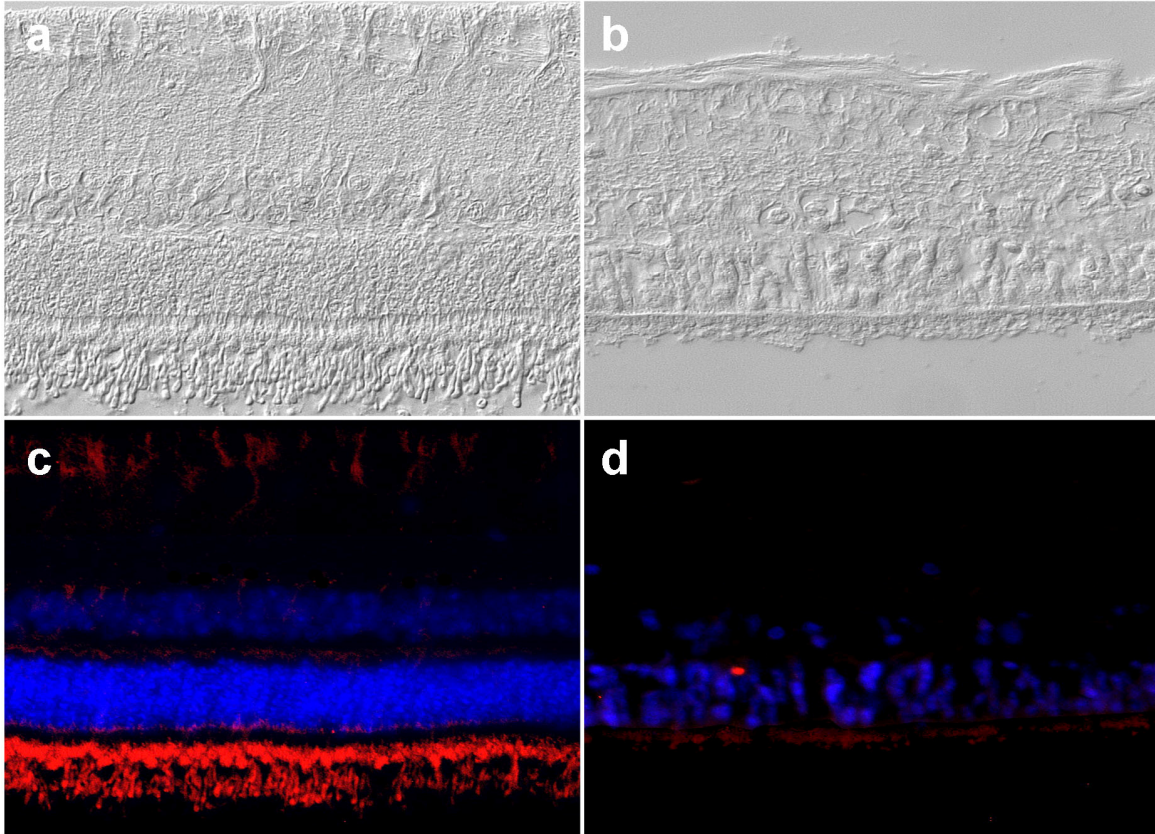


Abb. 4.15: TIMP-2 Expression (rot) in der Pferderetina, DAPI-Färbung der Zellkerne (blau). Differenzial-Interferenzkontrastaufnahme nach Nomarski einer gesunden Pferderetina (a) und der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes (b). Darstellung des detektierten TIMP-2 Signals im Bereich der Photorezeptorschicht und im Bereich der äußeren limitierenden Membran einer nicht erkrankten Retina (c). Die TIMP-2 Expression ist in der an ERU erkrankten Pferderetina fast nicht mehr nachweisbar (d).

4.6.3 Nachweis von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren durch reverse Zymographie

Um Aktivität und Vorkommen von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren in den Glaskörperproben nachweisen zu können, erfolgte eine Untersuchung der Proben mittels reverser Zymographie (Abb. 4.16a). Auf einer Höhe von ca. 21 kDa bis 23 kDa konnte eine durch Coomassie (Kang, 2002) anfärbbare Bande bei allen untersuchten Glaskörperproben detektiert werden (Abb. 4.16a, 1 bis 9, Pfeil). Ausmaß und Intensität der Bandenfärbung waren aber in den Glaskörperproben der Kontrollgruppe (Abb. 4.16a, Nr. 2, 4, 6, 8) stärker ausgeprägt als in den Glaskörperproben der an ERU erkrankten Pferdeaugen (Abb. 4.16a, Nr. 1, 3, 5, 7, 9). Als Negativkontrolle diente ein Standard SDS-Gel (Abb. 4.16b). Dort zeigten sich auf der entsprechenden Höhe (ca. 21 kDa bis 23 kDa) weder bei ERU-Glaskörperproben

(Abb. 4.16b, Nr. 1 und 3) noch bei Glaskörperproben der Kontrollgruppe (Abb. 4.16b, Nr. 2 und 4) durch Coomassie anfärbbare Proteinbanden.

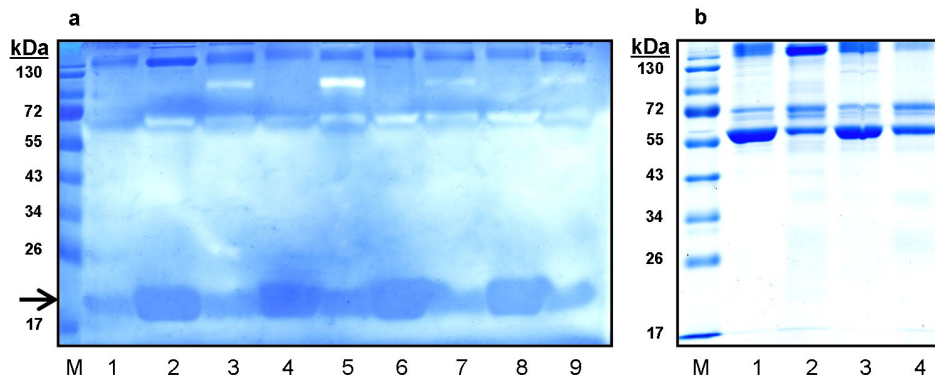


Abb. 4.16: (a) Erniedrigte MMP-2-Aktivitätshemmung durch TIMP-2 in den uveitischen Glaskörperproben. Reverse Zymographie (12% SDS Gel, Coomassiefärbung, enthält 0,8 µg MMP-2 (Gelatinase A) und 1 mg/ml Gelatine) mit Glaskörperproben gesunder Pferdeaugen (2, 4, 6, 8) und an ERU erkrankter Pferdeaugen (1, 3, 5, 7, 9), dunkelblau gefärbte Areale (Pfeil) kennzeichnen eine Hemmung der Gelatinaseaktivität (ca. 21 bis 23 kDa, korrespondierend zu TIMP-2), Rückgang der Hemmung bei ERU, (b) Coomassie gefärbtes, 12 % SDS Kontrollgel, Glaskörperproben 1 und 3 (ERU); 2 und 4 (Kontrollen). Auf der Höhe der in Abb. 4.16a gezeigten MMP-2-Hemmung sind keine anfärbbaren Proteinbanden zu erkennen.

Die in der reversen Zymographie detektierte Bande (Abb. 4.16a, 1 bis 9, Pfeil) wurde folglich nicht durch anfärbbare Proteine in den Glaskörperproben hervorgerufen, sondern konnte auf eine Hemmung der MMP-2-Aktivität zurückgeführt werden. Aufgrund des beobachteten Molekulargewichts und der bereits beschriebenen Identifikation von equinem TIMP-2 mittels reverser Zymographie auf ca. 22 kDa (Clegg et al., 1998) bzw. 21 kDa (Riley et al., 2001) wurde die beobachtete Hemmung der MMP-2-Aktivität (Abb. 4.16a, 1-9, Pfeil) in dieser Untersuchung ebenfalls TIMP-2 zugeordnet. Somit konnte für die uveitischen Glaskörperproben (Abb. 4.16a, Nr. 1, 3, 5, 7, 9) eine im Vergleich zu den physiologischen Verhältnissen in den Glaskörperproben der Kontrollgruppe (Abb. 4.16a, Nr. 2, 4, 6, 8) erniedrigte TIMP-2 Aktivität gezeigt werden.

4.7 Zusammenspiel der untersuchten Proteine in der Retina

4.7.1 Überschneidung der Expressionsmuster von Lipocalin 2 und MMP-9 in der Retina

Da Lipocalin 2 mit MMP-9 Komplexe bilden kann (Kubben et al., 2007), wurde die Beziehung dieser beiden Proteine zueinander anhand einer immunhistochemischen Koexpressionsstudie in gesunder (Abb. 4.17a, Nomarski) und in an ERU erkrankter (Abb. 4.17b, Nomarski) Pferde retina untersucht. Lipocalin 2 war in der gesunden Retina vor allem im Bereich der Nervenfaserschicht und der inneren plexiformen Schicht exprimiert (Abb. 4.17c, Lipocalin 2 (grün)). Gleichzeitig konnte MMP-9, die äußere Körnerschicht ausgenommen, im gesamten gesunden Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 4.17e, MMP-9 (rot)). Eine schwache Überlagerung der beiden Expressionsmuster fand sich im gesunden Gewebe in der inneren plexiformen Schicht sowie an den Rändern der äußeren Körnerschicht (Abb. 4.17g, MMP-9 (rot), Lipocalin 2 (grün), Überlagerung (gelb)).

Die erkrankte Retina zeigte hingegen ein deutlich verändertes Muster der Lipocalin 2 Expression bei nur unwesentlicher Veränderung der Expressionsstärke (Abb. 4.17d, ERU, Lipocalin 2 (grün)). Im Unterschied dazu ging die MMP-9 Expression im erkrankten Gewebe fast vollständig zurück (Abb. 4.17f, ERU, MMP-9 (rot)). Im an ERU erkrankten retinalen Gewebe war die Überlagerung der Expression an den rundlichen Strukturen choroideal der äußeren Körnerschicht detektierbar (Abb. 4.17h, MMP-9 (rot), Lipocalin 2 (grün), Überlagerung (gelb)).

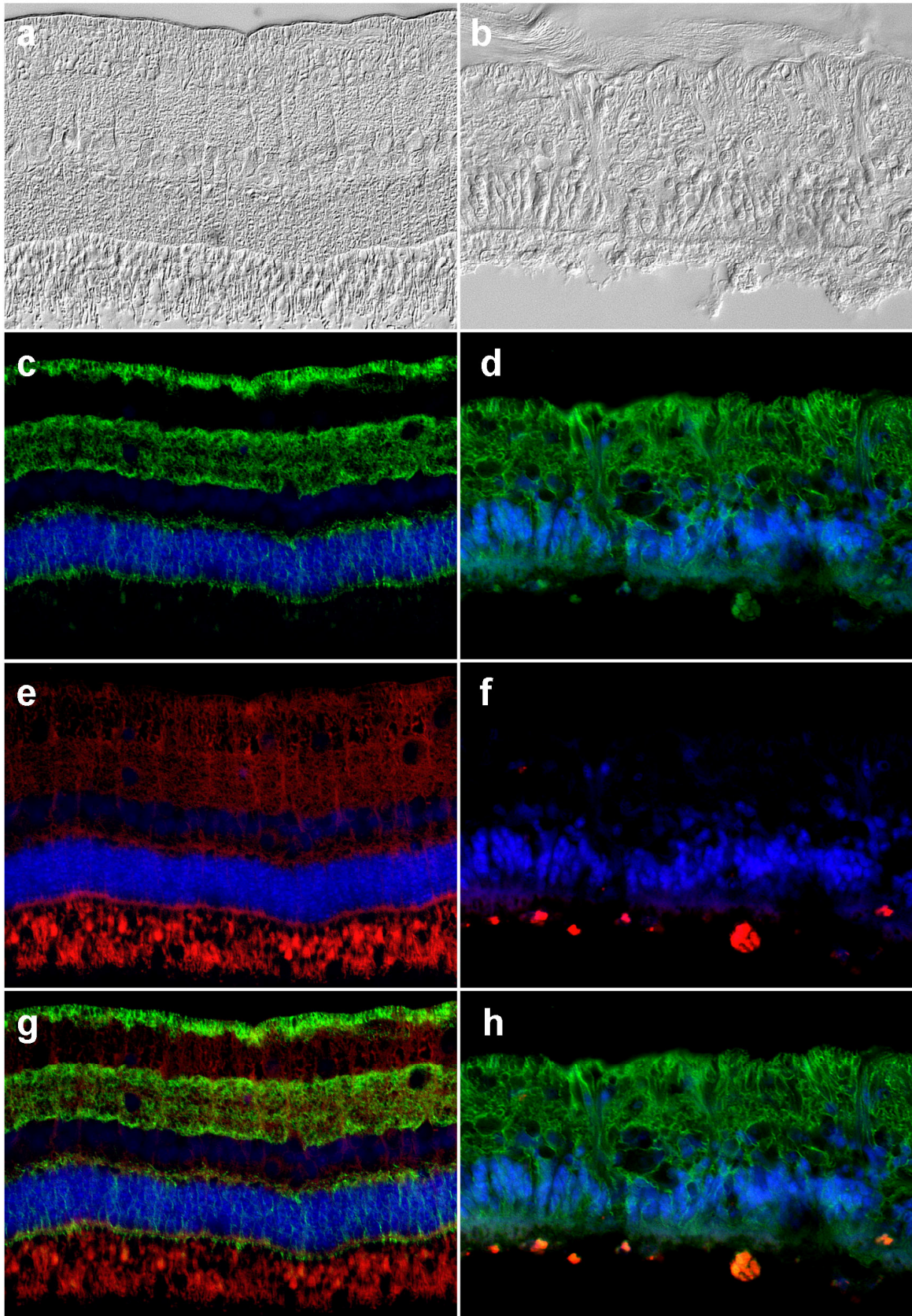


Abb. 4.17: Expressionsmuster der Interaktoren Lipocalin 2 (grün) und MMP-9 (rot) in der Pferderetina. DAPI-Färbung der Zellkerne (blau). Differenzial-Interferenzkontrastaufnahme nach Nomarski einer (a) gesunden Pferderetina und (b) der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes. (c) Lipocalin 2 (grün) Expression im gesunden und (d) im von ERU betroffenen Netzhautgewebe. (e) MMP-9 (rot) Expression im gesunden und (f) im von ERU betroffenen Netzhautgewebe.

Koexpression von Lipocalin (grün), MMP-9 (rot) (g) gesunde Pferderetina, (h) Verändertes Lipocalin 2 Expressionsmuster (grün) bei gleichzeitigem deutlichen Rückgang der MMP-9 Expression (rot) im erkrankten Gewebe.

4.7.2 Interaktion von SFRP-2, Wnt3a und Alpha-2-Makroglobulin in der Pferderetina

Um eine Aussage über die Verteilung der SFRP-2 Expression im Vergleich zu den potenziell mit SFRP-2 funktional zusammenhängenden Proteinen Wnt3a (Zhang et al., 2009b) und Alpha-2-Makroglobulin (Kapitel 4.3.3) zu erhalten, erfolgte eine immunhistochemische Koexpressionsstudie der drei Proteine in der Retina gesunder (Abb. 4.18a, Nomarski) und an ERU erkrankter (Abb. 4.18b, Nomarski) Pferde. In den Retinae augengesunder Pferde konnte SFRP-2 (Abb. 4.18e, g und i, SFRP-2 (grün)) wie auch dessen potenzielle Interaktoren Wnt3a (Abb. 4.18c, g und i, Wnt3a (rot)) und Alpha-2-Makroglobulin (Abb. 4.18c, e und i, Alpha-2-Makroglobulin (magenta)) in der Photorezeptorschicht nachgewiesen werden. In an ERU erkrankten Retinae verschwand die SFRP-2 Expression (Abb. 4.18f, h und j, SFRP-2 (grün)) fast vollständig. Simultan ging die Wnt3a Expression (Abb. 4.18d, h und j, Wnt3a (rot)) fast vollständig zurück. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei ERU eine deutlich erhöhte Alpha-2-Makroglobulin Expression im gesamten retinalen Gewebe (Abb. 4.18d, f und j, Alpha-2-Makroglobulin (magenta)).

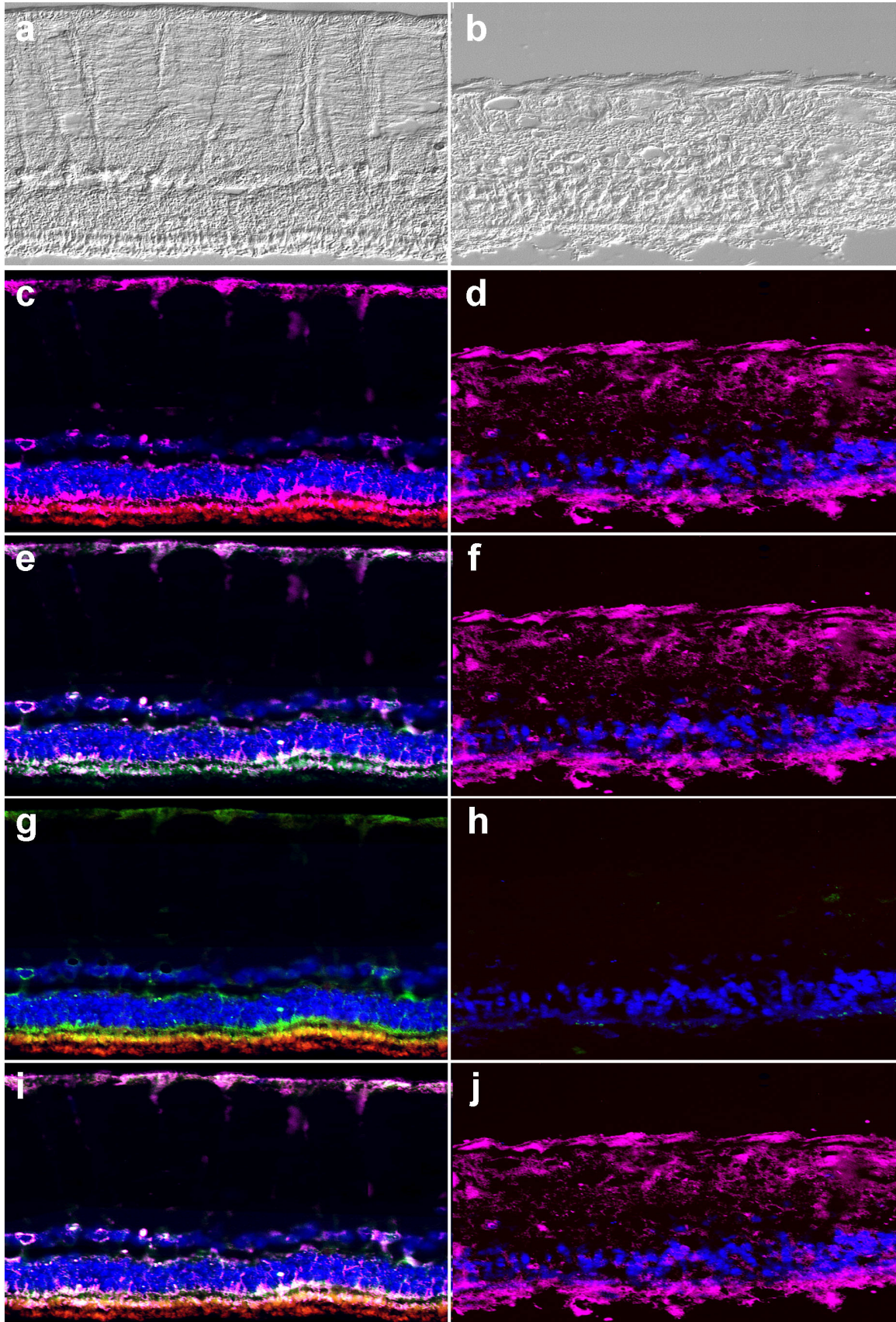


Abb. 4.18: Koexpressionsstudie von SFRP-2 (grün), Wnt3a (rot) und Alpha-2-Makroglobulin (magenta) in der Pferderetina. DAPI-Färbung der Zellkerne (blau). Differenzial-Interferenzkontrastaufnahme nach Nomarski (a) einer gesunden Pferderetina und (b) der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes. (c) Gesunde Retina, Wnt3a (rot) und Alpha-2-Makroglobulin (magenta);

(d) ERU, Wnt3a (rot) und Alpha-2-Makroglobulin (magenta). (e) Gesunde Retina, SFRP-2 (grün) und Alpha-2-Makroglobulin (magenta). (f) Erkranktes retinales Gewebe, SFRP-2 (grün) und Alpha-2-Makroglobulin (magenta). (g) Gesunde Retina, SFRP-2 (grün) und Wnt3a (rot). (h) ERU, SFRP-2 (grün) und Wnt3a (rot). (i) Expression von SFRP-2 (grün), Wnt3a (rot) und Alpha-2-Makroglobulin (magenta) in der Photorezeptorschicht der gesunde Retina. (j) Fast vollständiger Rückgang der SFRP-2 (grün) und Wnt3a (rot) Expression im erkrankten Gewebe bei gleichzeitig deutlicher Zunahme der Alpha-2-Makroglobulin-Expression (magenta) im gesamten Gewebe.

4.7.3 Koexpression von MMP-2 und Osteopontin mit dem Müller-Gliazellmarker GFAP in gesunder und an ERU erkrankter Pferderetina

Zur genaueren Identifizierung der MMP-2 und Osteopontin exprimierenden Strukturen in der Pferderetina (Abb. 4.19a, gesund, Nomarski, Abb. 4.19b, ERU, Nomarski), erfolgten Koexpressionsuntersuchungen mit dem auf Müller-Gliazellen exprimierten (Hauck et al., 2007) glialen fibrillären sauren Protein (GFAP).

In gesunden Retinae konnte die Expression der Proteine Osteopontin (Abb. 4.19c, e, und i, (magenta)) und MMP-2 (Abb. 4.19c, g und i, (rot)) zusammen mit GFAP (Abb. 4.19e, g und i, (grün)) in den Photorezeptoraußensegmenten nachgewiesen werden. Zusätzlich war sowohl GFAP, als auch Osteopontin im Bereich der Müller-Gliazellen exprimiert, wobei sich Osteopontin auf den Bereich der Müller-Gliazellendfüße beschränkte. Konträr dazu zeigten die Retinae von an ERU erkrankter Pferdeaugen einen fast vollständigen Verlust der Osteopontin-Expression (Abb. 4.19d, f und j, magenta) bei gleichzeitig veränderter und verstärkter Expression von GFAP (Abb. 4.19f, h und j, (grün)). Zusätzlich zeigte sich eine starke, an die äußere limitierenden Membran verlagerte sowie eine schwächere, diffus in der gesamten Retina verteilte Expression von MMP-2 bei der Erkrankung (Abb. 4.19d, h und j, (rot)).

