

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

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

# **Differenzielle Expression von Proteinen im Glaskörper gesunder und an ERU erkrankter Pferde**

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

von  
Frank Altmann  
aus  
Albstadt

München 2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer  
Referent: Jun. Prof. Dr. Deeg  
Korreferenten: Prof. Dr. Ammer  
Prof. Dr. Matis  
Prof. Dr. Liebich  
Prof. Dr. Erhard

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>9</b>
2.1	Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) .....	9
2.2	Klinisches Bild der ERU.....	9
2.3	Ätiologie der ERU .....	10
2.3.1	Intraokuläre Leptospireninfektion .....	11
2.3.2	Immunmediierte Erkrankung .....	12
2.4	Ätiologie der rezidivierende Uveitis des Menschen .....	14
2.5	Autoantigene bei der Uveitis .....	14
2.6	Pathogenese von Uveitiden .....	16
2.7	Therapie von Uveitiden .....	19
2.7.1	Konservative Therapie der ERU .....	19
2.7.2	Intravitreale Ciclosporinimplantate bei der ERU .....	19
2.7.3	Pars-plana-Vitrektomie bei der ERU .....	19
2.7.4	Vitrektomie bei der Uveitis des Menschen.....	20
2.8	Bedeutung des Glaskörpers .....	21
2.9	Proteomics .....	22
2.9.1	Separierung des Proteoms .....	23
2.9.2	Identifikation von Proteinen mit massenspektrometrischen Methoden .....	23
2.9.3	Analyse der differentiellen Proteinexpression .....	23
2.9.4	Differenzielle Expression von Proteinen im Glaskörper bei verschiedenen Erkrankungen in der Humanmedizin .....	25
2.9.4.1	Differenzielle Proteinexpression im Glaskörper nach Kataraktoperation .....	25
2.9.4.2	Differenzielle Proteinexpression bei diabetischer Retinopathie.....	26
2.9.4.3	Differenzielle Proteinexpression im Glaskörper bei Endotoxin-induzierter Uveitis in der Ratte .....	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>
3.1	Untersuchungsmaterial .....	29
3.1.1	Gewinnung des Glaskörpermaterials.....	31
3.1.2	Präparate für immunhistochemische Untersuchungen der Retina .....	32

<b>3.2</b>	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Puffer.....	32
3.2.2	Puffer und Lösungen für die zweidimensionale Gelelektrophorese .....	33
3.2.3	Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
3.2.4	Lösungen für das Semi-Dry-Blotting .....	35
3.2.5	Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen .....	36
<b>3.3</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentration des Glaskörpermaterials.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4</b>	<b>Aufbereitung der Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese .....</b>	<b>37</b>
3.4.1	Lyophilisierung der Glaskörperproben .....	37
3.4.2	Dialyse.....	38
<b>3.5</b>	<b>Zweidimensionale Gelelektrophorese.....</b>	<b>38</b>
3.5.1	Rehydratisierung der Proben .....	38
3.5.2	Isoelektrische Fokussierung.....	39
3.5.3	Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele für die 2. Dimension.....	39
3.5.4	Äquilibration und 2. Dimension .....	40
3.5.5	Färbung der Gele .....	42
3.5.5.1	Silberfärbung.....	42
3.5.5.2	Kolloidale Coomassie-Färbung.....	43
<b>3.6</b>	<b>Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen.....</b>	<b>43</b>
3.6.1	Entfärben und Verdauen der Proteinspots.....	43
3.6.2	Massenanalyse .....	44
3.6.3	Datenbanksuche .....	46
<b>3.7</b>	<b>Albumin- und IgG-Depletion aus dem Glaskörper.....</b>	<b>46</b>
<b>3.8</b>	<b>Immunoblotting .....</b>	<b>47</b>
3.8.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	47
3.8.2	Transfer der Proteine auf eine Membran (Western Blot).....	48
3.8.3	Detektion von Proteinen durch spezifische Antikörper .....	49
3.8.3.1	Detektion von sFRP-2.....	49
3.8.3.2	Detektion von PEDF.....	50
<b>3.9</b>	<b>Densitometrische Bildanalyse .....</b>	<b>51</b>
3.9.1	Zweidimensionale Gele.....	51
3.9.2	Eindimensionale Immunoblots .....	52
<b>3.10</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>52</b>
<b>3.11</b>	<b>Immunhistochemische Untersuchung des retinalen Gewebes.....</b>	<b>53</b>
3.11.1	Paraffinschnittherstellung .....	53

3.11.2	Immunhistochemische Färbung.....	53
3.11.2.1	Immunhistochemische Färbung von sFRP-2 .....	53
3.11.2.2	Immunhistochemische Färbung von PEDF .....	55
3.11.3	Immunhistochemische Doppelfärbung von PEDF und VEGF .....	57
3.11.4	Bilddokumentation .....	58
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Proteinkonzentration der Glaskörper .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>Glaskörperproteom .....</b>	<b>61</b>
4.2.1	Glaskörperproteom gesunder Pferdeaugen.....	61
4.2.2	Glaskörperproteom von an ERU erkrankten Augen .....	63
<b>4.3</b>	<b>Identifikation vitrealer Proteine.....</b>	<b>64</b>
4.3.1	Identifikation von Proteinen des Glaskörpers augengesunder Pferde .....	64
4.3.2	Identifikation von Proteinen des Glaskörpers von an ERU erkrankten Pferden .....	69
4.3.3	Proteomanalyse Albumin- und IgG-depletierter Glaskörper .....	74
<b>4.4</b>	<b>Quantifizierung der differentiellen Proteinexpression.....</b>	<b>77</b>
<b>4.5</b>	<b>Expression von Secreted frizzled related protein 2 (sFRP-2).....</b>	<b>81</b>
4.5.1	Verringerte Expression von sFRP-2 im Glaskörper bei Uveitis .....	81
4.5.2	Quantitative Verifizierung der sFRP-2-Expression im Glaskörper.....	82
<b>4.6</b>	<b>Expression von Pigment epithelium-derived factor (PEDF) .....</b>	<b>83</b>
4.6.1	Verringerte Expression von PEDF im Glaskörper bei Uveitis.....	83
4.6.2	Quantitative Verifizierung der PEDF-Expression im Glaskörper .....	84
<b>4.7</b>	<b>Expression von sFRP-2 im retinalen Gewebe .....</b>	<b>85</b>
<b>4.8</b>	<b>Expression von PEDF im retinalen Gewebe .....</b>	<b>86</b>
<b>4.9</b>	<b>Differenziell exprimierte vitreale Proteine.....</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
μ	mikro- ( $10^{-6}$ )
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
2D	zweidimensional
ACAID	engl.: anterior chamber associated immune deviation, Vorderkammer-assoziierte abweichende Immunantwort
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ASAP	Apoptosis- and splicing associated protein
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	Balanced salt solution
C3	Komplement C3
CD	Cluster of differentiation
CES	Carboxylesterase
dpi	dots per inch, Bildpunkte pro Zoll
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cRALBP	engl.: cellular retinaldehyde-binding protein, zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
Da	Dalton
Dkk	Dickkopf related protein
DTT	Dithiothreitol
EAAU	engl.: experimental autoimmune anterior uveitis Experimentelle autoimmune vordere Uveitis
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalitis
EAU	Experimentelle autoimmune Uveoretinitis
ECL	engl.: enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszens
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EIU	Endotoxin-induzierte Uveitis
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
Fz/LRP-Komplex	Frizzled/low density lipoprotein receptor-related protein-Komplex
Fz-Rezeptoren	Frizzled-Rezeptoren
g	Gramm
h	Stunde
HDAC	Histondeacetylase
HDL	High density lipoproteins
HEU	engl.: horse experimental uveitis experimentelle Uveitis des Pferdes
HLA	engl.: human leucocyte antigen humanes Leukozytenantigen
HMSE	Humane Monozyten/Makrophagen-Serinesterase
HUPO	Humane Proteom Organisation
ICAM-1	engl.: intercellular adhesion molecule-1 interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ID	Identifikationsnummer
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL-10	Interleukin-10
IL- $\beta$	Interleukin- $\beta$
IP-10	Interferon-inducible protein-10
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IRBP	Interphotorezeptor-Retinoid-bindendes Protein
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LCAT	Lecithin-Cholesterol Acyltransferase
LECAM-1	Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule-1
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
M	Molar
mA	Miliampere
MALDI	engl.: Matrix assisted laser desorption/ionisation Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation

MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MG	Molekulargewicht
MHC-II	engl.: major histocompatibility complex-class-II Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	engl.: messenger-ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	engl.: molecular weight, Molekulargewicht
NL	nicht linear
PBS	engl.: phosphate buffered saline phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
PGDS	Prostaglandin-D2 Synthase, syn. Prostaglandin-H2 D-isomerase
pl	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide mass fingerprinting
POD	Peroxidase
PRBP	Plasma Retinol-bindendes Protein
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	engl.: ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S-Ag	S-Antigen
SAP18	Sin3-associated polypeptide p18
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sFRP-2	Secreted frizzled-related protein 2
siRNA	small interfering RNA
syn.	synonym
Tab.	Tabelle



TBS	engl.: tris-buffered saline Trisgepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethyldiamin
Th1	T-Helfer 1
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TOF-Analysator	Time of flight-, Flugzeit-Analysator
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vh	Voltstunden
x g	x-fache Erdbeschleunigung

## 1 Einleitung

Die equine rezidivierende Uveitis ist die häufigste Augenkrankheit beim Pferd. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die Ätiologie und die Pathogenese dieser Erkrankung bislang nur unvollständig verstanden. Das intraokuläre Entzündungsgeschehen ist durch eine T-zellmedierte Immunantwort gekennzeichnet. Die pathogenetischen Mechanismen, die für den rezidivierenden Verlauf der Erkrankung und die progrediente Zerstörung intraokularer Strukturen verantwortlich sind, sind jedoch weitgehend unerforscht. Die konservative Therapie der ERU beruht im Wesentlichen auf dem Einsatz von Immunsuppressiva und Antiphlogistika. Die chirurgische Entfernung des Glaskörpers durch eine Pars-plana-Vitrektomie führt in den meisten Fällen zum Sistieren der Rezidive (Winterberg, 1997). Das dabei entfernte Glaskörpermaterial kann darüber hinaus für weiterführende Untersuchungen genutzt werden.

Krankhaft veränderte Gewebe oder Körperflüssigkeiten zeigen häufig ein verändertes Proteinexpressionsmuster. Vergleichende Proteomanalysen gesunder und erkrankter Gewebe ermöglichen die Detektion von differenziell exprimierten Proteinen. Aus einer abweichenden Proteinexpression können sich so Hinweise auf Faktoren und biologische Pfade ergeben, die an einem Krankheitsprozess beteiligt sind. Glaskörpermaterial stellt ein geeignetes Probenmaterial für solche Untersuchungen bei der ERU dar. Aufgrund seiner zentralen Lage im Auge, mit Kontakt zur Linse, zum Ziliarkörper und zur Retina zeigt das Proteinexpressionsmuster des Glaskörpers neben vitrealen Proteinen vermutlich auch Veränderungen der Proteinexpression der angrenzenden Strukturen.

Bislang wurden keine Studien zur differenziellen Proteinexpression im Glaskörper bei der rezidivierenden Uveitis publiziert.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, anhand der zweidimensionalen Gelelektrophorese in Kombination mit massenspektrometrischen Untersuchungen, die Glaskörperproteome gesunder sowie an ERU erkrankter Pferde zu analysieren und durch den Vergleich der Proteinexpressionsmuster differenziell exprimierte Proteine zu identifizieren, um so Hinweise auf Pathogenesemechanismen der ERU zu erhalten.

## **2 Literatur**

### **2.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU)**

Bei der equinen rezidivierenden Uveitis handelt es sich um eine endogene, nicht traumatische innere Augenentzündung (Werry und Gerhards, 1992). Diese verläuft als sero-fibrinöse Entzündung von Iris, Ziliarkörper, Chorioidea und benachbarten Augenstrukturen akut und chronisch rezidivierend, und kann durch progrediente Zerstörung intraokularer Strukturen zur Atrophie und Erblindung führen (Gerhards und Wollanke, 2001).

Die weltweit verbreitete Erkrankung ist zugleich die häufigste bei Equiden auftretende Augenerkrankung, und die Hauptursache für ein Erblinden beim Pferd (Jones, 1942; Rebhun, 1979; Cook et al., 1983; Dwyer et al., 1995; Gerhards und Wollanke, 2001). Die Krankheit betrifft weltweit bis zu zwölf Prozent der Pferdepopulation (Spiess, 1997). Dies unterstreicht den Stellenwert der ERU in der Veterinärophthalmologie. Neben ihrer Bedeutung in der Pferdemedizin ist die ERU aufgrund von Gemeinsamkeiten mit der Uveitis des Menschen auch in der Humanophthalmologie von Interesse. Sie ist das einzige spontan auftretende Modell zur Untersuchung der humanen Uveitis (Kalsow et al., 1993; Kalsow und Dwyer, 1998).

### **2.2 Klinisches Bild der ERU**

Der rekurrente Charakter der ERU ist geprägt von sich wiederholenden Phasen akuter Entzündung, die jeweils von entzündungsfreien Intervallen unterschiedlicher Dauer unterbrochen werden (Cook et al., 1983). Die Dauer der akuten Entzündungsphasen reicht dabei von einigen Tagen bis zu einem Monat (Cross, 1966), die entzündungsfreien Intervalle können Wochen bis Monate andauern (Cook et al., 1983). Jeder weitere Entzündungsschub kann unbehandelt zu einer progressiven Zerstörung okularer Strukturen führen und so in einer Blindheit münden. Die Krankheit tritt sowohl uni-, als auch bilateral auf. Oft sind jedoch im Verlauf der Erkrankung beide Augen betroffen, allerdings in unterschiedlichen Stadien (Cook et al., 1983; Gerhards und Wollanke, 2001). Das klinische Bild ist sehr variabel (Spiess, 1997; Gerhards und Wollanke, 2001). So kann eine akute Iridozyklitis (vordere Uveitis), eine Chorioretinitis (hintere Uveitis) oder eine Kombination beider vorliegen (Panuveitis). Je nach betroffenem Uveaabschnitt und

Schweregrad der Entzündungsreaktion variiert das klinische Bild von einer nur geringgradigen Entzündungssymptomatik bis hin zu einer hochgradigen Störung des Allgemeinbefindens (Gerhards und Wollanke, 2001).

Charakteristisch für eine akute vordere Uveitis (Iridozyklitis) sind eine plötzlich auftretende Abwehrtrias (Blepharospasmus, Lakrimation, Photophobie), eine Miosis, Schmerzhaftigkeit, Lidschwellung, vermehrte Wärme des Auges, gerötete Konjunktiven, diffuse, hauchartig grau-bläuliche Hornhauttrübung sowie die Ansammlung eines entzündlichen Exsudates in der ventralen Hälfte der vorderen Augenkammer (Gerhards und Wollanke, 2001).

Während Veränderungen am Auge bei einer akuten vorderen Uveitis auch vom Pferdebesitzer gut erkannt werden können, wird eine hintere Uveitis leicht übersehen. Da eine sensible Innervation der Chorioidea nicht vorhanden ist, fehlen bei einer hinteren Uveitis die Schmerzsymptome (Cook et al., 1983; Gerhards und Wollanke, 2001).

Die aus den Entzündungen resultierenden Schädigungen okularer Strukturen entscheiden über die weitere Sehfähigkeit sowie den Erhalt des Bulbus. Komplikationen bestehen in der Ausbildung von Synechien zwischen Irisrückfläche und Linsenvorderfläche, welche nach Lösen fokale oder diffuse Katarakte hinterlassen (Rebhun, 1979; Spiess, 1997; Gerhards und Wollanke, 2001). Die entzündliche Schädigung des Ziliarkörpers führt zu einer reduzierten Kammerwassrproduktion, wodurch die Gefahr einer Atrophia bulbi gegeben ist (Gerhards und Wollanke, 2001). Entzündliche Glaskörpertrübungen beeinträchtigen den Visus und können bindegewebig organisiert werden (Rebhun, 1979; Cook et al., 1983; Spiess, 1997). Wiederholte Entzündungsschübe können zur Bildung peripapillärer, chorioretinitischer Narben führen sowie Netzhautablösungen verursachen (Cook et al., 1983; Werry und Gerhards, 1992; Spiess, 1997).

### **2.3 Ätiologie der ERU**

Im Laufe der Zeit wurden verschiedenste Hypothesen zur Ätiologie der ERU aufgestellt. Theorien, die aktuell noch diskutiert werden, sind die einer intraokulären Leptospireninfektion und die einer autoimmunmedierten Erkrankung.

### **2.3.1 Intraokuläre Leptospireninfektion**

Eine bakterielle Infektion mit Leptospiren wird seit längerer Zeit als mögliches ursächliches Geschehen einer ERU vermutet. Die Zusammenhänge zwischen einer Leptospireninfektion und dem Auftreten einer ERU wurden von mehreren Autoren untersucht (Davidson et al., 1987; Matthews et al., 1987; Sillerud et al., 1987; Dwyer et al., 1995; Wollanke et al., 1998; Faber et al., 2000; Wollanke et al., 2001; Wollanke et al., 2004). Während von manchen Autoren eine Korrelation zwischen im Serum nachweisbaren Antikörpern gegen Leptospiren und dem Auftreten einer ERU festgestellt wurde (Sillerud et al., 1987; Dwyer et al., 1995), konnten die Ergebnisse anderer Untersuchungen dies nicht bestätigen (Davidson et al., 1987; Wollanke et al., 1998; Wollanke et al., 2004). In intraokularen Flüssigkeiten wurden Antikörpertiter gegen Leptospiren gemessen, die signifikant höher waren als die im Serum gemessenen, was nach Ansicht der Autoren für eine lokale Antikörperproduktion spricht (Wollanke et al., 1998; Wollanke et al., 2004; Verma et al., 2005). Bei Untersuchungen des Glaskörpermaterials von an Uveitis erkrankten Pferden und des Glaskörpermaterials augengesunder Pferde wurden in 90% der uveitischen Augen und in 6% der gesunden Augen Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen (Wollanke et al., 2004). Bei 53% der kultivierten uveitischen Glaskörperproben, jedoch nicht bei Proben gesunder Augen, waren Leptospiren kulturell nachweisbar. (Wollanke et al., 2004).

Zur Klärung der Bedeutung einer Leptospireninfektion bei der ERU infizierten Williams et al. Ponies mit Leptospiren und konnten damit eine Uveitis auslösen (Williams et al., 1971). Jedoch trat diese erst 50-59 Wochen nach der Infektion auf. Die Untersucher vermuteten daher, dass die beobachteten Veränderungen durch immunologische Mechanismen ausgelöst werden, die auf einer Kreuzreaktion zwischen uvealen und bakteriellen Antigenen beruhen (Williams et al., 1971). Die unklare Rolle von Leptospiren in der Ätiologie der ERU und Hinweise auf ein immunmediertes Geschehen veranlassten verschiedene Autoren nach einer Antigenverwandtschaft zwischen Leptospiren und okularem Gewebe zu suchen. Parma et al. stellten in einer Untersuchung eine Kreuzreaktion zwischen anti-Leptospiren-Pferdeseren und equiner Kornea sowie Linse fest. Nach Meinung der Autoren können die als komplementbindende Immunglobuline charakterisierten Antikörper den Komplementfaktor C3 binden, so dass nach Aktivierung des Komplementsystems der Mechanismus der Gewebeschädigung initiiert wird. Die

beobachteten Phänomene geben nach Ansicht der Autoren Hinweise auf Autoimmunreaktionen (Parma et al., 1985; Parma et al., 1992a; Parma et al., 1992b). Verma et al. identifizierten aus Leptospiren zwei Lipoproteine (LruA und LruB) als Antigene, gegen die sie hohe Mengen an spezifischen Antikörpern in okularen Flüssigkeiten, nicht jedoch in den Seren, von an ERU erkrankten Pferden feststellten. Im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung dieser Proteine bei der Auslösung von Autoimmunreaktionen untersuchten sie die Reaktion zwischen für die Lipoproteine spezifischen Antiseren und okularen Strukturen und wiesen eine Kreuzreaktivität mit equinem Gewebe aus Linse, Ziliarkörper und Retina nach (Verma et al., 2005). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass immunmedierte Mechanismen eine zentrale Rolle bei der ERU spielen.

### **2.3.2 Immunmedierte Erkrankung**

Der rezidivierende Charakter der Erkrankung und das Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie wiesen dagegen immer auf das Vorliegen einer immunmedierten Erkrankung hin (Mair und Crispin, 1989; Werry und Gerhards, 1992; Spiess, 1997; Romeike et al., 1998; Rebhun, 1999).

Weitergehende Untersuchungen zur Immunpathologie der ERU zeigten, dass ein zellmediertes Entzündungsgeschehen zugrunde liegt, bei dem T-Lymphozyten die vorherrschende Zellpopulation der entzündlichen Infiltrate darstellen (Kalsow und Dwyer, 1998; Romeike et al., 1998; Gilger et al., 1999; Deeg et al., 2002a). Die Lymphozyten konnten als CD4<sup>+</sup> T-Zellen charakterisiert werden (Gilger et al., 1999; Deeg et al., 2001). Diese T-Zellen lagen in entzündlich veränderten Geweben uveitischer Augen diffus verteilt vor, wurden aber auch als Hauptbestandteil von intraokulären Lymphfollikeln gefunden (Romeike et al., 1998; Gilger et al., 1999; Deeg et al., 2002a). Die Zellen im germinalen Zentrum der Follikel wurden als B-Lymphozyten charakterisiert, was als Hinweis auf eine mögliche intraokuläre Antikörperproduktion gesehen wurde (Romeike et al., 1998).

Eine diffuse Verteilung von T-Lymphozyten fand sich sowohl in der Iris, dem Ziliarkörper und der Chorioidea, als auch im retinalen Gewebe (Romeike et al., 1998; Deeg et al., 2002a). Dabei zeigte sich in der Retina im Bereich retinaler Gefäße die höchste Dichte an T-Lymphozyten. In stärker affizierten Augen wurden zudem subretinal gelegene Makrophagen gefunden, die mit Pigment gefüllt waren (Deeg et al., 2002a). Lymphfollikel waren vor allem im Ziliarkörper (Dubielzig et al., 1997;

Deeg et al., 2002a) und mit fortschreitender Erkrankung auch in der Iris und der Chorioidea zu finden (Deeg et al., 2002a). Zudem wurde eine erhöhte Transkription von Interleukin-2 und Interferon gamma sowie eine gleichzeitig niedrige Expression von Interleukin-4 in den Augen von an ERU erkrankten Pferden festgestellt, was für eine Th1-Antwort spricht (Gilger et al., 1999).

Ferner zeigten Augen von an ERU erkrankten Pferden eine erhöhte Expression von MHC-II-Antigenen. Von den untersuchenden Autoren wurde eine Korrelation zwischen dem Grad der MHC-II-Expression und dem Ausmaß histopathologischer Veränderungen der Retina festgestellt (Kalsow und Dwyer, 1998; Romeike et al., 1998).

Bei der experimentellen autoimmunen Uveoretinitis (EAU), einem Modell für die humane autoimmune Uveitis, ist eine mit der Uveitis einhergehende Pinealitis bekannt, die sich durch die selektive Expression der Autoantigene in der Retina und der Pinealdrüse erklärt. Kalsow et al. untersuchten daraufhin die Pinealdrüsen von an ERU erkrankten Pferden und konnten eine Infiltration mit T-Lymphozyten und MHC-II-Antigen exprimierende Zellen nachweisen (Kalsow et al., 1999).

Erste Untersuchungen zu Autoimmunreaktionen bei der ERU führten Maxwell et al. durch. Sie untersuchten bei an ERU erkrankten Pferden die periphere B-Zellantwort auf retinale Antigene. Dabei reagierten die Seren uveitischer Pferde insgesamt auf mehrere Antigene. Unterschiede zwischen gesunden und uveitischen Pferden bezüglich der Reaktion auf S-Antigen (engl.: Soluble antigen, lösliches Antigen, S-Ag) und Rhodopsin wurden nicht festgestellt. Die Seren von 31% der uveitischen Pferde reagierten jedoch auf ein zusätzliches nicht identifiziertes Antigen, welches im Western Blot als eine Bande mit einem Molekulargewicht von weniger als 26,6 kDa sichtbar war (Maxwell et al., 1991).

Im Weiteren wurde anhand des bei therapeutischen Pars-plana-Vitrektomien gewonnenen Glaskörpermaterials uveitischer Pferde die Immunantwort gegen die bereits aus Tiermodellen bekannten retinalen Autoantigene Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein (IRBP) und S-Antigen untersucht. Hierbei konnten in 72% der untersuchten uveitischen Glaskörper, jedoch nicht in den Glaskörpern von Kontrolltieren, Autoantikörper gegen IRBP oder S-Antigen nachgewiesen werden. Nach *in vitro* Stimulation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) und vitrealen Lymphozyten mit IRBP und S-Ag wurden intraokulare, für die beiden Antigene spezifische, autoaggressive T-Zellen nachgewiesen (Deeg et al., 2001).

## **2.4 Ätiologie der rezidivierende Uveitis des Menschen**

Bis in die frühen 70er Jahre dominierte die Meinung, dass die meisten Uveitiden infektiös bedingt sind (Nussenblatt und Gery, 1996). Während bei manchen Uveitiden eine infektiöse Ursache, wie etwa eine Toxoplasmose oder eine Herpesvirusinfektion, zu Grunde liegt, kann in vielen Fällen kein infektiöses Agens nachgewiesen werden (Forrester, 1991). Da antimikrobielle Therapien zudem in der Behandlung von Uveitiden nicht erfolgreich waren, wurde klar, dass infektiöse Ursachen allein nicht als Erklärung dienen können. Nach und nach wurde einer autoimmunen Ätiologie eine immer größere Bedeutung beigemessen, da sich der Einsatz von Kortikosteroiden und immunsuppressiven Medikamenten als das Mittel der Wahl erwiesen hat (Okada und Forrester, 2000).

Häufig werden Uveitiden im Zusammenhang mit systemischen Erkrankungen wie Morbus Behçet, Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom, Spondylitis ankylosans oder Sarkoidose diagnostiziert (Forrester, 1991; Nussenblatt und Gery, 1996). Bei einigen Erkrankungen liegt eine genetische Prädisposition vor. So zeigt sich eine Korrelation zwischen bestimmten HLA-Haplotypen und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen. Dies wurde beispielsweise bei der Birdshot Chorioretinopathie (HLA A29) festgestellt (Baarsma et al., 1990).

Untersuchungen zu den genauen Mechanismen der Autoimmunreaktionen gestalten sich schwierig, da das für Untersuchungen zur Verfügung stehende okulare Material größtenteils von Patienten stammt, die sich in einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium oder im Endstadium der Krankheit befinden (Forrester, 1991). Daher wurden Tiermodelle zur Erforschung der autoimmunen Uveitis etabliert.

## **2.5 Autoantigene bei der Uveitis**

Wacker und Lipton konnten 1965 durch die systemische Applikation von homologem Retinagewebe in Freund's komplettem Adjuvans in Meerschweinchen eine Uveitis auslösen, die sie als experimentelle autoimmune Uveoretinitis (EAU) bezeichneten (Wacker und Lipton, 1965). Nach weiterer Auftrennung des Retinagewebes und der Isolierung und Charakterisierung retinaler Antigene wurden in der Folgezeit einzelne Antigene ermittelt, mit denen sich eine EAU induzieren lässt. Bei den entsprechenden Antigenen handelt es sich zum Teil um solche, die auch in der Pinealdrüse zu finden sind, weshalb immunisierte Tiere zusätzlich zu einer Uveitis



auch eine Pinealitis entwickeln (Kalsow und Wacker, 1978; Gery et al., 1986; Donoso et al., 1987).

Die am besten charakterisierten EAU-Modelle sind die durch S-Antigen induzierte EAU bei der Ratte (Donoso et al., 1987; de Smet et al., 1993), die durch IRBP induzierte EAU bei der Ratte (Gery et al., 1986) und der Maus (Caspi et al., 1988; Caspi et al., 1990) und die durch Rhodopsin induzierte EAU bei der Ratte (Adamus et al., 1992). Den so induzierten Uveitiden liegen  $CD4^+$  Th1-medierte Entzündungen zu Grunde, die durch adoptiven Transfer von antigenspezifischen  $CD4^+$  T-Zellen übertragen werden können (Nussenblatt und Gery, 1996; Adamus und Chan, 2002). Aufgrund des Vorliegens von Autoantikörpern und autoaggressiven T-Zellen gegen S-Antigen und IRBP bei spontan an ERU erkrankten Pferden (Deeg et al., 2001), wurde die Uveitogenität von IRBP im Pferd weiter untersucht. Die Charakterisierung eines Antigens als Autoantigen erfordert unter anderem die Auslösung des Krankheitsbildes im Tierversuch durch Immunisierung mit dem entsprechenden Antigen (Rose und Bona, 1993). Durch die periphere Injektion von IRBP in Freund's komplettem Adjuvans wurde bei den immunisierten Pferden eine Uveitis induziert, die hinsichtlich dem klinischen Bild und den pathohistologischen Veränderungen der Augen dem Bild der spontan auftretenden ERU entspricht. Durch wiederholte Injektionen war die Uveitis zudem reinduzierbar. Diese HEU (engl.: horse experimental uveitis, experimentelle Uveitis des Pferdes) stellt somit das einzig reinduzierbare Modell einer Autoimmunerkrankung dar. Im Vergleich zu anderen Tiermodellen der experimentellen autoimmunen Uveoretinitis (EAU), die stets monophasisch verlaufen, erlaubt die HEU aufgrund einer möglichen Reinduzierbarkeit damit Studien zur Pathogenese und möglichen Therapieansätzen. Bemerkenswert ist, dass bei den mit IRBP immunisierten Pferden Epitop Spreading auf S-Antigen stattfand (Deeg et al., 2002b).

Hines et al. untersuchten 1990 die Uveitogenität von S-Antigen bei Ponies. Durch die periphere subkutane Applikation von S-Antigen konnte allerdings keine Uveitis induziert werden. Einen potenziellen Grund für das Misslingen der Uveitisinduktion in Ponies durch die subkutane Immunisierung mit S-Antigen sahen die Autoren in einer genetisch bedingten unterschiedlichen Anfälligkeit für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen (Hines et al., 1990).