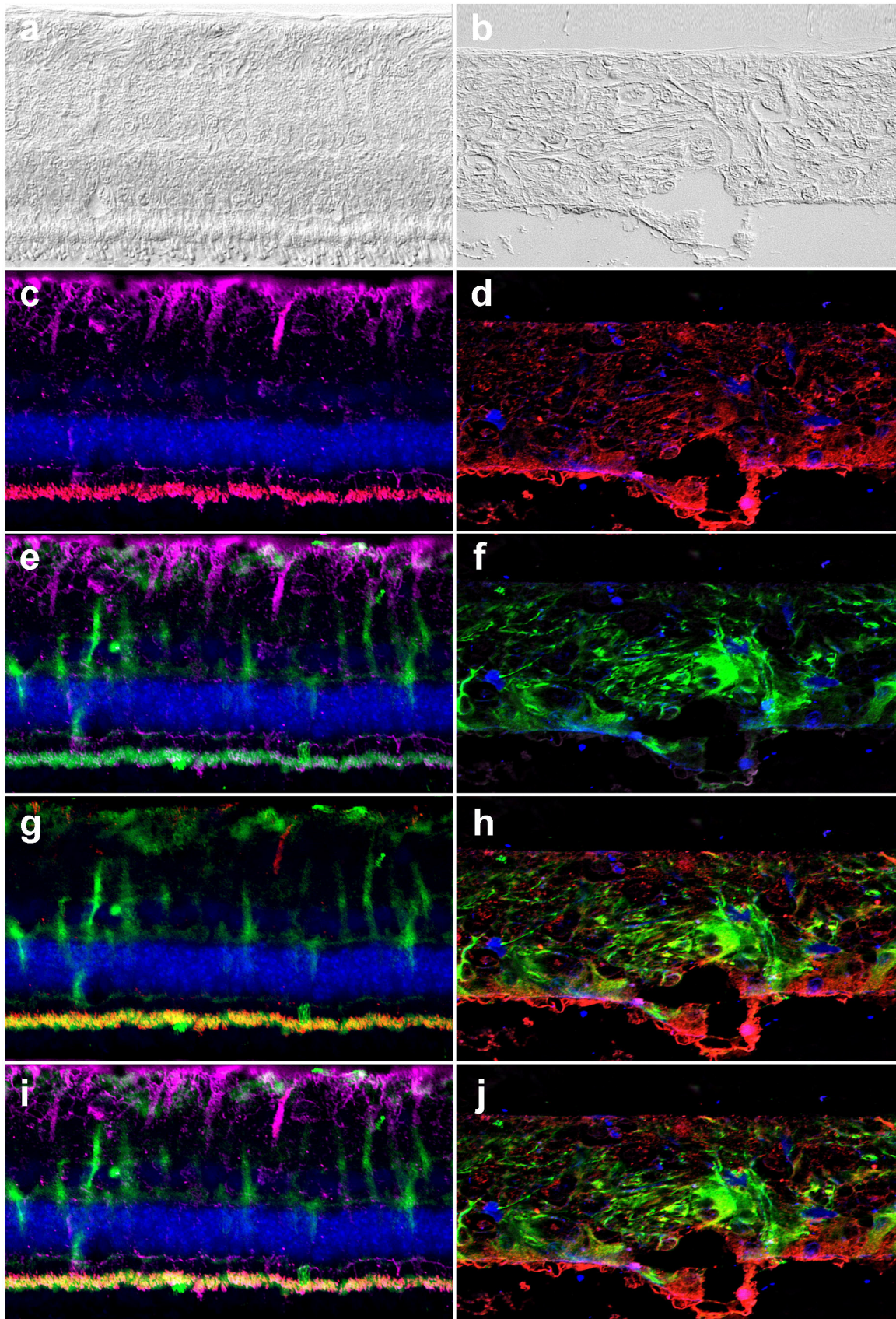


Abb. 4.19: Koexpression der retinalen Expression von MMP-2 (rot), GFAP (grün) und Osteopontin (magenta). Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). (a) Gesunde Retina, Nomarski. (b) An ERU erkrankte Retina, Nomarski. (c) Expression von Osteopontin (magenta) und MMP-2 (rot) in der gesunden Retina. (d) Osteopontin Expression im

erkrankten Gewebe (magenta), Expressionsmuster von MMP-2 (rot). (e) GFAP (grün) und Osteopontin (magenta) Expression in der gesunden Retina. (f) Osteopontinexpression (magenta) und GFAP Expressionsmusters (grün) im erkrankten Gewebe. (g) GFAP (grün) und MMP-2 (rot) Expression im gesunden Gewebe und (h) erkrankten retinalen Gewebe. (i) Koexpression (weiß) von MMP-2 (rot), Osteopontin (magenta), GFAP (grün) an den Photorezeptoraußensegmenten im gesunden Gewebe, zusätzliche Expression an Müller-Gliazellen von OPN (magenta) und GFAP (grün). (j) Verlust der OPN Expression (magenta) bei gleichzeitiger Veränderung der GFAP (grün) und MMP-2 (rot) Expressionsmuster in an ERU erkrankter Retina.

4.7.4 Koexpression der Proteine MMP-14, MMP-2 und TIMP-2 in der Photorezeptorschicht gesunder Retinae

TIMP-2 spielt zusammen mit MMP-14 in der Regulation der MMP-2 Aktivität eine wichtige Rolle (Kudo et al., 2007; Kinoshita et al., 1998). Um eine mögliche Bedeutung der TIMP-2/MMP-14/MMP-2 Achse in der ERU näher zu untersuchen, erfolgte eine immunhistochemische Koexpressionsstudie der drei genannten Proteine in der Pferderetina (Abb. 4.20a, gesund, Abb. 4.20b, ERU, Nomarski).

Sowohl MMP-14 (Abb. 4.20c, e und i, (magenta)), als auch TIMP-2 (Abb. 4.20e, g und i, (rot)) und MMP-2 (Abb. 4.20c, g und i, (grün)) waren in der Photorezeptorschicht gesunder Pferderetinae koexprimiert (Abb. 4.20i, 3fache Koexpression (weiß)). Im erkrankten Gewebe verlagerte sich die MMP-2 Expression auf den Bereich der äußeren limitierenden Membran (Abb. 4.20d, h und j, (grün)). Gleichzeitig konnte fast keine Expression von MMP-14 (Abb. 4.20d, f und j, (magenta)) und TIMP-2 (Abb. 4.20f, h und j, (rot)) in der erkrankten Retina mehr nachgewiesen werden.

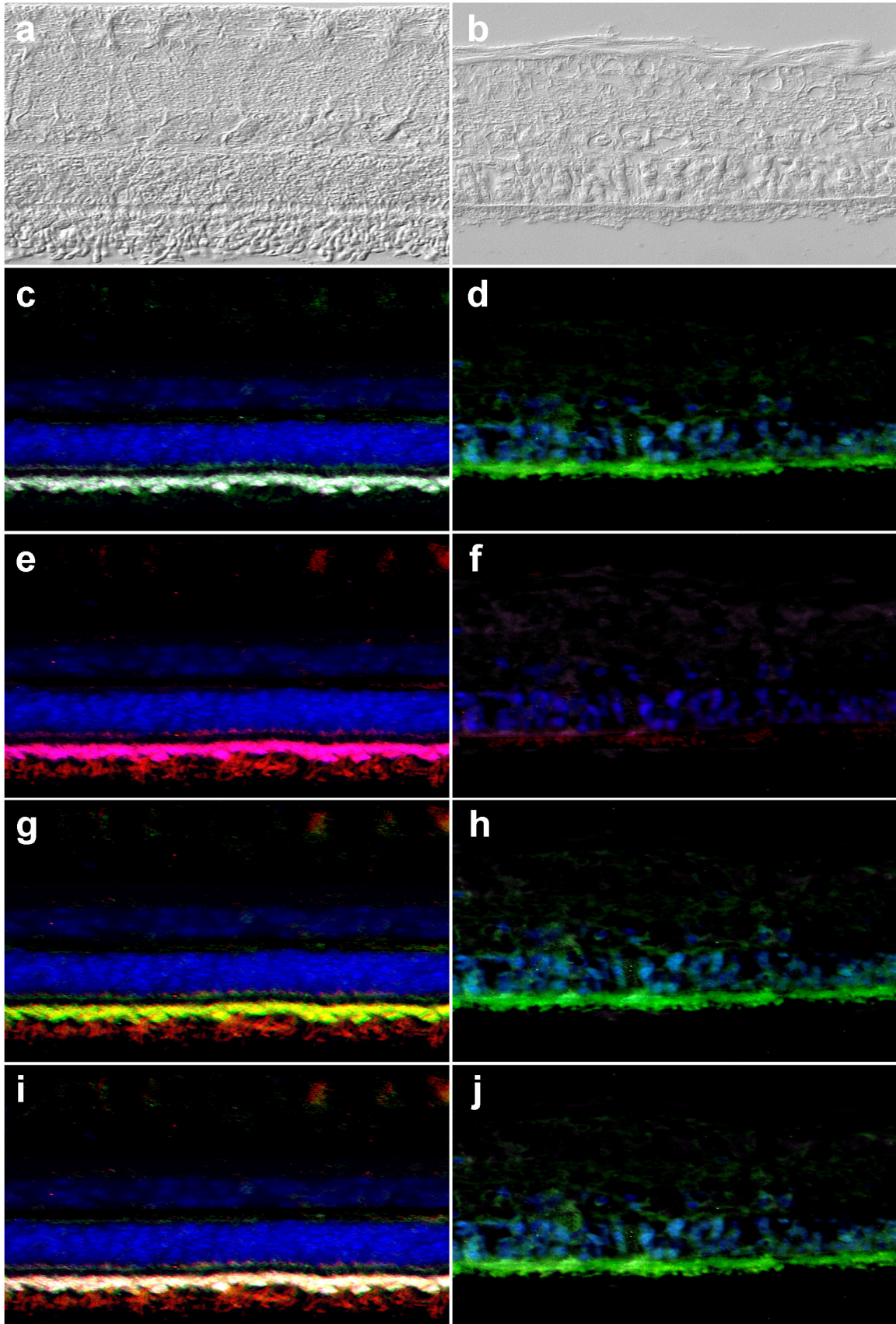


Abb. 4.20: Expression von TIMP-2 (rot), MMP-2 (grün) und MMP-14 (magenta) in der gesunden und kranken Pferdenetzhaut. Zellkerne gefärbt mit DAPI (blau). (a) Gesunde Pferderetina, Nomarski. (b) Pferderetina eines an ERU erkrankten Pferdes, Nomarski. (c) MMP-2 (grün) und MMP-14 (magenta) Expression in der gesunden Retina (Überlagerung weiß). (d) MMP-2 (grün) und MMP-14 (magenta)

Expression im erkrankten Gewebe. (e) TIMP-2 (rot) und MMP-14 (magenta) Expression in der gesunden Retina und (f) in der an ERU erkrankten Retina. (g) TIMP-2 (rot) und MMP-2 (grün) Expression im gesunden Gewebe und (h) in erkrankter Retina. (i) Koexpression (weiß) von TIMP-2 (rot), MMP-2 (grün) und MMP-14 (magenta) am Innensegment der Photorezeptoren, TIMP-2 im gesamten Außensegment exprimiert in der gesunden Retina. (j) Hingegen vollständiger Rückgang der TIMP-2 (rot) und MMP-14 (magenta) Expression in der ERU bei gleichzeitiger Zunahme und Verlagerung der MMP-2 (grün) Expression an die äußere limitierende Membran.

4.7.5 Datenbankbasierte Netzwerkanalyse der Protein-Protein

Interaktionen im Pferdeglaskörper

Für die im Pferdeglaskörper differenziell exprimierten Proteine (Tab. 4.2 und Tab. 4.3), sowie für die Proteine Wnt3a (Kapitel 4.3.2), MMP-9 (Kapitel 4.5.2) und MMP-14 (Kapitel 4.5.4) wurde basierend auf bereits bekannten Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe der Software STRING¹⁴⁷ (Open Source Software; Version 8.2) ein Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk erstellt. Dadurch sollte ein Überblick über funktionelle Cluster geschaffen werden, die in der Erkrankung ERU verändert werden. Abbildung 4.21 zeigt das mit STRING (<http://string.embl.de/>) generierte Interaktionsnetzwerk für die in dieser Arbeit in Pferdeglaskörper und Retina differenziell exprimierten Proteine (Abb. 4.21, nur in der Retina identifizierte Proteine schwarz, in der ERU im Glaskörper vermehrt exprimierte Proteine leuchtend gelb, nicht in die Abbildung integrierte Proteine Tab. 4.5a). Dickere blaue Linien verweisen auf eine stärkere Assoziation der Proteine. Vier über ihre Funktion assoziierte biologische Proteingruppen fallen besonders auf (Abb. 4.21 A, B, C, D). Es zeigt sich eine Anhäufung von Protein-Protein-Interaktionen, die die Proteine der Matrix-Metalloproteinasefamilie und ihre Inhibitoren mit einschließen (Abb. 4.21 A) und eine sich um das Zelladhäsionsprotein Fibronectin formierende Gruppe (Abb. 4.21 B). Des Weiteren stellt sich eine Gruppe von mit dem Gerinnungsfaktor II assoziierten Plasmaproteinen dar, von denen viele in der ERU vermehrt exprimiert wurden (Abb. 4.21 C). Eine weitere kleine Gruppe an Interaktoren besteht aus den Proteinen des Wnt-Signalweges SFRP-2 und Wnt3a (Abb. 4.21 D). Das Protein Alpha-2-Makroglobulin zeigt der STRING Datenbank (<http://string.embl.de/>) zufolge eine funktionelle Assoziation mit den drei erstgenannten Gruppen (Abb. 4.21 E). Eine in dieser Arbeit erstmals beschriebene Assoziation mit dem Protein des Wnt-Signalweges SFRP-2 wurde in das mit STRING generierte Proteinnetzwerk ergänzend eingefügt (Abb. 4.21 E, Verbindung A2M zu SFRP-2 (rot)). Für circa die

¹⁴⁷ <http://string.embl.de/>

Hälfte der Proteine konnte in der durchgeführten Interaktionsnetzwerk-Analyse in der STRING¹⁴⁸ Datenbank keine funktionelle Verbindung zu anderen Proteinen gefunden werden, die die Anforderungen dieser Analyse erfüllten. Diese Proteine sind in der Abb. 4.21 deshalb als Kugeln ohne Verbindungslinien dargestellt. Die STRING Datenbank verwendet in der Darstellung des Proteinnetzwerks die Gennamen der eingegebenen Proteine, welche über die Tabelle 4.5 dem jeweiligen Protein zugeordnet werden können.

Proteinname	Gensymbol
Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1
Alpha-2-Makroglobulin	A2M
Alpha-Albumin	AFM
Alpha-Crystallin B Kette	CRYAB
Amyloid beta A4 Protein	APP
Amyloid-like Protein 2	APLP2
Angiomodulin Fragment ^a	AGM
Angiotensinogen	AGT
Antithrombin III Protein	SERPINC1
Apolipoprotein A-I	APOA1
Apolipoprotein A-II (Apo-AII)	APOA2
Apolipoprotein D	APOD
Beta-2-Glykoprotein 1	APOH
Beta-2-Mikroglobulin	B2M
Beta-Crystallin B1	CRYBB1
BWK3 ^a	LOC366772
Cadherin 2	CDH2
Calsyntenin-1	CLSTN1
Cathepsin L2	CTSL2
Chromogranin-A	CHGA
Clusterin	CLU
Dickkopf-related Protein 3	DKK3
EGF-enthaltendes fibulinähnliches extrazelluläres Matrix Protein 1	EFEMP1
Epididymal secretory Protein E1	NPC2
Fibrinogen gamma-Polypeptid	FGG

¹⁴⁸ <http://string.embl.de/>

Ergebnisse

Fibronektin (FN)	FN1
Fibulin-2	FBLN2
Gelsolin	GSN
Gerinnungsfaktor II	F2
Hemopexin	HPX
Heparin Kofaktor 2	SERPIND1
Immunglobulin Gamma 1 c-Region ^a	IGHC1
Immunglobulin heavy variable 3-6 ^a	IGHV3-6
Immunglobulin J Kette	IGJ
Insulin-like growth factor binding Protein-5	IGFBP5
Insulin-like growth factor binding Protein-6	IGFBP6
Inter-alpha-Trypsin Inhibitor	AMBP
Interphotoreceptor Matrix-Proteoglycan 1	IMPG1
Interphotoreceptor retinoid binding Protein	IRBP
Keratin, Typ I zytoskeletal 10	KRT10
Keratin, Typ II cytoskeletal 1	KRT1
Keratin, Typ II cytoskeletal 75	KRT75
Kollagen alpha-1(VI) Kette	COL6A1
Kollagen, Typ II, alpha 1	COL2A1
Komplement Faktor I	CFI
Lipocalin 2	LCN2
Matrix-Metalloproteinase-2	MMP2
Matrix-Metalloproteinase-14	MMP14
Matrix-Metalloproteinase-9	MMP9
Metalloproteinase Inhibitor 1 (TIMP-1)	TIMP1
Metalloproteinase Inhibitor 2 (TIMP-2)	TIMP2
N-Acetyllactosaminide beta-1,3-N-Acetylglucosaminyl-transferase	B3GNT1
Neuropeptid VF	NPVF
NKG2D Ligand 4	RAET1E
Opticin	OPTC
Osteopontin	SPP1
Phosphatidylethanolamine-binding Protein 4	PEBP4
Pigment epithelium-derived Faktor	SERPINF1
PROS1	PROS1
Prostaglandin-H2 D-Isomerase	PTGDS
Protein FAM3C	FAM3C
Putative tenascin-XA	TNXA
Reelin	RELN

Retinoic acid receptor responder Protein 2	RARRES2
Retinol-binding Protein 4	RBP4
Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP-2)	SFRP2
Semaphorin-7A	SEMA7A
Serotransferrin	TF
SH2 domain-containing Protein 3C	SH2D3C
SPARC	SPARC
SPARC-like Protein 1	SPARCL1
Spondin-1	SPON1
Sulfhydryl Oxidase 1	QSOX1
Tenascin-R	TNR
Tetranectin	CLEC3B
Transforming growth factor-beta-induced Protein ig- h3	TGFBI
Transthyretin	TTR
Tripeptidyl-Peptidase 1	TPP1
Ubiquitin ^b	ENSG00000170315
WAP four-disulfide core domain Protein 2	WFDC2
Wnt3a	WNT3A

Tab. 4.5: Proteinnamen der differenziell in Glaskörper und/oder Retina exprimierten Proteine mit zugeordnetem Gensymbol wie in STRING eingegeben (<http://string.embl.de/>); a) Gensymbol ist nicht in der STRING-Datenbank vorhanden und konnte nicht in das Proteininteraktionsnetzwerk (Abb. 4.21) integriert werden. b) Ubiquitin wird in STRING unter dem Eintrag ENSG00000170315 geführt.

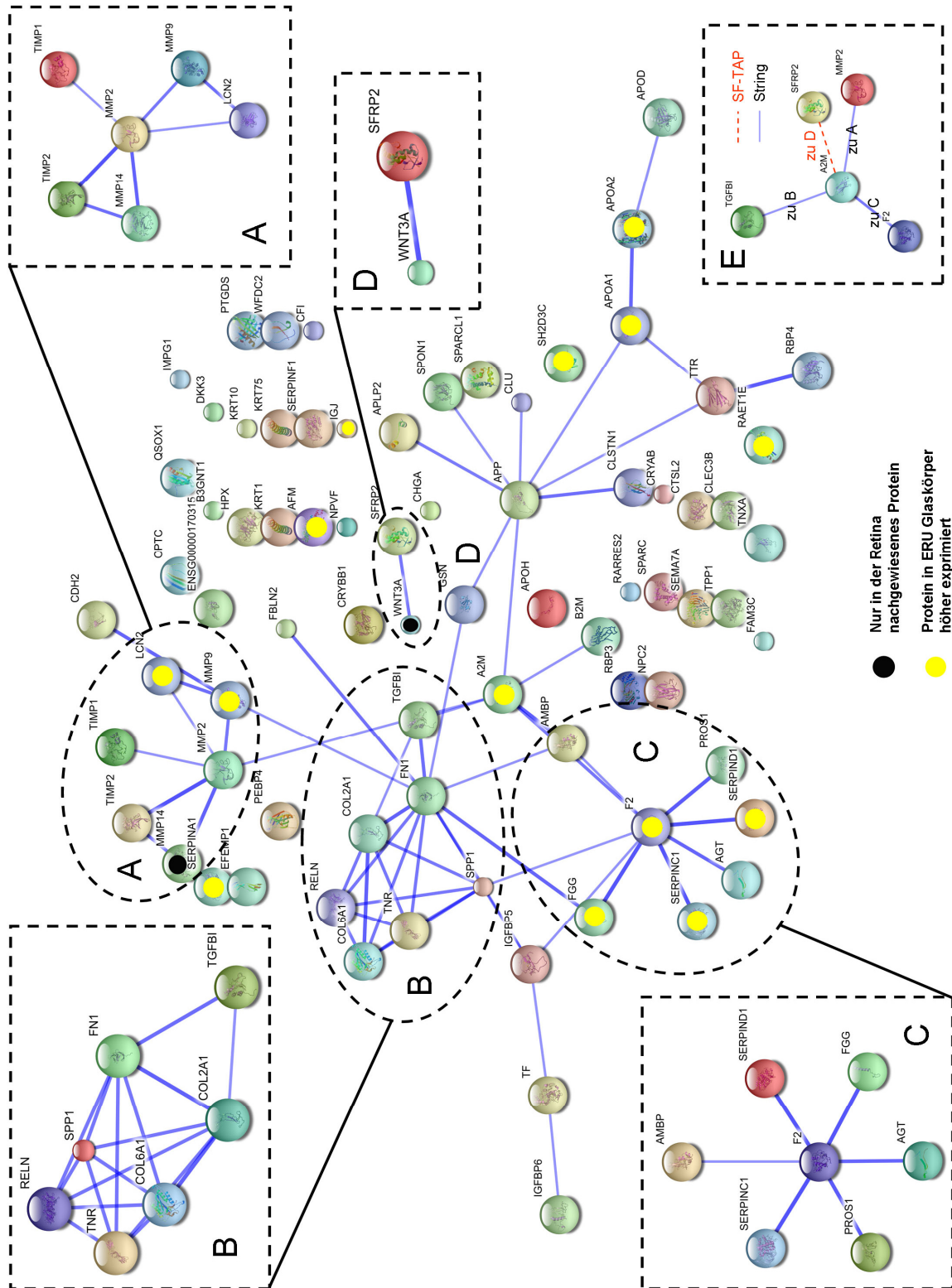


Abb. 4.21: Protein-Protein-Interaktionskarte der in dieser Arbeit untersuchten, differenziell exprimierten Proteine (in der ERU erhöht exprimierte Proteine leuchtend gelb) aus dem Pferdeglaskörper sowie der retinalen Proteine (schwarz) MMP-14 und Wnt3a mit STRING 8.2 (<http://string.embl.de/>) generiert. Dickere Linien verweisen auf eine stärkere Assoziation der Proteine. Vier funktionelle biologische Pfade fallen besonders auf (A, B, C, D). (A) Mit den Proteinen der Matrix-Metalloproteinasefamilie assoziierte Interaktionen. (B) Mit Fibronektin assoziierte Funktionen. (C) In ERU-Glaskörpern erhöhte Serumproteine der Gerinnungskaskade, die mit Gerinnungsfaktor II assoziiert sind. (D) Mit dem Wnt- Signaltransduktionsweg assoziierte Interaktionen. (E) Alpha-2-Makroglobulin als multi-funktionelles Protein mit A, B, C assoziiert (laut Datenbank), Verbindung zu SFRP-2 (D) in dieser Arbeit durch SF-TAP nachgewiesen (Kapitel 4.3.3).

5 DISKUSSION

Mit einer Verbreitung von ca. 7,6% bis 12% in der Pferdepopulation weltweit (Gilger and Michau, 2004; Szemes and Gerhards, 2000; Spiess, 1997) ist die equine rezidivierende Uveitis (ERU) die vorherrschende Ursache für eine erworbene Blindheit beim Pferd (Gilger and Michau, 2004; Halliwell and Hines, 1985; Rebhun, 1979). Im Zuge des charakteristisch rezidivierenden Krankheitsverlaufes kommt es zu einer progressiven Schädigung der Retina mit vollkommenem Verlust der Sehfähigkeit im Endstadium der Erkrankung (Deeg, 2009; Gilger et al., 2008; Cook et al., 1983). Als einzig spontanes Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen (Deeg et al., 2007c; Dick, 1998) ist das wissenschaftliche Interesse an den zugrundeliegenden Pathomechanismen dieser T-Zell medierten Erkrankung (Deeg et al., 2002a; Romeike et al., 1998) nicht allein auf die Veterinärmedizin beschränkt. Bei beiden Erkrankungen (Uveitis beim Pferd und Menschen) sind die auf molekularer Ebene ablaufenden Pathogenese-Prozesse noch nicht geklärt.

Durch den engen Kontakt zwischen Glaskörper und Retina (Balazs, 1973; Weidman, 1973) beeinflussen sowohl physiologische, als auch pathologische Zustände der Retina die Zusammensetzung der Proteinkomponenten des Glaskörpers (Shitama et al., 2008), weswegen Glaskörpermaterial zur Erforschung vitreoretinaler Erkrankungen herangezogen wird (Garcia-Ramirez et al., 2009; Garcia-Ramirez et al., 2007). Die beim Pferd im Rahmen eines minimalinvasiven therapeutischen Verfahrens mögliche Probengewinnung (von Borstel et al., 2005; Werry and Gerhards, 1992) verleiht dem Glaskörper in der Erforschung der equinen rezidivierenden Uveitis eine besondere Stellung, da hierdurch Proben von allen Krankheitsstadien zur Verfügung stehen. Die Vitrektomie wird bereits in Anfangsstadien der ERU durchgeführt, wenn drei Uveitisschübe aufgetreten sind (Werry and Gerhards, 1992). Dagegen werden Netzhautproben nur von Pferden im Endstadium der ERU gewonnen, bei denen eine Enukleation durchgeführt werden muss, oder wenn eine beidseitige Erblindung vorliegt, die die Euthanasie des Pferdes aus Tierschutzgründen nötig macht.

Glaskörperproteine standen bereits im Fokus des Interesses einer vorangegangenen Studie, die diese Proteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) untersuchte (Altmann, 2007; Deeg et al., 2007a). Die limitierte Analysekapazität der

2D-PAGE im Vergleich zu neueren Methoden (siehe Kapitel 2.4.4.1), wie der in dieser Arbeit verwendeten nicht-gelbasierten, an ein Massenspektrometer gekoppelten Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS) (Zhang et al., 2008; Washburn et al., 2001) sowie die seit der Sequenzierung des Pferdegenoms zur Verfügung stehenden verbesserten Datenbanken (http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index) ermöglichen heute qualitativ und quantitativ deutlich verbesserte Proteinidentifikationen. Dies war der Anlass, sich im Rahmen dieser Arbeit erneut mit den differenziell exprimierten Proteinen des Pferdeglaskörpers auseinanderzusetzen. Basierend auf einer nicht-hypothesengesteuerten Herangehensweise wurde zunächst das komplette, im Glaskörper exprimierte Proteinrepertoire identifiziert und anschließend Änderungen im Proteinexpressionsmuster detektiert, die durch die ERU verursacht werden (Tab. 4.1, 4.2 und 4.3). Damit konnten für die Pathogenese der ERU potenziell interessante Kandidaten und die mit ihnen assoziierten Signalwege identifiziert und näher untersucht werden.

Es gelang in dieser Arbeit insgesamt 119 Proteine aus den Glaskörpern von an ERU erkrankten und gesunden Pferden zu identifizieren (Tab. 4.1, 4.2 und 4.3), davon waren 79 Proteine differenziell exprimiert. Bei 62 Proteinen zeigte sich eine verminderte Expression in den uveitischen Glaskörperproben (Tab. 4.3), wogegen für 17 Proteine eine vermehrte Expression in den Glaskörperproben der an ERU erkrankten Pferde festgestellt werden konnte (Tab. 4.2). Im Vergleich zu der von Altmann durchgeführten Analyse mit 38 identifizierten Proteinen (Altmann, 2007), konnte die Gesamtmenge der identifizierten Proteine in dieser Arbeit mit 119 verschiedenen Proteinen mehr als verdreifacht werden. War in der vorangegangenen Studie eine differenzielle Expression für 11 Glaskörperproteine beschrieben worden (Altmann, 2007), so gelang in dieser Arbeit mit der Identifikation von 79 differenziell exprimierten (Kapitel 4.1), und somit für die Charakterisierung der ERU Pathogenese potenziell interessanten Glaskörperproteinen, eine erhebliche Erweiterung des für weitere hypothesengetriebene Forschungsansätze zur Verfügung stehenden Grundlagenwissens. Annähernd 100% der unter Verwendung von Mascot¹⁴⁹ in der Ensembl-Datenbank¹⁵⁰ (Version 56, 2009) identifizierten Peptide konnten klar einem bereits bekannten Protein zugeordnet werden. Nur für eines der detektierten Proteine, ENSECAP00000012924, sind keine Homologe bekannt, weswegen diesem

¹⁴⁹ <http://www.matrixscience.com/>

¹⁵⁰ <http://www.ensembl.org/index.html>

Protein kein Name zugeordnet werden konnte. Dank der fortschreitenden Weiterentwicklung dieser Datenbank sollte die betreffende Zuordnung jedoch in naher Zukunft nachgeholt werden können.

Schon aus den Proteinidentifikationen von Altmann sind eine große Gruppe von Serumproteinen und die Inhibitoren des Wnt-Signalwegs DKK3 und SFRP-2 im Pferdeglaskörper bekannt (Altmann, 2007). Serumproteine konnten auch in dieser Arbeit eindeutig in den Pferdeglaskörpern identifiziert werden (Tab. 4.1, 4.2 und 4.3). Aus der Gruppe der zwischen ERU und Kontrollen im Glaskörper differenziell exprimierten Serumproteine fiel eine mit Gerinnungsfaktor II assoziierte funktionelle Gruppe in der Protein-Protein-Interaktion(PPI)-Netzwerkanalyse besonders auf (Abb. 4.21 C). Auch die Inhibitoren des Wnt-Signalweges DKK3 und SFRP-2 konnten in dieser Arbeit eindeutig in den Glaskörpern identifiziert werden und waren in den untersuchten Glaskörpern der an ERU erkrankten Pferde signifikant vermindert exprimiert (Tab. 4.3). Die PPI-Netzwerkanalyse (Abb. 4.21) zeigte eine Assoziation zwischen SFRP-2 und dem in der gesunden Pferderetina exprimierten (Abb. 4.3c) und hier erstmals in Zusammenhang mit autoimmuner Uveitis beschriebenen (PubMed¹⁵¹ Recherche Stand 17. März 2010) Wnt-Protein Wnt3a (Abb. 4.21 D), welche sich durch Koexpression in der gesunden Pferderetina bestätigte (Abb. 4.18g). Bisher noch nicht im Zusammenhang mit der ERU beschrieben, fand sich im Rahmen dieser Studien eine Gruppe von Zelladhäsion assoziierten Proteinen, die sich in der PPI-Netzwerkanalyse um das Protein Fibronectin gruppierte (Abb. 4.21 B). Ebenfalls unter den im Pferdeglaskörper differenziell exprimierten Proteinen dieser Arbeit findet sich die funktionell interessante Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ihrer Inhibitoren (Tab. 4.3, Kapitel 4.5 und Abb. 4.21 A), für die in dieser Arbeit das erste Mal ein potenzieller Zusammenhang mit der Pathogenese der ERU beschrieben wird (PubMed¹⁵² Recherche Stand 17. März 2010). In der PPI-Netzwerkanalyse formierten sich diese Proteine zusammen mit der in der Pferderetina differenziell exprimierten Matrix-Metalloproteinase-14 (Abb. 4.13) um die in den uveitischen Glaskörpern vermindert exprimierte Matrix-Metalloproteinase-2 (Tab. 4.3) als zentrales Protein (Abb. 4.21, A). Da ein Teil der in den uveitischen Glaskörpern als vermehrt exprimiert nachgewiesenen Proteine wie Alpha-1-Antitrypsin, Apolipoprotein-A-I, Apolipoprotein-A-II, Gerinnungsfaktor II und

¹⁵¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

¹⁵² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Alpha-2-Makroglobulin und verschiedene Immunglobulinfragmente (Tab. 4.2) abundante Serumproteine repräsentiert (Zipplies et al., 2009) ergibt sich hieraus ein eindeutiger Hinweis auf den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke im Zuge der ERU, was mit den Ergebnissen vorheriger Studien zur ERU konform geht (Altmann, 2007; Deeg et al., 2007a; Hauck et al., 2007). Fast alle von Altmann identifizierten Proteine wurden auch in dieser Arbeit identifiziert. Die Proteinidentifikation Alpha-1-Antitrypsin findet sich sowohl unter den nicht differenziell exprimierten Proteinen (Tab. 4.1, SERPINA1 entspricht Alpha-1-Antitrypsin) als auch in der Gruppe der in ERU-Glaskörpern vermehrt exprimierten Proteine (Tab. 4.2), was auf eine differenzielle Regulation verschiedener Isoformen oder eine mögliche posttranslationale Modifikation von ein und demselben Protein in der ERU verweist. Letztere könnten in Experimenten mit vergleichenden 2D-PAGE Studien des Proteins und 2D-Western Blots weiter untersucht werden.

Aufgrund seiner funktionellen Assoziation mit den Vertretern der Matrix-Metalloproteinasefamilie MMP-2 und MMP-9 (Catalan et al., 2009; Folkesson et al., 2007; Fernandez et al., 2005; Kjeldsen et al., 1993; Triebel et al., 1992) und der für die ERU in dieser Arbeit erstmalig beschriebenen Expression (PubMed Recherche Stand 17. März 2010) im Pferdeglaskörper (Tab. 4.2) wurde zunächst das im uveitischen Glaskörper deutlich vermehrt exprimierte Protein **Lipocalin 2** (LCN2) (Tab. 4.2) näher charakterisiert. Allgemein kommt LCN2 eine Rolle in der Immunantwort (Chan et al., 2009; Borregaard and Cowland, 2006; Flo et al., 2004) und dem rezeptormediierten Eisentransport über Zellmembranen (Bolognino et al., 2010; Borregaard and Cowland, 2006; Yang et al., 2002) zu, außerdem wird LCN2 eine protektive Wirkung bei oxidativem Stress zugeschrieben (Roudkenar et al., 2008).

LCN2 wurde in dieser Studie auf seine Expression im Zielorgan der ERU, der Retina, hin untersucht (Abb. 4.1), wodurch LCN2 in dieser Arbeit erstmalig in der Pferderetina nachgewiesen werden konnte (PubMed Recherche 17. März 2010). Das gesunde retinale Gewebe war von einer gleichmäßigen LCN2-Expression vor allem im Bereich der Nervenfaserschicht und der inneren plexiformen Schicht gezeichnet (Abb. 4.1c), wohingegen das veränderte Expressionsmuster im an ERU erkrankten Gewebe hauptsächlich durch eine ungleichmäßige Verteilung über das gesamte retinale Gewebe vitreal der äußeren Körnerschicht charakterisiert war (Abb. 4.1d). LCN2 konnte bereits von Abu El-Asar et al. zymographisch in Kammerwasser-

Proben von Menschen mit immunmediierter Uveitis nachgewiesen werden, nicht aber in den Kontrollproben (Abu El-Asrar et al., 2004). Anhand dieser Zymographie konnte auch gezeigt werden, dass LCN2 in den uveitischen Kammerwasserproben als Komplex mit dem Protein MMP-9 vorlag (Abu El-Asrar et al., 2004). Aufgrund der beschriebenen Sekretion des LCN2/MMP-9 Komplexes durch neutrophile Granulozyten (Kjeldsen et al., 1993), wurden diese Zellen als Hauptquelle des detektierten MMP-9 und LCN2 in den Kammerwasserproben der Uveitispatienten angesehen (Abu El-Asrar et al., 2004).

Eine zeitgleich erhöhte Expression von LCN2 und MMP-9 konnte in dieser Arbeit in den uveitischen Glaskörpern bereits erfolgreich demonstriert werden (Tab. 4.2 und Abb. 4.10). Es besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der potenziell sehr geringen Konzentration der LCN2/MMP-9 Komplexe in den uveitischen Glaskörperproben, deren Detektion durch eine zu starke Coomassiefärbung der Gelatin-Zymographie verhindert wurde. Deswegen sollen die Glaskörperproben in einem modifizierten Zymographieprotokoll entweder durch eine Erhöhung des aufgetrennten Glaskörperproteins, oder durch eine schwächere Coomassiefärbung nochmals dahingehend überprüft werden. Der Frage nach dem Vorliegen des LCN2/MMP-9 Heterodimers in den ERU-Glaskörpern sollte aber auch bezüglich der für LCN2 beschriebenen protektiven Wirkung auf die enzymatische Aktivität von MMP-9 (Gupta et al., 2007; Kubben et al., 2007; Yan et al., 2001) nochmals nachgegangen werden. Die mit der LCN2-Menge korrelierende protektive Wirkung auf die Enzymaktivität des MMP-9 konnte bereits in einer Brustkarzinom-Zelllinie gezeigt werden (Yan et al., 2001). In derselben Studie gelang auch der Nachweis des LCN2/MMP-9 Komplexes in den Urinproben von Tumorpatienten durch Zymographie, der mit spezifischen AK gegen MMP-9 und LCN-2 eindeutig in Western Blot und Ko-Immunopräzipitationsexperimenten charakterisiert werden konnte (Yan et al., 2001). Dies ist eine Vorgehensweise, die auch bei der weiteren Charakterisierung von LCN2 in der ERU sinnvoll wäre. Yan et al. stellten, basierend auf der erfolgreichen Rekonstruktion des LCN2/MMP-9 Komplexes *in vitro* durch Mischen der beiden Proteine und der Abwesenheit von Leukozyten in den verwendeten Proben, Leukozyten als Quelle des LCN2/MMP-9 Komplexes in diesem Fall in Frage (Yan et al., 2001). Derselbe protektive Effekt auf die proteolytische Aktivität von MMP-9 wurde für LCN2 auch bei Osteoarthritis (Gupta et al., 2007) und Magentumoren (Kubben et al., 2007) beschrieben. In der letztgenannten Studie

wurde die Komplexbildung ebenfalls nicht neutrophilen Granulozyten, sondern einer erhöhten LCN2 Produktion der Tumorzellen zugeschrieben (Kubben et al., 2007). In Bezug auf die autoimmune Pathogenese der ERU (Deeg, 2008; Deeg et al., 2008; Deeg et al., 2006b) ist die Assoziation von LCN2 mit anderen Autoimmunerkrankungen wie der autoimmunen Myokarditis (Ding et al., 2010) relevant. Es konnte mittels RT-PCR und Immunhistochemie eine LCN2- Expression bei Kardiomyozyten, Gefäßwandzellen, Fibroblasten und neutrophilen Granulozyten von Ratten mit induzierter EAM und in Myokardgewebe von humanen Patienten mit Myokarditis, nicht aber den entsprechenden Kontrollen nachgewiesen werden (Ding et al., 2010). Die Expression von LCN2 durch Zellen als Reaktion auf Gewebeschädigung ist von Myokardzellen (Ding et al., 2010; Yndestad et al., 2009), Zellen der Nierentubuli (Ding et al., 2007; Schmidt-Ott et al., 2006; Mishra et al., 2003), Bronchialepithelzellen (Cowland et al., 2003) und auch von retinalen Müller-Gliazellen (Gerhardinger et al., 2005) bekannt. In Bezug auf die Bedeutung der Müller-Gliazellen für die Pathogenese der ERU (Hauck et al., 2007) stellt die Assoziation von Müller-Gliazellen und LCN-2 (Gerhardinger et al., 2005) eine bedeutende Information dar. Für Ratten-Müller-Gliazellen konnte durch Microarray-Analysen eine vermehrte Expression des LCN2 Genes in einem induzierten Modell für diabetische Retinopathie nachgewiesen werden (Gerhardinger et al., 2005). Im Falle der ERU spricht die starke Expression im retinalen Gewebe des gesunden (Abb. 4.1c) und des uveitischen Zustandes (Abb. 4.1d) für eine retinale Herkunft von LCN2. Ob Müller-Gliazellen beim Pferd als Ursprung in Frage kommen, bedarf noch weiterer Klärung in Zellkultur basierten Experimenten.

Für die sowohl in gesunder Pferderetina als auch in der Retina von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesene LCN2 Expression (Abb. 4.1) könnte der funktionell modifizierende Einfluss von Zytokinen auf LCN2 von Interesse sein. Neben der von mehreren Autoren beschriebenen Induktion einer LCN2 Expression in Zellen durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-17 (Chan et al., 2009; Yndestad et al., 2009; Cowland et al., 2003) und TNF-alpha in Kombination mit IL-17 (Shen et al., 2005) wird auch eine Hemmung der regenerativen LCN2-Effekte auf geschädigtes Gewebe in Anwesenheit eines proinflammatorischen Zytokinexpressionsmuster mit TNF-alpha, IFN-gamma und IL-1 β beschrieben (Vinueza et al., 2008). Die Assoziation mit IL-17 ist besonders in Bezug auf die kürzlich mit autoimmuner Uveitis in Verbindung gebrachten Th17-Zellen (Amadi-Obi

et al., 2007) interessant. Je nach Zustand könnte also LCN2 zum einen in der ERU seine zellregenerativen und protektiven Eigenschaften verlieren und gleichzeitig als Mediator einer gesteigerten MMP-9 Enzymaktivität agieren, was potenziell zur Schädigung okulärer Strukturen im Verlauf der ERU beitragen könnte. In an diese Arbeit anknüpfenden Studien soll deswegen neben der weiteren Charakterisierung des LCN2-Verhältnisses zu MMP-9 über Zymographie und Ko-Immunopräzipitationsstudien die Bedeutung von equinen Müller-Gliazellen als LCN2-Quelle in der Zellkultur verifiziert, und bei positivem Ergebnis der Einfluss von Zytokinen auf die LCN2 Expression weiter untersucht werden.

Ebenfalls konnte in dieser Arbeit für zwei inhibierende Faktoren der Wnt-Signaltransduktion, DKK3 und **SFRP-2** (Tab. 4.3) eine erniedrigte Expression in den uveitischen Glaskörperproben gezeigt werden, was durch das Ergebnis einer vorangegangenen Studie bestätigt wird (Altmann, 2007) und abgesehen davon noch nicht in Zusammenhang mit Uveitis beschrieben wurde (PubMed¹⁵³ Recherche Stand 17. März 2010). Die Wnt-Signaltransduktion ist ein komplexes, nicht linear interagierendes Proteinnetzwerk (van Amerongen and Nusse, 2009) und spielt sowohl bei der Tumorgenese (Matushansky et al., 2008), der Embryogenese und Gewebedifferenzierung (Agathocleous et al., 2009; Martin and Kimelman, 2009; van Amerongen and Nusse, 2009; Witte et al., 2009), hier speziell auch im frühen Stadium der Entwicklung der Retina von Vertebraten (Sanchez-Sanchez et al., 2010), aber auch bei der Regeneration geschädigter Retina (Osakada et al., 2007) eine Rolle. Die Wnt-Signaltransduktion scheint aber ebenfalls in Zusammenhang mit degenerativen Veränderungen der Retina zu stehen (Chen et al., 2009; Yi et al., 2007; Hackam, 2005). Mindestens drei verschiedene Wnt-Signalwege sind an der Wnt-Signaltransduktion beteiligt, der Wnt/ β -Catenin (oder kanonische) Weg, der nicht kanonische Weg und der Wnt-Ca²⁺-Weg (Bovolenta et al., 2006). Für die ERU interessant ist die Expression des Wnt/ β -Catenin Signalweg Inhibitors (Galli et al., 2006; Kawano and Kypta, 2003) SFRP-2 in retinalem Gewebe, welcher in der Pferderetina vor allem in der Photorezeptorschicht nachweisbar und in der von ERU betroffenen Retina vermindert ist (Abb. 4.2, Kapitel 4.3.1), was von vorangegangenen Studien bestätigt wird (Altmann, 2007). In dieser Arbeit konnte erstmalig eine Assoziation der Expression von SFRP-2 mit der Expression des Wnt-Proteins Wnt3a in der Pferderetina beschrieben werden (Abb. 4.18). Sehr interessant

¹⁵³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

ist neben der Koexpression beider Proteine in der Photorezeptorschicht der gesunden Pferderetina (Abb. 4.18g) der simultane Rückgang der Expression von SFRP-2 und Wnt3a in den an ERU erkrankten Retinae (Abb. 4.18h), ein Vorgang, der in Bezug auf autoimmune Uveitis in dieser Arbeit das erste Mal beschrieben wird (PubMed¹⁵⁴ Recherche Stand März 2010). Bereits bekannt ist eine Interaktion von SFRP-2 und Wnt3a durch den Nachweis der antiapoptotischen Wirkung von SFRP-2 auf Kardiomyozyten, die durch Blockade des proapoptotisch wirkenden Wnt-Proteins Wnt3a zustande kommt (Zhang et al., 2009b; Mirotsoy et al., 2007). SFRP-2 konnte noch keine Funktion in der Pferderetina zugeordnet werden, aber es ist bereits bekannt, dass SFRP-2 neben seiner Funktion in der Embryogenese (Misra and Matisse, 2010; Lee et al., 2006a; Lescher et al., 1998) auch als Tumorsuppressorgen wirken kann (Suzuki et al., 2008; Takagi et al., 2008). Im Widerspruch dazu implizieren manche Studien eine Tumor-fördernde Funktion durch antiapoptotische (Lee et al., 2006b; Lee et al., 2004) oder proangiogenetische (Courtwright et al., 2009) Wirkung. Aber auch Wnt-Signalweg unabhängige Funktionen sind für SFRP-2 beschrieben (Bovolenta et al., 2008), darunter die in Bezug auf die in der ERU differenziell exprimierten Mitglieder der Matrix-Metalloproteinasefamilie (Kapitel 4.1 und 4.5) potenziell interessante Funktion des Maus-SFRP-2 als Inhibitor von Krallenfroschproteinasen (Lee et al., 2006a) oder die im Widerspruch dazu beschriebene verstärkende Wirkung von SFRP-2 auf die Prokollagen-C-Proteinase-Aktivität von Tolloid-like-Metalloproteinasen (Kobayashi et al., 2009). Des Weiteren konnte auch eine über einen Fibronectin/Integrin Rezeptor vermittelte zellprotektive und antiapoptotische Funktion für Säugetierzellen in *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden (Lee et al., 2006b; Lee et al., 2004). In Zusammenhang mit der Koexpression von SFRP-2 und Wnt3a (Abb. 4.18 g) in der gesunden Pferderetina könnte auch die für Wnt3a postulierte pro-regenerative Funktion in der geschädigten Retina (Osakada et al., 2007) sowie der pro-proliferative Einfluss dieses Proteins auf Müller-Gliazellen (Osakada et al., 2007) bedeutsam sein. Um den Ursprung des in der Retina exprimierten SFRP-2 oder Wnt3a zu identifizieren, wäre eine zellkulturbasierte Untersuchung primärer equiner Retinazellen wie z.B. Müller-Gliazellen auf eine mögliche Expression der beiden Proteine sinnvoll. Dieses Vorgehen würde bei positivem Ergebnis die Möglichkeit eröffnen, durch Unterbinden der Expression von SFRP-2 oder Wnt3a mittels spezifischer siRNA, auf eine

¹⁵⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

potenziell schädigende oder protektive Funktion der Proteine SFRP-2 und Wnt3a auf primäre Zellen hin zu untersuchen, und somit den Kontext zur Pflinderetina und der Pathogenese der ERU zu erfassen.