Aufgrund der in Glaskörperproben uveitischer Pferde gefundenen Antikörper und autoreaktiven T-Zellen gegen S-Antigen, sowie wegen des bei der IRBP-induzierten

Uveitis beobachteten Epitop Spreadings untersuchten Deeg et al. die Uveitogenität von S-Antigen bei Pferden mit einem anderen genetischen Hintergrund. Die Immunisierung mit S-Antigen führte hierbei zwar zu einer antigenspezifischen T- und B-Zellantwort bei den immunisierten Pferden, jedoch entwickelte nur eines von fünf immunisierten Tieren eine Uveitis. Diese Untersuchungen zeigen, dass S-Antigen nicht als dominantes Autoantigen bei der ERU angesehen werden kann (Deeg et al., 2004).

Das Epitop Spreading, das sowohl bei Pferden mit induzierter Uveitis, als auch bei spontan an ERU erkrankten Pferden auftrat, zeigte, dass im Verlauf der ERU Immunreaktionen stattfinden, die gegen verschiedene Autoantigene gerichtet sind. Daher untersuchten Deeg et al. mittels neuartiger Techniken das Bindungsmuster von Autoantikörpern von an ERU erkrankten Pferden an retinale Antigene. Hierbei wurden zwei weitere retinale Autoantigene, Recoverin und zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (cRALBP) identifiziert (Deeg et al., 2006b).

In weiteren Untersuchungen wurden autoreaktive B- und T-Zellen gegen cRALBP bei spontan an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen. Durch subkutane Injektion von cRALBP in Freund's komplettem Adjuvans konnte sowohl in Ratten, als auch in Pferden eine Uveitis induziert werden. Diese Uveitis ist beim Pferd zudem reinduzierbar. Die klinischen und histopathologischen Untersuchungen ließen eine in den hinteren Augensegmenten lokalisierte Uveitis erkennen (Deeg et al., 2006b).

## **2.6 Pathogenese von Uveitiden**

Sowohl der ERU, als auch humanen autoimmunen Uveitiden liegt eine CD4<sup>+</sup> Th1-Antwort zu Grunde, bei der autoaggressive T-Zellen gegen retinale Antigene nachgewiesen wurden. Die genauen Pathogenesemechanismen, die zur Ausbildung dieser zellulären Immunantwort führen, sind jedoch weitgehend unbekannt (Mair und Crispin, 1989; Schwink, 1992; Terrada et al., 2006). Untersuchungen zu den Mechanismen der Immunpathogenese beschränken sich vor allem auf die EAU.

Das Auge gehört unter physiologischen Bedingungen zu den immunprivilegierten Organen (Mair und Crispin, 1989). Hierzu tragen verschiedene Faktoren bei. Neben einer anatomischen Barriere, die etwa durch die Blut-Retina-Schranke gegeben ist, existieren verschiedene immunregulatorische Zelloberflächenmoleküle und lösliche Faktoren. Durch den Mechanismus der anterior chamber associated immune deviation (ACAID) werden lymphozytäre Immunantworten auf einen nichtpathogenen

Pfad umgeleitet (Streilein et al., 2002). Die weitgehende Isolierung des Auges findet in einer frühen Phase der Ontogenese statt, was Auswirkungen auf eine Toleranzentwicklung gegenüber retinalen Antigenen haben könnte (Caspi, 1999). Die genauen Mechanismen, die letztlich zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunreaktionen führen, sind nicht bekannt. Aktuell werden drei verschiedene Mechanismen diskutiert, die sich jedoch gegenseitig nicht ausschließen.

Eine Erklärung für die Entstehung von Autoimmunreaktionen wird in einer molekularen Mimikri gesehen, bei der eine Immunreaktion auf ein exogenes Agens vorliegt, das mit einem körpereigenen Antigen kreuzreagiert (Wucherpfennig, 2001). Solche Immunantworten können auch zum Verlust der Toleranz gegenüber dem kreuzreagierenden körpereigenen Antigen führen (Davies, 1997).

Eine zweite Theorie ist die einer Bystander-Aktivierung. Diese beruht auf einer unspezifischen Aktivierung von T-Zellen. Hierbei werden beispielsweise im Rahmen einer Virusinfektion virusspezifische T-Zellen aktiviert. Das durch die Immunreaktionen entstehende inflammatorische Milieu trägt dann zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen bei (Horwitz et al., 1998).

Ein weiterer Mechanismus ist der des Epitop Spreading. Epitop Spreading ist ein Phänomen, das bei Autoimmunreaktionen in Zusammenhang mit chronischen Gewebeschädigungen auftritt (Vanderlugt und Miller, 1996). Hierbei dehnt sich eine zu Beginn der Erkrankung gegen ein dominantes Epitop gerichtete Immunreaktion im Verlauf der Erkrankung auf andere Epitope desselben Antigens (intramolekulares Epitop Spreading) oder Epitope eines anderen Antigens (intermolekulares Epitop Spreading) aus (Powell und Black, 2001). Epitop Spreading wurde in der Maus bei der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE), einem Modell zur Untersuchung der Multiplen Sklerose des Menschen, festgestellt (Lehmann et al., 1992; Tuohy et al., 1998). Daneben bestehen erste Hinweise, dass Epitop Spreading auch bei der humanen Uveitis eine Rolle spielen könnte (de Smet et al., 2001).

Das bei der IRBP-induzierten Uveitis des Pferdes beobachtete Epitop Spreading zeigte sich auch bei spontan erkrankten Pferden. Durch regelmäßige Überwachung der peripheren T-Zellantwort über einen längeren Zeitraum wurde anhand von T-Zellproliferationsassays sowohl inter-, als auch intramolekulares Epitop Spreading auf S-Antigen und IRBP festgestellt. Das Epitop Spreading könnte für den rekurrenten Charakter der ERU verantwortlich sein (Deeg et al., 2006a).

Die Mechanismen, die im Rahmen der rezidivierenden Entzündungsschübe zur Gewebeschädigung führen, sind jedoch weitgehend unbekannt. Untersuchungen zu den Mechanismen der Gewebeschädigung bei Uveitiden wurden vorwiegend bei der EAU durchgeführt. Hierbei muss bedacht werden, dass diese Modelle größtenteils einen monophasischen Krankheitsverlauf zeigen und die Mechanismen möglicherweise von denen der spontan auftretenden Erkrankung abweichen.

Demnach kommt CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine zentrale Bedeutung zu, da allein durch adoptiven Transfer in Form einer Injektion dieser Zellen in der Peripherie bei Empfängertieren eine EAU ausgelöst werden kann (Caspi, 1999). So wurde festgestellt, dass im Anschluss an die Injektion wahllos wenige antigenspezifische Zellen das Auge penetrieren und im Anschluss daran durch diese Zellen eine große Anzahl von Leukozyten rekrutiert wird (Prendergast et al., 1998; Caspi, 1999). Unklar ist, wie die antigenspezifischen Zellen die Blut-Augen-Schranke überwinden. Doch scheint dieser Verstärkermechanismus für die Auslösung der Krankheit entscheidend zu sein. Die Zellrekrutierung hängt dabei von der Lymphokin- und Chemokinproduktion der ersten infiltrierenden Zellen ab, da dadurch Adhäsionsmoleküle auf dem retinalen Gefäßendothel induziert und Chemoattraktine durch das Gewebe gebildet werden. Nach Ausbildung eines chemotaktischen Gradienten werden weitere Leukozyten rekrutiert, die ihrerseits die Entzündung weiter verstärken (Caspi, 1999). Durch den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke, der unter anderem durch degranulierende Mastzellen verursacht wird, können Zellen ins Auge eintreten und Zellen aus geschädigtem Gewebe sowie lösliche Faktoren in die Zirkulation gelangen (Li et al., 1992). Der Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke hat somit entscheidende Bedeutung für den weiteren Krankheitsverlauf (Caspi, 1999). Außerdem scheinen aktive Sauerstoffverbindungen einen Großteil der Gewebeschädigung zu verursachen (Hoey et al., 1997; Wu et al., 1997). In einem Tiermodell für die autoimmune vordere Uveitis wurde auch eine Bedeutung der Komplementaktivierung in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten des Auges gezeigt. Die Komplementaktivierung ist Auslöser für die Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (Jha et al., 2006a).

## **2.7 Therapie von Uveitiden**

### **2.7.1 Konservative Therapie der ERU**

Ziele der Therapie sind die Erhaltung des Sehvermögens, eine größtmögliche Limitierung der durch die Entzündungsvorgänge verursachten Augenschäden (z. B. Synechiebildung) sowie eine Schmerzlinderung (Gerhards und Wollanke, 2001).

Die medikamentöse Therapie beruht in der Regel auf einer relativ unspezifischen Suppression der lokalen oder systemischen Immunreaktion, der Anwendung von Mydriatika und Zykloplegika zur Pupillenweitstellung, sowie der lokalen und systemischen Applikation von Antiphlogistika zur Entzündungshemmung (Werry und Gerhards, 1992; Gerhards und Wollanke, 2001). Die Prognose der ERU ist bei konservativer Therapie jedoch aufgrund der Rezidivneigung und der damit verbundenen Komplikationen als vorsichtig bis schlecht einzustufen, zumal eine länger andauernde prophylaktische Applikation der eingesetzten Medikamente vor allem im Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen nicht praktikabel ist (Winterberg, 1997).

### **2.7.2 Intravitreale Ciclosporinimplantate bei der ERU**

Gilger et al. berichten von intravitrealen Ciclosporinimplantaten in der Behandlung der ERU. Das vor allem auf T-Helferzellen wirkende Immunsuppressivum Ciclosporin A soll dabei lokal konstant in einer geringen Menge über einen geschätzten Zeitraum von fünf Jahren freigesetzt werden. Die Implantate werden offensichtlich gut toleriert. Beim Großteil der behandelten Pferde sistierten die Rezidive während einer durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von circa einem Jahr und ein normaler Visus war vorhanden. Komplikationen waren selten und sollen operationsbedingt gewesen sein (Gilger et al., 2000; Gilger und Allen, 2001).

### **2.7.3 Pars-plana-Vitrektomie bei der ERU**

Positive Erfahrungen mit der chirurgischen Behandlung von an chronisch rezidivierender Uveitis leidender Patienten in der Humanophthalmologie veranlassten Werry und Gerhards die Pars-plana-Vitrektomie zur Behandlung der ERU zu etablieren (Werry und Gerhards, 1992).

Winterberg untersuchte den postoperativen Krankheitsverlauf von 43 vitrektomierten Augen von 38 Pferden im Abstand von minimal sechs und maximal 67 Monaten nach

der Operation. Demnach zeigte sich bei 97,7% der vitrektomierten Augen nach Angaben der Besitzer kein erneutes Rezidiv nach der Operation. Bei über 70% der Augen war nach der Operation noch Sehfähigkeit vorhanden und die Mehrheit der Augen zeigte eine normale Tonisierung. Die überwiegende Anzahl der durchgeführten Pars-plana-Vitrektomien (37 von 43) verlief dabei komplikationslos (Winterberg, 1997). In anderen Untersuchungen wurde eine ebenfalls hohe Rezidivfreiheit von 85% der operierten Augen während einer postoperativen Nachbeobachtungszeit von fünf Monaten bis zu fünf Jahren festgestellt (Fruhauf et al., 1998).

Eine häufiger auftretende längerfristige Komplikation war die einer Kataraktbildung (Winterberg, 1997; Fruhauf et al., 1998). Weitere Komplikationen waren eine Atrophia bulbi, eine Ablatio retinae sowie eine Phtisis bulbi (Winterberg, 1997).

Neben der Entfernung von optisch störenden Glaskörpertrübungen oder -strängen ermöglicht die Vitrektomie die Entnahme von diagnostischem Material (Werry und Gerhards, 1992; Winterberg, 1997; Gerhards und Wollanke, 2001).

Das Sistieren von Rezidiven nach einer Vitrektomie wird durch die Entfernung intraokular persistierender Leptospiren (Wollanke et al., 2004) oder durch eine mögliche Reduktion der lokalen immunologischen Prozesse nach Entfernung des entzündlich veränderten Glaskörpers (Werry und Gerhards, 1992; Winterberg, 1997) erklärt.

#### **2.7.4 Vitrektomie bei der Uveitis des Menschen**

Die systemische Applikation von Immunsuppressiva ist in der Regel das Mittel der Wahl zur Therapie humaner autoimmuner Uveitiden (Menezo et al., 2005). Trotz immunsuppressiver und antiinflammatorischer Therapie treten häufig Rezidive auf. Durch die Entzündungen können sich Komplikationen ergeben, die entscheidende Auswirkungen auf den Visus haben. Vor allem die Ausbildung eines Makulaödems stellt hierbei ein großes Problem dar (Wiechens et al., 2003). Daneben können Glaskörperhämorrhagien und -trübungen, Netzhautablösungen sowie die Bildung epiretinale Membranen auftreten (Dev et al., 1999; Becker et al., 2003).

Eine Behandlung solcher sekundärer Veränderungen ist nur chirurgisch möglich. Die Pars-plana-Vitrektomie ermöglicht die Entfernung optisch störender Glaskörpertrübungen und epiretinale Membranen, das Lösen von Traktionen, die intravitreale Applikation von Medikamenten, sowie eine kombinierte

Kataraktchirurgie. Außerdem besteht die Möglichkeit der Probenentnahme sowie der Entnahme retinaler und chorioidaler Biopsien (Becker et al., 2003).

Um die Erfahrungen mit der Pars-plana-Vitrektomie bei Uveitis auf lange Sicht zu beurteilen, untersuchten Becker et al. in einer Literaturanalyse 60 Arbeiten zur therapeutischen Vitrektomie bei Uveitis, die im Zeitraum von 1979-2003 angefertigt wurden. Demnach lagen die Vorteile der Operation vor allem in einer Visusverbesserung, einem Rückgang der Rezidivrate sowie einer Reduktion der vitrealen Zellinfiltration. Die häufigsten postoperativen Komplikationen waren eine Cataracta complicata sowie eine Ablatio retinae. Die therapeutische Beeinflussung eines Makulaödems, das in der Regel den visusbegrenzenden Faktor darstellt, wird kontrovers diskutiert. Der therapeutische Nutzen einer Vitrektomie scheint nicht für alle Uveitisformen gleich zu sein. Die Autoren sehen eine klare Indikation für intermediäre Uveitiden, bei denen durch die Entfernung von Glaskörpertrübungen eine deutliche Visusverbesserung zu erwarten ist. Weiterhin scheint eine Vitrektomie sinnvoll, wenn eine kortikosteroid- oder immunsuppressive Therapie keine Wirkung zeigt oder wenn ein Makulaödem nicht auf eine medikamentelle Therapie anspricht. Sehr gute Erfolge sollen auch bei Patienten mit einem Fuchs-Uveitis-Syndrom mit starken Glaskörpertrübungen erzielt werden (Becker et al., 2003).

## **2.8 Bedeutung des Glaskörpers**

Der größte Teil des intraokularen Raumes wird vom Glaskörper ausgefüllt. Sein Volumen beträgt beim erwachsenen Pferd ca. 28 ml. Anatomisch können ein kortikaler Bereich (Glaskörperkortex), ein intermediärer, sowie ein zentraler Bereich unterschieden werden (Barnett et al., 1998).

Die gelartige Konsistenz des Glaskörpers wird durch ein Netzwerk von dünnen Kollagenfibrillen aufrechterhalten, in das vor allem Hyaluronsäure eingelagert ist (Bishop, 2000). Durch die eingelagerte Hyaluronsäure erreicht der Glaskörper eine Quellfähigkeit, wodurch eine Beeinflussung des Augeninnendruckes ermöglicht wird. Dieser Aufbau gewährleistet einerseits die notwendige Transparenz und bietet andererseits eine Stütze für die Retina und die Linse (Gelatt, 1991; Wissdorf et al., 2002). Der Stoffaustausch zwischen Glaskörper und Kammerwasser, sowie zwischen Glaskörper und der vorne angrenzenden Linse und der hinten angrenzenden Retina erfolgt durch Diffusion (Gelatt, 1991).

Aufgrund der zentralen Lage des Glaskörpers im Auge, mit Kontakt sowohl zur Retina, als auch zu vorderen Augenstrukturen, stellt das im Rahmen von Pars-plana Vitrektomien gewonnene Glaskörpermaterial ein ideales Medium für verschiedene Untersuchungen dar.

## **2.9 Proteomics**

Der Begriff Proteomics beschreibt die Erforschung der Struktur und Funktion von Proteinen einer Zelle oder eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt unter genau definierten Bedingungen einschließlich der Funktionsweise und der Interaktion von Proteinen innerhalb der Zellen (Human Proteome Organization, HUPO, <http://www.hupo.org/>).

Unter einem Proteom wird "die quantitative Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus, also die Kenntnis aller exprimierten Proteine und ihrer jeweiligen Konzentrationen unter bestimmten äußeren Bedingungen" verstanden (Rehm, 2002). Während das Genom mehr oder weniger statisch ist, verändert sich das Proteom ständig und hat somit dynamischen Charakter (Tyers und Mann, 2003).

In der Regel ist in einer Zelle die Anzahl der kodierenden Gene geringer als die der Proteine, was vor allem auf alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen der Proteine zurückzuführen ist. Solche Proteinmodifikationen sind von entscheidender Bedeutung für den funktionellen Zustand von Zellen (Gygi et al., 1999; Chen et al., 2002; Hortin et al., 2006; Wittmann-Liebold et al., 2006).

Um die dynamischen Prozesse, die im Rahmen von Zellentwicklung, Zelldifferenzierung und Krankheitsentstehung ablaufen, zu verstehen, sind Kenntnisse über die jeweiligen Proteine in Zellen, Geweben oder Organismen erforderlich (Wittmann-Liebold et al., 2006).

Im Rahmen der Human Proteome Organization (HUPO) soll durch internationale Zusammenarbeit von Wissenschaftlern die Proteomforschung effektiv gestaltet werden. So wurden bereits verschiedene Forschungsprojekte wie das Human Liver Proteome Project, das Human Brain Proteome Project oder das Plasma Proteome Project etabliert (HUPO, <http://www.hupo.org/>).



### **2.9.1 Separierung des Proteoms**

Das elementare Instrument der Proteomforschung ist die zweidimensionale Gelelektrophorese, die eine Auftrennung komplexer Proteingemische nach dem isoelektrischen Punkt, dem Molekulargewicht, der Löslichkeit und der relativen Abundanz der einzelnen Proteine ermöglicht (Gorg et al., 1988a). Die Auftrennung der Proteine erfolgt dabei in der ersten Dimension anhand einer isoelektrischen Fokussierung, die von einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in der zweiten Dimension gefolgt wird (Gorg et al., 2004). Eine deutliche Verbesserung der von O'Farrell beschriebenen Technik wurde nach Etablierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG Streifen) durch Görg et al. erreicht (O'Farrell, 1975; Gorg et al., 1988b). Dadurch wurde insbesondere eine Reproduzierbarkeit der Analysen ermöglicht. So können mit der zum jetzigen Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Methode, abhängig von der Gelgröße und dem pH-Gradienten, bis zu 5000 Proteine pro Gel aufgetrennt, detektiert und quantifiziert werden (Gorg et al., 2004). Damit ermöglicht die zweidimensionale Gelelektrophorese eine Analyse komplexer Proteingemische von Gewebeproben, Körperflüssigkeiten, Biopsien, kultivierten Zelllinien sowie von Extrakten aus Mikroorganismen (Wittmann-Liebold et al., 2006).

### **2.9.2 Identifikation von Proteinen mit massenspektrometrischen Methoden**

Massenspektrometer, wie die Matrix-assistierten Laserdesorptions-/Ionisations- (MALDI) time-of-flight (TOF)-Geräte, ermöglichen eine Proteinidentifizierung durch Messung der Peptidmassen der Proteine und anschließenden Abgleich mit Proteindatenbanken. Tandem Massenspektrometer-Geräte (MS/MS-Geräte) ermöglichen darüber hinaus eine zusätzliche Sequenzierung der einzelnen Peptide (Gygi und Aebersold, 2000). Durch die Kombination von zweidimensionaler Gelelektrophorese und der anschließenden Identifikation von Proteinen mittels massenspektrometrischer Verfahren wurde ein breites Anwendungsgebiet für die Proteomik geschaffen (Wittmann-Liebold et al., 2006).

### **2.9.3 Analyse der differentiellen Proteinexpression**

In der medizinischen Forschung richtet sich das Hauptaugenmerk der Proteomforschung auf die Untersuchung der differentiellen Proteinexpression im

gesunden und krankhaft veränderten Zustand. Die Identifizierung von Proteinexpressionsmustern oder Proteinmodifikationen, die als charakteristisch für ein Krankheitsbild, eine bestimmte pathologische Veränderung oder ein bestimmtes Krankheitsstadium angesehen werden können, ermöglicht einerseits Einblicke in die Pathogenese auf Proteinebene, andererseits können dadurch bestimmte Proteine eventuell als Biomarker klassifiziert werden (Yanagisawa et al., 2003; Veenstra et al., 2005; Drukier et al., 2006; Hortin et al., 2006; Wittmann-Liebold et al., 2006). In diese Bereiche werden große Erwartungen in der klinischen Anwendung der Proteomik gesetzt. Biomarker sollen als diagnostische, prognostische oder prädiktive Marker Anwendung finden. Diagnostische Marker könnten hierbei etwa klassische histopathologische Diagnosen ergänzen. Prognostische Marker, wie angiogene oder proliferative Marker sowie Hormonrezeptoren könnten beispielsweise Hinweise zur Malignität von Tumoren geben. Prädiktive Marker könnten Aussagen über den möglichen Krankheitsverlauf zulassen (Azad et al., 2006).

Yanagisawa et al. stellten nach massenspektrometrischer Proteomanalyse gesunder Lungengewebe und Lungengewebe von Tumorpatienten ein proteomisches Klassifizierungsschema auf, anhand dessen eine Klassifizierung der Tumoren möglich war, die mit der histologischen Klassifizierung übereinstimmte. Darüber hinaus war es ihnen möglich anhand der Proteinmuster Primärtumoren von Metastasen zu unterscheiden (Yanagisawa et al., 2003).

Von großem Interesse sind Proteomanalysen des Plasmas. Das leicht zu gewinnende Probenmaterial enthält neben klassischen Plasmaproteinen auch Proteine, die aus verschiedenen Geweben in die Zirkulation gelangen. Im Rahmen des HUPO Plasma Proteome Project soll eine umfassende und systematische Charakterisierung zirkulierender Proteine im gesunden sowie im kranken Zustand durchgeführt werden (Omenn, 2004). In bisherigen Untersuchungen wurden im Plasma beispielsweise Proteine mit einer kardiovaskulär assoziierten Funktion ermittelt und "katalogisiert". Solche Untersuchungen bieten eine Grundlage für die Ermittlung von Biomarkern (Berhane et al., 2005).

Bei proteomischen Untersuchungen interessieren neben speziellen Geweben als Ganzes oder Körperflüssigkeiten auch Veränderungen auf zellulärer Ebene sowie subzelluläre Strukturen und Proteinkomplexe. Einen weiteren Anwendungsbereich finden proteomische Untersuchungen daher in der Pharmakologie, da die Wirkung der meisten Medikamente auf Proteine ausgerichtet ist. Hoffnungen werden hier vor

allem in die Entwicklung neuer Therapieansätze gesetzt (Anderson et al., 2000; Hanash, 2003; Azad et al., 2006; Wittmann-Liebold et al., 2006).

#### **2.9.4 Differenzielle Expression von Proteinen im Glaskörper bei verschiedenen Erkrankungen in der Humanmedizin**

In der Humanmedizin wurden Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung des bei Vitrektomien gewonnenen Glaskörpermaterials und Vergleiche mit dem Glaskörpermaterial gesunder Augen bereits Ende der 80er und Anfang der 90er Jahre von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt (Moter et al., 1989; Bresgen et al., 1991; Bresgen et al., 1994). Obgleich Techniken wie die isoelektrische Fokussierung oder auch die zweidimensionale Gelelektrophorese zum Einsatz kamen, so war doch bei diesen Arbeiten die Anzahl der identifizierten Proteine limitiert, da die Proteinidentifikation in der Regel anhand von spezifischen Antikörpern im Western Blot oder durch Vergleich mit Standardproteinen erfolgte.

Im Folgenden werden in der jüngeren Literatur gefundene Arbeiten aus der Humanmedizin erwähnt, in denen bei verschiedenen Erkrankungen Untersuchungen zur differentiellen Expression von Glaskörperproteinen durchgeführt wurden.

##### **2.9.4.1 Differenzielle Proteinexpression im Glaskörper nach Kataraktoperation**

Neal et al. untersuchten humane Glaskörper von phaken und pseudophaken Spenderaugen. Bei Kataraktextraktionen besteht das Risiko einer hinteren Glaskörperabhebung, eines Makulaödems sowie einer Retinaablösung. Daher wollten die Autoren prüfen in welchem Umfang in diesem Zusammenhang Veränderungen am Glaskörper auftreten. Hierzu wurde das Glaskörperproteom, die Viskosität des Glaskörpers sowie die Größenverteilung von Makromolekülen in verschiedenen Regionen des Glaskörpers bei phaken und pseudophaken Augen untersucht. Die proteomischen Untersuchungen zeigten das Vorliegen von Kristallinen im vorderen Glaskörperbereich von pseudophaken Augen, nicht jedoch im hinteren Glaskörperbereich oder in den Glaskörpern von phaken Augen. Im hinteren Glaskörperbereich nahe der Retina war die Proteinexpression bei pseudophaken Augen im Vergleich zu gesunden reduziert. Insbesondere galt dies für antioxidative Proteine und verschiedene Enzyme wie die Carboanhydrase oder die Triosephosphatisomerase. Die Autoren erklären sich dies durch eine veränderte

Prozessierung und Clearance der Proteine in diesen Glaskörpern. Des Weiteren wurden eine signifikant unterschiedliche Proteinexpression und/oder Modifikationen für die Proteine Transthyretin, Alpha-1-Antitrypsin und Retinolsäure-bindendes Protein festgestellt, wobei Transthyretin und Alpha-1-Antitrypsin in pseudophaken Augen erhöht, Retinolsäure-bindendes Protein jedoch erniedrigt war. Die erhöhte Expression von Transthyretin, ein aktives Transportprotein für Retinol und Retinol-bindendes Protein, und die gleichzeitig erniedrigte Expression von Retinolsäure-bindendem Protein deuten nach Ansicht der Autoren auf ein Ungleichgewicht der Retinoid-Verfügbarkeit hin. Des Weiteren wurden ein veränderter Viskositätskoeffizient und eine veränderte Verteilung von Hyaluronan in den untersuchten Glaskörpern festgestellt. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass dieses veränderte Mikromilieu zur Entwicklung retinaler Erkrankungen beitragen könnte (Neal et al., 2005).

#### **2.9.4.2 Differenzielle Proteinexpression bei diabetischer Retinopathie**

Nakanishi et al. untersuchten die Proteinprofile der Glaskörper von Patienten mit diabetischer Retinopathie. Das Hauptproblem bei dieser Erkrankung stellen Gefäßneubildungen in der Retina sowie Gefäßeinsprossungen in den Glaskörper dar. Um Einblicke in die Pathogenese zu erhalten, wurden die Proteinprofile der Glaskörper von Patienten mit diabetischer Retinopathie mit den Proteinmustern der Glaskörper von Patienten verglichen, die an einem Makulaloch leiden, einer Augenerkrankung, bei der Gefäßneubildungen keine Rolle spielen. Insgesamt wurden 51 verschiedene Proteine identifiziert. Eine höhere Expression in den Glaskörpern mit diabetischer Retinopathie zeigte sich für Immunglobuline sowie für die Proteine Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-2-HS-Glycoprotein und Komplement C4. Das Protein Pigment epithelium-derived factor, ein starker Angiogeneseinhibitor, war in den Proteinprofilen der Glaskörper mit diabetischer Retinopathie eindeutig detektierbar, in der Kontrollgruppe jedoch nur schwach exprimiert. Die Autoren merken allerdings an, dass mit Hilfe weiterer Methoden eine Quantifizierung dieses Proteins erfolgen muss, um genaue Aussagen zur Höhe der Expression treffen zu können (Nakanishi et al., 2002).

Proteomanalysen des Glaskörpermaterials von Patienten mit diabetischer Retinopathie wurden auch von Yamane et al. durchgeführt. Auch in dieser Arbeit dienten Glaskörper von Patienten mit idiopathischem Makulaloch als

Negativkontrolle. Achtzehn Proteine wurden sowohl in den Glaskörpern mit proliferativer diabetischer Retinopathie als auch in denen der Kontrollgruppe detektiert. Zwanzig zusätzliche Proteine wurden in den Glaskörpern der Augen mit proliferativer diabetischer Retinopathie nachgewiesen. Achtzehn dieser zwanzig Proteine waren auch im Serum der Patienten vorhanden, woraus die Autoren schließen, dass die erhöhte Proteinexpression vor allem auf eine Dysfunktion der Blut-Retina-Schranke zurückzuführen ist. Zwei dieser zwanzig Proteine, die neuronenspezifische Enolase sowie die Katalase, scheinen jedoch intraokulär produziert zu werden. Die Enolase könnte nach Ansicht der Autoren möglicherweise als Marker für eine neuronale Schädigung zur Anwendung kommen. Das Enzym Katalase könnte aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften eine Schutzfunktion im erkrankten Auge ausüben (Yamane et al., 2003).

Um die abundantesten löslichen Proteine in humanen Glaskörpern zu identifizieren und eine Grundlage für vergleichende Untersuchungen mit Glaskörpern aus krankhaft veränderten Augen zu schaffen, trennten Wu et al. das Glaskörpermaterial gesunder humaner Augen sowie das von Patienten mit diabetischer Retinopathie im eindimensionalen SDS-Gel auf. In den Gelen waren bei den gesunden Glaskörpern acht Banden, bei den Glaskörpern kranker Augen zehn Banden nachweisbar. Bei den beiden zusätzlichen Banden handelte es sich um die alpha- und beta-Kette von Hämoglobin, deren Auftreten die Autoren durch die bei der Krankheit stattfindenden Glaskörpereinblutungen erklären (Wu et al., 2004).