Um bisher unbekanntes, mit SFRP-2 funktionell assoziierte Proteine zu identifizieren, wurde eine Strep/FLAG-Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (SF-TAP) von SF-SFRP-2 aus transient transfizierten HEK-293T Zellen nach der von Glöckner et al. beschriebenen Methode (Gloeckner et al., 2009a; Gloeckner et al., 2009b; Gloeckner et al., 2007) durchgeführt, wodurch interessante und für SFRP-2 bisher noch nicht beschriebene Interaktionskandidaten identifiziert werden konnten (PubMed¹⁵⁵ Recherche Stand 22. März 2010). Die erfolgreiche Transfektion der Zellen mit SFRP-2 und die anschließende erfolgreiche Aufreinigung des Proteins wurden durch die eindeutige Identifikation von SFRP-2 mittels LC-MS/MS in den Aufreinigungsfraktionen bestätigt (Tab. 4.4). Somit können die acht weiteren, ebenfalls ausschließlich in den SFRP-2-Aufreinigungsfraktionen und nicht in der Negativkontrolle identifizierten Proteine als Bindungspartner von SFRP-2 angesehen werden. Dennoch ist eine Validierung der in der SF-TAP identifizierten SFRP-2 bindenden Proteine mit anderen Methoden wie zum Beispiel einer Ko-Immunpräzipitation in weiterführenden Experimenten ratsam, um unspezifische Bindungen degradierter Proteine oder Proteinaggregationen als Ursache der Interaktion auszuschließen. Diese Kontrolle empfiehlt sich besonders bei abundanten Proteinen oder an der Proteinfaltung beteiligten Proteinen (Seraphin et al., 2002). Unter den durch die SF-TAP identifizierten SFRP-2 Bindungspartnern (Tab. 4.4) sind die Proteine der 70 kDa Heat shock Proteinfamilie (HSP70), Heat shock 70 kDa Protein 1 A, Heat shock 70 kDa Protein 8 und das ebenfalls zur HSP70-Familie gehörende (Haas, 1994) 78 kDa Glucose-regulierte-Protein (GRP78) (Tab. 4.4) aufgrund ihrer bereits nachgewiesenen Expression in der Pflinderetina (Hauck et al., 2007) von besonderem Interesse. HSP70 sind Chaperon-Proteine. Diese Proteine medieren die Faltung neu translatierter Proteinkomplexe, die Translokation von Proteinen über mitochondriale und andere Membranen sowie den Umbau naiver regulatorischer Signalproteine wie Transkriptionsfaktoren und korrigieren stressbedingt missgefaltete Proteine, wodurch sie die zelluläre Proteinhomöostase aufrecht erhalten und zellprotektive Effekte medieren (Goloubinoff and De Los Rios, 2007). Als membranständige oder extrazelluläre Komponenten werden sie auch von

¹⁵⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Tumorzellen (Misra and Matise, 2010; Multhoff, 2007; Sherman and Multhoff, 2007; Misra and Pizzo, 2004b) und Makrophagen (Misra et al., 2004) exprimiert und übernehmen hier sowohl zellproliferative, antiapoptotische als auch immunmodulatorische Aufgaben (Gross et al., 2008; Multhoff, 2007; Sherman and Multhoff, 2007; Misra et al., 2006; Misra et al., 2004). Die Rolle der HSP70-Familie in der ERU ist bislang noch nicht näher untersucht worden. Basierend auf der in dieser Arbeit nachgewiesenen Funktion als SFRP-2 bindende Proteine (Tab. 4.4) könnten vergleichende immunhistochemische Koexpressionsstudien mit SFRP-2 in gesunden Retinae und in Retinae von an ERU erkrankten Pferden der nächste einfache durchführbare Schritt sein, um diese Assoziation in Bezug auf ihre Bedeutung für die ERU näher zu charakterisieren.

Aufgrund der im uveitischen Pferdeglaskörper vermehrten und somit für die ERU-Pathogenese bedeutsamen Expression (Tab. 4.2), ist das in dieser Arbeit zum ersten Mal als SFRP-2 Bindungspartner beschriebene Protein **Alpha-2-Makroglobulin (A2M)** (Tab. 4.4) ein sehr interessanter Kandidat für weitere Studien um seine SFRP-2 Assoziation in Bezug auf die ERU zu charakterisieren. Eine Assoziation der Expression der beiden Proteine A2M und SFRP-2 konnte durch Koexpressionsstudien in dieser Arbeit erstmalig in der Pferderetina nachgewiesen werden (Abb. 4.18), wobei sowohl A2M als auch SFRP-2 in der Photorezeptorschicht der gesunden Pferderetina exprimiert waren (Abb. 4.18e). Simultan mit dem Verschwinden der SFRP-2 Expression in der an ERU erkrankten Retina konnte dort eine im gesamten retinalen Gewebe vermehrte A2M Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.18f). Sehr interessant im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit erstmalig (PubMed Recherche Stand 17.März 2010) sowohl im Gewebe (Abb. 4.18), als auch durch Kopräzipitation gezeigten (Tab. 4.4) Assoziation des Wnt-Inhibitors SFRP-2 mit A2M ist der kürzlich für Alpha-2-Makroglobulin beschriebene hemmende Einfluss auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der über den A2M Rezeptor LRP1 mediiert wird (Lindner et al., 2010). Im Ausblick auf weitere Experimente wird hier der direkte Nachweis einer Bindung des in der Pferderetina exprimierten A2M an das ebenfalls dort exprimierte SFRP-2 angestrebt, was durch Ko-Immünpräzipitation der beiden Proteine aus Pferderetinaprobe bewerkstelligt werden könnte.

Alpha-2-Makroglobulin ist ein hochabundantes Glykoprotein, das aus vier 180 kDa Untereinheiten besteht, die ein Homotetramer bilden (Borth, 1992; Sottrup-Jensen et al., 1984; Barrett et al., 1979). Am häufigsten wird auf die Funktion des Proteins als

universeller Proteaseinhibitor verwiesen. Proteasen spalten die A2M-Köderregion. Dies bewirkt eine Konformationsänderung und damit Aktivierung des A2M, die wiederum eine Bindung der Protease an das A2M-Molekül bedingt. Der so entstandene A2M/Protease Komplex kann nun, vermittelt über den Rezeptor LRP1, durch Endozytose von Zellen aufgenommen und abgebaut werden (Chu and Pizzo, 1994; Borth, 1992; Maxfield et al., 1981). Diese Funktion könnte in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit als differenziell exprimiert identifizierten Matrix-Metalloproteinasen (Kapitel 4.1 und 4.5) von Bedeutung für die Vorgänge in der ERU sein. Im Vergleich zu anderen Proteaseinhibitoren wird das aktive Zentrum der Protease durch A2M nicht direkt blockiert und nur große Substrate werden physikalisch an einer Interaktion mit der Protease gehindert (Barrett et al., 1979). Doch gehen die Funktionen von A2M weit über die Proteaseinhibitoraktivität hinaus. Nach seiner Aktivierung kann es LRP1 (Low-density-lipoprotein-receptor-related protein) (Lindner et al., 2010; Bonacci et al., 2007; Qiu et al., 2002) oder GRP78 (Misra et al., 2005a; Misra et al., 2005b; Misra et al., 2002) vermittelte Signaltransduktionswege in verschiedenen Zellen initiieren. A2M bindet und beeinflusst Zytokine (Borth, 1992) wie TNF-alpha (Wollenberg et al., 1991), IL-1 β (Wu et al., 1998) sowie Wachstumsfaktoren und Hormone (Tayade et al., 2005) und moduliert so deren biologische Funktion (Bonacci et al., 2007; Milenkovic et al., 2005; Tayade et al., 2005; Misra and Pizzo, 2004a; Borth, 1992). Aufgrund der Abundanz von A2M im Plasma könnte das vermehrte Auftreten von A2M in der Retina und dem Glaskörper der an ERU erkrankten Pferde (Kapitel 4.3.4) auf den Übertritt von Plasma-A2M als Folge des in der ERU evidenten Zusammenbruchs der Blut-Retina-Schranke (Deeg et al., 2007a; Hauck et al., 2007) zurückgeführt werden. Die nachgewiesene Expression von A2M auch in der gesunden Pferderetina (Abb. 4.5), also bei intakter Blut-Retina-Schranke, verweist jedoch auch auf eine lokale Produktion des Proteins im retinalen Gewebe. Eine lokale Expression von A2M kann einen Zellmechanismus darstellen, um Matrix-Metalloproteinasen oder Zytokine in der extrazellulären Matrix zu regulieren (Borth, 1992). Dieser protektive Mechanismus wird von Astrozyten als Reaktion auf den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke beschrieben (Cucullo et al., 2003). Somit könnte die erhöhte A2M Expression bei der ERU auch eine kompensatorische Maßnahme der Retina zur Erhaltung der Zellintegrität darstellen. Über die Western Blot Untersuchung des Glaskörpermaterials konnte nachgewiesen werden, dass A2M in den Glaskörpern

von an ERU erkrankten Pferden vermehrt in fraktionierter Form vorliegt (Kapitel 4.3.4.1). Neben der für equines A2M erwarteten Bande auf einer Höhe von 180 kDa (Pritchett and Paulson, 1989) wurde auch eine Bande auf einer Höhe von über 200 kDa sowie eine Bande bei ca. 90 kDa nachgewiesen. Das Molekulargewicht der höchsten Bande konnte aufgrund der limitierten Aussagekraft der Markerproteine für diesen Bereich nicht näher eingegrenzt werden. Denkbar wäre hier, dass es sich um eine Dimerform von A2M mit einer theoretischen Größe von 360 kDa, um unvollständig reduzierte Reste des Homotetramers von A2M (Barrett et al., 1979) oder einer posttranslational modifizierte Version des Proteins handelt. Von besonderem Interesse ist die ebenfalls in den ERU-Glaskörpern nachweisbare A2M-Bande auf einer Höhe von ca. 90 bis 95 kDa. Dieses Fragment der 180 kDa A2M Untereinheit entsteht bei Interaktionen der A2M-Köderregion mit Proteasen (Sanchez et al., 2007; Bisaro de Lorenc et al., 2005; Arbelaez et al., 1997), welches einen indirekten Nachweis für aktive Proteasen im uveitischen Glaskörper darstellt. Weiterhin impliziert es das Vorliegen von aktiviertem und somit rezeptorbindungsfähigem A2M in den an ERU erkrankten Glaskörpern, was durch das dort nachgewiesene erhöhte Aufkommen der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) noch unterstrichen wird (Kapitel 4.5.2). In Glaskörpern von Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie wurde ebenfalls eine erhöhte MMP-9 Aktivität mit dem Auftreten der ca. 90 kDa Bande von A2M in Verbindung gebracht (Sanchez et al., 2007).

Die Zerstörung der Ganglienzellschicht im Zuge der ERU (Deeg et al., 2002a) geht zusammen mit der vermehrten Expression von A2M in den uveitischen Retinae in dieser Region einher (Abb.4.5.d). Ein potenzieller funktionaler Zusammenhang dieser beiden Ereignisse wird durch die bereits beschriebene, über den Rezeptor LRP1 vermittelte, apoptotische Wirkung von A2M auf retinale Ganglienzellen (Shi et al., 2008) denkbar, welche sowohl durch exogene Zufuhr von A2M in gesunde Ratten-Augen als auch durch lokal erhöhte Expression von A2M in einem Glaukom-Rattenmodel nachgewiesen wurde (Shi et al., 2008). In den von Glaukom betroffenen Augen konnte eine erhöhte A2M Expression in den Müller-Gliazellendfüßen, der Ganglienzellschicht, der inneren Körnerschicht und der inneren plexiformen Schicht nachgewiesen werden (Shi et al., 2008). Da auch in der Retina von Kontrollratten A2M immunhistochemisch in der Ganglienzellschicht und an Müller-Gliazellen nachweisbar war, gingen die Autoren der Studie davon aus, dass

A2M nicht per se neurotoxisch wirkt, sondern eher rezeptorvermittelt apoptotische Signale in den Ganglienzellen induziert (Shi et al., 2008). In Anbetracht der differentiellen Expression von A2M in der Pferderetina (Abb. 4.5), die durch eine vermehrte Expression des Proteins in der gesamten Retina der an ERU erkrankten Pferde gekennzeichnet ist (Abb. 4.5d) und basierend auf den Hinweisen aus den von Shi et al. beschriebenen Experimenten (Shi et al., 2008), wäre eine immunhistochemische Doppelfärbung des gesunden und erkrankten retinalen Gewebes mit spezifischen Antikörpern gegen A2M und LRP1 der nächste Schritt, um Hinweise auf die bisher noch nicht geklärte Funktion von A2M in der ERU zu erhalten. Sinnvoll wäre auch die Erweiterung der A2M/LRP-1 Koexpressionsstudie um den Nachweis der Expression des A2M Zellrezeptors GRP78 (Misra et al., 2004), da A2M in GRP78 mediierten Kaskaden nachweislich zellproliferativ wirkt und ein antiapoptotisches Milieu erzeugt (Misra and Pizzo, 2010; Misra et al., 2006; Misra et al., 2005c; Misra et al., 2004; Misra and Pizzo, 2004a). Dies könnte ebenfalls dazu beitragen, die Funktion von A2M in der ERU zu charakterisieren. Auch die an der Pathogenese der ERU beteiligten Müller-Gliazellen (Hauck et al., 2007) scheinen unter dem Einfluss von A2M mediierten Prozessen zu stehen. So konnte in *in vitro* Versuchen eine hemmende Wirkung auf die ATP und Neuropeptid-Y induzierte Zellproliferation der Müller-Gliazellen beobachtet werden, was einer A2M/LRP1 mediierten Elimination von Wachstumsfaktoren zugeschrieben wurde (Milenkovic et al., 2005).

Mit dieser Arbeit wird außerdem zum ersten Mal eine Assoziation zwischen **Osteopontin** (OPN) und der equinen rezidivierenden Uveitis beschrieben. OPN ist ein N-glykosiliertes, je nach Herkunft hoch phosphoryliertes Protein (Christensen et al., 2007; Giachelli and Steitz, 2000; Giachelli et al., 1995) mit vielfältigen Funktionen. Dazu gehören die Beteiligung an Prozessen bei Gewebeumbau und Gewebeumstrukturierung (Murugaiyan et al., 2008; Denhardt et al., 2001a; McKee and Nanci, 1996), die Beeinflussung von Tumorwachstum und Metastasierung (Shevde et al., 2010; Wai and Kuo, 2008), neuroprotektive Effekte (Meller et al., 2005), sowie regulatorische Effekte auf die Immunantwort (Lund et al., 2009; Cao et al., 2008; Wang and Denhardt, 2008; Ashkar et al., 2000). Seine Funktionen als Zelladhäsionsmolekül oder Zytokin kommen über Interaktionen mit als Rezeptor fungierenden Integrinen oder CD44 zum Tragen (Murugaiyan et al., 2008; Denhardt et al., 2001a). Abhängig von Effektorzelle und Zielgewebe werden teils sehr

widersprüchliche Funktionen für Osteopontin beschrieben, die weitestgehend auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen (Christensen et al., 2007) zurückgeführt werden (Meller et al., 2005). Als Zytokin-ähnliches Protein wird es nicht nur von Makrophagen, T-Zellen und anderen inflammatorischen Zellen produziert, sondern wirkt gleichzeitig aktivierend auf T-Zellen und Makrophagen und fördert deren Zelladhäsion und Migration (O'Regan et al., 1999; Atkins et al., 1998; Weber and Cantor, 1996). Durch die Induktion einer erhöhten Expression von Th-1 Zytokinen wie IFN-gamma und TNF-alpha bei gleichzeitiger Hemmung der Th-2 assoziierten Zytokinexpression wird OPN als Modulator der Th-1 medierten Immunantwort gesehen und gilt als proinflammatorischer Faktor in T-Zell medierten Modellen autoimmuner Erkrankungen wie EAU (Iwata et al., 2010; Hikita et al., 2006) und EAE (Murugaiyan et al., 2008). Eine durch IRBP induzierte EAU verläuft bei OPN^{-/-} Mäusen milder bei gleichzeitig eingeschränkter TNF-alpha Produktion der reaktiven T-Zellen (Kitamura et al., 2007; Hikita et al., 2006). Eine bei der IRBP-Immunisierung zeitgleiche intravenöse Verabreichung eines Osteopontin neutralisierenden Antikörpers mildert den Verlauf der EAU in Wild-Typ-Mäusen (Kitamura et al., 2007). Intravenös verabreichte OPN-siRNA konnte den Verlauf einer in B6-Mäusen mit IRBP induzierten Uveitis deutlich mildern und unterdrückte die Produktion von Th1-Zytokinen (IFN-gamma und TNF-alpha) und IL-17, wenn sie 24 Stunden vor und nochmals zeitgleich mit der IRBP-Immunisierung verabreicht wurde, reduzierte aber nicht die Proliferationsantwort der aus regionalen Lymphknoten gewonnenen T-Lymphozyten auf das IRBP Immunogen *in vitro* (Iwata et al., 2010). Interessanterweise ist OPN im Gegensatz dazu in Glaskörper- und Netzhautproben von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren signifikant erniedrigt exprimiert (Tab. 4.3 und Kapitel 4.4). In diesem Zusammenhang könnten die für OPN bereits nachgewiesenen neuroprotektiven (Schroeter et al., 2006) und die Gewebehomöostase aufrechterhaltenden (Denhardt et al., 2001b) Funktionen von Bedeutung sein. Dass OPN nicht zwangsläufig eine proinflammatorische Wirkung in T-Zell medierten Autoimmunerkrankungen inne haben muss, wurde bereits in einem durch Injektion mit Herz-alpha-Myosin induzierten Mausmodell für experimentelle autoimmune Myokarditis (EAM) gezeigt (Abel et al., 2006). In diesem Experiment konnten keine Unterschiede zwischen der Ausprägung der Myokarditis bei Wild-Typ und OPN^{-/-} Mäusen festgestellt werden, worauf ein kausaler Zusammenhang von OPN Expression und der Entwicklung der

Autoimmunerkrankung in diesem Modell als unwahrscheinlich angesehen wurde (Abel et al., 2006). Die Bioaktivität von OPN kann durch Spaltung des Proteins durch Thrombin oder Matrix-Metalloproteinasen (MMP) beeinflusst werden (Scatena et al., 2007; Gao et al., 2004; Agnihotri et al., 2001), wobei die Spaltprodukte neue Rezeptorbindungsstellen und eine veränderte Aktivität zeigen. Für durch Thrombin generierte Spaltprodukte konnte eine Verdopplung der neuroprotektiven Aktivität bei ischämischer ZNS-Schädigung gezeigt werden (Doyle et al., 2008). Der Western Blot Nachweis von Glaskörperosteopontin gesunder Pferdeaugen (Kapitel 4.4.1) zeigt ein ähnliches Bandenmuster wie durch Thrombin oder MMP gespaltenes OPN, was auf eine mögliche Funktion von OPN-Spaltprodukten im physiologischen Pferdeglaskörper hinweist. Zeitgleich zur erhöhten OPN Expression im gesunden Pferdeglaskörper findet sich dort zudem eine erhöhte Expression von MMP-2. OPN scheint in der Lage zu sein, die Expression von Pro-MMP-2 zu stimulieren und zu aktivieren (Jan et al., 2010; Philip and Kundu, 2003; Philip et al., 2001). Aktives MMP-2 ist umgekehrt in der Lage, OPN zu spalten (Gao et al., 2004) und somit dessen Aktivität zu erhöhen, weshalb von manchen Autoren ein positiv verstärkender Rückkopplungszyklus für diese beiden Proteine postuliert wird (Gao et al., 2004). Zieht man die gleichzeitig hohe Expression von MMP-2 und OPN im gesunden Pferdeglaskörper und den Rückgang beider Proteinexpressionen im uveitischen Glaskörper (Tab. 4.3) in Betracht, könnte dieser Mechanismus bzw. dessen Verlust auch im Pferdeauge im Zusammenhang mit der Entwicklung einer ERU stehen. In der immunhistochemischen Untersuchung lag der Schwerpunkt der OPN Expression in der gesunden Pferderetina im Bereich der Müller-Gliazellendfüße (Abb. 4.7c), welche an der Bildung der inneren limitierenden Membran beteiligt sind (Weidman, 1973) und dort in engen Kontakt zum Glaskörper treten (Balazs, 1973; Weidman, 1973). Dagegen verschwand die OPN Expression im ERU Gewebe völlig (Abb. 4.7d). Bedenkt man die schon für Müller-Gliazellen anderer Spezies beschriebene Funktion der OPN Expression (Gerhardinger et al., 2005), legen die Befunde dieser Arbeit die Müller-Gliazellen beim Pferd als potenziellen Quelle des Osteopontins in Glaskörper und Retina nahe. Dies erscheint besonders in Bezug auf die potenziell aktive Rolle der Müller-Gliazellen bei der Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses der ERU (Hauck et al., 2007) interessant. Müller-Gliazellen werden im Zuge der ERU zwar von der Gewebszerstörung betroffen, sind aber länger als andere Strukturen in der zerstörten Retina nachweisbar (Deeg et al.,

2002a), wie hier auch durch eine Färbung mit dem Müller-Gliazellmarker GFAP erneut gezeigt werden konnte (Abb. 4.19). Für OPN ist eine negative Korrelation mit der Expression von GFAP beschrieben. Durch Unterbinden der OPN Expression in humanen, malignen Glioma-Zellen konnten Jan et al. einen Anstieg der GFAP Expression bei gleichzeitigem Rückgang der Vimentin Expression in diesen Zellen auslösen (Jan et al., 2010). Ein ähnliches Regulationsmuster spiegelt sich auch in den Müller-Gliazellen der untersuchten Pferderetinae wieder, bei denen die Expression von GFAP nach Rückgang der OPN Expression im von ERU betroffenen Gewebe höher ist (Abb. 4.19 f), als in Anwesenheit von OPN in der gesunden Retina (Abb. 4.19 e). Aufgrund der sehr interessanten Funde soll in weiteren Versuchen eine mögliche Produktion von OPN in Pferde-Müller-Gliazellen in der Zellkultur mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern überprüft werden. Ein Vergleich des Western Blot Bandenmusters des Zellkultur Osteopontins mit den anti-OPN-Western Blot Ergebnissen aus dem gesunden Glaskörpermaterial wird dann Aufschluss darüber geben, ob und in welcher Form OPN, in Bezug auf die im gesunden Glaskörper charakteristischen OPN Spaltprodukte, von den Müller-Gliazellen sezerniert wird. Sollten keine OPN-Spaltprodukte in der Zellkultur nachgewiesen werden, kann in einem Verdau des Zellkultur Osteopontins mit rekombinantem MMP-2 versucht werden, die charakteristischen Spaltprodukte zu produzieren, um einen Hinweis auf die potenzielle Beteiligung der MMP-2 an diesem Vorgang zu erhalten. Eine Hemmung der OPN-Expression in den Müller-Gliazellen durch spezifische siRNA wäre eine geeignete Methode, um funktionelle Veränderungen in den Zellen zu studieren, welche dann Rückschlüsse auf die Bedeutung von OPN auf die Zellfunktion zulassen.