Ouchi et al. vermuteten, dass bei der Entstehung eines diabetischen Makulaödems bestimmte chemische Mediatoren beteiligt sind, die im Glaskörper akkumulieren und so die Blut-Retina-Schranke beeinflussen. Die Elimination dieser Mediatoren durch die chirurgische Glaskörperentfernung könnte somit den Therapieerfolg der Vitrektomie erklären. Daher verglichen die Autoren die zweidimensional aufgetrennten Glaskörperproteome von Patienten, die an präproliferativer diabetischer Retinopathie mit Makulaödem litten mit dem Glaskörperproteom von Patienten der gleichen Erkrankung ohne Makulaödem. Bei Patienten mit diabetischem Makulaödem zeigte sich eine erhöhte Expression der Proteine Pigment epithelium-derived factor, Plasma Retinol-bindendes Protein, Apolipoprotein A-IV, Apolipoprotein A-I, Thyroid hormone receptor-interacting protein 11 und Vitamin D-bindendes Protein. Ein anderes Protein, Apolipoprotein H, war dagegen nur in Glaskörpern von Augen ohne Makulaödem nachweisbar. Ob die höher exprimierten

Proteine in den Glaskörpern mit Makulaödem die Ursache oder die Folge einer erhöhten Permeabilität retinaler Gefäße sind, konnten die Autoren anhand der Untersuchungen nicht beurteilen (Ouchi et al., 2005).

Weitere Untersuchungen zur differentiellen Proteinexpression in Glaskörpern von Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie wurden von Kim et al. durchgeführt. Als Kontrollen dienten auch hier die Glaskörper von Patienten mit einem Makulaloch. Acht differentiell exprimierte Proteine wurden ermittelt. Hierbei waren in den Glaskörpern bei diabetischer Retinopathie die Proteine Pigment epithelium-derived factor, Serin-Protease-Inhibitor, Prostaglandin-H2 D-isomerase, Ankyrin repeat domain 15 protein und  $\alpha$ 2-HS-Glycoprotein höher, die Proteine Alpha-1-Antitrypsin, Beta V Spectrin sowie Apolipoprotein A-IV hingegen niedriger exprimiert, verglichen mit den Kontrollen. Aufgrund der Funktionen dieser differentiell exprimierten Proteine vermuten die Autoren, dass die acht Kandidatenproteine in die Pathogenese der proliferativen diabetischen Retinopathie involviert sind (Kim et al., 2006).

#### **2.9.4.3 Differentielle Proteinexpression im Glaskörper bei Endotoxin-induzierter Uveitis in der Ratte**

Bahk et al. untersuchten am Modell der Endotoxin-induzierten Uveitis (EIU) die differentielle Proteinexpression im Glaskörper, um die der EIU zu Grunde liegenden Mechanismen zu charakterisieren. Die in den Glaskörpern gesunder und uveitischer Ratten identifizierten Proteine gehörten zum größten Teil der Familie der Kristalline an. Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von Kristallinen im Glaskörper von uveitischen Ratten. Zusätzlich wurden strukturelle Unterschiede bei den detektierten Kristallinen festgestellt. Während in den Glaskörpern gesunder Augen beta A4- und beta B2-Kristalline vorwiegend in einer verkürzten Form vorlagen, waren diese verkürzten Formen bei uveitischen Ratten nicht zu finden. Aufgrund der beobachteten Unterschiede vermuteten die Autoren, dass Proteinen aus der Familie der Kristalline eine wesentliche Bedeutung bei der EIU zukommt (Bahk et al., 2006).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an 18 Glaskörperproben von zehn augengesunden Pferden (Tab. 3.1.1), sowie an 42 Glaskörperproben von 42 an ERU erkrankten Pferden (Tab. 3.1.2) durchgeführt. Alle Pferde entstammten dem Patientengut der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Diagnose equine rezidivierende Uveitis erfolgte nach drei vorangegangenen uveitischen Schüben. Bei allen an ERU erkrankten Pferden wurde eine Pars-plana-Vitrektomie durchgeführt. Die in die Untersuchung einbezogenen Glaskörper augengesunder Pferde stammten von Tieren, die aufgrund anderer nicht heilbarer Krankheiten euthanasiert wurden. Für die jeweiligen Experimente erfolgte keine Selektion der Proben; es wurden die Glaskörperproben der jeweils nächsten in der Klinik vorgestellten ERU-Patienten in die Untersuchung einbezogen.

<b>Glaskörper Nr.</b>	<b>Pferd Nr.</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>
1	1	Warmblut	1 Jahr	Hengst
2	2	Kaltblut	1 Jahr	Stute
3	3	Pony	7 Jahre	Wallach
4				
5	4	Warmblut	5 Jahre	Stute
6				
7	5	Warmblut	2 Jahre	Hengst
8				
9	6	Warmblut	12 Jahre	Stute
10				
11	7	Warmblut	21 Jahre	Stute
12				
13	8	Araber	16 Jahre	Stute
14				

15	9	Warmblut	14 Jahre	Wallach
16				
17	10	Warmblut	7 Monate	Hengst
18				

**Tab. 3.1.1:** Rasse, Alter und Geschlecht der augengesunden Pferde

<b>Glaskörper Nr.</b>	<b>Pferd Nr.</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>
1	1	Warmblut	7 Jahre	Hengst
2	2	Haflinger	16 Jahre	Stute
3	3	Vollblut	5 Jahre	Wallach
4	4	Traber	7 Jahre	Wallach
5	5	Warmblut	3 Jahre	Stute
6	6	Pony	9 Jahre	Wallach
7	7	Warmblut	7 Jahre	Stute
8	8	Lette	8 Jahre	Wallach
9	9	Pony	5 Jahre	Wallach
10	10	Pura Raza Espanol	8 Jahre	Hengst
11	11	Warmblut	14 Jahre	Wallach
12	12	Traber	5 Jahre	Hengst
13	13	Warmblut	3 Jahre	Stute
14	14	Paint Horse	7 Jahre	Wallach
15	15	Warmblut	11 Jahre	Wallach
16	16	Warmblut	5 Jahre	Stute
17	17	Warmblut	13 Jahre	Wallach
18	18	Quarter Horse	11 Jahre	Stute
19	19	Warmblut	8 Jahre	Wallach
20	20	Friesen-Mix	17 Jahre	Wallach
21	21	Vollblut	11 Monate	Hengst
22	22	Warmblut	7 Jahre	Hengst
23	23	Dt. Reitpony	4 Jahre	Stute



24	24	Warmblut	8 Jahre	Wallach
25	25	Warmblut	5 Jahre	Hengst
26	26	Isländer	3 Jahre	Stute
27	27	Warmblut	7 Jahre	Stute
28	28	Tinker	7 Jahre	Wallach
29	29	Tinker	4 Jahre	Wallach
30	30	Warmblut	10 Jahre	Wallach
31	31	Traber	7 Jahre	Stute
32	32	Vollblut	6 Jahre	Stute
33	33	Warmblut	11 Jahre	Wallach
34	34	Knabstrupper	11 Jahre	Stute
35	35	Knabstrupper	4 Jahre	Stute
36	36	Traber	3 Jahre	Hengst
37	37	Warmblut	3 Jahre	Stute
38	38	Kleinpferd	12 Jahre	Stute
39	39	Isländer	12 Jahre	Wallach
40	40	Knabstrupper	6 Jahre	Wallach
41	41	Traber	9 Jahre	Stute
42	42	Warmblut	3 Jahre	Hengst

**Tab. 3.1.2:** Rasse, Alter und Geschlecht der an ERU erkrankten Pferde

### 3.1.1 Gewinnung des Glaskörpermaterials

Das Glaskörpermaterial uveitischer Pferde wurde im Rahmen einer therapeutischen Pars-plana-Vitrektomie entnommen und lag in Form einer Glaskörperspülung in einer BSS-Lösung<sup>1</sup> vor. Das Glaskörpermaterial augengesunder Pferde wurde unmittelbar nach Euthanasie der Tiere mittels einer Kanüle und Spritze, nach Einstich im dorso-temporalen Bereich des enukleierten Bulbus, aspiriert.

Die Proben wurden nach Entnahme mit einem Proteaseinhibitor-Mix<sup>2</sup> versetzt und in mehreren Aliquots zu je 1,75 ml bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

<sup>1</sup> Fa. Alcon, Freiburg

<sup>2</sup> Fa. Roche, Mannheim

### 3.1.2 Präparate für immunhistochemische Untersuchungen der Retina

Zu immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Präparate von sieben gesunden und 35 uveitischen Pferdeaugen eingesetzt. Das Untersuchungsmaterial wurde im Rahmen der Arbeit von Ehrenhofer et al. gewonnen und lag nach vorangegangener Fixierung in Bouinscher Lösung in Paraffin eingebettet vor (Ehrenhofer et al., 2002).

## 3.2 Puffer und Lösungen

### 3.2.1 Puffer

#### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2

NaCl <sup>3</sup>	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,45 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g

ad 1000 ml Aqua dest.

Zur Herstellung von PBS-Tween (PBS-T) pH 7,2 wurden zusätzlich 0,05% Tween-20 (0,5 ml/1000 ml PBS) zugesetzt.

#### Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) pH 7,3

Tris	1,21 g
NaCl	8,76 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

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

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

Tris	12,11 g
------	---------

mit 5 M HCl auf pH 6,8 titrieren,

ad 100 ml Aqua bidest.

---

<sup>3</sup> Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien: Fa. AppliChem, Darmstadt

### Dialysepuffer pH 7,6

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>4</sup>	7,52 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>5</sup>	1,07 g

ad 1000 ml Aqua dest.

### 3.2.2 Puffer und Lösungen für die zweidimensionale Gelelektrophorese

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

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

ad 50 ml Aqua bidest.

Bei Raumtemperatur (RT) fünf Stunden rühren.

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

#### Äquibrierungslösung

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

ad 1000 ml Aqua bidest.

#### Agarose-Lösung, 0,5%

Agarose <sup>11</sup>	0,25 g
-----------------------	--------

ad 50 ml Elektrophoresepuffer

Aufkochen und anschließend auf 58°C temperieren.

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

---

<sup>4</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>5</sup> Fa. Merck, Darmstadt

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

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

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

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

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

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

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

#### Gelpuffer, 1,5 M, pH 8,8

Tris 18,15 g

mit 5 M HCl auf pH 8,8 titrieren,  
ad 100 ml Aqua bidest.

#### Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)-Lösung, 10%

Dodecylsulfat Na-Salz (SDS) 10,00 g

ad 100 ml Aqua bidest.

#### Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)-Lösung, 20%

Dodecylsulfat Na-Salz (SDS) 20,00 g

ad 100 ml Aqua bidest.

#### Ammoniumpersulfatlösung (APS), 10%

Ammoniumpersulfat 0,10 g

ad 1 ml Aqua bidest.

#### Tris-HCl-Puffer, 0,5 M, pH 6,8

Tris 6,00 g

mit 5 M HCl auf pH 6,8 titrieren,  
ad 100 ml Aqua bidest.

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

Tris 15,00 g

Glycin 72,00 g

SDS 5,00 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

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

**Probenpuffer (reduzierend)**

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

ergeben 8,00 ml Probenpuffer.

**3.2.4 Lösungen für das Semi-Dry-Blotting**

**Anodenpuffer I, 0,3 M, pH 10,4**

Tris	36,33 g
Methanol, reinst	200 ml

ad 1000 ml Aqua dest.

**Anodenpuffer II, 25 mM, pH 10,4**

Tris	3,03 g
Methanol, reinst	200 ml

ad 1000 ml Aqua dest.

**Kathodenpuffer, pH 9,4**

Tris	3,03 g
6-Aminocaprinsäure <sup>12</sup>	5,25 g
Methanol, reinst	200 ml

ad 1000 ml Aqua dest.

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

Polyvinylpyrrolidone (PVP40) <sup>13</sup>	10,00 g
--	---------

ad 1000 ml PBS-T.

---

<sup>12</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>13</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

**Tris-HCl-Puffer, 0,1 M, pH 8,6**

Tris 12,11 g  
ad 1000 ml Aqua bidest.

**ECL-Lösung**

**Lösung 1** (bei 4°C gelagert)

0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) 200 ml  
Luminol<sup>14</sup> 0,05 g

**Lösung 2** (bei RT dunkel gelagert)

Para-Hydroxycoumarinsäure<sup>15</sup> 0,011 g  
in 10 ml Dimethylsulfoxid<sup>16</sup>  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** (30%)

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

1 ml Lösung 1  
+ 0,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)  
+ 100 µl Lösung 2

**3.2.5 Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen**

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

EDTA<sup>17</sup> 29,22 g  
ad 1000 ml Aqua dest.

**1% BSA-Lösung**

Bovines Serumalbumin (BSA) 1,00 g  
in 100 ml TBS-T.

---

<sup>14</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen  
<sup>15</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen  
<sup>16</sup> Fa. Alfa Aesar, Karlsruhe  
<sup>17</sup> Fa. Merck, Darmstadt

### 3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration des Glaskörpermaterials

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

Die Reaktionslösung setzte sich wie folgt zusammen:

H <sub>2</sub> O	800 µl
Bradford-Reagenz <sup>18</sup>	200 µl

Zur Erstellung einer Eichkurve diente ein BSA Standard<sup>19</sup>, der in den Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8 µg/ml Reaktionslösung gemessen wurde.

Die Proben wurden zu je einem Milliliter der Reaktionslösung pipettiert. Das Volumen der zu messenden Proteinlösung wurde dabei so gewählt, dass die Messwerte im linearen Bereich der Eichkurve lagen. Die photometrische Bestimmung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm.

### 3.4 Aufbereitung der Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese

#### 3.4.1 Lyophilisierung der Glaskörperproben

Um bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese eine adäquate Proteinmenge einsetzen zu können, war eine Volumeneinengung des Probenmaterials erforderlich. Dies wurde durch ein Lyophilisieren der Proben erreicht. Dazu wurden je 1,5 ml Probenmaterial in 2-ml-Reaktionsgefäße überführt, welche dann mit einem perforierten Deckel verschlossen wurden. Ein Eintauchen der Gefäße in flüssigen Stickstoff führte zum sofortigen Gefrieren der Proben. Unmittelbar danach konnte im Vakuum eines Lyophilisators<sup>20</sup> das gefrorene Wasser durch Sublimation entzogen werden.

Nach Abschluss der Lyophilisation wurde das verbleibende Pellet, je nach Größe, in 50-100 µl RNAse-freiem Wasser gelöst.

---

<sup>18</sup> Fa. BioRad, München

<sup>19</sup> Fa. New England Biolabs, Frankfurt

<sup>20</sup> Fa. Savant, Holbrook, NY, USA

### 3.4.2 Dialyse

Um Interferenzen bei der isoelektrischen Fokussierung infolge hoher Ionenkonzentrationen, insbesondere der in BSS-Lösung verdünnten Proben, zu verhindern, war eine Reduktion des Salzgehaltes des Untersuchungsmaterials erforderlich. Die lyophilisierten und anschließend in Wasser gelösten Proben wurden hierzu in Dialysegefäßen (Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Unit, 7 kD cut off)<sup>21</sup> über Nacht bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert.

Im Anschluss an die Dialyse erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben, welche dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert wurden.

## 3.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

### 3.5.1 Rehydratisierung der Proben

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden auf 11 cm langen Plastikstreifen fixierte, getrocknete Polyacrylamidgele mit einem immobilisierten, nichtlinearen pH-Gradienten von 3-11 eingesetzt (Immobiline™ DryStrip pH 3-11 NL, 11 cm)<sup>22</sup>. Das Auftragen der Probe erfolgte durch Rehydratisierung der Streifen. Dazu wurde die Probe zunächst in einer Rehydratationsflüssigkeit gelöst, die sich wie folgt zusammensetzte:

Probe + Lysepuffer	210 µl
Pharmalyte 3-10 <sup>23</sup>	2,2 µl
Bromphenolblau <sup>24</sup>	1,1 µl

Nach gleichmäßigem Einpipettieren der Rehydratationslösung in die Vertiefung einer Quellkammer wurde die Schutzfolie vom trockenen Gelstreifen abgezogen und dieser luftblasenfrei mit der Gelfläche auf die Probe aufgelegt. Um ein Auskristallisieren des im Lysepuffer enthaltenen Harnstoffs zu verhindern, wurde der Streifen anschließend mit entgastem Paraffinöl überschichtet. Durch Aufnahme der probehaltigen Rehydratationslösung hatten sich die trockenen Streifen nach einer Dauer von fünf Stunden rehydriert (in-Gel Hydratation).

---

<sup>21</sup> Fa. Pierce, Bonn

<sup>22</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>23</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>24</sup> Fa. Merck, Darmstadt



### 3.5.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer Multiphor II Elektrophoreseeinheit<sup>25</sup>. Um eine gleichmäßige Temperatur von 20°C während der Fokussierung aufrechtzuerhalten, wurde beim Aufbau der Elektrophoreseeinheit zwischen Kühlplatte und Wanne, sowie zwischen Wanne und Streifenhalter Paraffinöl pipettiert. Die rehydratisierten Streifen wurden so auf dem Streifenhalter platziert, dass ihre saure Seite zur Kathode, die basische Seite zur Anode zeigte. Nach Auflegen der angefeuchteten Elektrodenstreifen<sup>26</sup> auf die Streifenenden wurden die beiden Elektroden aufgesetzt und die Gelstreifen mit entgastem Paraffinöl überschichtet.

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Hilfe eines EPS 3501 XL Electrophoresis Power Supply<sup>27</sup> wie folgt durchgeführt:

Phase	1	2	3
Spannung (V)	150	300	1000
Zeit (h)	2	3	13

Bei einer Summe von ca. 14000 Vh war die Fokussierung beendet und die Streifen wurden entweder direkt zur Verwendung in der SDS-Gelelektrophorese vorbereitet oder in Folie verpackt und bei -20°C gelagert.

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

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension kamen Minigele mit einer Größe von 7,5 cm x 8 cm und einer Geldicke von 0,75 mm zum Einsatz. Zum Gießen der Gele diente ein BV 102 Mini Slab Gel Gießstand<sup>28</sup>. Die Herstellung eines Gradientengels erfolgte nach einer von Rehm beschriebenen Methode (Rehm, 2002). Hierzu wurden je Gel folgende Acrylamid-Lösungen hergestellt:

---

<sup>25</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>26</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

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

<sup>28</sup> Fa. SERVA, Heidelberg

	Aqua bidest.	Glycerin	Gelpuffer	Acrylamid (30%) <sup>29</sup>
9%-Lösung	1,125 ml		0,625 ml	0,750 ml
15%-Lösung	0,400 ml	0,225 ml	0,625 ml	1,250 ml

Unmittelbar vor dem Gießen der Gele wurden zu jeder Lösung 12,5 µl APS 10% sowie 5 µl TEMED zugegeben.

In eine Pipette wurde zuerst die 9%-Lösung und anschließend die 15%-Lösung aufgezogen. Nach Durchperlen von ein paar Luftblasen durch die Pipette bildete sich der Gradient. Die Lösung wurde anschließend zwischen die beiden Glasplatten des Gelgießstandes gegossen und die Geloberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Polymerisierungszeit von einer Stunde und Entfernung des Isopropanols konnte das Gel zur Proteinauftrennung in der zweiten Dimension eingesetzt werden.

### 3.5.4 Äquibrierung und 2. Dimension

Der isoelektrischen Fokussierung folgte eine zweifache Äquibrierung der Streifen. Hierzu wurden diese jeweils zehn Minuten unter Schwenken nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

1. Reduktionslösung: Äquibrierungslösung + DTT<sup>30</sup> (0,3g/30ml)
2. Carbamylierungslösung: Äquibrierungslösung + Jodacetamid<sup>31</sup> (1,44g/30ml)

Der Carbamylierungspuffer enthielt zusätzlich 0,01% Bromphenolblau<sup>32</sup> zur Markierung der Lauffront bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese.

Um elektroendosmotische Effekte beim Proteintransfer zu reduzieren, enthielt die Äquibrierungslösung Harnstoff und Glycerin. Ein Zusatz von DTT zum ersten Äquibrierungspuffer dient der Aufrechterhaltung der reduzierenden Bindungen, die anschließend mit Jodacetamid in stabile Carbamidomethylierungen umgewandelt werden.

Nach der Äquibrierung wurden die Streifen luftblasenfrei hochkant auf das Polyacrylamidgel aufgelegt und anschließend mit in Laufpuffer aufgekochter und auf

<sup>29</sup> Fa. SERVA, Heidelberg

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

<sup>31</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>32</sup> Fa. Merck, Darmstadt

58°C temperierter Agarose (0,5%) überschichtet. Nach Erstarren der Agarose wurden die Gele in die Elektrophoresekammern eingesetzt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte während der ersten 30 Minuten mit einer konstanten Spannung von 60 V und anschließend mit einer konstanten Spannung von 175 V (BP 500 Plus Power Supply)<sup>33</sup>. Um eine Überhitzung der Gele zu verhindern erfolgte die Elektrophorese bei einer Umgebungstemperatur von 4°C. Kurz bevor die blaue Lauffront das untere Ende des Geles erreicht hatte, wurde der Lauf beendet und die Gele anschließend gefärbt oder zum Immunoblotting verwendet.

---

<sup>33</sup> Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

### 3.5.5 Färbung der Gele

Alle Färbungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Gele befanden sich dabei in Plastikschaalen auf einem Schüttler.

#### 3.5.5.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung der Gele umfasste die unten genannten Schritte. Sämtliche Lösungen wurden vor Gebrauch jeweils frisch hergestellt.

	<b>Zeit</b>	<b>Lösung</b>	<b>Herstellung von 1 Liter</b>
<b>Fixierung</b>	2 x 20 min	50% Methanol	500 ml Methanol
		12% Essigsäure	200 ml 60% Essigsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
		0,0185% Formaldehyd	+ 500 µl Formaldehyd 37%
<b>Inkubation</b>	3 x 10 min	50% Ethanol	500 ml Ethanol + 500 ml H <sub>2</sub> O
<b>Inkubation</b>	1 x 0,2 min	0,8 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	200 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>34</sup> /1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Waschen</b>	2 x kurz	H <sub>2</sub> O	
<b>Silberimprägnierung</b>	1 x 20 min	11,8 mM AgNO <sub>3</sub>	2 g AgNO <sub>3</sub> /1000 ml H <sub>2</sub> O
		0,028% Formaldehyd	+ 750 µl Formaldehyd 37%
<b>Waschen</b>	1 x kurz	H <sub>2</sub> O	
<b>Entwickeln</b>	variabel	0,57 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	60 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /1000 ml H <sub>2</sub> O
		0,02 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+ 25 ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Lösung (s.o.)
		0,0185% Formaldehyd	+ 500 µl Formaldehyd 37%
<b>Stoppen</b>	>10 min	50% Methanol	500 ml Methanol
		12% Essigsäure	200 ml 60% Essigsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Konservierung</b>	>20 min	20% Ethanol	200 ml Ethanol
		2% Glycerin	25 ml 80% Glycerin ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

---

<sup>34</sup> Fa. Merck, Darmstadt

### 3.5.5.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

Die kolloidale Coomassie-Färbung wurde wie folgt durchgeführt

	<b>Zeit</b>	<b>Lösung</b>	<b>Herstellung</b>
<b>Fixierung</b>	3 x 30 min	30% Ethanol 2% Phosphorsäure	300 ml Ethanol 23,5 ml 85% Phosphorsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Waschen</b>	3 x 20 min	2% Phosphorsäure	23,5 ml 85% Phosphorsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Äquilibrierung</b>	1 x 30 min	2% Phosphorsäure 18% Ethanol 15% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 ml H <sub>2</sub> O 20 ml 85% Phosphorsäure 150 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>35</sup> ad 800 ml H <sub>2</sub> O unter Rühren 20 ml H <sub>2</sub> O + 180 ml Ethanol zugeben
<b>Färbung</b>	über Nacht	Coomassie-Lösung	2 g Coomassie G <sup>36</sup> in 100 ml H <sub>2</sub> O heiß rühren (30 min); 1 vol% der Coomassie-Lösung zur vorherigen Lösung zugeben
<b>Waschen</b>	nach Bedarf	H <sub>2</sub> O	
<b>Konservierung</b>	1 min	20% Ethanol 2% Glycerin	200 ml Ethanol 25 ml 80% Glycerin ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

Nach Abschluss des Färbens wurden die Gele in Folien<sup>37</sup> verpackt und bei Raumtemperatur getrocknet.

## 3.6 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen

### 3.6.1 Entfärben und Verdauen der Proteinspots

Die massenspektrometrisch zu analysierenden Spots wurden mit Hilfe eines Skalpell aus den Gelen ausgeschnitten. Da die Gele zuvor in Folie verpackt waren, musste diese zunächst wieder von den Gelstücken abgelöst werden, indem die

<sup>35</sup> Fa. Fluka Chemie, Deisenhofen

<sup>36</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>37</sup> Fa. Deti, Meckesheim

Spots in je 100 µl Millipore-Wasser rehydriert wurden. Nach Entfernen der Plastikfolie wurden die silbergefärbten Spots mit folgenden Lösungen entfärbt:

30 mM Kaliumferricyanid<sup>38</sup> (0,09876 g ad 10 ml H<sub>2</sub>O)

100 mM Natriumthiosulfat<sup>39</sup> (0,24818 g ad 10 ml H<sub>2</sub>O)

Die Lösungen wurden jeweils frisch angesetzt und vor Verwendung im Verhältnis 1:1 gemischt. In einer 96-Loch-Polystrol-Platte<sup>40</sup> wurden die Gelstücke bis zur sichtbaren Entfärbung in je 100 µl der Entfärbelösung belassen und anschließend 1x1 Minute und 2x5 Minuten in H<sub>2</sub>O sowie 3x15 Minuten in Acetonitril<sup>41</sup> (40%) gewaschen.

Der Spotverdau erfolgte mit Trypsin, wodurch eine Spaltung der Proteine zwischen den Aminosäuren Arginin und Lysin stattfand und somit genau definierte Proteinfragmente resultierten. Hierzu wurde eine Trypsin-Lösung (0,5 µg Trypsin<sup>42</sup>/µl) mit einer Tris-Lösung (1mM) im Verhältnis 1:50 verdünnt. Pro Spot wurden maximal 10 µl dieser Lösung zugegeben. Die Inkubation der Gelstücke mit der Verdauungslösung erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 37°C.

### 3.6.2 Massenanalyse

Die massenspektrometrische Analyse der verdauten Proteine erfolgte mittels MALDI-TOF peptide mass fingerprinting und MS/MS in einem MALDI-TOF/TOF tandem Massenspektrometer<sup>43</sup>.

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

2,5 mg α-Cyano-4-hydroxymethylsäure<sup>44</sup> pro

1 ml 70% Acetonitril<sup>45</sup> + 0,1% Trifluoressigsäure<sup>46</sup>

---

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

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

<sup>40</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>41</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>42</sup> Fa. Promega, Mannheim

<sup>43</sup> ABI 4700 Proteomics Analyzer, Fa. Applied Biosystems, USA

<sup>44</sup> Fa. Bruker Daltonics, Bremen

<sup>45</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>46</sup> Fa. PerkinElmer, Rodgau - Jügesheim

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

Zur Ermittlung der Spektren im positiven Ionen Reflektor Modus wurden 2500 Laserschüsse gemittelt und mit Hilfe einer externen Kalibrierung analysiert. Die Kalibrierung erfolgte anhand der Standardpeptide Angiotensin-2-acetat mit einer monoisotopischen Masse des  $[M+H]^+$  Ionensignals bei 1046.54 Da, Substanz P (1347.74 Da), Bombesin (1619.82 Da), und ACTH 18-3 (2465.20 Da)<sup>47</sup>. Die PMF Spektren wurden nicht geglättet und Unschärfen nicht abgezogen. Die Bestimmung der monoisotopischen Peakmassen mit einer minimalen relativen Intensität von fünf und einer lokalen Unschärfe mit einer Spanne von 200  $m/z$  erfolgte automatisch innerhalb des Massenbereichs von 800-4000 kD. Bis zu sieben der intensivsten Ionensignale mit einer relativen Intensität  $>30$  wurden als Precursor für die MS/MS Erfassung ausgewählt, wobei Trypsin-Autolyse-Peaks und Matrixionensignale ausgeschlossen wurden. Im MS/MS positiven Ionenmodus wurden bei 1 kV Kollisionsenergie, einem Druck der Kollisionsgasluft von  $1,6 \times 10^{-6}$  torr und vorgegebener Kalibration jeweils 4000 Spektren gemittelt. Die monoisotopischen Peakmassen wurden, bei einer minimalen relativen Intensität von 10 und einer lokalen Unschärfe mit einer Spanne von 200  $m/z$ , automatisch bestimmt.

---

<sup>47</sup> Alle Kalibrationspeptide von Fa. Sigma, Deisenhofen

### 3.6.3 Datenbanksuche

Die kombinierten PMF- und MS/MS-Peptid-Massenlisten wurden mit Hilfe der MASCOT® Datenbank Suchmaschine v1.9<sup>48</sup>, welche in eine GPS-Explorer Software integriert war, mit den Einträgen in den öffentlichen Proteindatenbanken verglichen. Zur Suche dienten die SWISS-PROT Datenbank (Version 20051206; 201594 Sequenzen; 73123101 Reste) und die MSDB Metadatenbank (Version 20040703; 1501893 Sequenzen; 480537664 Reste) unter Vorgabe folgender Parameter:

Einträge beschränkt auf Mammalia (39612 und 252365 Sequenzen) oder Eubacteria (92920 und 527108 Sequenzen), 65 ppm Massentoleranz, 0,3 Da Fragmenttoleranz, Trypsinschnitt, maximal eine nicht geschnittene Trypsinspaltstelle, Carbamidomethylierung als feste Modifikation und Oxidation von Methioninen als variable Modifikation. Ein Protein galt als identifiziert, wenn der wahrscheinlichkeitsbasierte MOWSE Score signifikant ( $p < 0,05$ ) für die jeweilige Datenbank war (Protein Scores größer als 58 waren signifikant für SwissProt, Scores größer als 67 waren signifikant für MSDB), wenn die passenden Peptidmassen im Spektrum vorhanden waren und die theoretischen Massen der signifikanten Proteine mit den im Experiment beobachteten Werten übereinstimmten.

Die genannten Datenbanken sind über das World Wide Web frei zugänglich

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

SwissProt: <http://www.expasy.org>

MSDB: <http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>

### 3.7 Albumin- und IgG-Depletion aus dem Glaskörper

Die Proteine Albumin und IgG waren im Proteom der Glaskörper uveitischer Pferde hoch abundant. Um zu verhindern, dass infolgedessen schwach abundante Proteine einer Detektion entgehen, wurde eine Depletion der beiden Proteine aus den Glaskörperproben durchgeführt. Bei fünf Glaskörpern uveitischer Pferde und zwei Glaskörpern augengesunder Pferde wurde nach Aufbereitung des Probenmaterials wie in Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben, eine selektive Entfernung der beiden

---

<sup>48</sup> Matrix Science Ltd., UK



Proteine mittels eines Albumin- und IgG-Entfernungskits (Albumin and IgG Removal Kit)<sup>49</sup> vorgenommen.