Die Identifikation des Proteins **Matrix-Metalloproteinase-2** mittels LC-MS/MS im Pferdeglaskörper und die gleichzeitig nachgewiesene verminderte Expression dieses Proteins in den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden (Tab. 4.3) veranlasste eine Untersuchung des MMP-2-Expressionsmusters in der Pferderetina (Kapitel 4.5.1.2) und die Überprüfung weiterer, mit MMP-2 funktional verknüpfter Mitglieder der Matrix-Metalloproteinasefamilie (Kapitel 4.5). Dies führte zu der in dieser Arbeit erstmalig hergestellten Assoziation (PubMed¹⁵⁶ Recherche Stand März 2010) dieser Proteasefamilie mit der Pathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis (Kapitel 4.5).

¹⁵⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Matrix-Metalloproteinasen sind Kalzium abhängige, Zink enthaltende Proteasen, die an physiologischen und pathologischen Umbauprozessen der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt sind. Des Weiteren haben sie die Fähigkeit andere, nicht der extrazellulären Matrix zuzuordnende Proteine wie Proteasen, Proteaseinhibitoren und Zelloberflächenrezeptoren zu spalten und chemotaktisch wirkende Moleküle und Wachstumsfaktoren durch Abspaltung freizusetzen. Durch diese Modulation von Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen fällt ihnen eine wichtige Rolle in Gewebeumbauprozessen, der Gewebeentwicklung, sowie der Zellmigration, -proliferation und der Wundheilung zu (Clutterbuck et al., 2010; Malla et al., 2008; Murphy and Nagase, 2008; Nagase et al., 2006; Goetzi et al., 1996). Auch ist bekannt, dass retinale Müller-Gliazellen in der Lage sind, sowohl MMP-2 als auch MMP-9 zu exprimieren (Limb et al., 2002). Aufgrund dieser Eigenschaften ist eine aktive Funktion der Matrix-Metalloproteinasen bei der Zerstörung retinaler Strukturen bei der ERU denkbar. Die durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) medierte Umbauprozesse werden unter anderem über eine Wirkungsbalance von MMPs und ihren spezifischen Inhibitoren, den TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases), reguliert (Baker et al., 2002). Dabei nimmt das bei ERU in Glaskörper und Retina erniedrigte Protein TIMP-2 (Kapitel 4.6) in diesem Regulationskreis eine besonders wichtige Stellung ein, da es nicht nur MMP-2 zu hemmen vermag (Stetler-Stevenson et al., 1989a), sondern gleichzeitig eine wichtige Rolle für die Aktivierung der Pro-MMP-2 spielt (Bernardo and Fridman, 2003), wie bereits *in vivo* in einem Mäusemodell gezeigt werden konnte (Caterina et al., 2000). Eine eingeschränkte Regulation der MMP-Aktivität ist in vielen Erkrankungen evident (Malemud, 2006). Die erniedrigte Expression von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 (Tab. 4.3) in den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden bei gleichzeitig erhöhter MMP-9 Expression (Kapitel 4.5.2) im Vergleich zu gesunden Glaskörpern weist auf eine Entgleisung der MMP-Funktion bei der ERU hin. Da die in der Label-Free-Quantifizierung der LC-MS/MS Daten detektierte erniedrigte Expression von MMP-2 in den uveitischen Glaskörpern (Tab. 4.3) keine Aussage über die Funktionalität des Enzyms zulässt, wurde die Expression durch Western Blot überprüft (Kapitel 4.5.1.1) wodurch aufgrund der detektierten Bande von ca. 70 kDa (Brown et al., 1990; Stetler-Stevenson et al., 1989b) die differenzielle Expression der inaktiven Pro-Form des Enzyms und nicht der aktiven Form zugeordnet werden konnte. MMP-2 ist in der gesunden Pferderetina fast ausschließlich im Bereich der Photorezeptorschicht exprimiert (Abb. 4.9c), findet sich aber interessanterweise im

gesamten Bereich der von Gewebeerstörung betroffenen Retina der an ERU erkrankten Pferde (Abb. 4.9d), was aufgrund der für MMP-2 beschriebenen proteolytischen Eigenschaften eine Beteiligung von MMP-2 an der Retinazerstörung denkbar macht. Um hierzu eine fundiertere Aussage treffen zu können, wäre ein Nachweis der aktiven Form des Enzyms in den histologischen Retinapräparaten essenziell, was durch *in-situ*-Zymographie (George and Johnson, 2001; Mungall and Pollitt, 2001) ermöglicht werden könnte. Die Aktivierung der MMP-2 Pro-Form erfolgt über die membranständige Matrix-Metalloproteinase-14 (MMP-14). Dieser Vorgang wird durch den Matrix-Metalloproteinase Inhibitor TIMP-2 vermittelt, der sowohl an der Aktivierung, als auch an der Hemmung von MMP-2 essenziell beteiligt ist (Kudo et al., 2007; Toth et al., 2000; Butler et al., 1998; Kinoshita et al., 1998). Membranständiges MMP-14 bindet zuerst TIMP-2 wonach dieser MMP-14/TIMP-2-Komplex dann als Rezeptor für Pro-MMP-2 dient, welches durch ein TIMP-2 freies MMP-14 Molekül gespalten und somit aktiviert werden kann (Kudo et al., 2007; Bernardo and Fridman, 2003; Kinoshita et al., 1998). Nach Abspaltung des Propeptides reduziert sich die Masse der aktiven MMP um ca. 8-10 kDa im Vergleich zur Pro-Form (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005; Ratnikov et al., 2002; Park et al., 1991). Da im Western Blot nur die Pro-Form der MMP-2 durch den Antikörper detektiert werden konnte, erfolgte im Rahmen dieser Studie eine zymographische Untersuchung des Glaskörpermaterials (Kapitel 4.5.2). Diese Methode ist dem Western Blot im Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen an Sensitivität überlegen (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005; Descamps et al., 2002). Durch Gelatin-Zymographie ergibt sich die Möglichkeit, die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 im Probenmaterial aufgrund ihrer gelatinolytischen Aktivität zu detektieren und zwischen der aktiven und der Pro-Form zu unterscheiden (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005; Hawkes et al., 2001). Bei dieser Nachweismethode muss allerdings bedacht werden, dass die beobachtete gelatinolytische Aktivität des Pro-Enzyms nur durch die SDS- bedingte Aktivierung (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005; Kleiner and Stetler-Stevenson, 1994; Springman et al., 1990) im Rahmen der SDS-PAGE zustande kommt und keine enzymatische Aktivität der Pro-Form *in vivo* impliziert. Auch liegen die zu detektierenden aktiven MMP-Formen *in vivo* oft in Verbindung und unter der Kontrolle ihrer spezifischen Inhibitoren, den TIMPs, vor, von denen sie durch die SDS-PAGE getrennt werden, was ebenfalls in der Beurteilung der Ergebnisse

mitberücksichtigt werden sollte (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1994). Die Detektion von Pro-MMP-2 in allen hier untersuchten Glaskörperproben (Abb. 4.10) lässt sich durch die im Vergleich zum Western Blot höhere Sensitivität der Zymographie (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005; Shimokawa et al., 2003; Descamps et al., 2002) erklären. Auch scheint das Signal in den Glaskörperproben der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt zu sein als in den Proben der an ERU erkrankten Tiere und deckt sich somit mit den Ergebnissen des Western Blots. Eine densitometrische Analyse der Pro-MMP-2 Zymographie Signale muss hier noch durchgeführt werden, um Gewissheit zu schaffen (Leber and Balkwill, 1997). Da die aktivierte Form von MMP-2 sowohl in den Glaskörperproben der an ERU erkrankten als auch in denen der Kontrollpferde zu finden war, kann eine Regulation der MMP-2 Aktivität im Kontext mit dem differenziell exprimierten Inhibitor TIMP-2 (Tab 4.3) vermutet werden. Die MMP-2 hemmende Wirkung des im Glaskörper exprimierten TIMP-2 konnte in einer reversen Zymographie (Kapitel 4.6.3 und 3.9.2) demonstriert werden. Hier wurde eine Hemmung der gelatinolytischen Aktivität von rekombinantem MMP-2 auf einer für equines TIMP-2 beschriebenen Höhe von ca. 21 kDa (Riley et al., 2001; Clegg et al., 1998) detektiert (Abb.4.16). Die Hemmungsaktivität des in den uveitischen Glaskörpern exprimierten TIMP-2 war im Vergleich mit der MMP-2-Hemmungsaktivität der Kontrollglaskörperproben deutlich vermindert (Abb.4.16). Auch wenn die Funktion von TIMP-2 im Pferdeauge noch nicht geklärt ist, stellt der eindeutige Rückgang der Expression in den Glaskörperproben (Tab 4.3 und Abb. 4.14) und in der Retina (Abb.4.15) der an ERU erkrankten Pferde einen bedeutenden Befund dar.

Neben seiner Aufgabe bei der Regulation der MMP-2 Aktivität (Kudo et al., 2007; Butler et al., 1998; Kinoshita et al., 1998) sind für TIMP-2 noch weitere Funktionen beschrieben. So wird für TIMP-2 bei ischämischer ZNS-Schädigung eine neuroprotektive Wirkung postuliert (Magnoni et al., 2007), was in Bezug auf die TIMP-2 Expression in der neuronalen Retina gesunder Pferdeaugen (Abb. 4.15c) besonders von Interesse ist. Eine ebenfalls erwähnenswerte Komponente der TIMP-2 Funktion ist seine beschriebene hemmende Wirkung auf proliferierende und migrierende Endothelzellen, was TIMP-2 zu einem antiangiogenetischen Faktor macht (Stetler-Stevenson, 2008; Oh et al., 2004). Diese Funktion ist nicht MMP-assoziiert, sondern beruht vielmehr auf der Bindung des TIMP-2 Moleküls an einen $\alpha 3$ - $\beta 1$ -Integrinrezeptor (Stetler-Stevenson, 2008; Stetler-Stevenson and Seo,

2005), weswegen die Expression dieses Rezeptors in der Retina auch in Verbindung mit der ERU interessant sein dürfte. In Bezug auf die T-Zell medierte Pathogenese der ERU könnte TIMP-2 durch seine beschriebene apoptotische Wirkung auf aktivierte periphere T-Lymphozyten (Lim et al., 1999) an der Wahrung des Immunprivilegs des Auges beteiligt sein, so dass durch den Rückgang der TIMP-2 Expression in den uveitischen Retinae und Glaskörpern die Migration autoaggressiver T-Zellen ins Auge erleichtert werden könnte. Für die Pathogenese der ERU interessant ist die im Zuge des Gelatin-Zymographie Experiments zum ersten Mal im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesene Expression von MMP-9 (Kapitel 4.5.2). Eine differenzielle Expression von MMP-9 wurde auch schon in Glaskörpern von an Uveitis erkrankten Menschen beschrieben (Di Girolamo et al., 1996). Eine andere Studie beschreibt eine positive Korrelation des Vorkommen von MMP-9 im Kammerwasser mit dem klinisch erhobenen Schweregrad der Uveitis (Descamps et al., 2008).

MMP-9 lag in einigen uveitischen Pferdeglaskörperproben sowohl in der Pro-Form als auch teilweise in aktiviertem Zustand vor (Abb. 4.10). Dies stellt besonders in Zusammenhang mit dem Erkrankungsstadium der Tiere einen interessanten Aspekt dar und sollte anhand von vergleichenden Studien zwischen uveitischen Glaskörperproben von Tieren mit aktivem Uveitisschub und Tieren in der Ruhephase der ERU überprüft werden. Funktional für MMP-9 könnte das gleichzeitig in den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden erhöht exprimierte Protein LCN2 von Bedeutung sein, für das eine stabilisierende Wirkung auf die Proteinaseaktivität von MMP-9 nachgewiesen werden konnte (Gupta et al., 2007; Kubben et al., 2007). In Bezug auf die MMP-9 Aktivität ist auch die gegenläufige Regulation des mit MMP-9 assoziierten Inhibitors TIMP-1 (O'Connell et al., 1994) in den uveitischen Glaskörpern (Tab. 4.3) auffallend. Ebenfalls erwähnenswert ist die MMP-9 Expression in der Pferderetina. Während MMP-9 fast im gesamten gesunden retinalen Gewebe, und dort vor allem in den Photorezeptoren nachweisbar war, ging die Expression in der Erkrankung praktisch vollständig zurück und war nur noch an rundlichen Strukturen choroidal der äußeren Körnerschicht detektierbar (Abb. 4.17f). Dies wäre aufgrund der vermuteten Beteiligung der MMP-9 an der Zerstörung der retinalen Strukturen eher gegenläufig zu erwarten gewesen. Des Weiteren zeigte sich nur eine geringe Kolokalisation von MMP-9 und des mit ihm funktionell assoziierten (Gupta et al., 2007; Kubben et al., 2007) LCN2 in der gesunden Retina (Abb.4.17g), deren

Expressions-Überschneidungen in der uveitischen Retina wiederum nur auf die Orte der Restexpression von MMP-9 auf den oben beschriebenen rundlichen Strukturen beschränkt war (Abb. 4.17h), welche noch weiter charakterisiert werden müssen. Aufgrund der nicht mehr existenten Expression von MMP-9 im erkrankten retinalen Gewebe, muss eine andere Quelle für das nachgewiesene MMP-9 im uveitischen Glaskörper vermutet werden. Da sowohl Makrophagen (Matsumoto et al., 2009; Goetzl et al., 1996) und, wenn auch in geringerem Umfang, T-Zellen MMP-9 sezernieren um ihren Übertritt durch Basalmembranen zu bewerkstelligen und Gewebe zu infiltrieren (Goetzl et al., 1996), könnten diese Immunzellen die Quelle von MMP-9 darstellen. Sowohl T-Zellen (Deeg et al., 2002a), als auch Makrophagen (Zipplies et al., 2010b; Deeg et al., 2002a) sind in an ERU erkrankten Augen regelmäßig nachweisbar. Die pro-invasive Funktion der Matrix-Metalloproteinasen könnte auch mit dem für die Progression der ERU zentralen Zusammenbrechen der Blut-Retina-Schranke zusammenhängen, wobei ein auf der Proteolyse des Tight Junction Proteins Occludin durch MMP-2 und MMP-9 beruhender Alterationsmechanismus der Blut-Retina-Schranke bereits für die diabetische Retinopathie postuliert wurde (Giebel et al., 2005). Auch sind MMP-9 und MMP-2 die wichtigsten Enzyme für den Übertritt von Lymphozyten durch Basalmembranen (Goetzl et al., 1996) und es konnte bereits eine Rolle von MMP-2 bei der Migration autoreaktiver T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke in experimenteller autoimmuner Enzephalitis (Graesser et al., 2000) festgestellt werden, was in Bezug auf die T-Zell medierte autoimmune Pathogenese der ERU (Deeg et al., 2008; Deeg et al., 2006b; Deeg et al., 2002a) interessant ist und deswegen weiter verfolgt werden sollte.

Das veränderte Expressionsmuster und die verstärkte Expression der MMP-2 in der Retina von an ERU erkrankten Pferden (Kapitel 4.5.1) impliziert eine Beteiligung der für die Aktivierung von MMP-2 essenziellen Proteine MMP-14 und TIMP-2 (Kudo et al., 2007; Butler et al., 1998; Kinoshita et al., 1998). Um eine Beteiligung der TIMP-2/MMP-14/MMP-2 Achse an der Pathogenese der ERU zu eruieren, wurde die Expression von MMP-14 (Kapitel 4.5.4) und TIMP-2 (Kapitel 4.6.1) ebenfalls in der Pferderetina untersucht. Sowohl TIMP-2 (Abb. 4.15), als auch MMP-14 (Abb. 4.13), für die zum ersten Mal eine Expression in der Pferderetina nachgewiesen werden konnte (PubMed Recherche März 2010), zeigten eine Expression in der Photorezeptorschicht der gesunden Pferderetina und waren in den uveitischen Retinae fast nicht mehr detektierbar. Die Koexpression der in der MMP-2 Aktivierung

funktionellen Faktoren TIMP-2 und MMP-14 (Bernardo and Fridman, 2003) zusammen mit MMP-2 (Abb. 4.20i) impliziert eine Beteiligung des MMP-2 Regulationskreises an der Aufrechterhaltung der Strukturintegrität dieses Retinaabschnittes. Imbalancen in der TIMP-2/MMP-14/MMP-2 Achse könnten somit der Gewebeerstörung zu Grunde liegen. Die Vermutung eines aus dem Ruder gelaufenen Regulationsmechanismus wird durch die gegenläufige Expression von MMP-2 und TIMP-2/MMP-14 in der uveitischen Retina noch gestärkt (Abb. 4.20j). Basierend auf der differenziellen Expression und teilweise gegenläufigen Regulierung verschiedener, mit den Matrix-Metalloproteinasen-2 und 9 funktionell assoziierter Proteine lässt sich eine Imbalance zwischen Matrix-Metalloproteinasen und hemmenden Faktoren als grundlegend an der fortschreitenden Gewebeschädigung im Verlauf der ERU beteiligter Mechanismus postulieren.

Zur weiteren Klärung dieser Hypothese ist ein vergleichender Nachweis der Matrix-Metalloproteinaseaktivität zwischen gesunder und von ERU betroffener Pferderetina durch eine Zymographie geplant. Durch eine *in situ* Zymographie (George and Johnson, 2001; Mungall and Pollitt, 2001) könnte im Weiteren die Retina von an ERU erkrankten Pferden auf eine Lokalisation von aktiver MMP-2 in Arealen mit starker Gewebeerstörung hin untersucht werden, was Hinweise auf eine aktive Beteiligung dieser Proteinase an der zur Erblindung führenden Zerstörung der Retina bei ERU liefern könnte. Aber auch der Bezug der in der gesunden Pferderetina exprimierten Proteine MMP-2 und MMP-14 (Abb.4.20c) zu den ebenfalls in gesundem retinalen Gewebe nachgewiesenen Proteinen des Wnt-Signalweges SFRP-2 und Wnt3a (Abb. 4.18g) ist aufgrund der Ko-Expression der Proteine beider funktionellen Gruppen in der Photorezeptorschicht (Abb.4.20c und Abb. 4.18g) interessant.

Hinweise auf mögliche Signaleffekte zwischen dem Wnt-Signalweg und den Matrix-Metalloproteinasen sind bereits beschrieben (Karow et al., 2009; Roth et al., 2000) . Für Glioma-Zellen konnte ein mit verstärkter SFRP-2-Expression korrelierender Rückgang der MMP-2 Expression nachgewiesen werden (Roth et al., 2000). Wnt3a zeigte in Versuchen mit mesenchymalen Stammzellen von Mäusen einen negativen Effekt auf die Expression von MMP-14, steigerte jedoch die MMP-14 Expression in Versuchen mit humanen mesenchymalen Stammzellen (Karow et al., 2009). Um einen potenziellen synergistischen oder antagonistischen Effekt der in der ERU differenziell exprimierten Proteine des Wnt-Signalwegs (Abb. 21 D) auf die hier erstmalig nachgewiesenen Matrix-Metalloproteinasen (Abb. 21 A) weiter zu

untersuchen, könnten Zellproliferationsversuche mit rekombinanten Proteinen beider Gruppen durchgeführt werden. Der funktionelle Zusammenhang zwischen Wnt-Signalweg und MMPs ist aus der in dieser Arbeit durchgeführten Interaktions-Analyse nicht ersichtlich, was auf die bisher noch geringe Datengrundlage zurückzuführen ist. Diese Interaktions-Analyse wurde durchgeführt, um Pathogenese assoziierte Protein-Interaktionsnetzwerke in der ERU zu identifizieren. Hierzu wurden die im Glaskörper differenziell exprimierten Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden (Tab. 4.2, 4.3 und Abb. 4.10), zusammen mit den in der Pferderetina differenziell exprimierten Proteinen MMP-14 (Abb. 4.13) und Wnt3a (Abb. 4.3) einer datenbankbasierten Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk-Analyse unterzogen (Abb. 4.21). Aufgrund der dort verfügbaren Daten zu über 50 Millionen Protein-Protein Interaktionen (Jensen et al., 2009) wurde die STRING-Datenbank zur Auswertung herangezogen (<http://string.embl.de/>, frei zugänglich, Version 8.2). Hiermit konnte in dieser Arbeit erstmals ein systematischer Überblick über die funktionellen Zusammenhänge der im Pferdeglaskörper bei ERU differenziell exprimierten Proteine geschaffen werden.

Vier über ihre Funktion assoziierte biologische Proteingruppen fallen besonders auf (Abb. 4.21, A bis D). Allen voran die mit den Mitgliedern der Matrix-Metalloproteinasefamilie assoziierten Proteine, deren Vertreter sich um das zentrale, und im Rahmen dieser Arbeit bedeutsame Protein MMP-2 formieren (Abb. 4.21 A), und deren differenzielle Expression in Zusammenhang mit der ERU in dieser Arbeit das erste Mal beschrieben wird. Des Weiteren eine mit dem Zelladhäsionsprotein Fibronectin funktionell verbundene Gruppe (Abb. 4.21 B), bei der sofort die verminderte Expression sämtlicher assoziierter Proteine in den Glaskörpern der an ERU erkrankten Pferde auffällt. Im Gegensatz dazu ist in der Gruppe der mit Gerinnungsfaktor II assoziierten Plasmaproteine die Expression mehrerer Mitglieder in der ERU erhöht (Abb. 4.21 C). Eine weitere kleine Gruppe an Interaktoren besteht aus den Proteinen des Wnt-Signalweges SFRP-2 und Wnt3a (Abb. 4.21 D), die basierend auf der Analyse durch STRING 8.2¹⁵⁷ keine funktionelle Verbindung zu den anderen Proteingruppen aufweist. Diese Lücke konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschriebene Assoziation von A2M mit SFRP-2 geschlossen, und so für A2M eine funktionelle Assoziation mit allen vier Protein-Gruppen (Abb. 4.21 E) gezeigt werden. Jedoch ist eine Datenbank nur so gut und aktuell wie die

¹⁵⁷ <http://string.embl.de/>

dort verfügbaren Informationen (siehe <http://string.embl.de/>, frei zugänglich). Da in die STRING-Datenbank noch keine Pferdeproteindaten integriert sind, muss bei der PPI-Netzwerkanalyse bedacht werden, dass alle angegebenen Interaktionen auf Daten zu humanen Proteinen basieren und somit nicht direkt auf die PPI-Verhältnisse beim Pferd übertragen werden können. Dieser Nachteil zeigt sich schon in der nicht möglichen Einspeisung pferdespezifischer Gennamen (Tab. 4.5a), die somit nicht in das PPI-Interaktionsnetzwerk integriert werden konnten. Im Zuge der ständigen Verbesserung von Datenbanken und dem weltweiten exponentiellen Wissenszuwachs in der proteomischen Forschung, sollten diese bestehenden Nachteile bald behoben, und somit Spezies spezifische PPI-Analysen auch für das Pferd möglich werden.

Ferner wurden bei der Erstellung dieser PPI-Netzwerkanalyse bewusst keine auf der Option Textmining (siehe <http://string.embl.de/>, frei zugänglich) basierenden Interaktionsdaten zugelassen und ein Aussagewahrscheinlichkeitswert für die Richtigkeit der vorhergesagten Interaktion von 0,6 gewählt (siehe <http://string.embl.de/>, frei zugänglich). Dies erhöht die Zuverlässigkeit der im PPI-Netzwerk dargestellten funktionalen Proteinassoziationen, birgt aber den Nachteil, dass so potenziell interessante Verbindungen mit nur schwacher Datengrundlage übersehen werden.

Zusammenfassend konnten in dieser proteomisch vergleichenden Studie des Glaskörperproteoms von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu Gesunden durch LC-MS/MS Analyse etliche differenzielle, im Zusammenhang mit Uveitis bisher unbeschriebene Proteine erfolgreich identifiziert werden. Des Weiteren wurden mittels SF-TAP für das Protein SFRP-2 mehrere bislang unbekannte Interaktoren, unter anderem A2M, identifiziert und im Fall von A2M näher charakterisiert. Vor allem die mit MMP-2 und MMP-9 funktionell assoziierten Proteine sowie Osteopontin, SFRP-2 und A2M verdienen in Zukunft weitere Untersuchungen zur Charakterisierung ihrer Funktion bei der Pathogenese der autoimmunen rezidivierenden Uveitis.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine häufige (10%), spontane, immunmedierte, wiederkehrende Entzündung des inneren Pferdeauges, die letztendlich zur Erblindung des betroffenen Auges führt. Neben ihrer Bedeutung für die Veterinärmedizin stellt die ERU das einzige spontane Tiermodell für die autoimmunmedierte Uveitis des Menschen dar, so dass Fortschritte in der Erforschung der ERU auch einen Beitrag für ein besseres Verständnis dieser Erkrankung beim Menschen leisten.

Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen am Zielorgan, die zur Entstehung der ERU und den rezidivierenden Entzündungsschüben führen, sind bis heute nicht geklärt. Durch seinen unmittelbaren Kontakt zur Retina ermöglicht der Glaskörper einen indirekten Einblick auf die in der Retina ablaufenden pathophysiologischen Prozesse und stellt ein wertvolles Probenmaterial bei der Erforschung vitreoretinaler Erkrankungen wie der ERU dar. Ziel dieser Arbeit war es, Pathogenese assoziierte Glaskörperproteine und deren funktionelle Interaktionsnetzwerke in der ERU zu identifizieren und zu analysieren. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 119 Glaskörperproteine mittels LC-MS/MS identifiziert. Hiervon konnte durch eine Label-free Quantifizierung für 79 Proteine eine differenzielle Expression nachgewiesen werden. 17 Proteine zeigten eine signifikant erhöhte Expression in den Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden, wohingegen 62 Proteine in ihrer Expression vermindert waren. Durch die mit der Software STRING (Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins) durchgeführte Protein-Interaktionsnetzwerk-Analyse konnten vier Cluster von Proteinen identifiziert werden, die bei der ERU verändert exprimiert werden. Neben einer Gruppe von Plasmaproteinen, einer aus Zelladhäsions-Proteinen bestehenden Gruppe und Proteinen des Wnt-Signalweges wurde erstmalig eine funktionell mit den Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 assoziierte Gruppe identifiziert, für deren Vertreter ebenfalls eine differenzielle Expression in der Pferderetina nachgewiesen wurde. Der Wnt-Inhibitor SFRP-2 war in den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden vermindert nachweisbar und zeigte eine Assoziation mit der Expression seines Interaktors Wnt3a in der gesunden Pferderetina. Mit A2M konnte durch SF-TAP Aufreinigung ein bislang unbekannter Interaktor für SFRP-2 identifiziert und in Bezug zur ERU weiter charakterisiert

werden. Für das Protein Osteopontin konnte eine signifikant erhöhte Expression in den Glaskörperproben und Retinae der Kontrollpferde nachgewiesen werden.

Rückblickend erwies sich die Protein-Netzwerkanalyse der durch LC-MS/MS identifizierten, differenziell exprimierten Proteine als geeignete Methode, um Pathogenese assoziierte Glaskörperproteine und deren funktionelle Interaktionsnetzwerke in der ERU zu identifizieren und zu analysieren. Weitere Experimente sind nun notwendig, um die funktionelle Bedeutung der neu identifizierten Proteine und der mit ihnen assoziierten Signalwege in der ERU zu evaluieren.

7 SUMMARY

Equine recurrent uveitis (ERU) is a devastating immune mediated inflammation targeting the inner eye, ultimately leading to blindness in the affected animals. The widespread disease (10%) is characterized by recurring episodes of inflammation interrupted by quiescent stages. The underlying mechanisms triggering the onset of the disease as well as the precise factors involved in the recurring episodes have yet to be identified. Besides its impact on veterinary medicine, ERU represents the only spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. Therefore, knowledge gained by studying the pathogenesis of ERU does contribute to a better understanding of the factors involved in human disease.

Since the vitreous is directly adjacent to the retina, this compartment facilitates the indirect exploration of ongoing disease related events in the retina. Therefore the vitreous has proven to be a very valuable sample when studying vitreoretinal diseases like ERU.

The aim of this study was the identification and quantification of differentially expressed proteins in the vitreous of horses suffering from ERU in comparison to unaffected control animals, enabling the identification of ERU-related functional protein-networks and affiliated molecular signalling pathways through protein network analysis. This task was accomplished using LC-MS/MS based label-free quantification followed by protein-network analysis with the Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING). A total of 119 vitreous proteins were identified of which 17 were found to be upregulated during ERU and 62 showed a decreased expression in samples derived from diseased animals. The protein-network analysis led to the identification of four functional protein clusters, in which changes in protein expression occurred in ERU. Apart from a group of plasma derived proteins, a group of proteins related to cell adhesion as well as proteins from the Wnt-signaling pathway, a yet undescribed pathway for ERU involving the Matrix-Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and their specific inhibitor TIMP-2 stood out. For the proteins associated with the latter cluster, a differential expression was also shown in the target tissue of ERU, the retina. A decreased expression of the canonical Wnt-signalling inhibitor, SFRP-2, was also detected in ERU vitreous. SFRP-2 expression was successfully linked to the expression of its interactor Wnt3a in the healthy retina. Furthermore, a yet unknown interactor for SFRP-2, A2M, was

identified using SF-TAP pull-down and was successfully validated by confirming co-expression and differential regulation of both proteins in equine retina. Surprisingly, a described enhancer of inflammation in uveitis, Osteopontin, was only detected in healthy vitreous and retina.

In conclusion, LC-MS/MS followed by protein-network analysis has proven to be a suitable tool for analyzing differentially expressed proteins and their associated pathways in the vitreous of horses suffering from ERU. Further experiments are needed to evaluate the functional impact of the newly discovered proteins and their associated pathways on ERU pathogenesis.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abel B., Kurrer M., Shamshiev A., Marty R. R., Eriksson U., Gunthert U. and Kopf M. (2006) The osteopontin - CD44 pathway is superfluous for the development of autoimmune myocarditis. *Eur J Immunol* **36**, 494-9.
- Abu El-Asrar A. M., Struyf S., Descamps F. J., Al-Obeidan S. A., Proost P., Van Damme J., Opdenakker G. and Geboes K. (2004) Chemokines and gelatinases in the aqueous humor of patients with active uveitis. *Am J Ophthalmol* **138**, 401-11.
- Agarwal R. K. and Caspi R. R. (2004) Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Methods Mol Med* **102**, 395-419.
- Agathocleous M., Iordanova I., Willardsen M. I., Xue X. Y., Vetter M. L., Harris W. A. and Moore K. B. (2009) A directional Wnt/beta-catenin-Sox2-proneural pathway regulates the transition from proliferation to differentiation in the Xenopus retina. *Development* **136**, 3289-99.
- Agnihotri R., Crawford H. C., Haro H., Matrisian L. M., Havrda M. C. and Liaw L. (2001) Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem* **276**, 28261-7.
- Ahn J. K., Chung H. and Yu H. G. (2005) Vitrectomy for persistent panuveitis in Behcet's disease. *Ocul Immunol Inflamm* **13**, 447-53.
- Ahrne E., Muller M. and Lisacek F. (2009) Unrestricted identification of modified proteins using MS/MS. *Proteomics* **10**, 671-686.
- Albrethsen J., Knol J. C., Piersma S., Pham T. V., de Wit M., Mongera S., Carvalho B., Verheul H. M., Fijneman R. J., Meijer G. A. and Jimenez C. R. (2010) Sub-nuclear proteomics in colorectal cancer: Identification of proteins enriched in the nuclear matrix fraction and regulation in adenoma to carcinoma progression. *Mol Cell Proteomics*.
- Altmann F. (2007) Differenzielle Expression von Proteinen im Glaskörper gesunder und an ERU erkrankter Pferde. *Inaugural Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Amadi-Obi A., Yu C. R., Liu X., Mahdi R. M., Clarke G. L., Nussenblatt R. B., Gery I., Lee Y. S. and Egwuagu C. E. (2007) TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* **13**, 711-8.
- Amaratunga A., Abraham C. R., Edwards R. B., Sandell J. H., Schreiber B. M. and Fine R. E. (1996) Apolipoprotein E is synthesized in the retina by Muller glial cells, secreted into the vitreous, and rapidly transported into the optic nerve by retinal ganglion cells. *J Biol Chem* **271**, 5628-32.
- Apweiler R., Aslanidis C., Deufel T., Gerstner A., Hansen J., Hochstrasser D., Kellner R., Kubicek M., Lottspeich F., Maser E., Mewes H. W., Meyer H. E., Mullner S., Mutter W., Neumaier M., Nollau P., Nothwang H. G., Ponten F., Radbruch A., Reinert K., Rothe G., Stockinger H., Tarnok A., Taussig M. J., Thiel A., Thiery J., Ueffing M., Valet G., Vandekerckhove J., Verhuven W., Wagener C., Wagner O. and Schmitz G. (2009) Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in fluid proteomics. *Clin Chem Lab Med* **47**, 724-44.
- Arbelaez L. F., Bergmann U., Tuuttila A., Shanbhag V. P. and Stigbrand T. (1997) Interaction of matrix metalloproteinases-2 and -9 with pregnancy zone protein and alpha2-macroglobulin. *Arch Biochem Biophys* **347**, 62-8.
- Ashkar S., Weber G. F., Panoutsakopoulou V., Sanchirico M. E., Jansson M., Zawaideh S., Rittling S. R., Denhardt D. T., Glimcher M. J. and Cantor H. (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* **287**, 860-4.

- Atkins K., Berry J. E., Zhang W. Z., Harris J. F., Chambers A. F., Simpson R. U. and Somerman M. J. (1998) Coordinate expression of OPN and associated receptors during monocyte/macrophage differentiation of HL-60 cells. *J Cell Physiol* **175**, 229-37.
- Baarsma G. S., Priem H. A. and Kijlstra A. (1990) Association of birdshot retinochoroidopathy and HLA-A29 antigen. *Curr Eye Res* **9 Suppl**, 63-8.
- Bahk S. C., Jang J. U., Choi C. U., Lee S. H., Park Z. Y., Yang J. Y., Kim J. D., Yang Y. S. and Chung H. T. (2007) Post-translational modification of crystallins in vitreous body from experimental autoimmune uveitis of rats. *J Proteome Res* **6**, 3891-8.
- Baker A. H., Edwards D. R. and Murphy G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* **115**, 3719-27.
- Balazs E. A. (1973) Fine structure and function of ocular tissues. The vitreous. *Int Ophthalmol Clin* **13**, 169-87.
- Bansal R., Gupta V. and Gupta A. (2010) Current approach in the diagnosis and management of panuveitis. *Indian J Ophthalmol* **58**, 45-54.
- Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J. and Kuster B. (2007) Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* **389**, 1017-31.
- Barrett A. J., Brown M. A. and Sayers C. A. (1979) The electrophoretically 'slow' and 'fast' forms of the alpha 2-macroglobulin molecule. *Biochem J* **181**, 401-18.
- Becker M. and Davis J. (2005) Vitrectomy in the treatment of uveitis. *Am J Ophthalmol* **140**, 1096-105.
- 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.
- Becker M. D., Harsch N., Zierhut M., Davis J. L. and Holz F. G. (2003) [Therapeutic vitrectomy in uveitis: current status and recommendations]. *Ophthalmologe* **100**, 787-95.
- Becker M. D., Smith J. R., Max R. and Fiehn C. (2005) Management of sight-threatening uveitis: new therapeutic options. *Drugs* **65**, 497-519.
- Bernardo M. M. and Fridman R. (2003) TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J* **374**, 739-45.
- Bertazzoli-Filho R., Laicine E. M. and Haddad A. (2003) Synthesis and secretion of transferrin by isolated ciliary epithelium of rabbit. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 820-5.
- Bisaro de Lorenc L., Ramos A. M., Sanchez M. C., Montenegro R. and Chiabrando G. A. (2005) Structural evaluation of plasma alpha2-macroglobulin in acute pancreatitis. *Clin Chem Lab Med* **43**, 1183-9.
- Bishop P. N. (2000) Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res* **19**, 323-44.
- Bishop P. N., Takanosu M., Le Goff M. and Mayne R. (2002) The role of the posterior ciliary body in the biosynthesis of vitreous humour. *Eye (Lond)* **16**, 454-60.
- Bodaghi B., Cassoux N., Wechsler B., Hannouche D., Fardeau C., Papo T., Huong D. L., Piette J. C. and LeHoang P. (2001) Chronic severe uveitis: etiology and visual outcome in 927 patients from a single center. *Medicine (Baltimore)* **80**, 263-70.
- Bolignano D., Donato V., Lacquaniti A., Fazio M. R., Bono C., Coppolino G. and Buemi M. (2010) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene. *Cancer Lett* **288**, 10-6.

- Bonacci G. R., Caceres L. C., Sanchez M. C. and Chiabrando G. A. (2007) Activated alpha(2)-macroglobulin induces cell proliferation and mitogen-activated protein kinase activation by LRP-1 in the J774 macrophage-derived cell line. *Arch Biochem Biophys* **460**, 100-6.
- Bonfioli A. A. and Orefice F. (2005a) Behcet's disease. *Semin Ophthalmol* **20**, 199-206.
- Bonfioli A. A. and Orefice F. (2005b) Sarcoidosis. *Semin Ophthalmol* **20**, 177-82.
- Borregaard N. and Cowland J. B. (2006) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein. *Biometals* **19**, 211-5.
- Borth W. (1992) Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J* **6**, 3345-53.
- Bovolenta P., Esteve P., Ruiz J. M., Cisneros E. and Lopez-Rios J. (2008) Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* **121**, 737-46.
- Bovolenta P., Rodriguez J. and Esteve P. (2006) Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development* **133**, 4399-408.
- 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**, 248-54.
- 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**, 270-5.
- Brandt C., Pavlovic V., Radbruch A., Worm M. and Baumgrass R. (2009) Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. *Allergy* **64**, 1588-96.
- Brinkman C. J., Otto A. J., Kijlstra A. and Breebaart A. C. (1990) The influence of vitrectomy and lensectomy on experimental uveitis. *Curr Eye Res* **9 Suppl**, 125-30.
- Brown P. D., Levy A. T., Margulies I. M., Liotta L. A. and Stetler-Stevenson W. G. (1990) Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res* **50**, 6184-91.
- Butler G. S., Butler M. J., Atkinson S. J., Will H., Tamura T., Schade van Westrum S., Crabbe T., Clements J., d'Ortho M. P. and Murphy G. (1998) The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* **273**, 871-80.
- Cao Z., Dai J., Fan K., Wang H., Ji G., Li B., Zhang D., Hou S., Qian W., Zhao J. and Guo Y. (2008) A novel functional motif of osteopontin for human lymphocyte migration and survival. *Mol Immunol* **45**, 3683-92.
- Carastro S. M. (2004) Equine ocular anatomy and ophthalmic examination. *Vet Clin North Am Equine Pract* **20**, 285-99.
- Caspi R. R. (2003) Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 15**, Unit 15 6.
- Caspi R. R., Chan C. C., Wiggert B. and Chader G. J. (1990) The mouse as a model of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Curr Eye Res* **9 Suppl**, 169-74.
- 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**, 1490-5.
- Caspi R. R., Roberge F. G., McAllister C. G., el-Saied M., Kuwabara T., Gery I., Hanna E. and Nussenblatt R. B. (1986) T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J Immunol* **136**, 928-33.

- Caspi R. R., Silver P. B., Luger D., Tang J., Cortes L. M., Pennesi G., Mattapallil M. J. and Chan C. C. (2008) Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* **40**, 169-74.
- Catalan V., Gomez-Ambrosi J., Rodriguez A., Ramirez B., Silva C., Rotellar F., Gil M. J., Cienfuegos J. A., Salvador J. and Fruhbeck G. (2009) Increased adipose tissue expression of lipocalin-2 in obesity is related to inflammation and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities in humans. *J Mol Med* **87**, 803-13.
- Caterina J. J., Yamada S., Caterina N. C., Longenecker G., Holmback K., Shi J., Yermovsky A. E., Engler J. A. and Birkedal-Hansen H. (2000) Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2(Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. *J Biol Chem* **275**, 26416-22.
- Chan Y. R., Liu J. S., Pociask D. A., Zheng M., Mietzner T. A., Berger T., Mak T. W., Clifton M. C., Strong R. K., Ray P. and Kolls J. K. (2009) Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against Klebsiella infection. *J Immunol* **182**, 4947-56.
- Chen G. and Pramanik B. N. (2008) LC-MS for protein characterization: current capabilities and future trends. *Expert Rev Proteomics* **5**, 435-44.
- Chen Y., Hu Y., Moiseyev G., Zhou K. K., Chen D. and Ma J. X. (2009) Photoreceptor degeneration and retinal inflammation induced by very low-density lipoprotein receptor deficiency. *Microvasc Res* **78**, 119-27.
- Christensen B., Kazanekki C. C., Petersen T. E., Rittling S. R., Denhardt D. T. and Sorensen E. S. (2007) Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J Biol Chem* **282**, 19463-72.
- Chu C. T. and Pizzo S. V. (1994) alpha 2-Macroglobulin, complement, and biologic defense: antigens, growth factors, microbial proteases, and receptor ligation. *Lab Invest* **71**, 792-812.
- Clegg P. D., Coughlan A. R. and Carter S. D. (1998) Equine TIMP-1 and TIMP-2: identification, activity and cellular sources. *Equine Vet J* **30**, 416-23.
- Clutterbuck A. L., Harris P., Allaway D. and Mobasher A. (2010) Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *Vet J* **183**, 27-38.
- Cook C. S., Pfeiffer R. L. and Harling D. E. (1983) Equine recurrent Uveitis. *Equine Vet J Suppl.* **2**, 57-60.
- Corthals G. L., Wasinger V. C., Hochstrasser D. F. and Sanchez J. C. (2000) The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* **21**, 1104-15.
- Courtwright A., Siamakpour-Reihani S., Arbiser J. L., Banet N., Hilliard E., Fried L., Livasy C., Ketelsen D., Nepal D. B., Perou C. M., Patterson C. and Klauber-Demore N. (2009) Secreted frizzled-related protein 2 stimulates angiogenesis via a calcineurin/NFAT signaling pathway. *Cancer Res* **69**, 4621-8.
- Cowland J. B., Sorensen O. E., Sehested M. and Borregaard N. (2003) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol* **171**, 6630-9.
- Craig R., Cortens J. P. and Beavis R. C. (2004) Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data. *J Proteome Res* **3**, 1234-42.
- Cucullo L., Marchi N., Marroni M., Fazio V., Namura S. and Janigro D. (2003) Blood-brain barrier damage induces release of alpha2-macroglobulin. *Mol Cell Proteomics* **2**, 234-41.
- Damico F. M., Kiss S. and Young L. H. (2005a) Sympathetic ophthalmia. *Semin Ophthalmol* **20**, 191-7.
- Damico F. M., Kiss S. and Young L. H. (2005b) Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Semin Ophthalmol* **20**, 183-90.

- de Kozak Y., Camelo S. and Pla M. (2008) Pathological aspects of spontaneous uveitis and retinopathy in HLA-A29 transgenic mice and in animal models of retinal autoimmunity: relevance to human pathologies. *Ophthalmic Res* **40**, 175-80.
- 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**, 761-97.
- Deeg C. A. (2008) Ocular immunology in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* **11 Suppl 1**, 61-5.
- Deeg C. A. (2009) A proteomic approach for studying the pathogenesis of spontaneous equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Immunol Immunopathol* **128**, 132-6.
- 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**, 1540-8.
- 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**, 652-6.
- 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**, 127-33.
- 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**, 3291-6.
- Deeg C. A., Hauck S. M., Amann B., Pompetzki D., Altmann F., Raith A., Schmalzl T., Stangassinger M. and Ueffing M. (2008) Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res* **40**, 151-3.
- 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**, 393-8.
- Deeg C. A., Marti E., Gaillard C. and Kaspers B. (2004a) Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9. *Equine Vet J* **36**, 73-5.
- 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**, 1462-70.
- Deeg C. A., Raith A. J., Amann B., Crabb J. W., Thurau S. R., Hauck S. M., Ueffing M., Wildner G. and Stangassinger M. (2007c) CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol* **2007**, 39245.
- Deeg C. A., Reese S., Gerhards H., Wildner G. and Kaspers B. (2004b) The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 2286-92.
- 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**, 2598-606.
- Denhardt D. T., Giachelli C. M. and Rittling S. R. (2001a) Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 723-49.
- Denhardt D. T., Noda M., O'Regan A. W., Pavlin D. and Berman J. S. (2001b) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* **107**, 1055-61.
- Descamps F. J., Kangave D., Cauwe B., Martens E., Geboes K., Abu El-Asrar A. and Opdenakker G. (2008) Interphotoreceptor retinoid-binding protein as biomarker in systemic autoimmunity with eye afflictions. *J Cell Mol Med* **12**, 2449-56.
- Descamps F. J., Martens E. and Opdenakker G. (2002) Analysis of gelatinases in complex biological fluids and tissue extracts. *Lab Invest* **82**, 1607-8.

- Di Girolamo N., Verma M. J., McCluskey P. J., Lloyd A. and Wakefield D. (1996) Increased matrix metalloproteinases in the aqueous humor of patients and experimental animals with uveitis. *Curr Eye Res* **15**, 1060-8.
- Dick A. D. (1998) Understanding uveitis through the eyes of a horse: relevance of models of ocular inflammation to human disease. *Ocul Immunol Inflamm* **6**, 211-4.
- Diedrichs-Mohring M., Hoffmann C. and Wildner G. (2008) Antigen-dependent monophasic or recurrent autoimmune uveitis in rats. *Int Immunol* **20**, 365-74.
- Ding H., He Y., Li K., Yang J., Li X., Lu R. and Gao W. (2007) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol* **123**, 227-34.
- Ding L., Hanawa H., Ota Y., Hasegawa G., Hao K., Asami F., Watanabe R., Yoshida T., Toba K., Yoshida K., Ogura M., Kodama M. and Aizawa Y. (2010) Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. *Circ J* **74**, 523-30.
- Dixon S. P., Pitfield I. D. and Perrett D. (2006) Comprehensive multi-dimensional liquid chromatographic separation in biomedical and pharmaceutical analysis: a review. *Biomed Chromatogr* **20**, 508-29.
- Doyle K. P., Yang T., Lessov N. S., Ciesielski T. M., Stevens S. L., Simon R. P., King J. S. and Stenzel-Poore M. P. (2008) Nasal administration of osteopontin peptide mimetics confers neuroprotection in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 1235-48.
- Faber N. A., Crawford M., LeFebvre R. B., Buyukmihci N. C., Madigan J. E. and Willits N. H. (2000) Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J Clin Microbiol* **38**, 2731-3.
- Fernandez C. A., Yan L., Louis G., Yang J., Kutok J. L. and Moses M. A. (2005) The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **11**, 5390-5.
- Flo T. H., Smith K. D., Sato S., Rodriguez D. J., Holmes M. A., Strong R. K., Akira S. and Aderem A. (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**, 917-21.
- Folkesson M., Kazi M., Zhu C., Silveira A., Hemdahl A. L., Hamsten A., Hedin U., Swedenborg J. and Eriksson P. (2007) Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost* **98**, 427-33.
- Forrester J. V. (1991) Uveitis: pathogenesis. *Lancet* **338**, 1498-501.
- Fountoulakis M., Takacs M. F., Berndt P., Langen H. and Takacs B. (1999) Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography. *Electrophoresis* **20**, 2181-95.
- Freese J. L., Pino D. and Pleasure S. J. (2009) Wnt signaling in development and disease. *Neurobiol Dis.*
- Frühauß 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.
- Funatsu H., Yamashita H., Ikeda T., Mimura T., Eguchi S. and Hori S. (2003) Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology* **110**, 1690-6.
- Galli L. M., Barnes T., Cheng T., Acosta L., Anglade A., Willert K., Nusse R. and Burrus L. W. (2006) Differential inhibition of Wnt-3a by Sfrp-1, Sfrp-2, and Sfrp-3. *Dev Dyn* **235**, 681-90.
- Gao B. B., Chen X., Timothy N., Aiello L. P. and Feener E. P. (2008) Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *J Proteome Res* **7**, 2516-25.