Zur Entalbuminisierung kam je Probe eine maximale Gesamtproteinmenge von 650 µg zum Einsatz. Die Proben wurden zusammen mit 750 µl der im Kit enthaltenen Reaktionslösung in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen<sup>50</sup> überführt und 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach Überführen des entstandenen Proben-Gel-Gemisches in eine Mikrozentrifugensäule folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 6500 x g. Das gewonnene (Albumin- und IgG-depletierte) Filtrat wurde durch Konzentration und Entsalzen zur weiteren Verwendung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese vorbereitet. Hierzu wurde das Filtrat auf zwei Mikrozentrifugengefäße verteilt und jeweils 1 ml Aceton (vorgekühlt auf -20°C) zugegeben. Während zweistündiger Inkubation bei -20°C erfolgte eine Präzipitation der Proteine. Nach zehnminütiger Zentrifugation mit 13000 x g bei 4°C und anschließendem Dekantieren des Acetons wurden die verbleibenden Pellets 5-10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Größe in 50-180 µl Lysepuffer gelöst, so dass eine anschließende Verwendung zur zweidimensionalen Gelelektrophorese möglich war.

### **3.8 Immunoblotting**

#### **3.8.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die eindimensionale Auftrennung der vitrealen Proteine erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). In einer Mini Protean II Cell Gießkammer<sup>51</sup> wurden Gele mit einer Größe von 8 x 7 cm und einer Geldicke von 0,75 mm gegossen. Dabei wurde ein Trenngel mit einer Trennstrecke von 5 cm und einer Acrylamidkonzentration von 10% mit einem Sammelgel mit einer Länge von 2 cm und einer Acrylamidkonzentration von 4% überschichtet. Zur Herstellung von zwei Gelen wurden folgende Lösungen angesetzt:

---

<sup>49</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>50</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>51</sup> Fa. BioRad, München

	<b>10%ige Lösung</b>	<b>4%ige Lösung</b>
<b>Aqua bidest.</b>	4,20 ml	6,17 ml
<b>Gelpuffer pH 8,8</b>	2,50 ml	
<b>Tris-HCl-Puffer, 0,5 M, pH 6,8</b>		2,50 ml
<b>Acrylamidlösung 30%</b> <sup>52</sup>	3,30 ml	1,33 ml
<b>SDS-Lösung, 10%</b>	100 µl	100 µl

Unmittelbar vor dem Gießen wurden zusätzlich jeweils 50 µl APS 10% sowie 20 µl TEMED zugegeben.

Nach Gießen des Trenngeles wurde dieses mit Aqua bidest. überschichtet. Nach einer Polymerisierungszeit von 30 Minuten konnte das Wasser wieder entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet werden. Um eine Auftrennung mehrerer Proben in einem Gel zu ermöglichen, wurde vor der Polymerisierung ein Kamm zur Formung von Probenaschen in das Sammelgel eingelassen, welcher nach erfolgter Polymerisierung wieder entfernt werden konnte.

Das aufzutrennende Glaskörpermaterial wurde im Verhältnis 1:3 mit reduzierendem Probenpuffer verdünnt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Pro Geltasche wurden je 1,5 µg Glaskörperprotein aufgetragen. Zur Ermittlung der Bandenhöhe wurde in einer Tasche ein Molekulargewichtsmarker<sup>53</sup> aufgetrennt, welcher Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht enthält. Nach Einsatz der Gele in die Elektrophoresekammern wurden diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte während der ersten zehn Minuten mit einer konstanten Stromstärke von 10 mA pro Gel und danach mit einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel (Power Pac 300 Power Supply)<sup>54</sup>.

### **3.8.2 Transfer der Proteine auf eine Membran (Western Blot)**

Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in einem Semi-dry-Elektroblotter<sup>55</sup> vom Gel auf eine Membran transferiert. Nach Zuschneiden der Filterpapiere<sup>56</sup> und der

<sup>52</sup> Fa. SERVA Electrophoresis, Heidelberg

<sup>53</sup> Fa. Fermentas, St. Leon-Rot

<sup>54</sup> Fa. BioRad, München

<sup>55</sup> BlueFlash-L, Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

<sup>56</sup> 3MM Chr, Fa. Whatman, Dassel

Nitrozellulosemembran<sup>57</sup> auf die Größe des Geles wurde das Blot-Sandwich folgendermaßen aufgebaut (Abb. 3.8.2):

Auf die anodische Platte des Elektrobloppers wurden zwei Lagen in Anodenpuffer I getränktes Filterpapier sowie eine Lage in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier gelegt. Darauf wurden die in Aqua bidest. getränkte Nitrozellulosemembran und anschließend das SDS-Gel aufgelegt. Nach Auflegen von drei Lagen in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere wurden mit einer Glaspipette Luftblasen ausgestrichen und anschließend die kathodische Platte aufgesetzt.



Abb. 3.8.2: Aufbau des Blotsandwiches

Der elektrophoretische Transfer erfolgte mit Hilfe eines BP 500 Plus Power supply<sup>58</sup> bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm<sup>2</sup> und einer Transferzeit von 30 Minuten.

### 3.8.3 Detektion von Proteinen durch spezifische Antikörper

Nach Transfer der Glaskörperproteine auf eine Membran wurde unter Verwendung spezifischer Antikörper die Expression der Proteine sFRP-2 und PEDF verifiziert.

#### 3.8.3.1 Detektion von sFRP-2

- Blockieren freier Bindungsstellen der Membran  
Inkubation der Membran in PBS-T-PVP-Lösung über Nacht bei 4°C

1 x 15 Minuten, 5 x 5 Minuten mit PBS-T waschen

<sup>57</sup> Hybond-ECL, Nitrocellulose, Porengröße 0,45 µm, Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>58</sup> Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

- Inkubation mit dem primären Antikörper  
Kaninchen-anti-human-sFRP-2-Antiserum (polyklonal)<sup>59</sup>  
1 µg/ml in PBS-T  
drei Stunden bei RT

3 x 5 Minuten mit PBS-T waschen

- Inkubation mit dem sekundären Antikörper  
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antiserum (POD-konjugiert)<sup>60</sup>  
1:3000 in PBS-T  
eine Stunde bei RT

6 x 10 Minuten mit PBS-T waschen

- Enhanced-Chemilumineszens (ECL)-Entwicklung  
10 ml ECL-Lösung pro Membran  
zwei Minuten Inkubation bei RT

Anschließend wurde die Farbreaktion auf einem Röntgenfilm<sup>61</sup> sichtbar gemacht.

### **3.8.3.2 Detektion von PEDF**

- Blockieren freier Bindungsstellen der Membran  
Inkubation der Membran in PBS-T-PVP  
über Nacht bei 4°C

1 x 15 Minuten, 5 x 5 Minuten mit PBS-T waschen

---

<sup>59</sup> Fa. Santa Cruz, Heidelberg

<sup>60</sup> Fa BioRad, München

<sup>61</sup> HR-E30, Fa. FUJI, Vertrieb über Fa. Christiansen, Planegg

- Inkubation mit dem primären Antikörper  
Maus-anti-human-PEDF-Antikörper (monoklonal)<sup>62</sup>  
1,3 µg/ml in PBS-T  
drei Stunden bei RT

3 x 5 Minuten mit PBS-T waschen

- Inkubation mit dem sekundären Antikörper  
Ziege-anti-Maus-IgG-Antiserum (POD-konjugiert)<sup>63</sup>

6 x 10 Minuten mit PBS-T waschen

- Enhanced-Chemilumineszens (ECL)-Entwicklung  
10 ml ECL-Lösung pro Membran  
zwei Minuten Inkubation bei RT

Anschließend wurde die Farbreaktion auf einem Röntgenfilm<sup>64</sup> sichtbar gemacht.

### **3.9 Densitometrische Bildanalyse**

Zur quantitativen Analyse der Proteinexpression wurden die Spotintensitäten der zweidimensionalen Gele sowie die Schwärzungsgrade der Immunoblot-Signale densitometrisch bestimmt.

#### **3.9.1 Zweidimensionale Gele**

Nach zweidimensionaler Auftrennung des Glaskörperproteoms wurden die silbergefärbten Gele in einem Farbscanner (GS 710 Calibrated Imaging Densitometer)<sup>65</sup> mit einer Auflösung von 300 dpi gescannt. In einer automatischen Bildanalyse durch eine Proteomanalyse-Software (ProteomWeaver 2.2)<sup>66</sup> erfolgte die Detektion der Spots, die Ermittlung der Spotanzahl je Gel sowie die Messung der

---

<sup>62</sup> Fa. Chemicon, Ochsenhausen

<sup>63</sup> Fa. BioRad, München

<sup>64</sup> HR-E30, Fa. FUJI, Vertrieb über Fa. Christiansen, Planegg

<sup>65</sup> Fa. BioRad, München

<sup>66</sup> Fa. BioRad, München

Intensitäten einzelner Spots. Für die Spotdetektion wurden folgende Parameter vorgegeben:

Minimaler Spotradius:	4
Minimale Spotintensität:	2000
Minimaler Kontrast:	10

Weiterhin wurden anhand dieses Programms repräsentative Durchschnittsgele für die Glaskörperproteome gesunder und an ERU erkrankter Augen erstellt. Bei der Erstellung von Durchschnittsgelen wurden jene Spots berücksichtigt, die in mindestens 55% der analysierten Gele detektiert werden konnten.

Zur quantitativen Erfassung der differentiellen Proteinexpression wurde der Mittelwert der Schwärzungsgrade der Spots aus den Gelen gesunder Glaskörper 100% gesetzt ( $\pm$  Standardabweichung). Die prozentuale Intensität der Spots uveitischer Glaskörperproben wurde anhand des Schwärzungsgrades entsprechend errechnet.

### **3.9.2 Eindimensionale Immunoblots**

Die quantitative Analyse der in den Immunoblots detektierten Proteine erfolgte mittels densitometrischer Bestimmung der Signalintensitäten. Hierzu wurden die entwickelten Röntgenfilme in einem Scanner (GS 710 Calibrated Imaging Densitometer)<sup>67</sup> mit einer Auflösung von 300 dpi eingescannt. Die Bestimmung der Intensitäten der Signale erfolgte mittels der 1D-Gel-Analyse-Software Quantity One 4.2.1<sup>68</sup>.

Die differentielle Proteinexpression wurde ermittelt, indem die Schwärzungsgrade der Blot-Signale gesunder Glaskörper 100% gesetzt ( $\pm$  Standardabweichung) wurden und die prozentuale Intensität der Signale uveitischer Glaskörperproben entsprechend anhand des Schwärzungsgrades errechnet wurden.

### **3.10 Statistische Auswertung**

Zum Vergleich der Proteinexpression in gesunden und uveitischen Glaskörperproben wurde der student's t-test durchgeführt (zweiseitig, gepaart).

---

<sup>67</sup> Fa. BioRad, München

<sup>68</sup> Fa. BioRad, München

### 3.11 Immunhistochemische Untersuchung des retinalen Gewebes

#### 3.11.1 Paraffinschnittherstellung

Von den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms<sup>69</sup> Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt, welche im Wasserbad auf beschichtete Objektträger<sup>70</sup> gezogen und anschließend auf einer Wärmeplatte (47°C) getrocknet wurden. Um ein Abschwimmen der Präparate während der histologischen Färbeprozesse zu verhindern, wurden die Objektträger für mindestens 24 weitere Stunden im Trockenschrank bei 39°C gelagert.

#### 3.11.2 Immunhistochemische Färbung

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

- Xylol (2 x 5 Minuten)
- Isopropanol (2 x 5 Minuten)
- Ethanol 96% (5 Minuten)
- Ethanol 70% (5 Minuten)
- Aqua dest. (5 Minuten)

Anschließend wurden die Epitope für die immunhistochemische Färbung demaskiert:

- Demaskieren  
15 Minuten in 0,1 M EDTA-Puffer (pH 8,0) kochen

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

Danach erfolgte die immunhistochemische Färbung.

##### 3.11.2.1 Immunhistochemische Färbung von sFRP-2

- Blockieren  
In 25 µl Ziegen Serum / ml TBS-T mit 1% BSA für 45 Minuten

---

<sup>69</sup> HM360, Fa. Microm, Walldorf

<sup>70</sup> Super Frost Plus, Fa. Neo Lab, Heidelberg

- Inkubation mit dem primären Antikörper  
Kaninchen-anti-human-sFRP-2-Antiserum (polyklonal)<sup>71</sup>  
10 µg/ml in TBS-T mit 1% BSA  
eine Stunde bei Raumtemperatur (RT)

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

- Inkubation mit dem sekundären Antikörper  
Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (biotinyliert)<sup>72</sup>  
1:2000 in TBS-T  
eine Stunde bei RT

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

- Brücke  
Inkubation mit Streptavidin-POD<sup>73</sup> 30 Minuten bei RT

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

- Färbung  
VIP<sup>74</sup> 1 Minute  
Leitungswasser 5 Minuten (fließend)  
Aqua dest.

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun<sup>75</sup> 30 Sekunden
- mit Aqua dest. abspülen
- unter fließendem Leitungswasser 15 Minuten spülen

---

<sup>71</sup> Fa. Santa Cruz, Heidelberg

<sup>72</sup> Fa. Linaris, Wertheim-Bettingen

<sup>73</sup> Elite Kit, Fa. Linaris, Wertheim

<sup>74</sup> Vector-VIP, Fa. Linaris, Wertheim

<sup>75</sup> Fa. Merck, Darmstadt



Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:

- Aqua dest. (5 Minuten)
- Ethanol 70% (5 Minuten)
- Ethanol 96% (5 Minuten)
- Isopropanol (2 x 5 Minuten)
- Xylol (2 x 5 Minuten)

Abschließend wurden die Schnitte mit Eukitt<sup>76</sup> eingedeckelt. Die Färbung wurde mit dem Mikroskop Leica DM LS2<sup>77</sup> beurteilt.

### 3.11.2.2 Immunhistochemische Färbung von PEDF

- Blockieren  
In 25 µl Pferdeserum / ml TBS-T mit 1% BSA für 45 Minuten
- Inkubation mit dem primären Antikörper  
Maus-anti-human-PEDF-Antikörper (monoklonal)<sup>78</sup>  
15 µg/ml TBS-T mit 1% BSA  
eine Stunde bei RT

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

- Inkubation mit dem sekundären Antikörper  
Pferd-anti-Maus-Antikörper (biotinyliert)<sup>79</sup>  
1:1000 in TBS-T  
eine Stunde bei RT

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

---

<sup>76</sup> Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

<sup>77</sup> Fa. Leica, Bensheim

<sup>78</sup> Fa. Chemicon, Ochsenshausen

<sup>79</sup> Fa. Linaris, Wertheim-Bettingen

- Brücke  
Inkubation mit Streptavidin-POD<sup>80</sup> 30 Minuten bei RT

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

- Färbung  
VIP<sup>81</sup> 1 Minute  
Leitungswasser 5 Minuten (fließend)  
Aqua dest.

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun<sup>82</sup> 30 Sekunden
- mit Aqua dest. abspülen
- unter fließendem Leitungswasser 15 Minuten spülen

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:

- Aqua dest. (5 Minuten)
- Ethanol 70% (5 Minuten)
- Ethanol 96% (5 Minuten)
- Isopropanol (2 x 5 Minuten)
- Xylol (2 x 5 Minuten)

Abschließend wurden die Schnitte mit Eukitt<sup>83</sup> eingedeckelt.

Die Färbung wurde mit dem Mikroskop Leica DM LS2<sup>84</sup> beurteilt.

---

<sup>80</sup> Elite Kit, Fa. Linaris, Wertheim

<sup>81</sup> Vector-VIP, Fa. Linaris, Wertheim

<sup>82</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>83</sup> Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

<sup>84</sup> Fa. Leica, Bensheim

### 3.11.3 Immunhistochemische Doppelfärbung von PEDF und VEGF

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte erfolgte wie in Abschnitt 3.11.2 beschrieben.

Anschließend folgte die Demaskierung der Schnitte:

- Demaskieren  
15 Minuten in 0,1M EDTA-Puffer (pH 8,0) kochen

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

Die immunhistochemische Doppelfärbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Blockieren  
In 25 µl Ziegen Serum / ml TBS-T mit 1% BSA für 30 Minuten bei RT

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

- Inkubation mit dem ersten primären Antikörper  
Maus-anti-human-PEDF-Antikörper (monoklonal)  
15 µg/ml in TBS-T mit 1% BSA  
über Nacht bei 4°C

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

- Inkubation mit dem ersten sekundären Antikörper  
Ziege-anti-Maus-IgG<sub>1</sub> (Alexa Fluor 568, rot)<sup>85</sup> 1:200  
30 Minuten bei RT

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

- Blockieren  
Mit DakoCytomation Protein Block<sup>86</sup> 30 Minuten bei RT

---

<sup>85</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

- Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper  
Maus-anti-human-VEGF-Antikörper (monoklonal)<sup>87</sup>  
15 µg/ml Antibody Diluent<sup>88</sup>  
über Nacht bei RT

3 x 5 min mit TBS-T waschen

- Inkubation mit dem zweiten sekundären Antikörper  
Ziege-anti-Maus-IgG<sub>1</sub> (Alexa Fluor 488, grün)<sup>89</sup> 1:200  
30 Minuten bei RT

3 x 5 Minuten mit TBS-T waschen

Anschließend wurden die Schnitte mit einem Eindeckelmedium (Dako Fluorescent Mounting Medium)<sup>90</sup> eingedeckelt.

### 3.11.4 Bilddokumentation

Die Bilddokumentation erfolgte mit einer auf dem Mikroskop<sup>91</sup> adaptierten Digitalkamera<sup>92</sup> mit Hilfe der Software AXIO VISION LE Rel. 4.5<sup>93</sup> bei einer Bildgröße von 2584x1936 Pixel.

---

<sup>86</sup> Fa. Dako, Hamburg

<sup>87</sup> Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

<sup>88</sup> Fa. Dako, Hamburg

<sup>89</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

<sup>90</sup> Fa. Dako, Hamburg

<sup>91</sup> Fa. Zeiss, Hallbergmoos

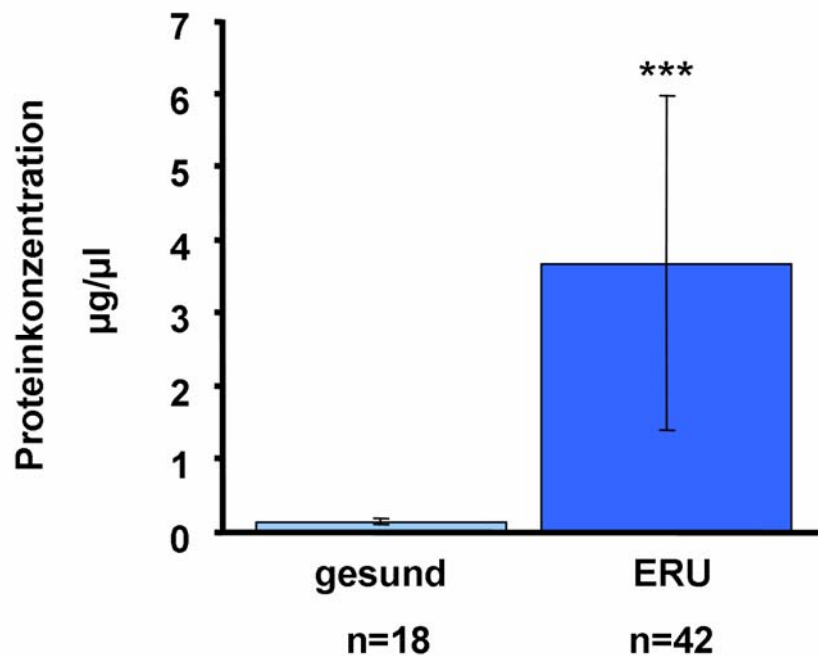
<sup>92</sup> AxioCam MRc5, Fa. Zeiss, Hallbergmoos

<sup>93</sup> Fa. Zeiss, Hallbergmoos

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Proteinkonzentration der Glaskörper

Das Glaskörpermaterial von 18 untersuchten gesunden Pferdeaugen wies eine mittlere Proteinkonzentration von  $0,15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $0,10 \mu\text{g}/\mu\text{l} - 0,29 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) auf (Tab. 4.1). Die mittlere Proteinkonzentration der Glaskörper von 42 untersuchten an ERU erkrankten Pferdeaugen betrug  $3,67 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $0,40 \mu\text{g}/\mu\text{l} - 9,80 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Tab. 4.1). Dies entspricht einer Erhöhung der mittleren Proteinkonzentration der Glaskörper uveitischer Augen um den Faktor 24 (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** Proteinkonzentrationen der Glaskörper gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Signifikante Erhöhung der mittleren Proteinkonzentration der Glaskörper uveitischer Augen (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ). Die Säulen geben die mittlere Proteinkonzentration ( $\pm$  Standardabweichung) wieder.

Ergebnisse

gesund			ERU		
Glaskörper	Proteinkonzentration (µg/µl)		Glaskörper	Proteinkonzentration (µg/µl)	
1	0,11		1	4,80	
2	0,12		2	9,80	
3	0,10		3	5,50	
4	0,21		4	0,40	
5	0,11		5	0,90	
6	0,12		6	0,50	
7	0,25		7	3,00	
8	0,16		8	1,10	
9	0,13		9	1,60	
10	0,12		10	2,00	
11	0,15		11	4,90	
12	0,29		12	2,10	
13	0,15		13	2,70	
14	0,12		14	4,70	
15	0,15		15	1,40	
16	0,14		16	3,30	
17	0,11		17	1,40	
18	0,11		18	3,10	
		Mittelwert	19	4,10	Mittelwert
		0,15 µg/µl	20	5,90	3,67 µg/µl
		± 0,05 µg/µl	21	1,90	± 2,28 µg/µl
			22	1,70	
			23	3,10	
			24	5,90	
			25	2,60	
			26	2,50	
			27	4,80	
			28	1,60	
			29	8,20	
			30	7,00	
			31	2,80	
			32	5,50	
			33	4,60	
			34	3,30	
			35	9,50	
			36	5,90	
			37	1,70	
			38	2,00	
			39	1,00	
			40	3,00	
			41	2,10	
			42	6,60	

**Tab. 4.1:** Proteinkonzentrationen des Glaskörpermaterials von 18 gesunden und 42 an ERU erkrankten Pferdeaugen.

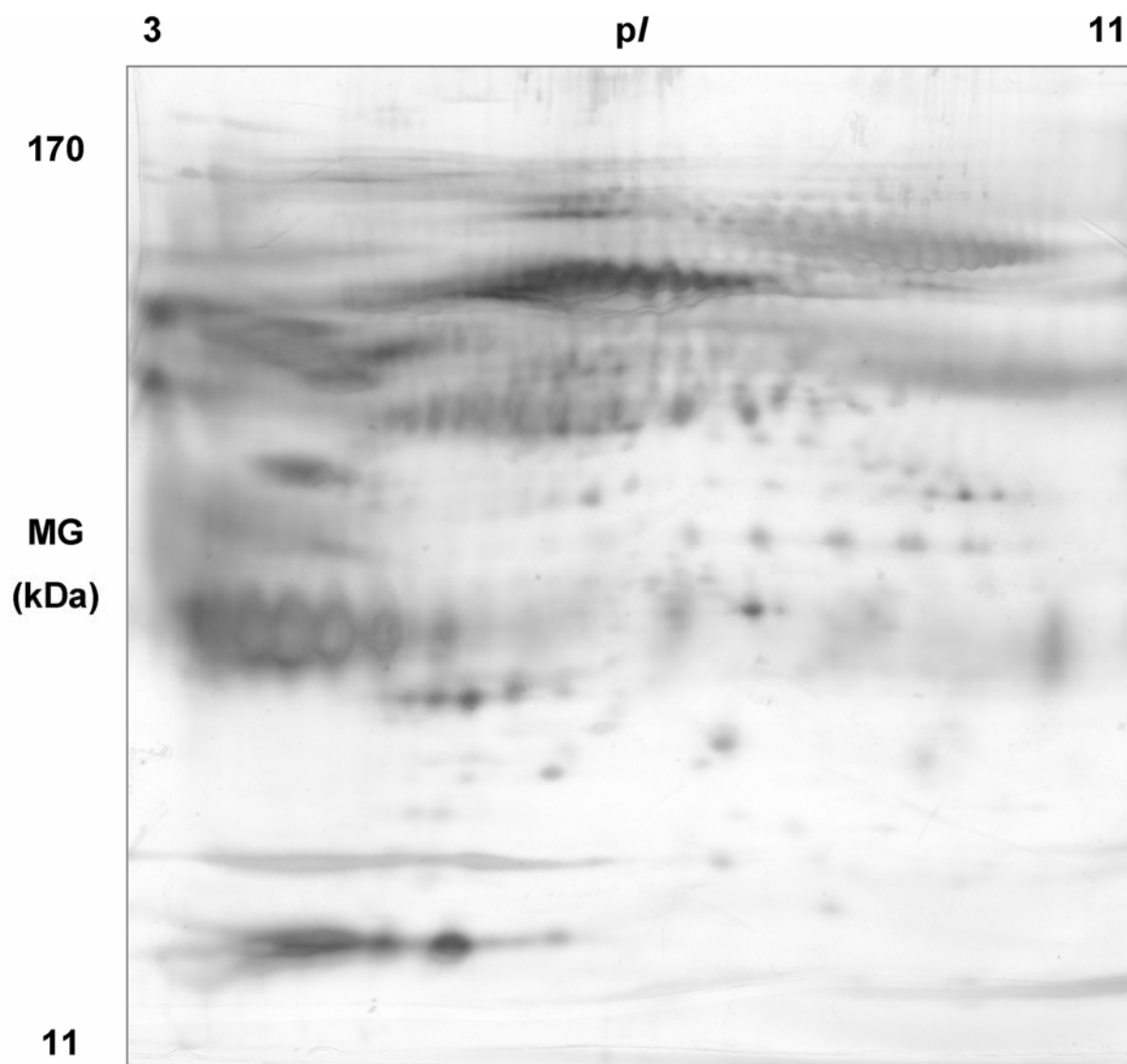
## **4.2 Glaskörperproteom**

Mittels zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Proteinexpressionsmuster der Glaskörper von insgesamt 15 gesunden und 20 uveitischen Pferdeaugen untersucht. Die Kombination von isoelektrischer Fokussierung und anschließender SDS-Gelelektrophorese ermöglichte eine hochauflösende Separation vitrealer Proteine. Durch die Verwendung von IPG-Streifen mit einem nichtlinearen pH-Gradienten von 3-11 wurde bei der Auftrennung in der ersten Dimension insgesamt ein breiter pH-Bereich abgedeckt, wobei gleichzeitig im mittleren pH-Bereich (pH 5-8) eine intensivere Auftrennung ermöglicht wurde. Mit einem 9-15% Polyacrylamidgel konnten in der zweiten Dimension Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 10-200 kDa aufgetrennt werden.

### **4.2.1 Glaskörperproteom gesunder Pferdeaugen**

Die aus der zweidimensionalen Gelelektrophorese resultierenden Proteinmuster der Glaskörper gesunder Augen wiesen eine große Homogenität auf. Die Reproduzierbarkeit wurde in Wiederholungsversuchen bestätigt.

Durch eine Bildanalyse der silbergefärbten Gele mittels einer 2D-Bildanalyse-Software konnte eine durchschnittliche Spotanzahl von  $482 \pm 171$  pro Gel ermittelt und anhand der detektierten Spots in verschiedenen Gelen ein repräsentatives Durchschnittsgel erstellt werden (Abb. 4.2.1).

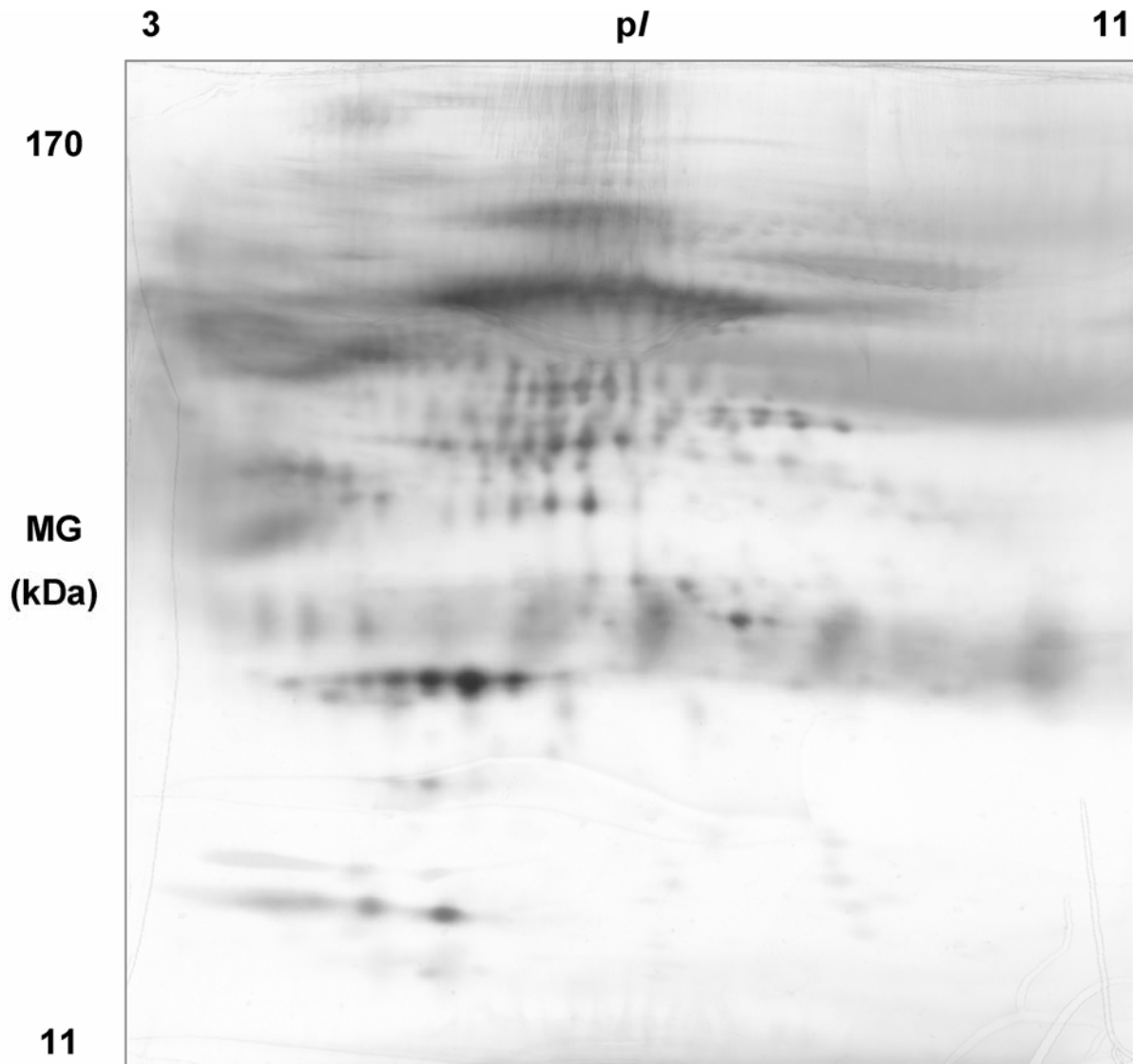


**Abb. 4.2.1:** Glaskörperproteom gesunder Pferdeaugen. Mit 2D-Bildanalyse-Software erstelltes 2D-Durchschnittsgel, ermittelt durch Analyse von silbergefärbten 2D-Gelen des Glaskörperproteoms von vier augengesunden Tieren. Proteinauftrennung in horizontaler Richtung nach dem isoelektrischen Punkt ( $pI$  3-11), in vertikaler Richtung nach dem Molekulargewicht (11-170  $kDa$ ).



#### 4.2.2 Glaskörperproteom von an ERU erkrankten Augen

Die Proteinmuster der untersuchten Glaskörper uveitischer Augen wiesen in den 2D-Gelen nur geringe individuelle Unterschiede auf. Die mittels 2D-Bildanalyse-Software ermittelte durchschnittliche Spotanzahl betrug  $522 \pm 145$  pro Gel. Auch hier konnte analog zur Gruppe der gesunden Pferdeaugen ein repräsentatives Durchschnittsgel erstellt werden (Abb. 4.2.2). Ein Vergleich mit dem Proteinmuster gesunder Glaskörper ließ deutliche Unterschiede in den Proteinprofilen erkennen.



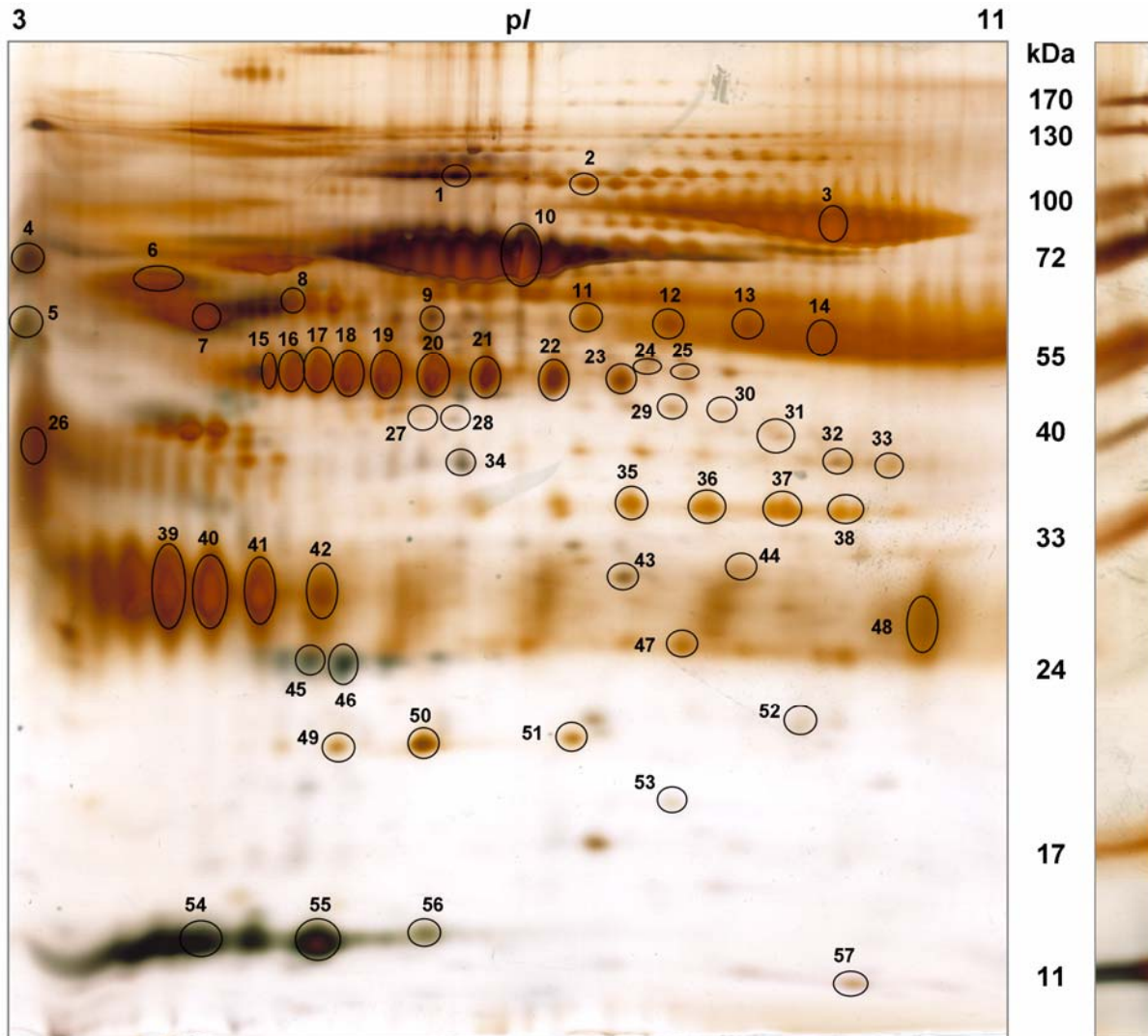
**Abb. 4.2.2:** Glaskörperproteom uveitischer Pferdeaugen. Repräsentatives 2D-Durchschnittsgel, ermittelt durch Bildanalyse von silbergefärbten 2D-Gelen des Glaskörperproteoms von zwölf an ERU erkrankten Augen. In horizontaler Richtung liegt eine Proteinauftrennung nach dem isoelektrischen Punkt (pI 3-11), in vertikaler Richtung eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht (11-170 kDa) vor.

### **4.3 Identifikation vitrealer Proteine**

Nach der zweidimensionalen Auftrennung vitrealer Proteine wurde eine Spotidentifikation mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) durchgeführt, wobei insbesondere jene Spots berücksichtigt wurden, die eine unterschiedliche Abundanz beim Vergleich der gesunden mit den uveitischen Proteinprofilen zeigten.

#### **4.3.1 Identifikation von Proteinen des Glaskörpers augengesunder Pferde**

Aus dem Glaskörperproteom gesunder Pferdeaugen konnten insgesamt 57 Spots massenspektrometrisch identifiziert werden (Abb. 4.3.1.1). Für die identifizierten Spots wurden insgesamt 21 verschiedene korrespondierende Proteine oder Proteinfragmente ermittelt (Tab. 4.3.1)



**Abb. 4.3.1.1:** Identifikation vitrealer Proteine gesunder Pferdeaugen. Links: repräsentatives Glaskörperproteom eines augengesunden Pferdes nach zweidimensionaler Gelelektrophorese (IPG-Streifen pH 3-11, NL, Gel 9-15%) und anschließender Silberfärbung. Die mit Nummern gekennzeichneten Spots konnten massenspektrometrisch identifiziert werden. Die korrespondierenden Proteinidentifikationen sind in Tabelle 4.3.1 unter der jeweiligen Nummer aufgeführt. Rechts: Angabe des Molekulargewichts (kDa) durch Referenzbanden.

## Ergebnisse

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Species <sup>c</sup>	Accession number <sup>d</sup>	Theoretical		Protein Score <sup>g</sup>
				MW (Da) <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
1	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	333
2	Gelsolin	Equus caballus	GELS_HORSE	80931	5,6	219
3	Serotransferrin	Equus caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	710
4	Dickkopf-related protein 3	Homo sapiens	DKK3_HUMAN	39463	4,55	75
5	Dickkopf-related protein 3	Homo sapiens	DKK3_HUMAN	39463	4,55	82
6	Serpin III (Fragment)	Equus caballus	Q7M387_HORSE	5614	4,76	161
und	Alpha-1-antitrypsin	Equus caballus	A1AT2_HORSE	47141	5,23	51*
7	Alpha-1-antitrypsin	Equus caballus	A1AT2_HORSE	47141	5,23	318
8	Antithrombin-III	Bos taurus	ANT3_BOVIN	49437	6,02	125
9	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	430
10	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	415
11	Beta-2-glycoprotein 1	Canis familiaris	APOH_CANFA	39689	8,51	63
12	Beta-2-glycoprotein 1	Canis familiaris	APOH_CANFA	39689	8,51	111
13	Beta-2-glycoprotein 1	Canis familiaris	APOH_CANFA	39689	8,51	74
14	Beta-2-glycoprotein 1	Canis familiaris	APOH_CANFA	39689	8,51	66
und	IgG1 heavy chain constant region (Fragment)	Bos taurus	AAB37381	36510	6,09	114
15	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	115
16	Pigment epithelium-derived factor	Homo sapiens	PEDF_HUMAN	46484	5,97	149
17	Pigment epithelium-derived factor	Homo sapiens	PEDF_HUMAN	46484	5,97	165
18	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	184
19	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	154
20	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	210
21	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	201
22	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	155
23	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	146
24	Alpha-enolase	Bos taurus	ENOA_BOVIN	47458	6,43	70
25	Alpha-enolase	Homo sapiens	ENOA_HUMAN	47350	6,99	113
26	Clusterin	Equus caballus	CLUS_HORSE	52691	5,77	184
27	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	235
28	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	309
29	Serotransferrin	Equus caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	400
30	Serotransferrin	Equus caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	315
31	Serotransferrin	Equus caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	297
32	Serotransferrin	Equus caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	680
33	Serotransferrin	Equus caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	266
34	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	112
35	Secreted frizzled-related protein 2	Canis familiaris	SFRP2_CANFA	34344	7,79	119
36	Secreted frizzled-related protein 2	Canis familiaris	SFRP2_CANFA	34344	7,79	118
37	Secreted frizzled-related protein 2	Canis familiaris	SFRP2_CANFA	34344	7,79	185
38	Secreted frizzled-related protein 2	Canis familiaris	SFRP2_CANFA	34344	7,79	88
39	Prostaglandin-H2 D-isomerase	Equus caballus	PTGDS_HORSE	21883	6,51	220
40	Prostaglandin-H2 D-isomerase	Equus caballus	PTGDS_HORSE	21883	6,51	223
41	Prostaglandin-H2 D-isomerase	Equus caballus	PTGDS_HORSE	21883	6,51	206
42	Prostaglandin-H2 D-isomerase	Equus caballus	PTGDS_HORSE	21883	6,51	202
43	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	127

## Ergebnisse

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Species <sup>c</sup>	Accession number <sup>d</sup>	Theoretical		Protein Score <sup>g</sup>
				MW (Da) <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
44	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	142
45	Apolipoprotein A-I	Canis familiaris	APOA1_CANFA	30178	5,2	60
46	Apolipoprotein A-I	Canis familiaris	APOA1_CANFA	30178	5,2	74
47	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	133
48	Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50981	22939	6,99	156
49	Plasma retinol-binding protein	Equus caballus	RETBP_HORSE	23349	5,28	262
50	Plasma retinol-binding protein	Equus caballus	RETBP_HORSE	23349	5,28	323
51	Plasma retinol-binding protein	Equus caballus	RETBP_HORSE	23349	5,28	60
52	Metalloproteinase inhibitor 2	Homo sapiens	TIMP2_HUMAN	21016	7,98	202
53	Superoxide dismutase	Equus caballus	SODC_HORSE	16101	6,04	75
54	Transthyretin	Homo sapiens	TTHY_HUMAN	15991	5,52	175
55	Transthyretin	Sus scrofa	TTHY_PIG	16185	6,29	161
56	Transthyretin	Sus scrofa	TTHY_PIG	16185	6,29	82
57	Hemoglobin subunit beta	Equus caballus	HBB_HORSE	16055	6,52	392

**Tab. 4.3.1:** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine des Glaskörpers augengesunder Pferde.

<sup>a</sup>) Nummer des korrespondierenden Spots in Abb. 4.3.1.1

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

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

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

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

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

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

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

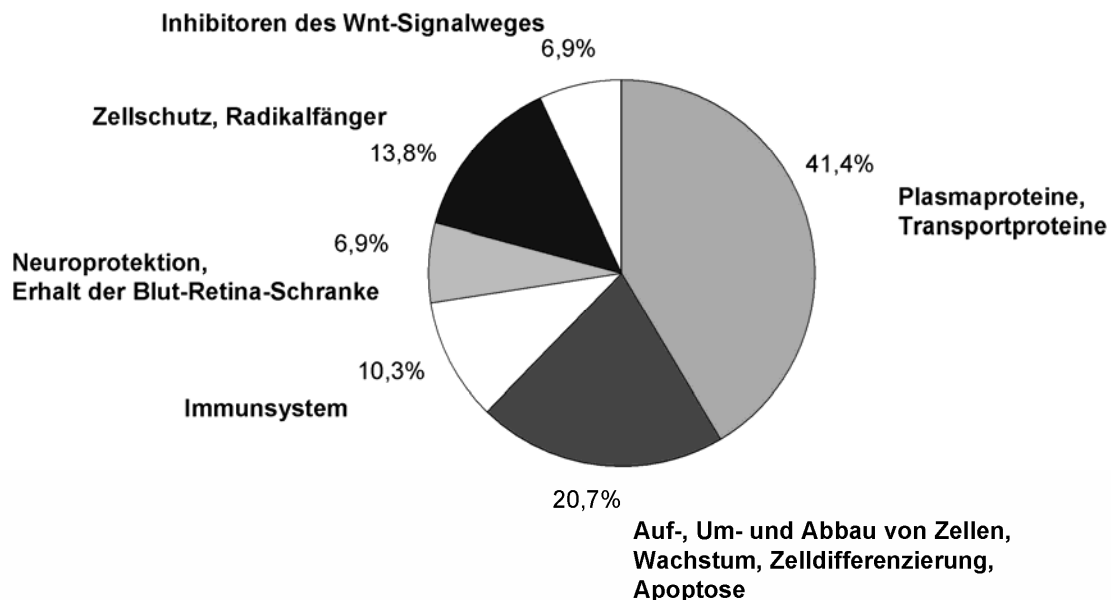
Anhand von Protein-Datenbanken wurde die jeweilige Funktion der identifizierten Proteine ermittelt. Die Recherche erfolgte in folgenden Datenbanken, die alle über das World Wide Web frei zugänglich sind:

[www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/](http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/)

[www.ebi.uniprot.org](http://www.ebi.uniprot.org)

[www.expasy.org](http://www.expasy.org).

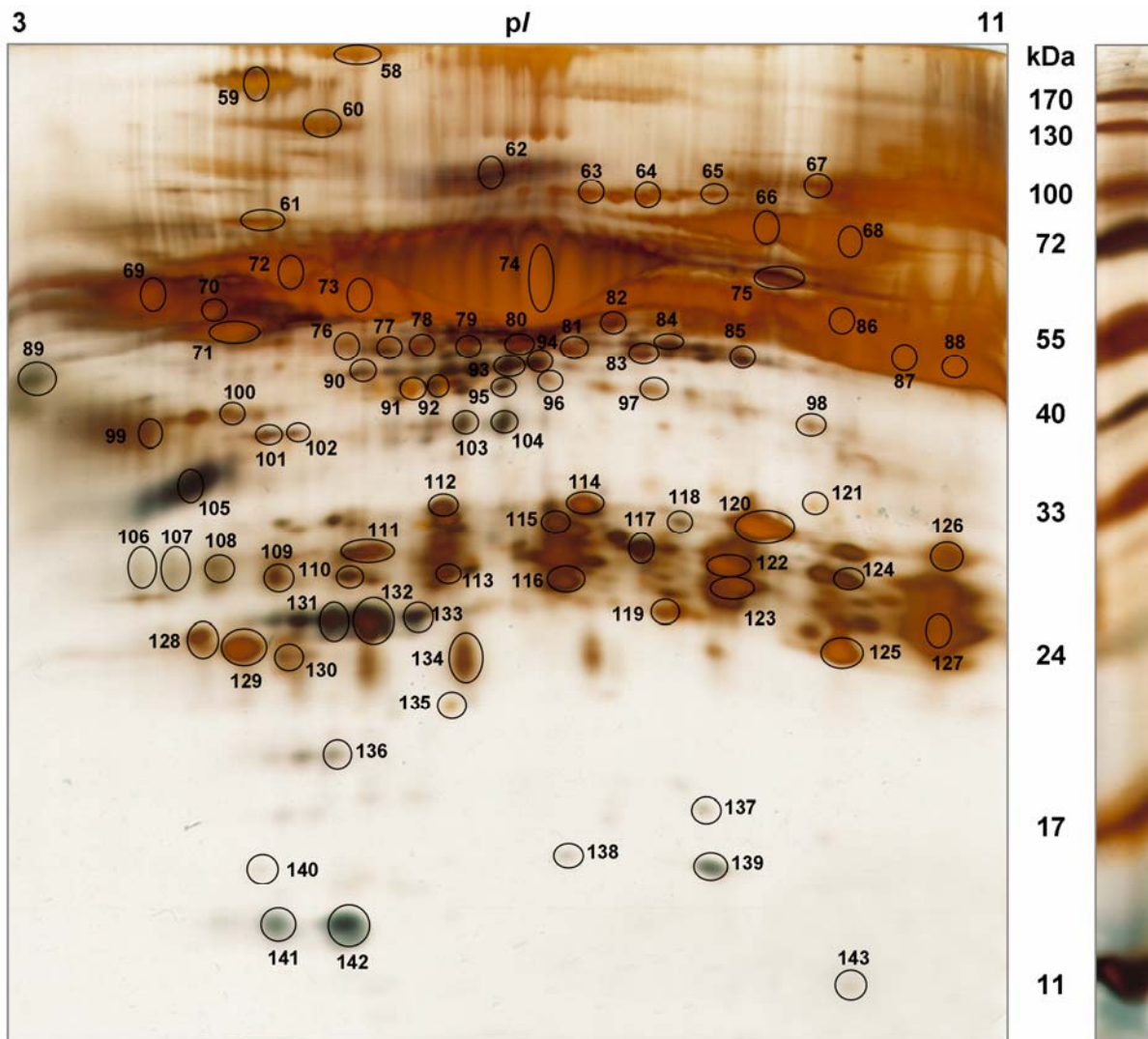
Die 21 verschiedenen identifizierten Proteine konnten anhand ihrer jeweiligen funktionellen Bedeutung verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Abb. 4.3.1.2). Danach handelte es sich bei einem Großteil der identifizierten Proteine um solche, die als klassische Plasmaproteine charakterisiert werden können (41,4%). Von diesen Proteinen kommt vielen eine Funktion als Transportprotein zu. Den nächstgrößeren Anteil (20,7%) hatten Proteine, die eine Funktion bei Zellauf-, Um- und Abbauvorgängen, bei der Zelldifferenzierung oder bei apoptotischen Prozessen haben. Eine weitere Gruppe umfasste Proteine, die dem Zellschutz dienen oder als Radikalfänger fungieren (13,8%). Außerdem wurden Proteine identifiziert, die dem Immunsystem zuzuordnen sind (10,3%). Jeweils gleich große Anteile hatten Proteine mit neuroprotektiver Wirkung und einer Funktion bei der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke (6,9%) sowie Inhibitoren des Wnt-Signalweges (6,9%).



**Abb. 4.3.1.2:** Zuordnung von in gesunden Glaskörpern identifizierten Proteinen zu ihrer Funktion. Entsprechend ihrer jeweiligen Funktionen sind einige Proteine in mehreren Gruppen vertreten.

### 4.3.2 Identifikation von Proteinen des Glaskörpers von an ERU erkrankten Pferden

Aus dem Glaskörperproteom uveitischer Pferde konnten von 86 Spots die Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden. Hierbei wurden insgesamt 32 verschiedene Proteine ermittelt (Abb. 4.3.2.1 und Tab. 4.3.2).



**Abb. 4.3.2.1:** Identifikation vitrealer Proteine von an ERU erkrankten Pferdeaugen. Links: Glaskörperproteom eines an ERU erkrankten Pferdes nach zweidimensionaler Gelelektrophorese (IPG-Streifen pH 3-11, NL, Gel 9-15%) und anschließender Silberfärbung. Die mit Nummern gekennzeichneten Spots konnten massenspektrometrisch identifiziert werden. Die korrespondierenden Proteinidentifikationen sind in Tabelle 4.3.2 unter der jeweiligen Nummer aufgeführt. Rechts: Angabe des Molekulargewichts (kDa) durch Referenzbanden.

## Ergebnisse

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Species <sup>c</sup>	Accession number <sup>d</sup>	Theoretical		Protein Score <sup>g</sup>
				MW (Da) <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
58	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	348
59	Carboxylesterase D1	Canis familiaris	Q95N05_CANFA	62189	5,75	75
60	Ceruloplasmin	Homo sapiens	CERU_HUMAN	122983	5,44	78
61	Prothrombin	Homo sapiens	THRB_HUMAN	71475	5,64	114
62	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	169
63	Gelsolin	Equus caballus	GELS_HORSE	80931	5,58	117
64	Gelsolin	Equus caballus	GELS_HORSE	80931	5,58	267
65	Serotransferrin	Equus caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	138
66	Serotransferrin	Equus caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	908
67	Plasminogen (Fragment)	Equus caballus	PLMN_HORSE	51888	7,14	200
68	Serotransferrin	Equus caballus	TRFE_HORSE	80268	6,83	920
69	Alpha-1-antitrypsin	Sus scrofa	A1AT_PIG	47449	5,54	94
70	Alpha-1-antitrypsin	Sus scrofa	A1AT_PIG	47449	5,54	93
71	Alpha-1-antitrypsin	Sus scrofa	A1AT_PIG	47449	5,54	125
72	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	90
73	Antithrombin, chain L- human (Fragment)	Homo sapiens	1AZXL	47415	6,25	283
und	Immunoglobulin alpha constant heavy chain	Equus caballus	AAP80145	37870	5,48	446
74	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	598
75	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	557
76	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	76
und	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	84
77	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	152
78	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	186
und	Pigment epithelium-derived factor	Homo sapiens	PEDF_HUMAN	46484	5,97	77
79	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	90
und	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	147
80	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	166
und	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	104
81	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	123
und	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	112
82	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	90
83	Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	46262	6,48	159
84	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	332
85	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	300
86	Immunoglobulin gamma 5 heavy chain constant region	Equus caballus	CAC86340	36432	5,95	104
87	Immunoglobulin gamma 4 heavy chain constant region	Equus caballus	CAC44763	37041	8,04	368
88	Immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region (Fragment)	Equus caballus	CAC44760	37971	7,68	415
89	Clusterin	Equus caballus	CLUS_HORSE	52691	5,77	62
90	Actin, cytoplasmic 1	Canis familiaris	ACTB_CANFA	41923	6,03	108
91	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	183
und	Complement C3	Rattus norvegicus	CO3_RAT	32414	5,73	116
92	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	257



Ergebnisse

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Species <sup>c</sup>	Accession number <sup>d</sup>	Theoretical		Protein Score <sup>c</sup>
				MW (Da) <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
93	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	505
94	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	349
95	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	254
96	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	139
97	Immunoglobulin gamma 5 heavy chain constant region (Fragment)	Equus caballus	CAC86340	36432	5,95	147
98	Immunoglobulin gamma 5 heavy chain constant region (Fragment)	Equus caballus	CAC86340	36432	5,95	142
99	Clusterin	Equus caballus	CLUS_HORSE	52691	5,77	365
100	Haptoglobin	Homo sapiens	HPT_HUMAN	45861	6,13	114
101	Haptoglobin (Fragment)	Macaca mulatta	G02959	28946	8,41	70
102	Haptoglobin	Homo sapiens	HPT_HUMAN	45861	6,13	115
103	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	213
104	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	251
105	Transthyretin	Homo sapiens	TTHY_HUMAN	15991	5,52	116
106	Prostaglandin-H2 D-isomerase	Equus caballus	PTGDS_HORSE	21883	6,51	85
107	Prostaglandin-H2 D-isomerase	Equus cabalus	PTGDS_HORSE	21883	6,51	58
108	Prostaglandin-H2 D-isomerase	Equus caballus	PTGDS_HORSE	21883	6,51	288
109	Prostaglandin-H2 D-isomerase	Equus caballus	PTGDS_HORSE	21883	6,51	210
110	Keratin, type I cytoskeletal 10	Homo sapiens	K1C10_HUMAN	59711	5,13	224
111	Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50978	17651	8,35	67
112	Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50978	17651	8,35	59*
113	Immunoglobulin kappa light chain	Equus caballus	CAA53284	25577	6,08	116
114	Lambda-Immunoglobulin	Equus caballus	AAA50982	23892	7,52	71
115	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	322
116	Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50981	22939	6,99	107
117	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	473
118	Keratin, type II cytoskeletal 1	Homo sapiens	K2C1_HUMAN	66149	8,16	87
119	Immunoglobulin kappa light chain	Equus caballus	CAA53284	25577	6,08	175
120	Lambda-Immunoglobulin	Equus caballus	AAA50982	23892	7,52	242
121	Secreted frizzled-related protein 2	Canis familiaris	SFRP2_CANFA	34344	7,79	70
122	Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50978	17651	8,35	97
123	Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50978	17651	8,35	198
124	Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50978	17651	8,35	79
125	Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50978	17651	8,35	146
126	Immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region	Equus caballus	CAC44760	37971	7,68	306
127	Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50981	22939	6,99	128
128	Immunoglobulin J-chain	Bos taurus	AAA93045	18359	5,1	112
129	Immunoglobulin J-chain	Bos taurus	AAA93045	18359	5,1	114
130	Immunoglobulin J-chain	Bos taurus	AAA93045	18359	5,1	133
131	Apolipoprotein A-I	Canis familiaris	APOA1_CANFA	30178	5,2	97
132	Apolipoprotein A-I	Canis familiaris	APOA1_CANFA	30178	5,2	90
133	Apolipoprotein A-I	Canis familiaris	APOA1_CANFA	30178	5,2	78
134	Histone deacetylase complex subunit SAP18	Mus musculus	SAP18_MOUSE	17641	9,38	60**

## Ergebnisse

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Species <sup>c</sup>	Accession number <sup>d</sup>	Theoretical		Protein Score <sup>e</sup>
				MW (Da) <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
135	Plasma retinol-binding protein	Equus caballus	RETBP_HORSE	23349	5,28	287
136	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	310
137	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	201
138	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	173
139	Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	189
140	Haptoglobin	Sus scrofa	HPT_PIG	39028	6,51	93
141	Transthyretin	Homo sapiens	TTHY_HUMAN	15991	5,52	98
142	Transthyretin	Homo sapiens	TTHY_HUMAN	15991	5,52	83
143	Beta-2-microglobulin	Equus caballus	B2MG_HORSE	13532	6,4	108

**Tab. 4.3.2:** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden.

<sup>a</sup>) Nummer des korrespondierenden Spots in Abb. 4.3.2.1

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

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

<sup>d</sup>) Entry name, wie in Swiss-prot Datenbank bzw. MSDB Datenbank geführt

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

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

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

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

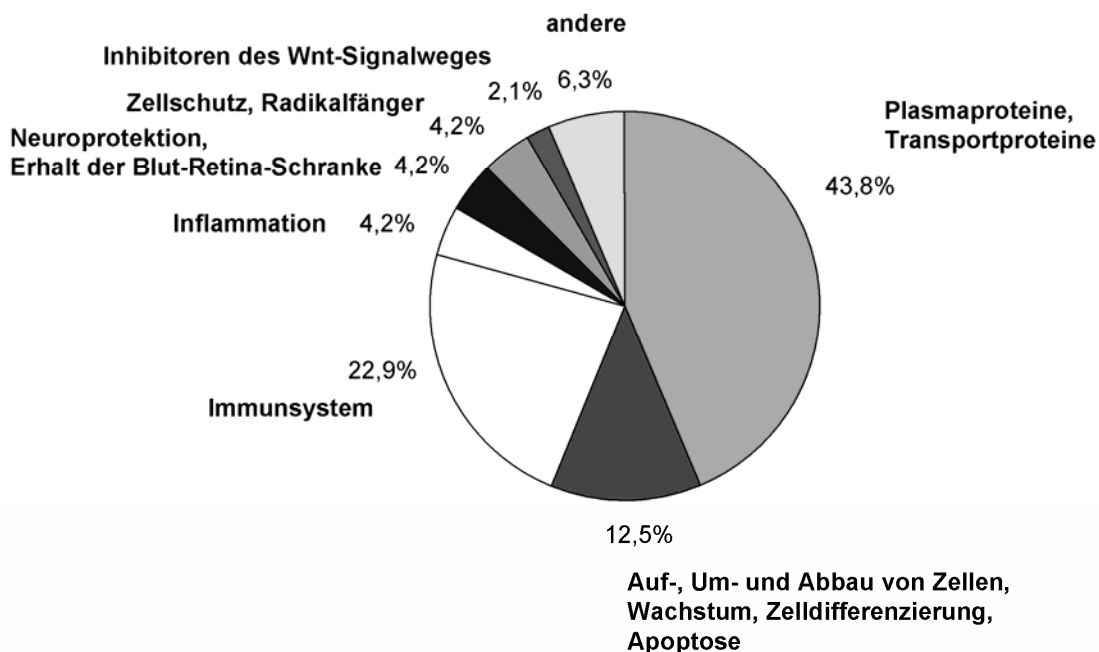
Die Funktionen der 32 verschiedenen identifizierten Proteine wurden anhand folgender Datenbanken ermittelt

[www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/](http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/)

[www.ebi.uniprot.org](http://www.ebi.uniprot.org)

[www.expasy.org](http://www.expasy.org).