- Gao Y. A., Agnihotri R., Vary C. P. and Liaw L. (2004) Expression and characterization of recombinant osteopontin peptides representing matrix metalloproteinase proteolytic fragments. *Matrix Biol* **23**, 457-66.
- 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**, 1294-303.
- Garcia-Ramirez M., Hernandez C., Villarroel M., Canals F., Alonso M. A., Fortuny R., Masmiquel L., Navarro A., Garcia-Arumi J. and Simo R. (2009) Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy. *Diabetologia* **52**, 2633-41.
- George R. K., Chan C. C., Whitcup S. M. and Nussenblatt R. B. (1997) Ocular immunopathology of Behcet's disease. *Surv Ophthalmol* **42**, 157-62.
- George S. J. and Johnson J. L. (2001) In Situ Zymography. *Methods in Molecular Biology, Matrix Metalloproteinase Protocols Volume 151*, 411-415.
- Gerhardinger C., Costa M. B., Coulombe M. C., Toth I., Hoehn T. and Grosu P. (2005) Expression of acute-phase response proteins in retinal Muller cells in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 349-57.
- Gerhards H. and Wollanke B. (2001) Uveitis bei Pferden-Diagnose und Therapie. *Pferdeheilkunde* **17**, 319-329.
- Giachelli C. M., Liaw L., Murry C. E., Schwartz S. M. and Almeida M. (1995) Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* **760**, 109-26.
- Giachelli C. M. and Steitz S. (2000) Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* **19**, 615-22.
- Giebel S. J., Menicucci G., McGuire P. G. and Das A. (2005) Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest* **85**, 597-607.
- 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**, 239-55.
- Gilger B. C. and Michau T. M. (2004) Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract* **20**, 417-27, vii.
- Gilger B. C., Salmon J. H., Wilkie D. A., Cruysberg L. P., Kim J., Hayat M., Kim H., Kim S., Yuan P., Lee S. S., Harrington S. M., Murray P. R., Edelhauser H. F., Csaky K. G. and Robinson M. R. (2006) A novel bioerodible deep scleral lamellar cyclosporine implant for uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 2596-605.
- Gilger B. C., Salmon J. H., Yi N. Y., Barden C. A., Chandler H. L., Wendt J. A. and Colitz C. M. (2008) Role of bacteria in the pathogenesis of recurrent uveitis in horses from the southeastern United States. *Am J Vet Res* **69**, 1329-35.
- Gilger B. C., Wilkie D. A., Davidson M. G. and Allen J. B. (2001) Use of an intravitreal sustained-release cyclosporine delivery device for treatment of equine recurrent uveitis. *Am J Vet Res* **62**, 1892-6.
- Giuliari G. P., Chang P. Y., Thakuria P., Hinkle D. M. and Foster C. S. (2010) Pars plana vitrectomy in the management of paediatric uveitis: the Massachusetts eye research and surgery Institution experience. *Eye (Lond)* **24**, 7-13.

- Gloeckner C. J., Boldt K., Schumacher A., Roepman R. and Ueffing M. (2007) A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics* **7**, 4228-34.
- Gloeckner C. J., Boldt K., Schumacher A. and Ueffing M. (2009a) Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells by the Strep/FLAG (SF)-TAP tag. *Methods Mol Biol* **564**, 359-72.
- Gloeckner C. J., Boldt K. and Ueffing M. (2009b) Strep/FLAG tandem affinity purification (SF-TAP) to study protein interactions. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 19**, Unit19 20.
- Goetzl E. J., Banda M. J. and Leppert D. (1996) Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* **156**, 1-4.
- Goloubinoff P. and De Los Rios P. (2007) The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends Biochem Sci* **32**, 372-80.
- Graesser D., Mahooti S. and Madri J. A. (2000) Distinct roles for matrix metalloproteinase-2 and alpha4 integrin in autoimmune T cell extravasation and residency in brain parenchyma during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **109**, 121-31.
- Gross C., Holler E., Stangl S., Dickinson A., Pockley A. G., Asea A. A., Mallappa N. and Multhoff G. (2008) An Hsp70 peptide initiates NK cell killing of leukemic blasts after stem cell transplantation. *Leuk Res* **32**, 527-34.
- Gupta K., Shukla M., Cowland J. B., Malemud C. J. and Haqqi T. M. (2007) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is expressed in osteoarthritis and forms a complex with matrix metalloproteinase 9. *Arthritis Rheum* **56**, 3326-35.
- Haas I. G. (1994) BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia* **50**, 1012-20.
- Hackam A. S. (2005) The Wnt signaling pathway in retinal degenerations. *IUBMB Life* **57**, 381-8.
- Halfter W., Dong S., Dong A., Eller A. W. and Nischt R. (2008) Origin and turnover of ECM proteins from the inner limiting membrane and vitreous body. *Eye (Lond)* **22**, 1207-13.
- Halfter W., Dong S., Schurer B., Ring C., Cole G. J. and Eller A. (2005) Embryonic synthesis of the inner limiting membrane and vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 2202-9.
- Halliwell R. E. and Hines M. T. (1985) Studies on equine recurrent uveitis. I: Levels of immunoglobulin and albumin in the aqueous humor of horses with and without intraocular disease. *Curr Eye Res* **4**, 1023-31.
- Hanash S. M. (2000) Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. *Electrophoresis* **21**, 1202-9.
- Harocopos G. J., Shui Y. B., McKinnon M., Holekamp N. M., Gordon M. O. and Beebe D. C. (2004) Importance of vitreous liquefaction in age-related cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 77-85.
- 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**, 2121-31.
- Hawkes S. P., Li H. and Taniguchi G. T. (2001) Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. *Methods Mol Biol* **151**, 399-410.
- Heiligenhaus A., Niewerth M., Ganser G., Heinz C. and Minden K. (2007) Prevalence and complications of uveitis in juvenile idiopathic arthritis in a population-based nationwide study in Germany: suggested modification of the current screening guidelines. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 1015-9.

- Heussen C. and Dowdle E. B. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* **102**, 196-202.
- Hikita S. T., Vistica B. P., Jones H. R., Keswani J. R., Watson M. M., Ericson V. R., Ayoub G. S., Gery I. and Clegg D. O. (2006) Osteopontin is proinflammatory in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 4435-43.
- Hines M. T. (1984) Immunologically mediated ocular disease in the horse. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* **6**, 501-12.
- Ho S., Clipstone N., Timmermann L., Northrop J., Graef I., Fiorentino D., Nourse J. and Crabtree G. R. (1996) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* **80**, S40-5.
- Hogan M. J. (1963) The Vitreous, Its Structure, and Relation to the Ciliary Body and Retina. Proctor Award Lecture. *Invest Ophthalmol* **2**, 418-45.
- Holekamp N. M. (2010) The vitreous gel: more than meets the eye. *Am J Ophthalmol* **149**, 32-6.
- Hood L., Heath J. R., Phelps M. E. and Lin B. (2004) Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science* **306**, 640-3.
- Itakura H., Kishi S., Kotajima N. and Murakami M. (2005) Vitreous collagen metabolism before and after vitrectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **243**, 994-8.
- Iwata D., Kitamura M., Kitaichi N., Saito Y., Kon S., Namba K., Morimoto J., Ebihara A., Kitamei H., Yoshida K., Ishida S., Ohno S., Uede T., Onoe K. and Iwabuchi K. (2009) Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA. *Exp Eye Res*.
- Iwata D., Kitamura M., Kitaichi N., Saito Y., Kon S., Namba K., Morimoto J., Ebihara A., Kitamei H., Yoshida K., Ishida S., Ohno S., Uede T., Onoe K. and Iwabuchi K. (2010) Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA. *Exp Eye Res* **90**, 41-8.
- Jakob E., Reuland M. S., Mackensen F., Harsch N., Fleckenstein M., Lorenz H. M., Max R. and Becker M. D. (2009) Uveitis subtypes in a german interdisciplinary uveitis center--analysis of 1916 patients. *J Rheumatol* **36**, 127-36.
- Jan H. J., Lee C. C., Shih Y. L., Hueng D. Y., Ma H. I., Lai J. H., Wei H. W. and Lee H. M. (2010) Osteopontin regulates human glioma cell invasiveness and tumor growth in mice. *Neuro Oncol* **12**, 58-70.
- Jensen L. J., Kuhn M., Stark M., Chaffron S., Creevey C., Muller J., Doerks T., Julien P., Roth A., Simonovic M., Bork P. and von Mering C. (2009) STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* **37**, D412-6.
- Jungblut P. R., Zimny-Arndt U., Zeindl-Eberhart E., Stulik J., Koupilova K., Pleissner K. P., Otto A., Muller E. C., Sokolowska-Kohler W., Grabher G. and Stoffler G. (1999) Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* **20**, 2100-10.
- Kalsow C. M. and Dwyer A. E. (1998) Retinal immunopathology in horses with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* **6**, 239-51.
- Kang. (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **Vol. 23**,
- Kang D., Gho Y. S., Suh M. and Kang C. (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**.

- Karow M., Popp T., Egea V., Ries C., Jochum M. and Neth P. (2009) Wnt signalling in mouse mesenchymal stem cells: impact on proliferation, invasion and MMP expression. *J Cell Mol Med* **13**, 2506-20.
- Kawaguchi T., Hanada A., Horie S., Sugamoto Y., Sugita S. and Mochizuki M. (2007) Evaluation of characteristic ocular signs and systemic investigations in ocular sarcoidosis patients. *Jpn J Ophthalmol* **51**, 121-6.
- Kawano Y. and Kypta R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-34.
- Keller R. L. and Hendrix D. V. (2005) New Surgical Therapies for the Treatment of Equine Recurrent Uveitis. *Clinical Techniques in Equine Practice* **4**, 81-86.
- Kim T., Kim S. J., Kim K., Kang U. B., Lee C., Park K. S., Yu H. G. and Kim Y. (2007) Profiling of vitreous proteomes from proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic patients. *Proteomics* **7**, 4203-15.
- Kinoshita T., Sato H., Okada A., Ohuchi E., Imai K., Okada Y. and Seiki M. (1998) TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem* **273**, 16098-103.
- Kitamura M., Iwabuchi K., Kitaichi N., Kon S., Kitamei H., Namba K., Yoshida K., Denhardt D. T., Rittling S. R., Ohno S., Uede T. and Onoe K. (2007) Osteopontin aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *J Immunol* **178**, 6567-72.
- Kjeldsen L., Johnsen A. H., Sengelov H. and Borregaard N. (1993) Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* **268**, 10425-32.
- Kleiner D. E. and Stetler-Stevenson W. G. (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* **218**, 325-9.
- Kobayashi K., Luo M., Zhang Y., Wilkes D. C., Ge G., Grieskamp T., Yamada C., Liu T. C., Huang G., Basson C. T., Kispert A., Greenspan D. S. and Sato T. N. (2009) Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol* **11**, 46-55.
- Kocher T., Pichler P., Schutzbier M., Stingl C., Kaul A., Teucher N., Hasenfuss G., Penninger J. M. and Mechtler K. (2009) High precision quantitative proteomics using iTRAQ on an LTQ Orbitrap: a new mass spectrometric method combining the benefits of all. *J Proteome Res* **8**, 4743-52.
- Kramer R. (2010) Identifikation differenziell exprimierter Proteine in peripheren Blut-Leukozyten von Pferden mit equiner Rezidivierender Uveitis. *Inaugural Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Kubben F. J., Sier C. F., Hawinkels L. J., Tschesche H., van Duijn W., Zuidwijk K., van der Reijden J. J., Hanemaaijer R., Griffioen G., Lamers C. B. and Verspaget H. W. (2007) Clinical evidence for a protective role of lipocalin-2 against MMP-9 autodegradation and the impact for gastric cancer. *Eur J Cancer* **43**, 1869-76.
- Kudo T., Takino T., Miyamori H., Thompson E. W. and Sato H. (2007) Substrate choice of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is dictated by tissue inhibitor of metalloproteinase-2 levels. *Cancer Sci* **98**, 563-8.
- Kulaber A., Tugal-Tutkun I., Yentur S. P., Akman-Demir G., Kaneko F., Gul A. and Saruhan-Direskeneli G. (2007) Pro-inflammatory cellular immune response in Behcet's disease. *Rheumatol Int* **27**, 1113-8.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Laicine E. M. and Haddad A. (1994) Transferrin, one of the major vitreous proteins, is produced within the eye. *Exp Eye Res* **59**, 441-5.

- Langen H., Takacs B., Evers S., Berndt P., Lahm H. W., Wipf B., Gray C. and Fountoulakis M. (2000) Two-dimensional map of the proteome of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis* **21**, 411-29.
- Le Goff M. M. and Bishop P. N. (2007) Focus on molecules: opticin. *Exp Eye Res* **85**, 303-4.
- Leber T. M. and Balkwill F. R. (1997) Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem* **249**, 24-8.
- Lee H. X., Ambrosio A. L., Reversade B. and De Robertis E. M. (2006a) Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteinases. *Cell* **124**, 147-59.
- Lee J. L., Chang C. J., Chueh L. L. and Lin C. T. (2006b) Secreted frizzled related protein 2 (sFRP2) decreases susceptibility to UV-induced apoptosis in primary culture of canine mammary gland tumors by NF-kappaB activation or JNK suppression. *Breast Cancer Res Treat* **100**, 49-58.
- Lee J. L., Lin C. T., Chueh L. L. and Chang C. J. (2004) Autocrine/paracrine secreted Frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis: a possible mechanism of mammary tumorigenesis. *J Biol Chem* **279**, 14602-9.
- LeHoang P., Sterkers M., Thillaye B., de Kozak Y., Coscas G. and Faure J. P. (2008) Primate model of uveoretinitis and vasculitis/experimental autoimmune uveoretinitis induced in cynomolgus monkeys by retinal s antigen. *Ophthalmic Res* **40**, 181-8.
- Lescher B., Haenig B. and Kispert A. (1998) sFRP-2 is a target of the Wnt-4 signaling pathway in the developing metanephric kidney. *Dev Dyn* **213**, 440-51.
- Levin D. S., Han D. P., Dev S., Wirostko W. J., Mieler W. F., Connor T. B., George V. and Eastwood D. (2002) Subtenon's depot corticosteroid injections in patients with a history of corticosteroid-induced intraocular pressure elevation. *Am J Ophthalmol* **133**, 196-202.
- Lim L. L., Scarborough J. D., Thorne J. E., Graham E., Kempen J. H., Mackensen F., Nguyen Q. D., Prabripitaloong T., Read R. W., Suhler E. B., Schwartz J. M. and Smith J. R. (2009) Uveitis in patients with autoimmune hepatitis. *Am J Ophthalmol* **147**, 332-338 e1.
- Lim M. S., Guedez L., Stetler-Stevenson W. G. and Stetler-Stevenson M. (1999) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 induces apoptosis in human T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* **878**, 522-3.
- Limb G. A., Daniels J. T., Pleass R., Charteris D. G., Luthert P. J. and Khaw P. T. (2002) Differential expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 by glial Muller cells: response to soluble and extracellular matrix-bound tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* **160**, 1847-55.
- Lindner I., Hemdan N. Y., Buchold M., Huse K., Bigl M., Oerlecke I., Ricken A., Gaunitz F., Sack U., Naumann A., Hollborn M., Thal D., Gebhardt R. and Birkenmeier G. (2010) Alpha2-macroglobulin inhibits the malignant properties of astrocytoma cells by impeding beta-catenin signaling. *Cancer Res* **70**, 277-87.
- Liu H., Sadygov R. G. and Yates J. R., 3rd. (2004) A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* **76**, 4193-201.
- Liu X., Ren X., Deng X., Huo Y., Xie J., Huang H., Jiao Z., Wu M., Liu Y. and Wen T. (2010) A protein interaction network for the analysis of the neuronal differentiation of neural stem cells in response to titanium dioxide nanoparticles. *Biomaterials*.
- Logan C. Y. and Nusse R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810.
- Lund S. A., Giachelli C. M. and Scatena M. (2009) The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal*.

- Magnoni S., Baker A., Thomson S., Jordan G., George S. J., McColl B. W., McCulloch J. and Horsburgh K. (2007) Neuroprotective effect of adenoviral-mediated gene transfer of TIMP-1 and -2 in ischemic brain injury. *Gene Ther* **14**, 621-5.
- Makarov A., Denisov E., Kholomeev A., Balschun W., Lange O., Strupat K. and Horning S. (2006) Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* **78**, 2113-20.
- Malemud C. J. (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* **11**, 1696-701.
- Malla N., Sjoli S., Winberg J. O., Hadler-Olsen E. and Uhlin-Hansen L. (2008) Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes. *Connect Tissue Res* **49**, 180-4.
- Martin B. L. and Kimelman D. (2009) Wnt signaling and the evolution of embryonic posterior development. *Curr Biol* **19**, R215-9.
- Matsumoto Y., Park I. K. and Kohyama K. (2009) Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *J Immunol* **183**, 4773-81.
- Matthews A. G. and Handsombe M. C. (1983) Uveitis in the horse: A review of the aetiological and immunopathological aspects of the disease. *Equine Vet J Suppl.* **2**, 61-64.
- 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**, 125-8.
- Matushansky I., Maki R. G. and Cordon-Cardo C. (2008) A context dependent role for Wnt signaling in tumorigenesis and stem cells. *Cell Cycle* **7**, 720-4.
- Maxfield F. R., Willingham M. C., Haigler H. T., Dragsten P. and Pastan I. H. (1981) Binding, surface mobility, internalization, and degradation of rhodamine-labeled alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry* **20**, 5353-8.
- McAllister C. G., Wiggert B., Chader G. J., Kuwabara T. and Gery I. (1987) Uveitogenic potential of lymphocytes sensitized to interphotoreceptor retinoid-binding protein. *J Immunol* **138**, 1416-20.
- McDonald W. H. and Yates J. R., 3rd. (2002) Shotgun proteomics and biomarker discovery. *Dis Markers* **18**, 99-105.
- McKee M. D. and Nanci A. (1996) Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* **33**, 141-64.
- Melberg N. S. and Thomas M. A. (1995) Nuclear sclerotic cataract after vitrectomy in patients younger than 50 years of age. *Ophthalmology* **102**, 1466-71.
- Meller R., Stevens S. L., Minami M., Cameron J. A., King S., Rosenzweig H., Doyle K., Lessov N. S., Simon R. P. and Stenzel-Poore M. P. (2005) Neuroprotection by osteopontin in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 217-25.
- Mempel M., Flageul B., Suarez F., Ronet C., Dubertret L., Kourilsky P., Gachelin G. and Musette P. (2000) Comparison of the T cell patterns in leprosy and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire. *Am J Pathol* **157**, 509-23.
- Michaud G. A. and Snyder M. (2002) Proteomic approaches for the global analysis of proteins. *Biotechniques* **33**, 1308-16.
- Milenkovic I., Birkenmeier G., Wiedemann P., Reichenbach A. and Bringmann A. (2005) Effect of alpha2-macroglobulin on retinal glial cell proliferation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **243**, 811-6.

- Mirotsoy M., Zhang Z., Deb A., Zhang L., Gnecci M., Noiseux N., Mu H., Pachori A. and Dzau V. (2007) Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1643-8.
- Mishra J., Ma Q., Prada A., Mitsnefes M., Zahedi K., Yang J., Barasch J. and Devarajan P. (2003) Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* **14**, 2534-43.
- Misra K. and Matisse M. P. (2010) A critical role for sFRP proteins in maintaining caudal neural tube closure in mice via inhibition of BMP signaling. *Dev Biol* **337**, 74-83.
- Misra U. K., Deedwania R. and Pizzo S. V. (2005a) Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J Biol Chem* **280**, 26278-86.
- Misra U. K., Deedwania R. and Pizzo S. V. (2006) Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J Biol Chem* **281**, 13694-707.
- Misra U. K., Gonzalez-Gronow M., Gawdi G., Hart J. P., Johnson C. E. and Pizzo S. V. (2002) The role of Grp 78 in alpha 2-macroglobulin-induced signal transduction. Evidence from RNA interference that the low density lipoprotein receptor-related protein is associated with, but not necessary for, GRP 78-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **277**, 42082-7.
- Misra U. K., Gonzalez-Gronow M., Gawdi G. and Pizzo S. V. (2005b) The role of MTJ-1 in cell surface translocation of GRP78, a receptor for alpha 2-macroglobulin-dependent signaling. *J Immunol* **174**, 2092-7.
- Misra U. K., Gonzalez-Gronow M., Gawdi G., Wang F. and Pizzo S. V. (2004) A novel receptor function for the heat shock protein Grp78: silencing of Grp78 gene expression attenuates alpha2M*-induced signalling. *Cell Signal* **16**, 929-38.
- Misra U. K. and Pizzo S. V. (2004a) Activation of Akt/PDK signaling in macrophages upon binding of receptor-recognized forms of alpha2-macroglobulin to its cellular receptor: effect of silencing the CREB gene. *J Cell Biochem* **93**, 1020-32.
- Misra U. K. and Pizzo S. V. (2004b) Potentiation of signal transduction mitogenesis and cellular proliferation upon binding of receptor-recognized forms of alpha2-macroglobulin to 1-LN prostate cancer cells. *Cell Signal* **16**, 487-96.
- Misra U. K. and Pizzo S. V. (2010) Modulation of the unfolded protein response in prostate cancer cells by antibody-directed against the carboxyl-terminal domain of GRP78. *Apoptosis* **15**, 173-82.
- Misra U. K., Sharma T. and Pizzo S. V. (2005c) Ligation of cell surface-associated glucose-regulated protein 78 by receptor-recognized forms of alpha 2-macroglobulin: activation of p21-activated protein kinase-2-dependent signaling in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* **175**, 2525-33.
- 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.
- Monti M., Cozzolino M., Cozzolino F., Vitiello G., Tedesco R., Flagiello A. and Pucci P. (2009) Puzzle of protein complexes in vivo: a present and future challenge for functional proteomics. *Expert Rev Proteomics* **6**, 159-69.
- Mosteller M. W., Gebhardt B. M., Hamilton A. M. and Kaufman H. E. (1985) Penetration of topical cyclosporine into the rabbit cornea, aqueous humor, and serum. *Arch Ophthalmol* **103**, 101-2.
- Multhoff G. (2007) Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods* **43**, 229-37.