Nach einer Zuordnung der Proteine zu funktionellen Gruppen (Abb. 4.3.2.2) hatten klassische Plasmaproteine den größten Anteil (43,8%). Die zweitgrößte Gruppe stellten Proteine, die dem Immunsystem zuzuordnen sind (22,9%), wobei diese Gruppe vor allem durch Immunglobuline oder -fragmente repräsentiert wurde. An nächster Stelle standen Proteine, die eine Bedeutung bei Auf-, Um- oder Abbauvorgängen von Zellen, bei der Zelldifferenzierung oder bei apoptotischen Prozessen haben (12,5%). Mit einem Anteil von 4,2% waren Proteine vertreten, die eine neuroprotektive und neurotrophe Eigenschaft haben und denen eine Funktion beim Erhalt der Blut-Retina-Schranke zugeschrieben werden kann. Jeweils weitere 4,2% Prozent wurden durch Proteine repräsentiert, die an inflammatorischen Prozessen oder deren Regulation beteiligt sind, sowie solche mit Zellschutzfunktion. Einen Anteil von 2% hatten Inhibitoren des Wnt-Signalweges.



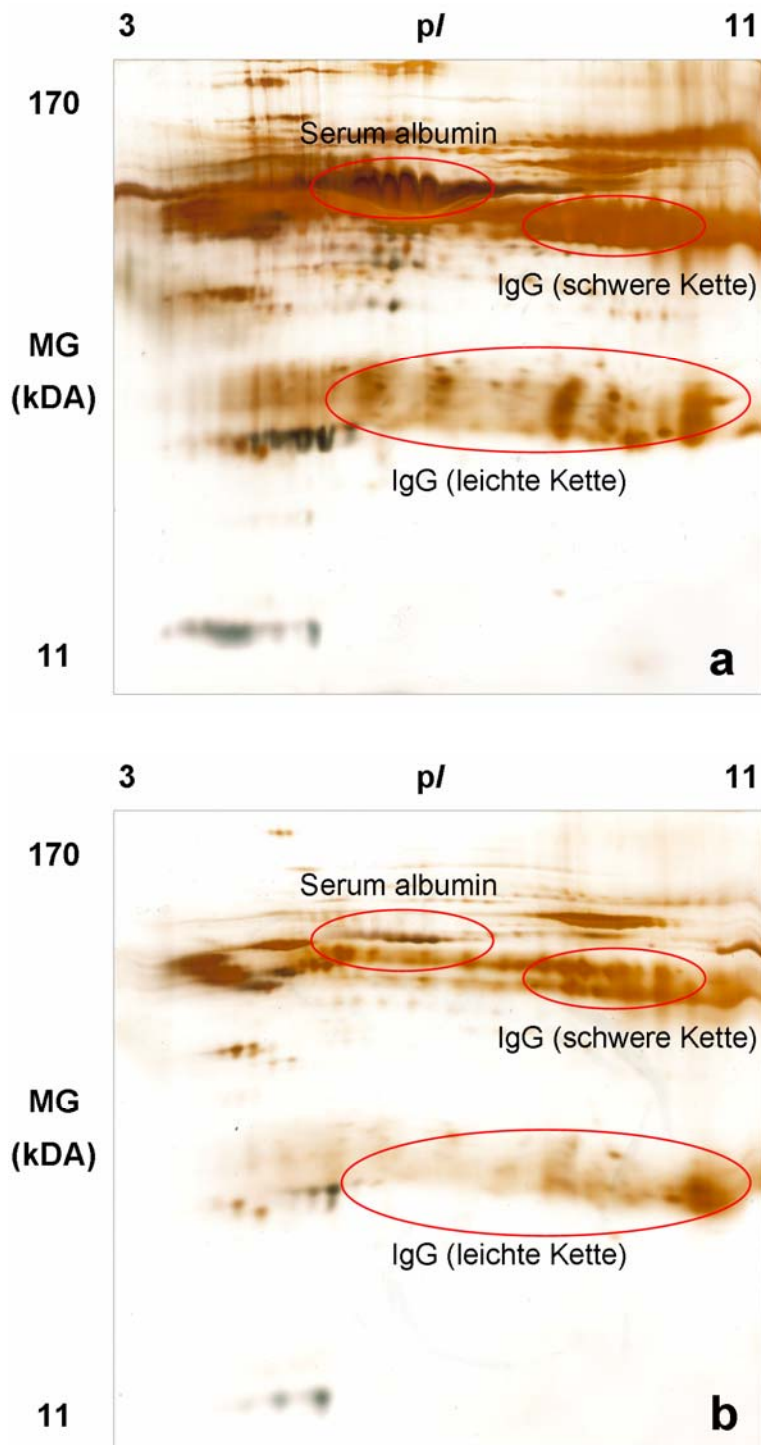
**Abb. 4.3.2.2:** Zuordnung von in uveitischen Glaskörpern identifizierten Proteinen zu ihrer Funktion. Entsprechend der jeweiligen Funktionen sind einige Proteine in mehreren Gruppen vertreten.

Das Protein Albumin sowie die Immunglobuline zeigten in den Gelen uveitischer Glaskörper eine sehr hohe Abundanz. Aufgrund dieses Phänomens konnte nicht ausgeschlossen werden, dass schwach abundante Proteine von diesen stark abundanten überlagert werden oder die Proteinmenge schwach abundanter Proteine für eine Detektion nicht ausreicht.

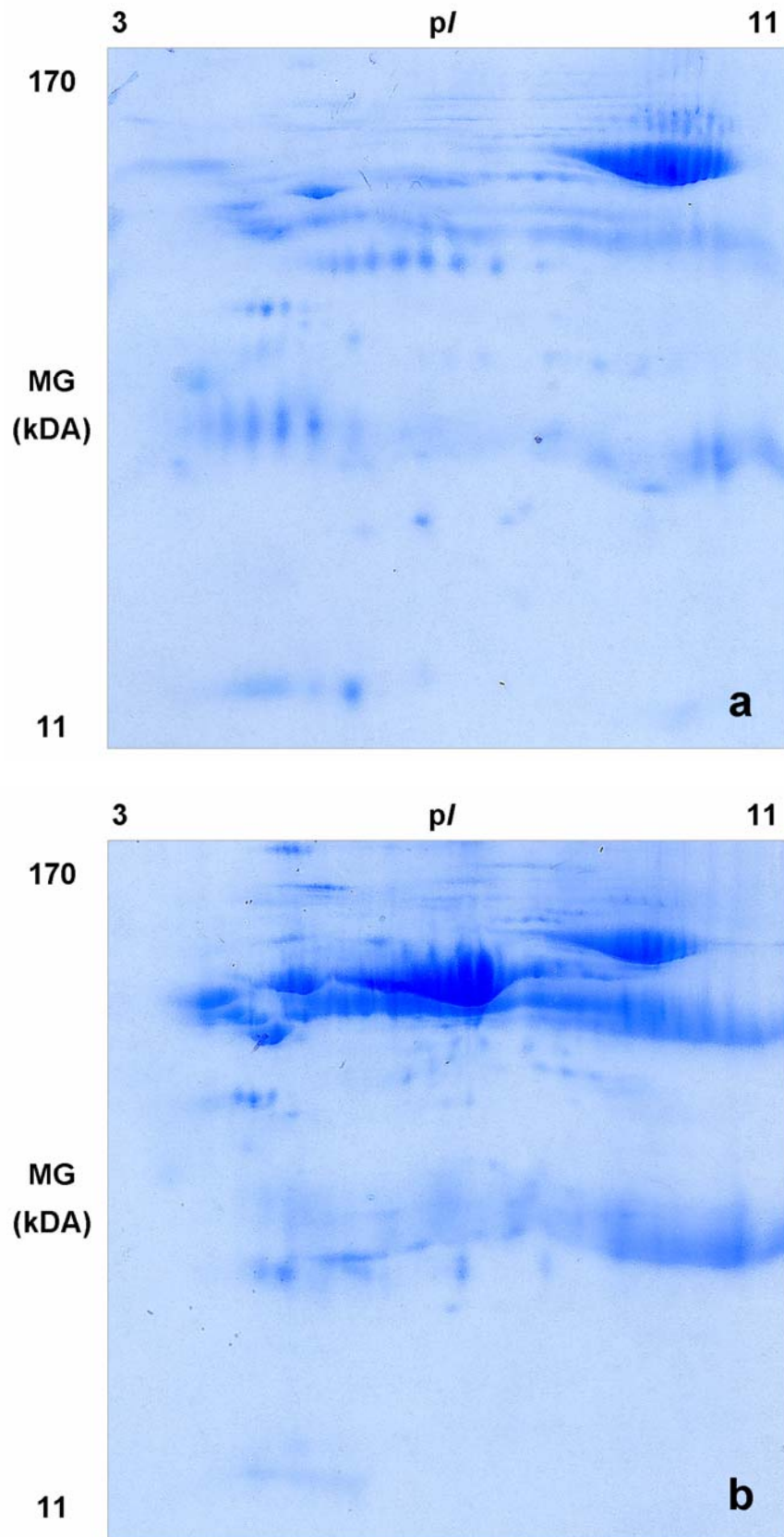
#### **4.3.3 Proteomanalyse Albumin- und IgG-depletierter Glaskörper**

Um zu verhindern, dass schwach abundante Proteine des Glaskörpers einer Detektion entgehen, wurde eine selektive Entfernung der beiden hoch abundanten Proteine Albumin und Gamma-Immunglobulin (IgG) durchgeführt. Durch Entfernung dieser beiden Komponenten wird die Anreicherung schwach abundanter Proteine ermöglicht, da sich deren Anteil am Gesamtprotein infolgedessen erhöht.

Nach Depletion von Albumin und Immunglobulinen aus den Glaskörperproben wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese zur Analyse des verbleibenden Glaskörperproteoms durchgeführt (Abb. 4.3.3.1 und 4.3.3.2). Zusätzliche Proteine wurden nach Entfernung von Albumin und IgG in den Gelen nicht entdeckt (Abb. 4.3.3.1), es konnten jedoch vier Proteine zusätzlich massenspektrometrisch signifikant identifiziert werden, die zuvor nicht oder unzureichend identifiziert wurden.



**Abb. 4.3.3.1:** Zweidimensionale Auftrennung der Glaskörperproteine eines uveitischen Auges vor (a) und nach (b) Depletion von Albumin und IgG aus den Proben. Silberfärbung. Zu erkennen ist eine deutliche Reduktion der beiden Proteine (b). Zusätzliche Spots treten jedoch nach Entfernung der hoch abundanten Proteine nicht auf.



**Abb. 4.3.3.2:** Proteinmuster des Glaskörpers eines gesunden (a) sowie eines an ERU erkrankten Auges (b) nach Depletion von Albumin und IgG. Kolloidale Coomassie-Färbung.

#### 4.4 Quantifizierung der differentiellen Proteinexpression

Anhand der vergleichenden Proteomanalyse der Glaskörper gesunder und an ERU erkrankter Pferdeaugen konnte bei elf detektierten und identifizierten Proteinen eine in uveitischen Glaskörpern veränderte Expression festgestellt werden. Sechs Proteine zeigten eine höhere, vier Proteine eine niedrigere Abundanz im Vergleich zum gesunden Glaskörper. Ein Protein war ausschließlich in den Glaskörpern erkrankter Augen detektierbar.

Mit Hilfe einer 2D-Bildanalyse-Software wurde für neun der differentiell exprimierten Proteine die unterschiedliche Expression durch densitometrische Bestimmung der Spotintensitäten quantifiziert. Hierbei wurden jeweils acht repräsentative 2D-Gele augengesunder Glaskörperproteome sowie 18 Gele uveitischer Glaskörperproteome analysiert. Der Mittelwert der in den gesunden Proteomen gemessenen jeweiligen Spotintensitäten diente als Bezugsgröße, zu der die mittlere Spotintensität der ERU-Glaskörperproteome in Relation gesetzt wurde.

Eine veränderte Expression in uveitischen Glaskörpern war für fünf Proteine zu verzeichnen, die physiologischerweise auch im Plasma zu finden sind. Vier dieser Proteine (Albumin, Immunglobulin, Komplement C3 und Apolipoprotein A-I) zeigten eine signifikant erhöhte Expression (Abb. 4.4 a-d). Aufgrund der hohen Abundanz der Proteine Albumin und Immunglobulin in den Glaskörpern uveitischer Augen erfolgte die quantitative Auswertung für diese Proteine stellvertretend anhand von einzelnen Spots. Eine deutlich verringerte Expression bei Uveitis zeigte dagegen das Protein Plasma Retinol-bindendes Protein (Abb. 4.4 e).

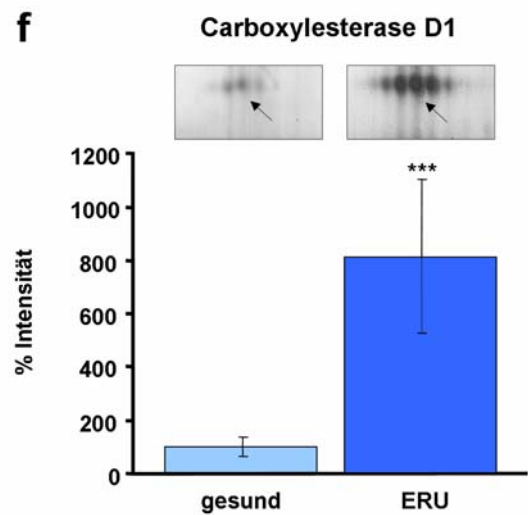
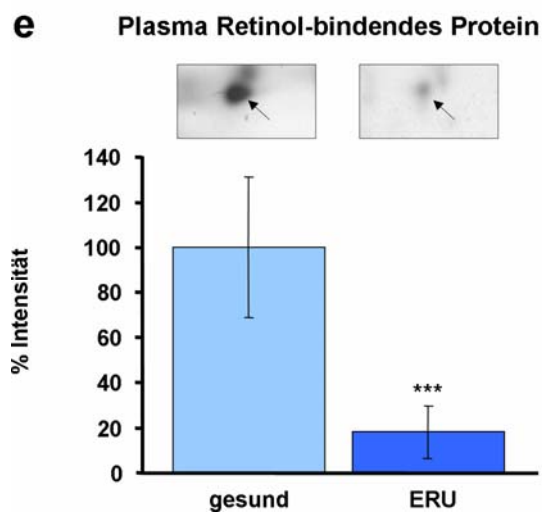
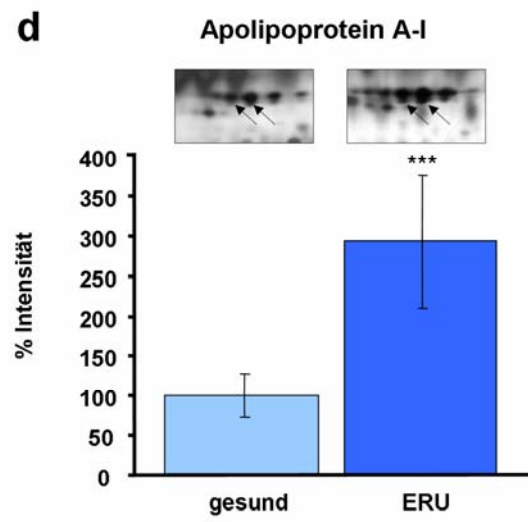
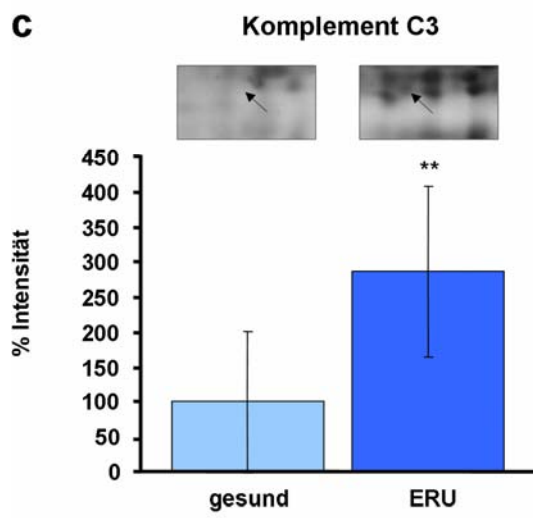
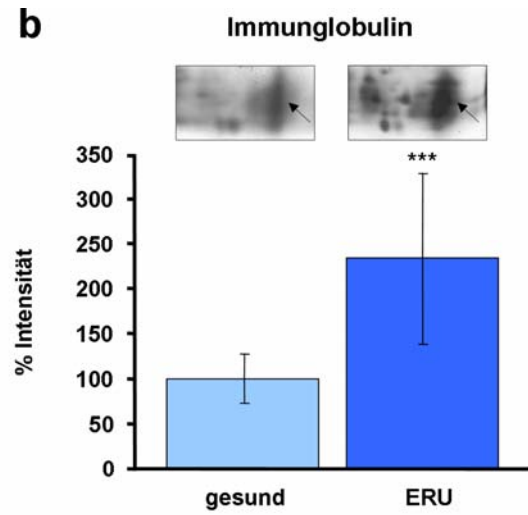
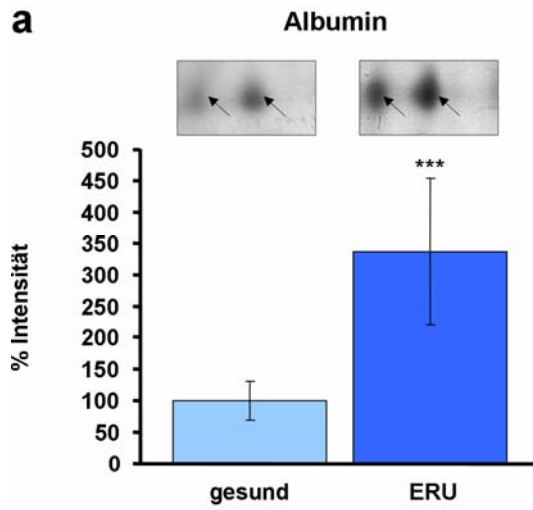
Signifikant höher exprimiert in ERU-Glaskörpern war das Protein Carboxylesterase D1, ein Enzym aus der Familie der Typ-B Carboxylesterasen. SAP18, ein Protein, das Bestandteil eines Transkriptionsrepressorkomplexes ist, war nur im Proteom der ERU-Glaskörper detektierbar (Abb. 4.4 g).

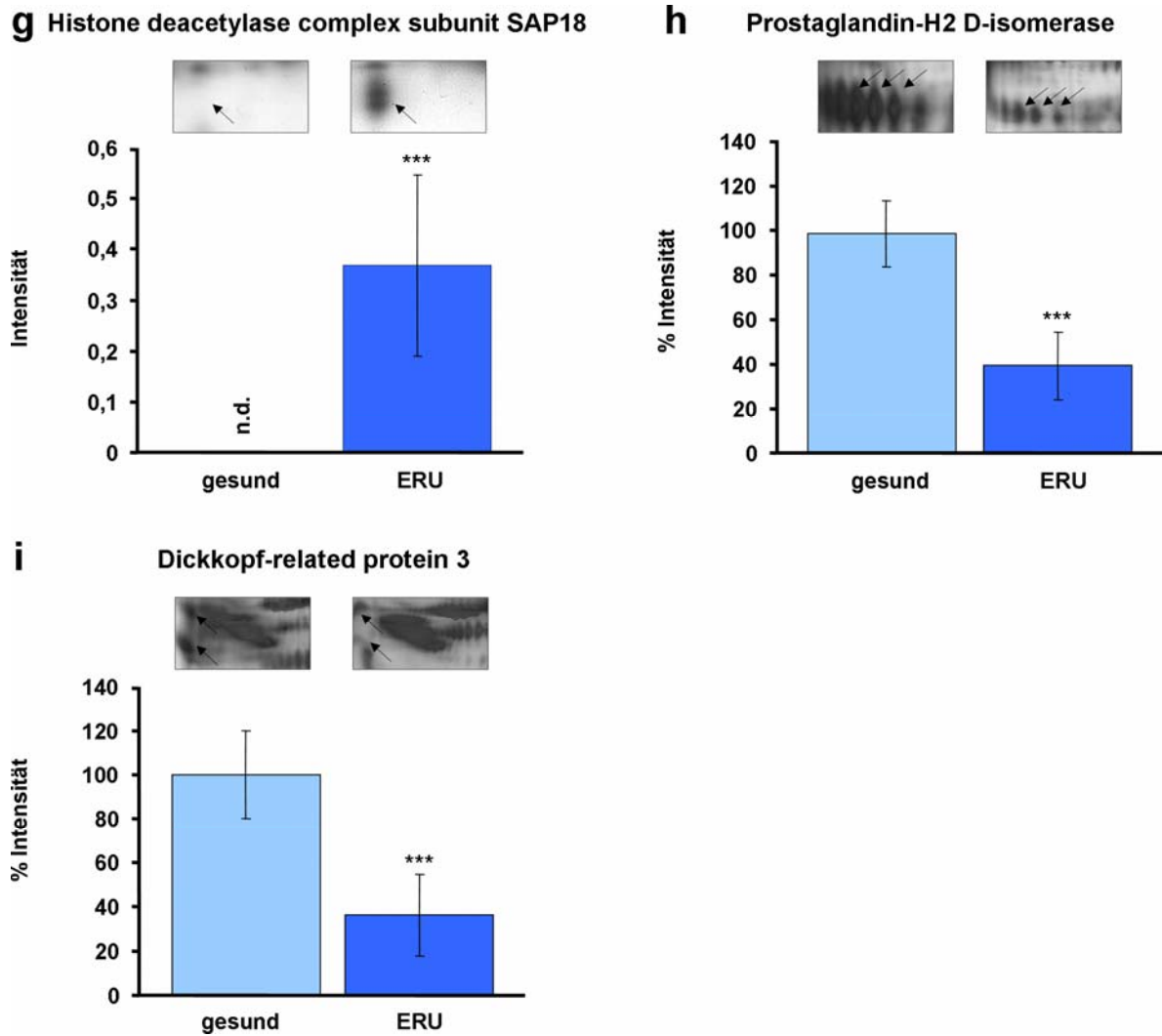
Prostaglandin-H2 D-isomerase (syn.: Prostaglandin-D2 Synthase, PGDS), ein Enzym, welches an einer Reihe von ZNS-Funktionen beteiligt ist und dem unter anderem eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke und der Blut-Kammerwasser-Schranke des Auges zugesprochen wird, war in uveitischen Glaskörpern signifikant erniedrigt (Abb. 4.4 h).

Eine ebenfalls erniedrigte Expression in den Glaskörpern uveitischer Augen war für Dickkopf-related protein 3 (Dkk-3), einen Inhibitor des Wnt-Signalweges, zu verzeichnen (Abb. 4.4 i).

Des Weiteren war eine unterschiedliche Expression anhand der zweidimensionalen Gele bei den Proteinen Secreted frizzled-related protein 2 (sFRP-2), ebenfalls ein Inhibitor des Wnt-Signalweges, und Pigment epithelium-derived factor (PEDF) erkennbar. Die differenzielle Expression dieser Proteine wurde mittels Western Blots quantifiziert.







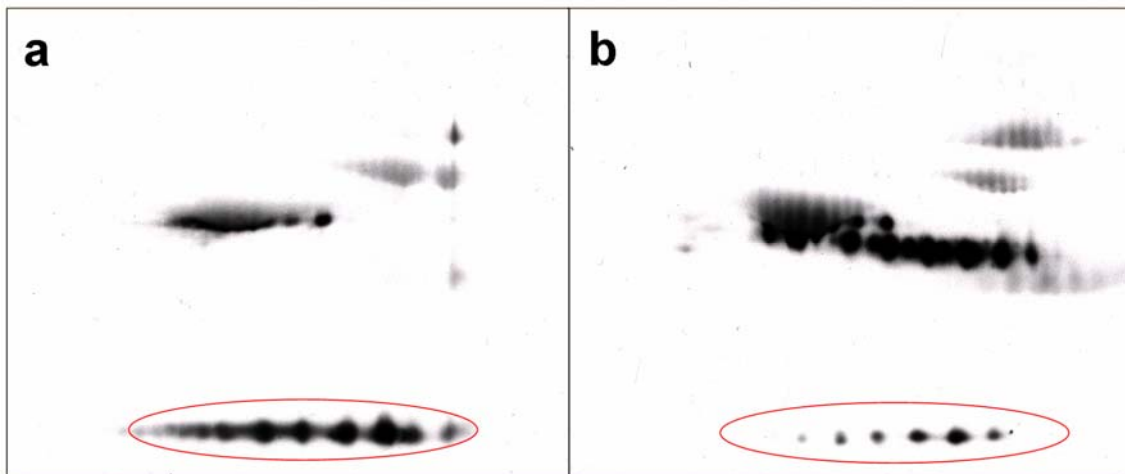
**Abb. 4.4:** Differenzielle Expression vitrealer Proteine. Vergleich der densitometrisch bestimmten Spotintensitäten im 2D-Proteinprofil von je acht gesunden und 18 an ERU erkrankten Pferdeaugen. Der Mittelwert der gemessenen Spotintensitäten der gesunden Glaskörper diente als Bezugsgröße ( $100\% \pm$  Standardabweichung) zu der die Spotintensitäten aus den uveitischen Proteinprofilen in Relation gesetzt wurden. In den Bildausschnitten über den Säulen sind die analysierten Spots durch Pfeile gekennzeichnet. (a) Albumin. (b) Immunglobulin. (c) Komplement C3. (d) Apolipoprotein-AI. (e) Plasma Retinol-bindendes Protein. (f) Carboxylesterase D1. (g) Histone deacetylase complex subunit SAP18, n.d. = nicht detektierbar. (h) Prostaglandin-H2 D- isomerase. (i) Dickkopf-related protein 3. Die Sterne geben die Signifikanz der Abweichung an (\*\*\*) =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ ).

## 4.5 Expression von Secreted frizzled related protein 2 (sFRP-2)

### 4.5.1 Verringerte Expression von sFRP-2 im Glaskörper bei Uveitis

Das Protein sFRP-2, ein Inhibitor des Wnt-Signalweges, hat eine Bedeutung bei der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung in verschiedene Zelltypen. Die vergleichende Proteomanalyse gesunder und uveitischer Glaskörper zeigte eine erniedrigte Expression von sFRP-2 in den Glaskörpern erkrankter Augen. Diese sollte anhand von Immunoblots validiert werden.

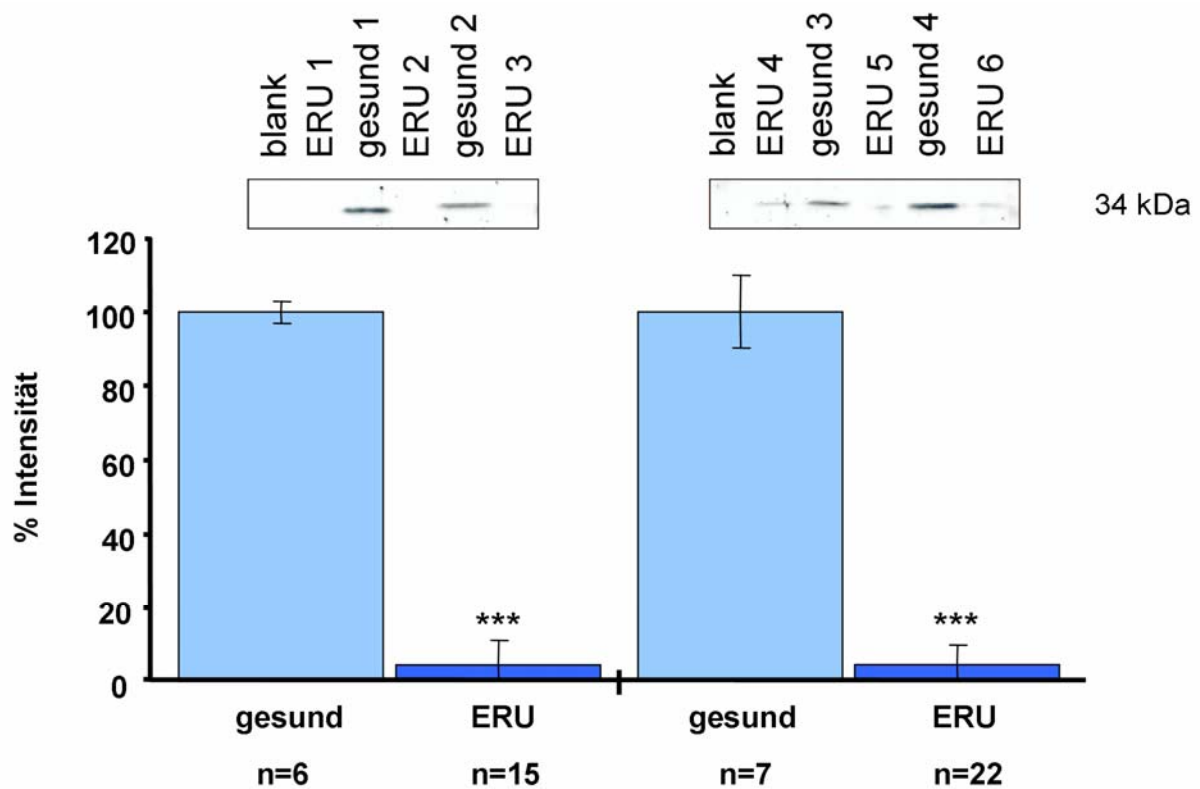
Unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen-anti-human-sFRP-2-Antiserums wurde sowohl in ein- als auch in zweidimensionalen Westernblots eine reduzierte Expression von sFRP-2 in uveitischen Glaskörpern bestätigt (Abb. 4.5.1 und Abb. 4.5.2)



**Abb. 4.5.1:** Erniedrigte Expression von sFRP-2 im Glaskörper eines an ERU erkrankten Auges (b) im Vergleich zu einem gesunden Auge (a). Zweidimensionaler Western Blot mit Glaskörpermaterial. Die Ellipse kennzeichnet das mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-human-sFRP-2-Antiserum detektierte sFRP-2. Rechts sind ein deutlich abgeschwächtes Signal und eine reduzierte Spotanzahl sichtbar. Zusätzlich ist eine Markierung einiger Spots auf der Höhe von Albumin und IgG erkennbar.

#### 4.5.2 Quantitative Verifizierung der sFRP-2-Expression im Glaskörper

Die sFRP-2-Expression wurde bei insgesamt 13 gesunden Glaskörpern und 37 ERU-Glaskörpern mittels eindimensionaler Western Blots untersucht. Anhand der densitometrischen Analyse der Blotbanden konnte eine signifikante Reduktion der sFRP-2-Expression in ERU-Glaskörpern festgestellt werden (Abb. 4.5.2).



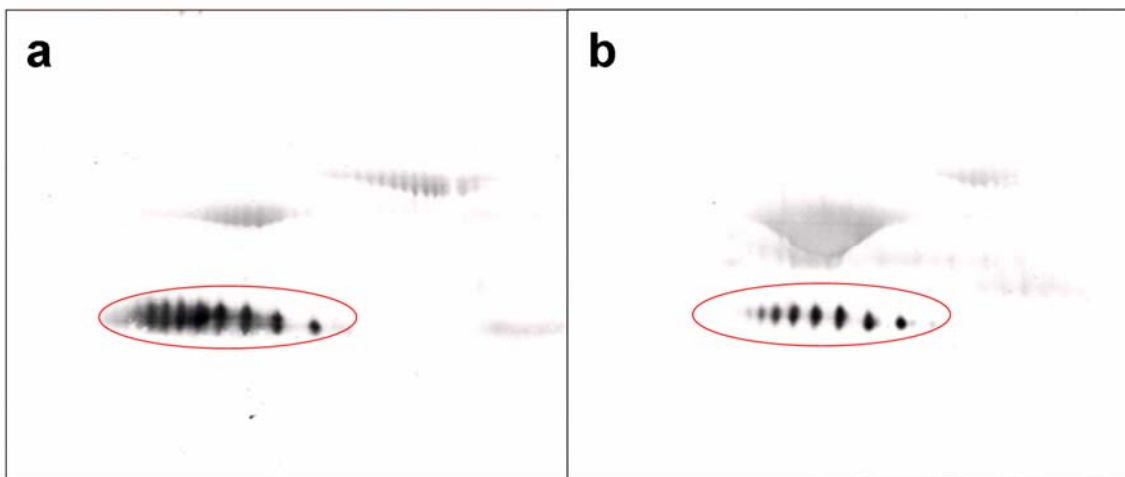
**Abb. 4.5.2:** Signifikant erniedrigte Expression von sFRP-2 im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ). Densitometrische Analyse der in eindimensionalen Western Blots detektierten Banden. Der Mittelwert der Signalintensitäten gesunder Augen diente als Bezugsgröße ( $100\% \pm$  Standardabweichung), zu der der Mittelwert der Signalintensitäten erkrankter Augen in Relation gesetzt wurde. Hellblaue Säulen: Glaskörper augengesunder Pferde. Dunkelblaue Säulen: Glaskörper uveitischer Pferde. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Experimenten. Über den Säulen sind repräsentative Banden gesunder (gesund 1-4) und uveitischer Augen (ERU 1-6) abgebildet. Das Molekulargewicht von sFRP-2 beträgt ca. 34 kDa. Als Negativkontrolle diente ein absoluter Blank-Wert.

## 4.6 Expression von Pigment epithelium-derived factor (PEDF)

### 4.6.1 Verringerte Expression von PEDF im Glaskörper bei Uveitis

PEDF, ein Protein mit neurotrophen und neuroprotektiven Eigenschaften und Funktion als Angiogeneseinhibitor, zeigte in der zweidimensionalen Proteomanalyse ebenfalls eine reduzierte Expression in erkrankten Glaskörpern. Auch für dieses Protein wurde eine weitere Evaluierung anhand von ein- und zweidimensionalen Immunoblots vorgenommen.

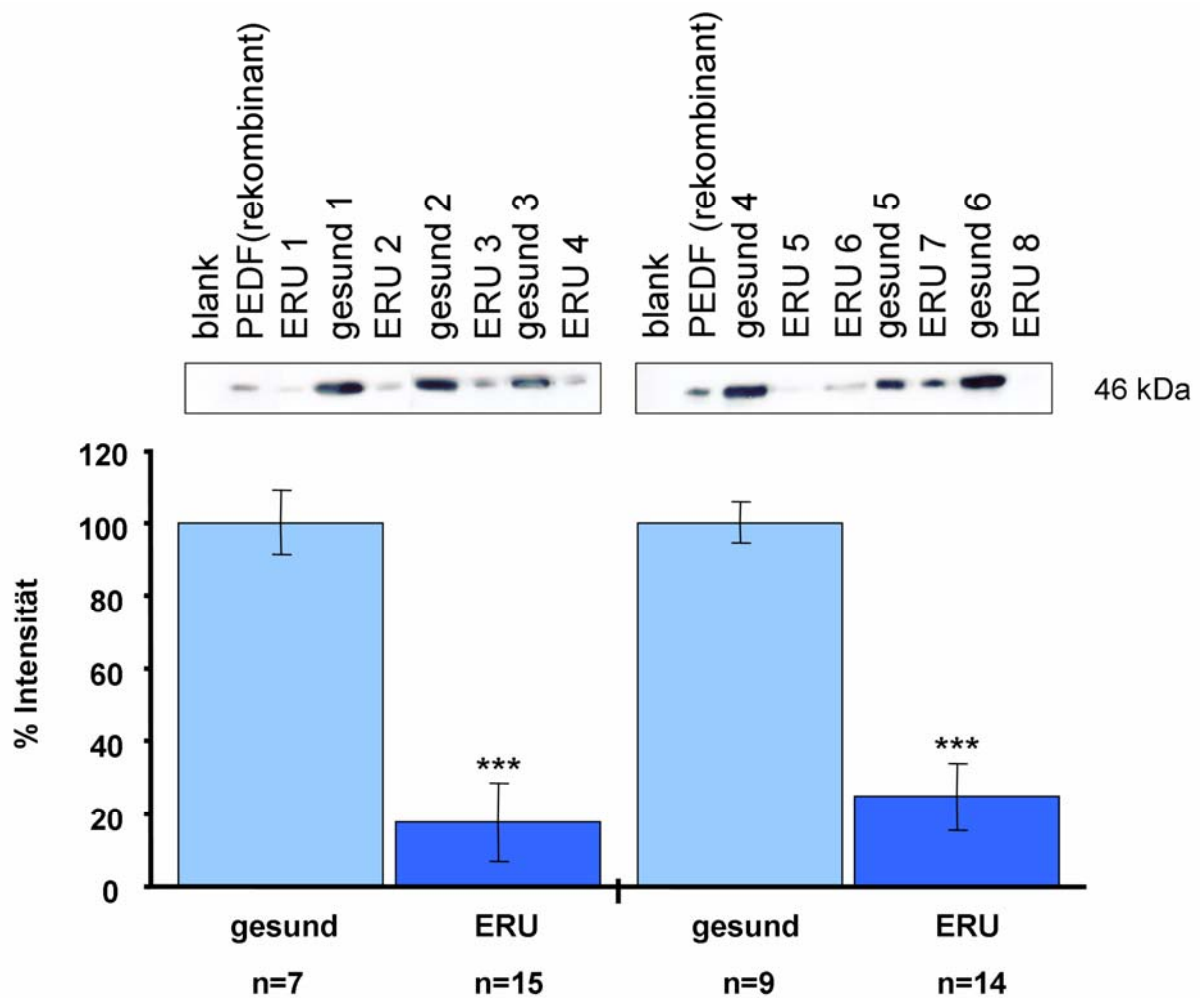
Durch Detektion des Proteins mit Hilfe eines monoklonalen Maus-anti-human-PEDF-Antikörpers konnte eine verringerte Expression im Glaskörper uveitischer Augen bestätigt werden (Abb. 4.6.1 und Abb. 4.6.2)



**Abb. 4.6.1:** Verringerte Expression von PEDF im Glaskörper eines an ERU erkrankten Pferdes (b) im Vergleich zum Glaskörper eines gesunden Auges (a). Zweidimensionaler Immunoblot. Detektion von PEDF mittels eines Maus-anti-human-PEDF-Antikörpers. Die Ellipsen kennzeichnen die Spots von PEDF. Rechts ist ein deutlich abgeschwächtes Signal erkennbar. Zusätzlich sind Signale auf der Höhe von Albumin, IgG und Serotransferrin zu sehen.

#### 4.6.2 Quantitative Verifizierung der PEDF-Expression im Glaskörper

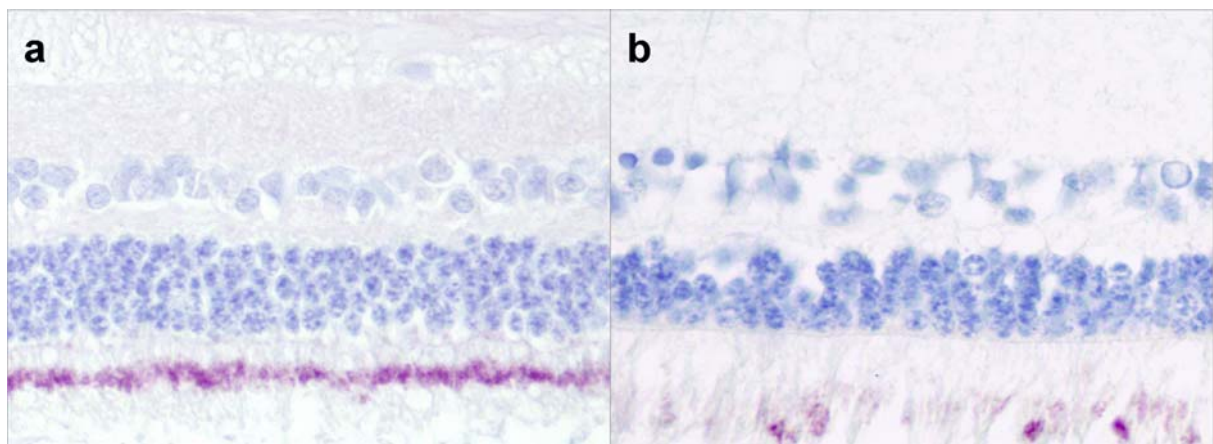
Die PEDF-Expression wurde bei insgesamt 16 gesunden Glaskörpern und 29 Glaskörpern uveitischer Augen mittels eindimensionaler Western Blots untersucht. Anhand der densitometrischen Analyse der Blotbanden konnte eine signifikante Reduktion der PEDF-Expression in ERU-Glaskörpern festgestellt werden (Abb. 4.6.2).



**Abb. 4.6.2:** Signifikant erniedrigte PEDF-Expression im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ). Densitometrische Analyse der in eindimensionalen Western Blots detektierten Signale. Der Mittelwert der Signalintensitäten gesunder Augen diente als Bezugsgröße (100%  $\pm$  Standardabweichung), zu der der Mittelwert der Signalintensitäten erkrankter Augen in Relation gesetzt wurde. Hellblaue Säulen: Glaskörper gesunder Augen. Dunkelblaue Säulen: Glaskörper uveitischer Augen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Experimenten. Über den Säulen sind repräsentative Banden aus den Western Blots abgebildet (gesund 1-6 und ERU 1-8). Das Molekulargewicht von PEDF beträgt ca. 46 kDa. Als Positivkontrolle diente rekombinantes humanes PEDF. Als Negativkontrolle diente ein absoluter Blank-Wert.

#### 4.7 Expression von sFRP-2 im retinalen Gewebe

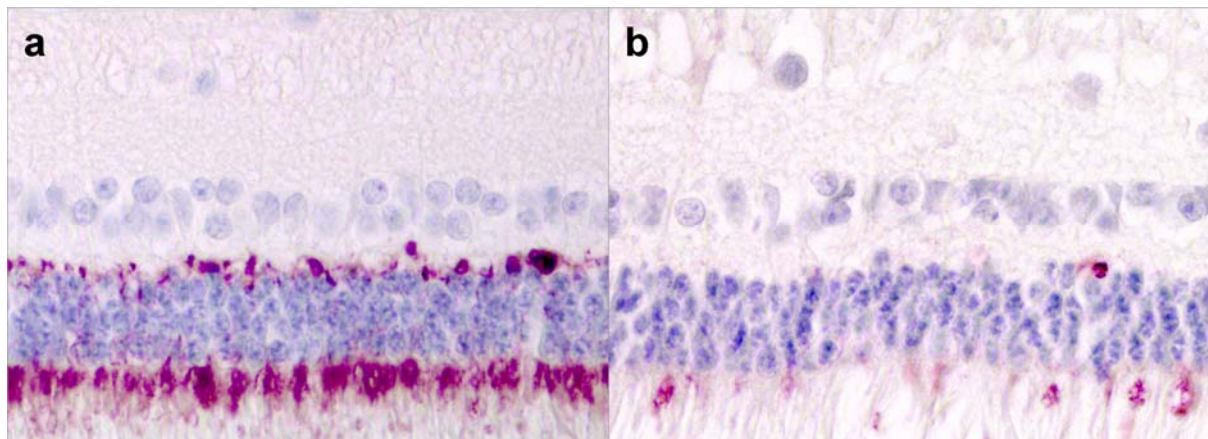
Da die retinalen Strukturen das Zielgewebe immunologischer Reaktionen bei der ERU sind, wurde die sFRP-2-Expression zusätzlich im retinalen Gewebe untersucht. Die immunhistochemische Untersuchung der Retina gesunder Augen zeigte eine Lokalisation von sFRP-2 in den Außensegmenten der Photorezeptorschicht. In uveitischen Augen war eine stark reduzierte, auf wenige Photorezeptoraußensegmente beschränkte Expression von sFRP-2 erkennbar (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7:** Expression von sFRP-2 (violett) in den Außensegmenten der Photorezeptoren der Retina eines gesunden (a) und an ERU erkrankten Auges (b). In der Retina des uveitischen Auges ist eine deutlich verringerte Expression festzustellen.

#### 4.8 Expression von PEDF im retinalen Gewebe

Für das neurotrophe und neuroprotektive Protein PEDF wurde ebenfalls die Expression im retinalen Gewebe untersucht. In gesunden Pferdeaugen war PEDF in den Innensegmenten der Photorezeptorenschicht sowie in der äußeren Körnerschicht lokalisiert. Eine deutlich verringerte Expression mit Beschränkung auf wenige Innensegmente der Photorezeptorenschicht zeigte sich bei uveitischen Augen (Abb. 4.8.1).

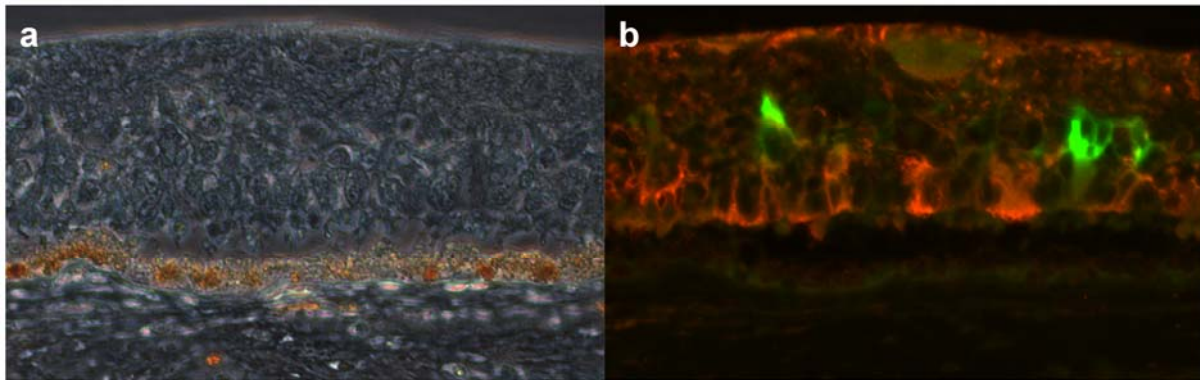


**Abb. 4.8.1:** Expression von PEDF (violett) in den Innensegmenten der Photorezeptorenschicht sowie der äußeren Körnerschicht der Retina eines augengesunden Pferdes (a). Beschränkung der Expression von PEDF auf wenige Innensegmente der Photorezeptorenschicht der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes (b).



PEDF besitzt außerdem antiangiogenetische Eigenschaften. Diesbezüglich spielt insbesondere eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen dem antiangiogenetischen Faktor PEDF und dem proangiogenetischen Faktor Vascular endothelial growth factor (VEGF) eine Rolle (Barnstable und Tombran-Tink, 2004). Im Hinblick auf ein mögliches Ungleichgewicht dieser beiden Faktoren wurde daher die Expression von PEDF und VEGF in der Retina mittels einer Doppelfärbung untersucht.

In der Retina uveitischer Pferdeaugen konnte VEGF an Stellen lokalisiert werden, an denen eine nur geringe PEDF-Expression vorlag. Im retinalen Gewebe gesunder Augen ist VEGF nicht nachweisbar (Abb. 4.8.2).



**Abb. 4.8.2:** Doppelfärbung von VEGF (grün, b) und PEDF (rot, b) in der Retina eines an ERU erkrankten Pferdes (a). VEGF ist an Stellen detektierbar, die eine geringe Expression von PEDF aufweisen.

#### 4.9 Differenziell exprimierte vitreale Proteine

Die zweidimensionale Gelelektrophorese in Kombination mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie ermöglichte eine erfolgreiche Identifikation vitrealer Proteine. Anhand der 2D-Proteinprofile der Glaskörper gesunder sowie an ERU erkrankter Augen konnte für elf Proteine eine in uveitischen Augen veränderte Expression festgestellt werden (Tab. 4.9). Diese wurde für neun der elf Proteine durch densitometrische Analyse der Spotintensitäten evaluiert. Für zwei weitere Proteine, sFRP-2 sowie PEDF, konnte die in uveitischen Glaskörpern veränderte Expression mittels Immunoblots quantitativ belegt werden. Für die beiden letztgenannten Proteine wurde darüber hinaus die Expression im retinalen Gewebe untersucht. In diesem war, wie im Glaskörper, ebenfalls eine erniedrigte Expression festzustellen.

Protein Name	Species	Accession number	Expression
Serum albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	↑
Lambda-Immunoglobulin (Fragment)	Equus caballus	AAA50981	↑
Complement C3	Rattus norvegicus	CO3_RAT	↑
Apolipoprotein A-I	Canis familiaris	APOA1_CANFA	↑
Plasma retinol-binding protein	Equus caballus	RETBP_HORSE	↓
Carboxylesterase D1	Canis familiaris	Q95N05_CANFA	↑
Histone deacetylase complex subunit SAP18	Mus musculus	SAP18_MOUSE	↑
Prostaglandin-H2 D-isomerase	Equus caballus	PTGDS_HORSE	↓
Pigment epithelium-derived factor	Mus musculus	PEDF_MOUSE	↓
Secreted frizzled-related protein 2	Canis familiaris	SFRP2_CANFA	↓
Dickkopf-related protein 3	Homo sapiens	DKK3_HUMAN	↓

**Tab. 4.9:** Differenziell exprimierte Proteine im Glaskörper gesunder sowie an ERU erkrankter Pferde. Die Pfeile in der rechten Spalte zeigen die in uveitischen Glaskörpern veränderte Expression der jeweiligen Proteine an (↑ erhöhte Expression, ↓ erniedrigte Expression).

## 5 Diskussion

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist die häufigste Augenerkrankung beim Pferd. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist die Pathogenese der Erkrankung weitgehend unerforscht. Die Mechanismen, die den immunologisch-inflammatorischen Reaktionen zu Grunde liegen und die zur progredienten Zerstörung intraokularer Strukturen führen können, sind bisher nicht genau bekannt. Durch eine chirurgische Entfernung des Glaskörpers bei der Pars-plana-Vitrektomie wird ein Therapieerfolg erzielt und gleichzeitig intraokulares Probenmaterial gewonnen, das für weitere Untersuchungen genutzt werden kann (Gerhards et al., 1999). In dieser Arbeit wurden die Proteinexpressionsmuster in den Glaskörpern gesunder und an ERU erkrankter Pferde untersucht, um anhand unterschiedlich exprimierter Proteine Hinweise auf Faktoren oder Prozesse zu erhalten, die bei der Pathogenese der ERU von Bedeutung sind. Erste Unterschiede zwischen den Glaskörperproben von an ERU erkrankten und augengesunden Pferden zeigten sich bereits durch einen signifikant erhöhten Gesamtproteingehalt der Glaskörper uveitischer Pferde. Dabei fanden sich in den Glaskörperproben erkrankter Augen im Mittel  $3,67 \mu\text{g} \pm 2,28 \mu\text{g}$  Protein pro  $\mu\text{l}$  Glaskörpermaterial im Vergleich zu  $0,15 \mu\text{g} \pm 0,05 \mu\text{g}$  Protein pro  $\mu\text{l}$  Glaskörpermaterial bei gesunden Augen. Die Auftrennung des Glaskörperproteoms mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese ermöglichte eine gute Separation der intravitrealen Proteine. Beim Vergleich der Proteinprofile gesunder und uveitischer Glaskörper waren deutliche Unterschiede erkennbar. Die Proteinmuster der untersuchten gesunden Glaskörper waren hingegen sehr homogen. Ebenso wiesen die Proteinprofile uveitischer Glaskörper untereinander nur geringe individuelle Unterschiede auf. Anhand der MALDI-TOF Massenspektrometrie und anschließendem Datenbankabgleich der ermittelten Massenspektren konnten trotz spärlicher Daten zu equinen Proteinen in Proteindatenbanken aus den Gelen gesunder Glaskörper 21 verschiedene Proteine und aus den Gelen uveitischer Glaskörper 32 verschiedene Proteine identifiziert werden. Der Datenbankabgleich erfolgte dabei unter Berücksichtigung von Säugetierproteinen, und wegen der diskutierten Bedeutung von Leptospiren bei der Ätiopathogenese der ERU wurde die Recherche zusätzlich auch auf Eubacteria erweitert. Bei allen identifizierten Proteinen handelte es sich um Säugetierproteine, bakterielle Proteine wurden nicht identifiziert. Sollten Bakterien in den Proben vorhanden gewesen sein, so waren

diese zumindest nicht hoch abundant. Beim Vergleich der gesunden und uveitischen Glaskörperproteome war eine differenzielle Expression bei elf verschiedenen Proteinen festzustellen. Hierbei waren in uveitischen Glaskörpern, im Vergleich zu gesunden, sechs Proteine höher und fünf Proteine niedriger exprimiert. Eine erhöhte Expression zeigten die Proteine Albumin, Gamma-Immunglobulin (IgG), Komplement C3 (C3), Apolipoprotein A-I (Apo-AI), Carboxylesterase D1 und Histone deacetylase complex subunit SAP18 (SAP18). Eine erniedrigte Expression bei Uveitis wurde bei den Proteinen Plasma Retinol-bindendes Protein (PRBP), Prostaglandin-H2 D-Isomerase (syn.: Prostaglandin-D2 Synthase, PGDS), Dickkopf-related protein 3 (Dkk-3), Secreted frizzled related protein 2 (sFRP-2) und Pigment epithelium-derived factor (PEDF) festgestellt.

Eine erste Gruppe von Proteinen, bei denen eine veränderte Expression in erkrankten Glaskörpern vorlag, wird durch fünf typische Plasmaproteine repräsentiert. Deutliche Abweichungen zeigte das Protein Albumin ([http://www.expasy.org/uniprot/ALBU\\_HORSE](http://www.expasy.org/uniprot/ALBU_HORSE)), ein hochabundantes Plasmaprotein (Anderson und Anderson, 2002), dessen wesentliche Funktion die Regulation des kolloidosmotischen Druckes im Blut ist. Albumin ist auch im physiologischen Zustand im Glaskörper vorhanden (Moter et al., 1989; Clausen et al., 1990; Bresgen et al., 1991). Wie Untersuchungen an menschlichen Augen zeigen, nimmt Albumin im Glaskörper den größten Anteil am Gesamtprotein ein (Moter et al., 1989). Dies bestätigte sich auch in dieser Arbeit. In den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden war Albumin im Vergleich zu gesunden Glaskörpern im Mittel um mehr als das Dreifache erhöht. Dieser erhöhte Albumin-Gehalt spricht für einen Übertritt des Proteins aus dem Serum in den Glaskörper und ist charakteristisch für einen Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke. Diese besteht aus der inneren und der äußeren Blut-Retina-Schranke. Die innere Blut-Retina-Schranke wird durch retinale Gefäßendothelien gebildet, zwischen denen Zonulae occludentes ausgebildet sind. Retinale Pigmentepithelzellen bilden die äußere Blut-Retina-Schranke (Cunha-Vaz, 1976). Verschiebungen der Proteinmuster des Glaskörpers in Richtung eines serumähnlichen Proteinprofils sind typisch für einen Zusammenbruch dieser Barriere (Moter et al., 1989; Bresgen et al., 1991). Schädigungen der Blut-Retina-Schranke sind bei sehr vielen Augenerkrankungen bekannt, bei denen die Retina beteiligt ist (Cunha-Vaz, 1976). Auch bei der ERU ist die Retina in das Entzündungsgeschehen

involviert (Deeg et al., 2002a). Der erhöhte intraokuläre Albumin-Gehalt ist ein deutliches Zeichen einer gestörten Blut-Augen-Schranke.

Eine ebenfalls veränderte Expression in den Glaskörpern uveitischer Pferde zeigte sich für IgG. Immunglobuline zählen zu den klassischen hochabundanten Plasmaproteinen (Anderson und Anderson, 2002). IgG wurde auch im physiologischen Zustand im Glaskörper nachgewiesen (Clausen et al., 1990; Bresgen et al., 1991; Bresgen et al., 1994; Wagner et al., 1997). Allerdings waren intraokulär gemessene Konzentrationen deutlich geringer als diejenigen im Plasma oder Serum. So wurden in humanen Glaskörpern IgG-Konzentrationen gemessen, die im Mittel etwa um den Faktor 350 geringer waren als die korrespondierenden Konzentrationen im Plasma (Clausen et al., 1990). In den Glaskörpern von Pferden wurden IgG-Konzentrationen gemessen, die im Mittel etwa um den Faktor 1000 geringer waren als die im Serum gemessenen (Wagner et al., 1997). Die Herkunft des intraokulären IgG ist nicht genau geklärt. Aufgrund des Fehlens von Plasmazellen im Glaskörper postulieren Clausen et al. einen Übertritt von IgG aus dem Plasma in den Glaskörper (Clausen et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit war die IgG-Expression in den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Glaskörpern signifikant erhöht. Diese erhöhten IgG-Gehalte resultieren entweder aus einer erhöhten intraokulären IgG-Produktion durch lokal ansässige B-Lymphozyten oder können auf einen Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke mit nachfolgendem Einstrom von B-Lymphozyten oder IgG zurückzuführen sein. B-Lymphozyten wurden in den Augen uveitischer Pferde nachgewiesen (Romeike et al., 1998). Für einen Übertritt von IgG aus dem Plasma ins Auge spricht der Nachweis von anti-Tetanus-spezifischen Antikörpern im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden (Deeg et al., 2001).

Ein drittes Protein aus der Gruppe der klassischen Plasmaproteine (Anderson und Anderson, 2002), das in den Glaskörpern uveitischer Pferde eine veränderte Expression zeigte, ist die Komplement-Komponente C3 (<http://www.expasy.org/uniprot/P01026>). Die Produktion dieses Proteins erfolgt primär in der Leber (Alper et al., 1969). Daneben findet eine extrahepatische Synthese unter anderem auch in Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie statt (Whaley, 1980). Das Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems, das bei Entzündungen beteiligt ist, aber auch als Verstärker bei adaptiven Immunantworten wirkt (Carroll, 2004). Eine Aktivierung des Komplementsystems ist

über drei Wege möglich: einen klassischen Weg, einen Lektin-Weg und einen alternativen Weg. Allen drei Wegen ist die Aktivierung der Komplement-Komponente C3 gemeinsam (Carroll, 2004). Die zentrale Reaktion ist hierbei die Prozessierung von C3 durch die C3-Konvertase (Muller-Eberhard, 1988). Nach Aktivierung kann C3b an Zelloberflächen oder Immunkomplexe binden (Dolmer und Sottrup-Jensen, 1993). C3a, welches durch proteolytische Degradation von C3 entsteht, ist ein Mediator lokaler Entzündungsprozesse und führt zu Kontraktionen der glatten Muskulatur, erhöht die Gefäßpermeabilität und führt zur Histaminfreisetzung aus Mastzellen (Hugli, 1975). Beim Vergleich der Glaskörperproteome gesunder und uveitischer Augen zeigte sich eine erhöhte Expression dieses Proteins in uveitischen Augen. Eine bedeutende Rolle des Komplementsystems bei der ERU vermuteten Parma et al. (Parma et al., 1992b). Zwischen equiner Kornea und Leptospiren kreuzreagierende Antikörper wurden als C3-bindende Antikörper charakterisiert. Die Aktivierung des Komplementsystems würde den Mechanismus der Gewebeschädigung und Autoimmunreaktionen erklären (Parma et al., 1992b). Untersuchungen im Modell der experimentellen autoimmunen vorderen Uveitis in der Ratte weisen auf eine zentrale Rolle des Komplementsystems bei der Auslösung dieser Uveitis hin. In diesem Modell zeigte sich eine Korrelation zwischen der lokalen Aktivierung des Komplementsystems und dem Krankheitsverlauf. Bei Komplement-depletierten Versuchstieren reduzierten sich die Inzidenz, die Krankheitsdauer und der Schweregrad der Uveitis. Zudem sank die Produktion von Zytokinen (IL-10), Chemokinen (IP-10) und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und LECAM-1). Darüber hinaus war eine Uveitisinduktion in Form des adoptiven Transfers durch T-Zellen nicht mehr möglich, wenn entweder das Spender- oder das Empfängertier Komplement-depletiert waren (Jha et al., 2006a). Sohn et al. postulieren nach Untersuchungen an Rattenaugen, dass das Komplementsystem in gesunden Augen auf einem niedrigen Level kontinuierlich aktiv ist und durch intraokuläre Komplement-regulierende Proteine kontrolliert wird. Dadurch soll eine Zerstörung von Pathogenen ermöglicht werden, ohne dass intraokulare Strukturen entzündlich geschädigt werden (Sohn et al., 2000). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei der experimentellen autoimmunen vorderen Uveitis verschiedene okuläre Gewebe Komplement-regulierende Proteine hochregulieren, um eine Komplement-Aktivierung zu dämpfen und so einer Zerstörung okulärer Strukturen entgegenzuwirken (Jha et al., 2006b). Da C3 zu den hoch abundanten Plasmaproteinen zählt, könnte die

erhöhte Expression dieses Proteins in den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden ebenfalls auf einen Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke zurückzuführen sein. Andererseits ist auch eine zentrale Bedeutung bei der Auslösung von immunologischen Reaktionen und der Zerstörung okularer Strukturen nicht auszuschließen. Weitere Untersuchungen zur Abklärung der Beteiligung des Komplementsystems bei der ERU sind daher interessant.