- Mungall B. A. and Pollitt C. C. (2001) In situ zymography: topographical considerations. *J Biochem Biophys Methods* **47**, 169-76.
- Murphy G. and Nagase H. (2008) Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* **29**, 290-308.
- Murugaiyan G., Mittal A. and Weiner H. L. (2008) Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. *J Immunol* **181**, 7480-8.
- Mushtaq B., Saeed T., Situnayake R. D. and Murray P. I. (2007) Adalimumab for sight-threatening uveitis in Behcet's disease. *Eye (Lond)* **21**, 824-5.
- Nagase H., Visse R. and Murphy G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* **69**, 562-73.
- Nussenblatt R. B. (1990) The natural history of uveitis. *Int Ophthalmol* **14**, 303-8.
- O'Connell J. P., Willenbrock F., Docherty A. J., Eaton D. and Murphy G. (1994) Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B. *J Biol Chem* **269**, 14967-73.
- O'Regan A. W., Chupp G. L., Lowry J. A., Goetschkes M., Mulligan N. and Berman J. S. (1999) Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* **162**, 1024-31.
- Oh J., Seo D. W., Diaz T., Wei B., Ward Y., Ray J. M., Morioka Y., Shi S., Kitayama H., Takahashi C., Noda M. and Stetler-Stevenson W. G. (2004) Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res* **64**, 9062-9.
- Okunuki Y., Usui Y., Takeuchi M., Kezuka T., Hattori T., Masuko K., Nakamura H., Yudoh K., Usui M., Nishioka K. and Kato T. (2007) Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease. *Exp Eye Res* **84**, 823-31.
- Old W. M., Meyer-Arendt K., Aveline-Wolf L., Pierce K. G., Mendoza A., Sevinsky J. R., Resing K. A. and Ahn N. G. (2005) Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1487-502.
- Oliver G. W., Leferson J. D., Stetler-Stevenson W. G. and Kleiner D. E. (1997) Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Anal Biochem* **244**, 161-6.
- Osakada F., Ooto S., Akagi T., Mandai M., Akaike A. and Takahashi M. (2007) Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci* **27**, 4210-9.
- Ozbek Z., Arikan G., Yaman A., Oner H., Bajin M. S. and Saatci A. O. (2009) Sympathetic ophthalmia following vitreoretinal surgery. *Int Ophthalmol*.
- Palestine A. G., Mc Allister C., Carter C., Keenan A. M., Vistica B., Gery I., Davey R. and Nussenblatt R. (1986) Lymphocyte migration in the adoptive transfer of EAU. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**, 611-5.
- Park A. J., Matrisian L. M., Kells A. F., Pearson R., Yuan Z. Y. and Navre M. (1991) Mutational analysis of the transin (rat stromelysin) autoinhibitor region demonstrates a role for residues surrounding the "cysteine switch". *J Biol Chem* **266**, 1584-90.
- Pay S., Simsek I., Erdem H. and Dinc A. (2007) Immunopathogenesis of Behcet's disease with special emphasize on the possible role of antigen presenting cells. *Rheumatol Int* **27**, 417-24.
- 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**, 686-90.

- Pennesi G., Mattapallil M. J., Sun S. H., Avichezer D., Silver P. B., Karabekian Z., David C. S., Hargrave P. A., McDowell J. H., Smith W. C., Wiggert B., Donoso L. A., Chan C. C. and Caspi R. R. (2003) A humanized model of experimental autoimmune uveitis in HLA class II transgenic mice. *J Clin Invest* **111**, 1171-80.
- Perry R. H., Cooks R. G. and Noll R. J. (2008) Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom Rev* **27**, 661-99.
- Philip S., Bulbule A. and Kundu G. C. (2001) Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem* **276**, 44926-35.
- Philip S. and Kundu G. C. (2003) Osteopontin induces nuclear factor kappa B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I kappa B alpha /IKK signaling pathways, and curcumin (diferulolylmethane) down-regulates these pathways. *J Biol Chem* **278**, 14487-97.
- Pinkert S., Schultz J. and Reichardt J. (2010) Protein interaction networks--more than mere modules. *PLoS Comput Biol* **6**, e1000659.
- Pleyer U. and Dutescu M. (2009) [Sympathetic ophthalmia]. *Ophthalmologe* **106**, 167-75; quiz 176.
- Pritchett T. J. and Paulson J. C. (1989) Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* **264**, 9850-8.
- Qiu Z., Strickland D. K., Hyman B. T. and Rebeck G. W. (2002) alpha 2-Macroglobulin exposure reduces calcium responses to N-methyl-D-aspartate via low density lipoprotein receptor-related protein in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* **277**, 14458-66.
- Ratnikov B. I., Deryugina E. I. and Strongin A. Y. (2002) Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Lab Invest* **82**, 1583-90.
- Rebhun W. C. (1979) Diagnosis and treatment of equine uveitis. *J Am Vet Med Assoc* **175**, 803-8.
- Riley S. C., Gibson A. H., Leask R., Mauchline D. J., Pedersen H. G. and Watson E. D. (2001) Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. *Reproduction* **121**, 553-60.
- Romeike A., Brugmann M. and Drommer W. (1998) Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol* **35**, 515-26.
- Roth W., Wild-Bode C., Platten M., Grimm C., Melkonyan H. S., Dichgans J. and Weller M. (2000) Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. *Oncogene* **19**, 4210-20.
- Roudkenar M. H., Halabian R., Ghasemipour Z., Roushandeh A. M., Rouhbakhsh M., Nekogoftar M., Kuwahara Y., Fukumoto M. and Shokrgozar M. A. (2008) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H₂O₂ toxicity. *Arch Med Res* **39**, 560-6.
- Sakane T., Takeno M., Suzuki N. and Inaba G. (1999) Behcet's disease. *N Engl J Med* **341**, 1284-91.
- Salinovich O. and Montelaro R. C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **156**, 341-7.
- Sanchez-Sanchez A. V., Camp E., Leal-Tassias A. and Mullor J. L. (2010) Wnt signaling has different temporal roles during retinal development. *Dev Dyn* **239**, 297-310.

- Sanchez M. C., Luna J. D., Barcelona P. F., Gramajo A. L., Juarez P. C., Riera C. M. and Chiabrando G. A. (2007) Effect of retinal laser photocoagulation on the activity of metalloproteinases and the alpha(2)-macroglobulin proteolytic state in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* **85**, 644-50.
- Santoni V., Molloy M. and Rabilloud T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21**, 1054-70.
- Sato H., Takino T., Kinoshita T., Imai K., Okada Y., Stetler Stevenson W. G. and Seiki M. (1996) Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett* **385**, 238-40.
- Scatena M., Liaw L. and Giachelli C. M. (2007) Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2302-9.
- Schmidt-Ott K. M., Mori K., Kalandadze A., Li J. Y., Paragas N., Nicholas T., Devarajan P. and Barasch J. (2006) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **15**, 442-9.
- Schroeter M., Zickler P., Denhardt D. T., Hartung H. P. and Jander S. (2006) Increased thalamic neurodegeneration following ischaemic cortical stroke in osteopontin-deficient mice. *Brain* **129**, 1426-37.
- Schwink K. L. (1992) Equine uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* **8**, 557-74.
- Scigelova M. and Makarov A. (2006) Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* **6 Suppl 2**, 16-21.
- Seider N., Beiran I., Scharf J. and Miller B. (2001) Intravenous immunoglobulin therapy for resistant ocular Behcet's disease. *Br J Ophthalmol* **85**, 1287-8.
- Seraphin B., Puig O., Bouveret, Emmanuelle, Rutz B. and Caspary F. (2002) Tandem Affinity Purification to Enhance Interacting Protein Identifikation. *Protein-Protein Interaktions: AMolecular Cloning Manual*, 313-321.
- Shao H., Liao T., Ke Y., Shi H., Kaplan H. J. and Sun D. (2006) Severe chronic experimental autoimmune uveitis (EAU) of the C57BL/6 mouse induced by adoptive transfer of IRBP1-20-specific T cells. *Exp Eye Res* **82**, 323-31.
- Shao H., Shi H., Kaplan H. J. and Sun D. (2005) Chronic recurrent autoimmune uveitis with progressive photoreceptor damage induced in rats by transfer of IRBP-specific T cells. *J Neuroimmunol* **163**, 102-9.
- Shen F., Ruddy M. J., Plamondon P. and Gaffen S. L. (2005) Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol* **77**, 388-99.
- Sherman M. and Multhoff G. (2007) Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1113**, 192-201.
- Shevde L. A., Das S., Clark D. W. and Samant R. S. (2010) Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis. *Curr Mol Med* **10**, 71-81.
- Shi Z., Rudzinski M., Meerovitch K., Lebrun-Julien F., Birman E., Di Polo A. and Saragovi H. U. (2008) Alpha2-macroglobulin is a mediator of retinal ganglion cell death in glaucoma. *J Biol Chem* **283**, 29156-65.
- Shimokawa K., Katayama M., Matsuda Y., Takahashi H., Hara I. and Sato H. (2003) Complexes of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human seminal plasma. *J Androl* **24**, 73-7.
- Shitama T., Hayashi H., Noge S., Uchio E., Oshima K., Haniu H., Takemori N., Komori N. and Matsumoto H. (2008) Proteome Profiling of Vitreoretinal Diseases by Cluster Analysis. *Proteomics Clin Appl* **2**, 1265-1280.

- Shui Y. B., Holekamp N. M., Kramer B. C., Crowley J. R., Wilkins M. A., Chu F., Malone P. E., Mangers S. J., Hou J. H., Siegfried C. J. and Beebe D. C. (2009) The gel state of the vitreous and ascorbate-dependent oxygen consumption: relationship to the etiology of nuclear cataracts. *Arch Ophthalmol* **127**, 475-82.
- Sivaraj R. R., Durrani O. M., Denniston A. K., Murray P. I. and Gordon C. (2007) Ocular manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 1757-62.
- Snoek-van Beurden P. A. and Von den Hoff J. W. (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* **38**, 73-83.
- Sottrup-Jensen L., Stepanik T. M., Kristensen T., Wierzbicki D. M., Jones C. M., Lonblad P. B., Magnusson S. and Petersen T. E. (1984) Primary structure of human alpha 2-macroglobulin. V. The complete structure. *J Biol Chem* **259**, 8318-27.
- Souchelnytskyi S. (2002) Proteomics in studies of signal transduction in epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 359-71.
- Spiess B. M. (1997) [Equine recurrent uveitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **139**, 126-33.
- Springman E. B., Angleton E. L., Birkedal-Hansen H. and Van Wart H. E. (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 364-8.
- Stetler-Stevenson W. G. (2008) Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* **1**, re6.
- Stetler-Stevenson W. G., Kruttsch H. C. and Liotta L. A. (1989a) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* **264**, 17374-8.
- Stetler-Stevenson W. G., Kruttsch H. C., Wachter M. P., Margulies I. M. and Liotta L. A. (1989b) The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J Biol Chem* **264**, 1353-6.
- Stetler-Stevenson W. G. and Seo D. W. (2005) TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. *Trends Mol Med* **11**, 97-103.
- Sudharshan S., Ganesh S. K. and Biswas J. (2010) Current approach in the diagnosis and management of posterior uveitis. *Indian J Ophthalmol* **58**, 29-43.
- Sugita S., Sagawa K., Mochizuki M., Shichijo S. and Itoh K. (1996) Melanocyte lysis by cytotoxic T lymphocytes recognizing the MART-1 melanoma antigen in HLA-A2 patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Int Immunol* **8**, 799-803.
- Suzuki H., Toyota M., Carraway H., Gabrielson E., Ohmura T., Fujikane T., Nishikawa N., Sogabe Y., Nojima M., Sonoda T., Mori M., Hirata K., Imai K., Shinomura Y., Baylin S. B. and Tokino T. (2008) Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer* **98**, 1147-56.
- Suzuki I., Takahashi S., Fujii Y., Fuyama S. and Arai S. (1989) Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in rats: isolation of S-antigen, EAU susceptibility of rat strains, genetic control of EAU induction, and effects of cyclophosphamide and irradiation on EAU. *Jpn J Ophthalmol* **33**, 13-26.
- Szemes P. A. and Gerhards H. (2000) Untersuchungen zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn. *Praktischer Tierarzt* **81**, 408-420.
- Takagi H., Sasaki S., Suzuki H., Toyota M., Maruyama R., Nojima M., Yamamoto H., Omata M., Tokino T., Imai K. and Shinomura Y. (2008) Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* **43**, 378-89.
- Tayade C., Esadeg S., Fang Y. and Croy B. A. (2005) Functions of alpha 2 macroglobulins in pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* **245**, 60-6.
- Tellier Z. (2007) Human immunoglobulins in intraocular inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **1110**, 337-47.

- Thurau S. R., Wildner G., Reiter C., Riethmuller G. and Lund O. E. (1994) Treatment of endogenous uveitis with anti-CD4 monoclonal antibody: first report. *Ger J Ophthalmol* **3**, 409-13.
- Tóth J., Hollerrieder J. and Huskamp B. (2006) Spezielle Indikationen zur Vitrektomie beim Pferd. *Pferdeheilkunde* **22** 296-300.
- Toth M., Bernardo M. M., Gervasi D. C., Soloway P. D., Wang Z., Bigg H. F., Overall C. M., DeClerck Y. A., Tschesche H., Cher M. L., Brown S., Mobashery S. and Fridman R. (2000) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem* **275**, 41415-23.
- Triebel S., Blaser J., Reinke H. and Tschesche H. (1992) A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* **314**, 386-8.
- Troeberg L. and Nagase H. (2004) Zymography of metalloproteinases. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 21**, Unit 21 15.
- van Amerongen R. and Nusse R. (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**, 3205-14.
- Vinuesa E., Sola A., Jung M., Alfaro V. and Hotter G. (2008) Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F1554-62.
- von Borstel M., von Oppen T., Glitz F., Frühauf B., Deegen E., Boevé M. H. and Ohnesorge B. (2005) Langzeitergebnisse der Pars plana Vitrektomie (double port) bei Equiner Rezidivierender Uveitis. *Pferdeheilkunde* **21**, 13-18.
- von Mering C., Huynen M., Jaeggi D., Schmidt S., Bork P. and Snel B. (2003) STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* **31**, 258-61.
- von Mering C., Jensen L. J., Kuhn M., Chaffron S., Doerks T., Kruger B., Snel B. and Bork P. (2007) STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Res* **35**, D358-62.
- Wai P. Y. and Kuo P. C. (2008) Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 103-18.
- Wang G., Wu W. W., Zeng W., Chou C. L. and Shen R. F. (2006) Label-free protein quantification using LC-coupled ion trap or FT mass spectrometry: Reproducibility, linearity, and application with complex proteomes. *J Proteome Res* **5**, 1214-23.
- Wang H. Q., Yang B., Xu C. L., Wang L. H., Zhang Y. X., Xu B., Ji J. T. and Sun Y. H. (2009) Differential phosphoprotein levels and pathway analysis identify the transition mechanism of LNCaP cells into androgen-independent cells. *Prostate*.
- Wang K. X. and Denhardt D. T. (2008) Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 333-45.
- Wang M., You J., Bemis K. G., Tegeler T. J. and Brown D. P. (2008) Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. *Brief Funct Genomic Proteomic* **7**, 329-39.
- Washburn M. P., Wolters D. and Yates J. R., 3rd. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**, 242-7.
- Weber G. F. and Cantor H. (1996) The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**, 241-8.
- Weidman T. A. (1973) Fine structure and function of ocular tissues. The retina. *Int Ophthalmol Clin* **13**, 205-27.
- Werry H. and Gerhards H. (1992) [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax* **20**, 178-86.

- Wildner G., Diedrichs-Mohring M. and Thureau S. R. (2008) Rat models of autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* **40**, 141-4.
- 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**, 61-5.
- 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.
- Winterberg A. and Gerhards H. (1997) Langzeitergebnisse der Pars-Plana Vitrektomie bei equiner rezidivierender Uveitis *Pferdeheilkunde* **13**, 377-383.
- Witte F., Dokas J., Neuendorf F., Mundlos S. and Stricker S. (2009) Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expr Patterns* **9**, 215-23.
- Woessner J. F., Jr. (1995) Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples. *Methods Enzymol* **248**, 510-28.
- Wollenberg G. K., LaMarre J., Rosendal S., Gonias S. L. and Hayes M. A. (1991) Binding of tumor necrosis factor alpha to activated forms of human plasma alpha 2 macroglobulin. *Am J Pathol* **138**, 265-72.
- Wu S. M., Patel D. D. and Pizzo S. V. (1998) Oxidized alpha2-macroglobulin (alpha2M) differentially regulates receptor binding by cytokines/growth factors: implications for tissue injury and repair mechanisms in inflammation. *J Immunol* **161**, 4356-65.
- Yamane K., Minamoto A., Yamashita H., Takamura H., Miyamoto-Myoken Y., Yoshizato K., Nabetani T., Tsugita A. and Mishima H. K. (2003) Proteome analysis of human vitreous proteins. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1177-87.
- Yan L., Borregaard N., Kjeldsen L. and Moses M. A. (2001) The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* **276**, 37258-65.
- Yang J., Goetz D., Li J. Y., Wang W., Mori K., Setlik D., Du T., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Strong R. and Barasch J. (2002) An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* **10**, 1045-56.
- Yi H., Nakamura R. E., Mohamed O., Dufort D. and Hackam A. S. (2007) Characterization of Wnt signaling during photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 5733-41.
- Yndestad A., Landro L., Ueland T., Dahl C. P., Flo T. H., Vinge L. E., Espevik T., Froland S. S., Husberg C., Christensen G., Dickstein K., Kjekshus J., Oie E., Gullestad L. and Aukrust P. (2009) Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J* **30**, 1229-36.
- Yu J., Liu F., Cui S. J., Liu Y., Song Z. Y., Cao H., Chen F. E., Wang W. J., Sun T. and Wang F. (2008) Vitreous proteomic analysis of proliferative vitreoretinopathy. *Proteomics* **8**, 3667-78.
- Zaba L. C., Smith G. P., Sanchez M. and Prystowsky S. D. (2010) Dendritic cells in the pathogenesis of sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 32-9.
- Zhang Q., Menon R., Deutsch E. W., Pitteri S. J., Faca V. M., Wang H., Newcomb L. F., Depinho R. A., Bardeesy N., Dinulescu D., Hung K. E., Kucherlapati R., Jacks T., Politi K., Aebersold R., Omenn G. S., States D. J. and Hanash S. M. (2008) A mouse plasma peptide atlas as a resource for disease proteomics. *Genome Biol* **9**, R93.

- Zhang Y., Zhang M. N., Jiang C. H. and Yao Y. (2009a) Development of sympathetic ophthalmia following globe injury. *Chin Med J (Engl)* **122**, 2961-6.
- Zhang Z., Deb A., Pachori A., He W., Guo J., Pratt R. and Dzau V. J. (2009b) Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 370-7.
- Zhu L., Zhao G., Stein R., Zheng X., Hu W., Shang N., Bu X., Liu X., Wang J., Feng E., Zhang X., Ye Q., Huang P., Zeng M. and Wang H. (2010) The proteome of *Shigella flexneri* 2a 2457T grown at 30uC and 37uC. *Mol Cell Proteomics*.
- Zipplies J. K., Hauck S. M., Schoeffmann S., Amann B., Stangassinger M., Ueffing M. and Deeg C. A. (2009) Serum PEDF levels are decreased in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. *J Proteome Res* **8**, 992-8.
- Zipplies J. K., Hauck S. M., Schoeffmann S., Amann B., van der Meijden C. H., Stangassinger M., Ueffing M. and Deeg C. A. (2010a) Kininogen in autoimmune uveitis: decrease in peripheral blood stream versus increase in target tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 375-82.
- Zipplies J. K., Kirschfink M., Amann B., Hauck S. M., Stangassinger M. and Deeg C. (2010b) Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model *Immunobiology* doi:10.1016/j.imbio.2010.02.003.

DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger bedanke ich mich herzlichst für den am Institut für Tierphysiologie der LMU-München zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Cornelia Deeg für die Überlassung des Themas und die exzellente fachliche Betreuung meiner Arbeit. Durch ihr hohes persönliches Engagement stand sie mir auch in Zeiten voller Terminkalender bei Fragen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Sie ermöglichte mir eine stete Erweiterung meines Wissens durch den Besuch von Tagungen und Fortbildungen.

Die von ihr freundlicherweise zur Verfügung gestellte Senseo Kaffeemaschine trug nicht unerheblich dazu bei, diese Arbeit voranzubringen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Frau Barbara Amann, die jederzeit Ihr unerschöpfliches Laborwissen und ihre jahrzehntelange Erfahrung mit mir teilte. Ohne Ihre Unterstützung wäre mir das Fertigstellen dieser Arbeit sehr viel schwerer gefallen.

Frau Dr. Stefanie Hauck, Department of Protein Science, Helmholtz Zentrum München, danke ich herzlichst für die sehr große Hilfe und die tatkräftige Unterstützung bei allen proteomischen und massenspektrometrischen Fragestellungen, sowie für die konstruktive Kritik bei der Korrektur dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. Hanna Zipplies möchte ich mich besonders herzlich für die geduldige Beantwortung von Fragen, für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge und die, aufgrund meiner endlos langen Sätze, sicher mühevollen Korrektur der Arbeit bedanken.

Ein ebenso herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. Roxane Kramer und Frau Christina Eberhardt, die mir bei der Korrektur dieser Arbeit ebenfalls sehr geholfen haben.

Bei all meinen Kollegen möchte ich mich für das äußerst angenehme Arbeitsklima und die in jeglicher Hinsicht stete Hilfsbereitschaft besonders bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Sieglinde Hirmer und Konstantin Lutz für die freundliche Unterstützung im Labor bedanken.

Ein besonderes Dankeschön verdient Ramona Schmitt, die bei allen technischen Fragen und Problemen des Laboralltags immer geduldig und hilfsbereit zur Stelle war.

Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel danke ich herzlich für seinen freundlichen Rat bei meinen Fragen zur Proteinaufreinigung.

Herrn Prof. Dr. Marius Ueffing danke ich herzlichst für den am Helmholtz Zentrum München, Department of Protein Science, zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz, die Nutzung der Gerätschaften, sowie das Ermöglichen der dort durchgeführten massenspektrometrischen Analysen.

Ein besonderer Dank geht auch an Caroline Bobe, Jennifer Behler und Stephanie Schöffmann für die mehr als geduldige Unterstützung bei den im Helmholtz Zentrum München durchgeführten Versuchen.

Special thanks to Dr. Előd Körtvély and Matteo Gorza, Department of Protein Science, Helmholtz Zentrum München, for their support in different experiments, I really learned a lot.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Gerhards, Klinik für Pferde, LMU-München danke ich herzlich für die Überlassung der Vitrektomieproben.

Bei der Metzgerei Veit, Deggendorf, möchte ich mich besonders herzlich für die Überlassung der Pferdeaugen bedanken.

Für ihre jahrelange Unterstützung in Studium und Sport bedanke ich mich besonders herzlich bei Ulrike und Peter Müller, denen ich auf diesem Wege das Allerbeste wünschen möchte.

Meinem Bruder danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei Christian Kujat bedanke ich mich besonders für den Rückhalt, die Unterstützung und sein Verständnis während des Studiums und der Dissertation.

Abschließend gebührt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, auf deren Unterstützung ich in jeder Lebenslage zählen kann, und die mir mein Studium und die anschließende Promotion ermöglichten.