Ein weiteres differenziell exprimiertes Protein, ApoA-I (<http://www.expasy.org/uniprot/P02648>), zählt ebenfalls zu den hochabundanten Plasmaproteinen (Anderson und Anderson, 2002). Dieses Protein ist ein wichtiger Bestandteil der Plasma-HDL (High density lipoproteins)-Fraktion. Die Synthese von ApoA-I erfolgt primär in der Leber und im Dünndarm. Das Protein ist am Cholesteroltransport von den Geweben zur Leber beteiligt und fungiert als Cofaktor für die Lecithin-Cholesterol Acyltransferase (LCAT) (Sorci-Thomas und Thomas, 2002). Im menschlichen Auge ist ApoA-I auch im physiologischen Zustand im retinalen Pigmentepithel exprimiert (West et al., 2003). In den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden war ApoA-I im Vergleich zu gesunden Glaskörpern erhöht exprimiert. Da ApoA-I zu den hoch abundanten Proteinen des Plasmas zählt (Anderson und Anderson, 2002), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Expression auf eine geschädigte Blut-Retina-Schranke zurückzuführen ist. Bei humanen Patienten mit diabetischem Makulaödem wurde eine erhöhte Expression von Apolipoprotein A-I und ein gleichzeitiges Fehlen der Expression von Apolipoprotein H im Glaskörper festgestellt. Nach Ansicht der Autoren könnte dies auf eine Lipidakkumulation in der Retina zurückzuführen sein, die häufig bei Patienten mit diabetischem Makulaödem vorliegt (Ouchi et al., 2005). Untersuchungen von Bruch'schen Membranen des Menschen gaben Hinweise auf eine intraokuläre Produktion von Lipoproteinpartikeln, die Apolipoprotein B und Apolipoprotein A-I enthalten (Li et al., 2005). Diese Lipoproteinpartikel wiesen eine andere Zusammensetzung auf als Lipoproteine des Plasmas. Die zusätzlich festgestellte Expression von für Apolipoproteine kodierenden Genen in der Retina und dem retinalen Pigmentepithel stützen die Hypothese einer intraokulären Produktion. Diese Partikel könnten dann im Alter oder bei altersbedingten Makulopathien zur Drusenbildung beitragen und intraokulär abgelagert werden. Solche Vorgänge wären nach Ansicht der Autoren vergleichbar mit dem Prozess bei der Initiierung der Arteriosklerose, bei dem in der Intima von Arterien

Plasmalipoproteine, die Apolipoprotein B enthalten, akkumulieren (Li et al., 2005). Interessanterweise ist ApoA-I als negatives Akute-Phase-Protein mit potenzieller antiinflammatorischer Wirkung bekannt. Hierbei ist HDL-assoziiertes ApoA-I in der Lage, die durch aktivierte T-Zellen medierte Aktivierung von Monozyten zu hemmen, und so die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch Monozyten zu reduzieren (Hyka et al., 2001). Der Anstieg von ApoA-I im Glaskörper uveitischer Pferde könnte daher einen gegenregulatorischen Mechanismus zur intraokulären Entzündung darstellen. Solche, die Zytokinproduktion hemmenden Mechanismen werden auch bei der rheumatoiden Arthritis des Menschen vermutet. Immunhistochemische Untersuchungen der Synovia solcher Patienten zeigten, dass ApoA-I in der entzündeten Synovia vor allem in perivaskulären Bereichen lokalisiert war, wo infiltrierende T-Zellen und Makrophagen vorhanden waren. In gesunden Gewebeproben war ApoA-I nicht, in Gewebeproben von Patienten, die therapiert wurden, war ApoA-I nur schwach nachweisbar (Bresnihan et al., 2004). Ob solch ein Mechanismus auch bei der ERU eine Bedeutung hat, bleibt abzuklären.

Ein weiteres klassisches Plasmaprotein (Anderson und Anderson, 2002), das eine in uveitischen Glaskörpern veränderte Expression zeigte, war Plasma-Retinol-bindendes Protein (PRBP) (<http://www.expasy.org/uniprot/Q28369>). Aufgabe dieses Proteins ist der Transport von Vitamin A (Retinol) von der Leber zu den peripheren Geweben. Im Plasma interagiert der PRBP-Retinol-Komplex dabei mit Transthyretin, was vor einer glomerulären Filtration in der Niere schützt (Naylor und Newcomer, 1999). Eine Synthese von Plasma-Retinol-bindendem Protein und Transthyretin findet auch intraokulär statt. Nach der Synthese in retinalen Pigmentepithelzellen erfolgt eine Sekretion vor allem über den apikalen Zellpol (Ong et al., 1994; Jaworowski et al., 1995). Transthyretin scheint dabei in wesentlich größeren Mengen als PRBP synthetisiert zu werden (Ong et al., 1994; Pfeffer et al., 2004). PRBP kommt aufgrund seiner hohen Bindungsfähigkeit für Retinoide vermutlich eine wesentliche Bedeutung im Sehzyklus zu (Adler und Edwards, 2000). In den Glaskörpern von humanen Patienten mit diabetischem Makulaödem wurde eine erhöhte Expression von PRBP festgestellt. Ob diese erhöhte Expression von PRBP jedoch die Ursache oder die Folge eines Übertritts von Proteinen aus retinalen Gefäßen ist, konnten die Autoren nicht beurteilen (Ouchi et al., 2005). Interessanterweise war PRBP in den Glaskörpern uveitischer Pferde im Vergleich zu denen gesunder deutlich geringer exprimiert. Da PRBP zu den klassischen



Plasmaproteinen zählt, wäre im Falle der Schädigung der Blut-Retina-Schranke ein vermehrter Übertritt des Proteins aus der Blutzirkulation ins Auge, und somit eine höhere Abundanz zu erwarten. Angesichts der intraokularen Produktion von PRBP durch retinale Pigmentepithelzellen könnte jedoch eine Schädigung des retinalen Pigmentepithels zu einer verringerten Produktion des Proteins führen. Denkbar wäre auch eine verringerte Expression infolge eines reduzierten Retinol-Bedarfs nach einer Schädigung intraokulärer Strukturen, die am Sehzyklus teilhaben. Bemerkenswert ist, dass zwei Proteine, IRBP und cRALBP, die beide eine Funktion im Sehzyklus haben, als Autoantigene in der ERU bekannt sind (Deeg et al., 2002b; Deeg et al., 2006b). Ob hier funktionelle Zusammenhänge bestehen, muss weiter abgeklärt werden.

Eine differenzielle Expression zeigte sich auch bei zwei Proteinen die mit Zellen des Immunsystems assoziiert sind. Eine veränderte Expression war für das Protein Carboxylesterase D1 zu verzeichnen. Dieses Enzym gehört zur Familie der Typ-B-Carboxylesterasen und katalysiert die Reaktion  $\text{Carboxylester} + \text{H}_2\text{O} = \text{Alkohol} + \text{Carboxylat}$  (<http://www.expasy.org/uniprot/Q95N05>). Die Carboxylesterasen von Säugetieren repräsentieren eine Multigenfamilie. Verschiedene Carboxylesterasen kommen in vielen Organen und Geweben verschiedener Säugetierspezies vor. Entsprechend einer Einteilung der Isoenzyme der Carboxylesterasen nach Satoh et al. ist die Carboxylesterase D1 der Familie CES1 zuzuordnen (Satoh und Hosokawa, 1998). Die humane Carboxylesterase 1 (CES1) ist auch unter dem Synonym humane Monozyten/Makrophagen Serin Esterase 1 (HMSE1) bekannt ([www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/](http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/)). HMSE1 ist ein für die Monozyten/Makrophagen-Zelllinie spezifisches Enzym und kann daher als Marker zur Monozyten/Makrophagen-Differenzierung und zur Charakterisierung physiologischer und neoplastischer Varianten dieser Zellen beim Menschen verwendet werden (Satoh et al., 1999; Boyle et al., 2000; Uphoff und Drexler, 2000). Unter physiologischen Bedingungen wurde HMSE1-mRNA in Monozyten sowie in Makrophagen verschiedener Gewebe nachgewiesen, unter pathologischen Bedingungen in Entzündungsmakrophagen, in epitheloiden Zellen, in Fremdkörperriesenzellen und in Langerhansschen Riesenzellen (Satoh et al., 1999). Die eigentliche physiologische Funktion dieses Enzyms ist unklar. Eine Funktion bei der Immunabwehr gegenüber Tumorzellen sowie eine Entgiftungsfunktion werden vermutet (Munger et al., 1991; Uphoff und Drexler, 2000). Die erhöhte Expression dieses Proteins in den Glaskörpern

uveitischer Pferde verweist auf die im Rahmen der ERU ablaufenden Immunreaktionen.

Eine differenzielle Expression wurde bei einem weiteren Protein festgestellt, das im Rahmen der Immunantwort bei der ERU eine Rolle spielen könnte. Das Protein Histone deacetylase complex subunit SAP18 (Sin3-associated polypeptide p18, SAP18) war nur in den Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden detektierbar. Dieses Protein hat eine regulatorische Funktion bei der Transkription von Genen. SAP18 ist Bestandteil des Sin3-Repressor-Komplexes (<http://www.expasy.org/uniprot/O55128>), einem Transkriptionsrepressor. Die Beeinflussung der Transkription wird hierbei durch Modifikationen von Histon-Proteinen bewirkt. SAP18, das mit der Histon deacetylase HDAC1 und Sin3 in einem Komplex vorliegt, verstärkt dabei die Sin3-HDAC1-medierte Repression der Transkription (Zhang et al., 1997). Des Weiteren ist SAP18 Bestandteil des ASAP-Komplexes (apoptosis- and splicing-associated protein complex). Dieser ist vermutlich an der Regulation des Spleißens während der Apoptose beteiligt (Schwerk et al., 2003). SAP18 spielt im Rahmen der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen eine Rolle. In Untersuchungen bei der Maus wurde eine allgemeine Expression von SAP18-mRNA in pluripotenten und hämatopoetischen Vorläuferzellen, jedoch eine spezifisch verringerte mRNA-Expression von SAP18 in sich terminal differenzierenden Monozyten/Makrophagen und Megakaryozyten nachgewiesen. Diese Ergebnisse sprechen für eine regulatorische Aufgabe von SAP18 bei der Reifung dieser Zellen (Boehmelt et al., 1998). Andere Zellen oder Organsysteme, bei denen SAP18 eine spezielle Bedeutung besitzt, wurden in der Literatur nicht gefunden. Interessanterweise war SAP18 lediglich in den Glaskörpern von uveitischen Pferden, nicht jedoch in Glaskörpern von augengesunden Tieren nachweisbar. Ob dieses Protein auch bei der Differenzierung der genannten Zelllinien beim Pferd eine Rolle spielt und welche Bedeutung dies für die Regulation der Immunantwort bei der ERU hat, muss weiter untersucht werden.

Ein weiteres Protein, PGDS (<http://www.expasy.org/uniprot/O97921>), war in den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden deutlich geringer exprimiert als in gesunden Glaskörpern. PGDS ist ein bifunktionales Protein. Neben einer enzymatischen Funktion, die in der Katalyse der Umwandlung von Prostaglandin H2 in Prostaglandin D2 besteht (Urade et al., 1985), hat PGDS eine Bedeutung als

Transportprotein von lipophilen Molekülen wie Biliverdin, Bilirubin, Schilddrüsenhormonen (Beuckmann et al., 1999) sowie Retinal und Retinolsäure (Tanaka et al., 1997). Hauptlokalisation dieses Proteins ist das zentrale Nervensystem. Dort ist PGDS in den Leptomeningen, den Plexus choroidei und in Oligodendrozyten des Gehirns und Rückenmarks nachweisbar (Urade et al., 1987; Urade et al., 1993). Nach der Synthese, die vermutlich in der Arachnoidea und den Plexus choroidei des Gehirns stattfindet (Urade et al., 1993), erfolgt eine Sekretion in die Zerebrospinalflüssigkeit (Watanabe et al., 1994). Intraokulär wird PGDS in der Iris, im Ziliarkörper sowie im retinalen Pigmentepithel synthetisiert (Beuckmann et al., 1996; Gerashchenko et al., 1998). Eine Sekretion erfolgt in den Glaskörper und ins Kammerwasser (Gerashchenko et al., 1998). Nach der Synthese im retinalen Pigmentepithel und anschließender Sekretion akkumuliert das Protein in der Interphotorezeptormatrix, wo es von Photorezeptoren aufgenommen wird. Vermutlich ist PGDS hier am Transport von Retinoiden durch die Interphotorezeptormatrix zu den Photorezeptorzellen beteiligt (Beuckmann et al., 1996). Eine hohe Expression von mRNA eines Prostaglandin D<sub>2</sub>-Rezeptors in der Retina deutet darauf hin, dass Prostaglandin D<sub>2</sub> wichtig für die Funktion der Retina ist (Boie et al., 1995). Bemerkenswert ist die allgemeine Expression von PGDS an Blut-Gewebe-Schranken. Das retinale Pigmentepithel ist am Aufbau der Blut-Retina-Schranke, die Leptomeningen sind am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Diese Expressionsmuster, die sich schon während der Ontogenese abzeichnen und auch für die Blut-Kammerwasser-Schranke und die Blut-Hoden-Schranke zutreffen sollen, weisen auf eine Bedeutung dieses Enzyms bei der Ausbildung und Erhaltung dieser Barrieren hin (Beuckmann et al., 1996; Hoffmann et al., 1996). In den Glaskörpern von humanen Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie wurde eine erhöhte Expression von PGDS festgestellt. Die Bedeutung ist jedoch bislang unklar (Kim et al., 2006). In den untersuchten Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden war PGDS im Vergleich zu gesunden Glaskörpern deutlich geringer exprimiert. PGDS ist damit neben dem bereits erwähnten PRBP ein weiteres Retinoid-bindendes Protein, das in den Augen uveitischer Pferde eine verringerte Expression zeigte. Interessant ist die erniedrigte Expression jedoch vor allem im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung von PGDS bei der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke. Veränderte Expressionsmuster von PGDS im Zusammenhang mit Uveitiden sind bisher nicht beschrieben.

Besonders bemerkenswert war eine veränderte Expression von zwei Proteinen, die als Inhibitoren des Wnt-Signalweges gelten. Dieser Signalweg reguliert verschiedene Prozesse während der Entwicklung eines Organismus, spielt aber auch bei adulten Individuen bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase eine Rolle (Nusse, 2005). Störungen im Wnt-Signalweg führen zu verschiedenen Erkrankungen wie Neoplasien oder degenerativen Erkrankungen (Gong et al., 2001; Giles et al., 2003). Sezernierte Wnt-Proteine sind die Mediatoren der komplexen Signalübertragung zwischen Signalzellen und Zielzellen (Nusse, 2005). Die von den Signalzellen sezernierten oder auf der Zelloberfläche präsentierten Wnt-Proteine binden an einen Fz/LRP-Komplex (Frizzled/low density lipoprotein receptor-related protein-Komplex) auf der Zelloberfläche der Zielzellen (Logan und Nusse, 2004). Bei der weiteren intrazellulären Signalübertragung sind drei verschiedene Wege bekannt: ein  $\beta$ -Catenin-Weg (kanonischer Wnt-Weg), ein Planar-Zell-Polaritäts-Weg und ein Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Weg (Huelsen und Behrens, 2002). Über den Wnt-Signalweg werden Prozesse wie Zellproliferation, Zellpolarität und Zelldifferenzierung reguliert (Seto und Bellen, 2004). Das erste, in uveitischen Augen differenziell exprimierte Protein, das als Modulator des Wnt-Weges fungiert, ist Dkk-3. Dkk-3 gehört zu einer Familie von sezernierten Glykoproteinen, die die Proteine Dkk 1-4 umfasst. Proteine aus dieser Familie sind als Inhibitoren des Wnt-Signalweges bekannt (Krupnik et al., 1999). Die inhibitorische Wirkung von Dickkopf-Proteinen kommt durch die Bindung an die LRP (low density lipoprotein receptor-related protein)-Einheit des Wnt-Rezeptorkomplexes zustande. Hierdurch wird der kanonische Wnt-Weg gehemmt. Das am besten untersuchte Protein aus dieser Familie ist Dkk-1. Die exakte Funktion von Dkk-3 im Wnt-Signalweg ist bisher wenig charakterisiert (Kawano und Kypta, 2003) und die genaue biologische Funktion des Proteins ist unklar. Eine hohe mRNA-Expression von Dkk-3 wurde beim Menschen in Herz, Gehirn und Rückenmark nachgewiesen. Bei der Maus ist Dkk-3-mRNA auch im Linsenepithel, im Ziliarkörper, sowie in bipolaren Neuronen und Ganglienzellen der Retina exprimiert (Krupnik et al., 1999). Die Expression von Dkk-3 in den untersuchten Glaskörpern uveitischer Pferde war signifikant erniedrigt. In einem Mausmodell zur Untersuchung retinaler Degenerationen wurde hingegen eine erhöhte Expression von Dkk-3-Genen in den veränderten Retinae festgestellt (Hackam et al., 2004). Möglicherweise steht diese veränderte Genexpression mit einer pro- oder antiapoptotischen Antwort oder einem Remodeling nach der Degeneration von Photorezeptoren in Zusammenhang. Um die

genaue Bedeutung der veränderten Expression im Rahmen der Degeneration von Photorezeptoren zu ermitteln, sind nach Ansicht der Autoren Untersuchungen zur korrespondierenden Proteinexpression erforderlich, da die RNA-Expression nicht immer auf die Proteinexpression schließen lässt (Hackam et al., 2004). Untersuchungen an Osteosarkomzellen gaben Hinweise darauf, dass Dkk-3 eine antiapoptotische Wirkung besitzt und die Invasionsfähigkeit dieser Tumorzellen durch eine Modulation des  $\beta$ -Catenin-Weges reduziert (Hoang et al., 2004). Dkk-3 scheint für die Embryogenese und die Überlebensfähigkeit nicht notwendig zu sein, wie sich bei Dkk-3-defizienten Mäusen zeigte. Jedoch wurden bei solchen Tieren Veränderungen im Verhalten, der Lungenventilation sowie veränderte hämatologische und immunologische Parameter festgestellt (Barrantes Idel et al., 2006). Die letzteren zeigten sich durch einen erhöhten Hämatokrit, einen erhöhten Hämoglobingehalt, höhere IgM-Werte und dem vermehrten Auftreten von natürlichen Killerzellen (Barrantes Idel et al., 2006). Diese Ergebnisse sind in Anbetracht der erniedrigten Expression von Dkk-3 in den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden sehr interessant. Durch die erniedrigte Expression von Dkk-3 könnte die inhibitorische Wirkung auf den Wnt-Signalweg reduziert werden und so möglicherweise eine verstärkte Immunantwort resultieren. Bemerkenswert im Zusammenhang mit solchen veränderten hämatologischen und immunologischen Parametern ist auch die in uveitischen Glaskörpern erhöhte Expression von SAP18, einem Protein, das bei der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen eine Rolle spielt. Eine weitere Charakterisierung von Dkk-3 ist deshalb erstrebenswert.

Ein weiteres Protein mit regulatorischer Funktion im Wnt-Signalweg, das Protein Secreted frizzled-related protein 2 (sFRP-2), war in den Glaskörpern uveitischer Pferde ebenfalls deutlich geringer exprimiert als in den Glaskörpern augengesunder Pferde. sFRP-2 gehört zu einer Familie, die bei Säugetieren fünf verschiedene Proteine umfasst (sFRP-1 – sFRP-5). sFRP-2 ist ein Inhibitor des Wnt-Signalweges. Die inhibitorische Wirkung von sFRPs kommt in erster Linie durch die direkte Bindung an Wnt-Proteine zustande, wodurch eine Bindung dieser an die Frizzled (Fz)-Rezeptoren verhindert wird. Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Bindung der sFRPs an die Frizzled (Fz)-Rezeptoren zu einer Hemmung führt (Kawano und Kypta, 2003). In der bovinen Retina ist sFRP-2 in der inneren Körnerschicht, und sFRP-5 in retinalen Pigmentepithelzellen exprimiert

(Chang et al., 1999). Die genaue Bedeutung von sFRPs sowie des Wnt-Signalweges in der Retina ist jedoch noch nicht bekannt. Diese Expressionsmuster weisen aber auf eine Beteiligung der entgegengesetzten Gradienten von sFRP-2 und sFRP-5 bei der Bestimmung der Polarität von Photorezeptoren und möglicherweise auch anderer Zellen in der Retina hin (Chang et al., 1999). Untersuchungen an Stäbchen-defizienten Mäusen zeigten, dass für die Funktion und die Homöostase der Photorezeptoren vermutlich eine Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über den Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Weg von Bedeutung ist (Yu et al., 2004). In den Retinae von Patienten mit Retinitis pigmentosa, einer Erkrankung, die durch progressives apoptotisch bedingtes Absterben von Photorezeptoren gekennzeichnet ist, wurde eine erhöhte Expression von sFRP-2 festgestellt. Dies lässt sich möglicherweise als antiapoptotische Antwort erklären (Jones et al., 2000). Eine antiapoptotische Eigenschaft dieses Proteins wurde auch bei Untersuchungen von Tumorzellen gezeigt. Zellen aus Mammatumoren des Hundes exprimieren spezifisch sFRP-2 (Lee et al., 2004a). Durch die Sekretion von sFRP-2 werden einerseits Tumorzellen vor einer Apoptose geschützt, andererseits werden benachbarte Zellen zu Tumorzellen transformiert und bleiben ebenfalls vor einer Apoptose bewahrt. Wie sich weiter zeigte, sind diese Vorgänge von einer Inkorporation von sFRP-2 in die extrazelluläre Matrix abhängig. Die Interaktion wird dabei durch einen Fibronectin-Integrin-Komplex vermittelt (Lee et al., 2004b). In den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden war sFRP-2 signifikant erniedrigt. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass sFRP-2 in gesunden Pferdeaugen in den Außensegmenten der Photorezeptoren hoch exprimiert ist. In uveitischen Augen war die Expression von sFRP-2 deutlich reduziert und beschränkte sich auf einzelne Photorezeptoraußensegmente. Die genaue Funktion von sFRP-2 im Auge ist bislang unklar. Die hohe Expression dieses Proteins in der Photorezeptorenschicht der equinen Retina weist auf eine wichtige Funktion für die Photorezeptoren hin. Interessant ist, dass zwei Inhibitoren des Wnt-Signalweges in den Augen uveitischer Pferde signifikant erniedrigt waren. Die genaue Bedeutung dieser verringerten Expression bei der ERU ist bisher nicht klar. Ein Zusammenhang des Wnt-Signalweges mit Uveitiden ist bislang nicht beschrieben. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung dieses Weges sind daher unbedingt anzustreben.

Ein weiteres, in den Glaskörpern uveitischer Pferde differenziell exprimiertes Protein, ist PEDF. Beim Menschen ist PEDF im physiologischen Zustand im Auge

(Karakousis et al., 2001), sowie in fast allen Regionen des Gehirns und im Rückenmark (Tombran-Tink et al., 1996) exprimiert. Daneben kann es im Plasma, (Petersen et al., 2003) sowie in den meisten Geweben (Tombran-Tink et al., 1996) nachgewiesen werden. Im Auge ist PEDF in Korneaepithelzellen, in Ganglienzellen der Retina, in retinalen Pigmentepithelzellen, in Photorezeptorzellen (Karakousis et al., 2001), im Ziliarepithel (Ortego et al., 1996) sowie in Müller-Gliazellen (Eichler et al., 2004) exprimiert. Ferner ist es im Glaskörper (Ogata et al., 2002), im Kammerwasser (Yoshida et al., 2006) und in der Interphotorezeptormatrix (Tombran-Tink et al., 1995) nachweisbar. Neben seiner neurotrophen und neuroprotektiven Eigenschaft ist dieses Protein als potenter Angiogeneseinhibitor bekannt (Barnstable und Tombran-Tink, 2004). Die neurotrophe Eigenschaft scheint in der Beeinflussung der Zellproliferation und Differenzierung von Zellen zu liegen (Barnstable und Tombran-Tink, 2004). Neuroprotektive Wirkungen des Proteins sind bei Ischämien (Ogata et al., 2001), bei Glutamat-induziertem Zelltod (DeCoster et al., 1999), bei oxidativem Stress (Cao et al., 1999) und bei der Degeneration von Photorezeptoren (Cayouette et al., 1999) bekannt. Die zu Grunde liegenden biochemischen Mechanismen dieser Wirkungen sind jedoch weitgehend ungeklärt (Barnstable und Tombran-Tink, 2004). Erhöhte PEDF-Konzentrationen wurden im Kammerwasser von humanen Uveitis-Patienten festgestellt. Die Erhöhung korrelierte dabei mit erhöhten Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und der Aktivität der Erkrankung. Der Anstieg der intraokularen PEDF-Konzentration könnte hierbei eine antiinflammatorische Antwort darstellen (Yoshida et al., 2006). Erniedrigte PEDF-Konzentrationen fanden sich dagegen in den Augen von Patienten mit diabetischer Retinopathie (Ogata et al., 2002) oder altersbedingter Makuladegeneration (Holekamp et al., 2002). Außerdem zeigten sich reduzierte PEDF-Konzentrationen bei der Endotoxin-induzierten Uveitis in der Ratte. Hierbei sank nach der Induktion einer Uveitis die PEDF-Konzentration in der Retina und im Plasma der Versuchstiere. Gleichzeitig erhöhten sich sowohl in der Retina als auch im Plasma die Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen. PEDF kann daher als Negativ-Akute-Phase-Protein charakterisiert werden (Zhang et al., 2006b). Eine reduzierte Expression von PEDF, die durch eine Transfektion von siRNA in Müller-Gliazellen herbeigeführt wurde, resultierte in einem signifikanten Anstieg der Sekretion der proinflammatorischen Faktoren VEGF und TNF- $\alpha$  in Müller-Gliazellen (Zhang et al., 2006b). PEDF übt sowohl auf Müller-Gliazellen als auch auf die mit diesen assoziierten Photorezeptoren protektive Effekte aus und ist

für die strukturelle Integrität und die Entwicklung dieser Zellen von Bedeutung (Jablonski et al., 2000, , 2001). Bei der immunhistochemischen Untersuchung von Retinapräparaten gesunder und an ERU erkrankter Pferde zeigte sich eine hohe Expression von PEDF in den Innensegmenten der Photorezeptoren, sowie in der äußeren Körnerschicht der Retinae gesunder Pferdeaugen. Eine deutlich verringerte Expression von PEDF, die sich lediglich noch auf wenige Photorezeptorenaußensegmente beschränkte, lag dagegen in den Retinae uveitischer Pferde vor. Aus der verringerten Expression von PEDF in der Netzhaut uveitischer Pferde könnte eine reduzierte protektive Wirkung auf die Photorezeptorzellen resultieren. Protektive Effekte hat PEDF zudem auf retinale Pigmentepithelzellen, und somit auf die äußere Blut-Retina-Schranke, beispielsweise bei oxidativem Stress (Ho et al., 2006). Die antiinflammatorischen und antivasopermeablen Eigenschaften von PEDF wurden in verschiedenen Tiermodellen belegt. Diese Eigenschaften werden zu einem großen Teil auf Interaktionen zwischen PEDF und VEGF zurückgeführt. So konnte im Rattenmodell des Diabetes und der Sauerstoff-induzierten Retinopathie durch die intravitreale Injektion von PEDF eine Reduktion der intraokularen Gefäßpermeabilität erreicht werden. Damit einhergehend sanken die Konzentrationen der retinalen Entzündungsfaktoren Vascular endothelial growth factor (VEGF), Vascular endothelial growth factor-Rezeptor-2 (VEGF-Rezeptor-2), Monozyten-chemoattraktives Protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) (Zhang et al., 2006b). Eine antivasopermeable Wirkung von PEDF wurde außerdem in der Maus gezeigt. Durch die intravitreale Injektion von VEGF wurde eine erhöhte Permeabilität retinaler Gefäße induziert. Durch eine kombinierte intravitreale Injektion von VEGF und PEDF im kontralateralen Auge konnte hingegen eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität verhindert werden (Liu et al., 2004). Die genauen Mechanismen dieser reziproken Regulation zwischen PEDF und VEGF sind jedoch nicht bekannt (Zhang et al., 2006a). Faktoren wie VEGF, TNF- $\alpha$  und Interleukin- $\beta$  tragen möglicherweise bereits in frühen Stadien der EAU, in denen noch keine strukturellen Schädigungen erkennbar sind, zu einer Dysfunktion der Blut-Retina-Schranke bei (Luna et al., 1997). Um zu untersuchen, ob die erniedrigte Expression von PEDF bei der ERU mit einer veränderten Expression von VEGF einhergeht, wurden in der vorliegenden Arbeit immunhistochemische



Doppelfärbungen von PEDF und VEGF in equinen Retinapräparaten angefertigt. Diese zeigten, dass VEGF in der Retina augengesunder Pferde nicht exprimiert ist. In der Retina uveitischer Augen dagegen konnte VEGF an Stellen nachgewiesen werden, an denen lediglich eine geringe PEDF-Expression vorlag. Die verringerte Expression von PEDF in den Augen von an ERU erkrankten Pferden könnte durch die dadurch bedingten reduzierten protektiven, antiinflammatorischen und antivasopermeablen Wirkungen wesentlich zum Entzündungsgeschehen und zum Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke beitragen.

Durch die vergleichende Analyse der Proteinexpression in den Glaskörpern gesunder und an ERU erkrankter Pferde wurden insgesamt elf differenziell exprimierte Proteine identifiziert. Diese Proteine sind im Zusammenhang mit der Blut-Retina-Schranke, mit Immunreaktionen und als Modulatoren des Wnt-Signalweges von Bedeutung. Insbesondere letzterer ist im Zusammenhang mit Uveitiden bisher nicht beschrieben. Somit hat sich die Proteomanalyse als hilfreiches Instrument bei der Identifizierung neuer, möglicherweise bei der Pathogenese der ERU bedeutender Proteine und biologischer Signalwege erwiesen.

## 6 Zusammenfassung

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist die häufigste Augenerkrankung bei Equiden. Die pathogenetischen Mechanismen, die den rezidivierenden immunologisch-inflammatorischen Reaktionen und der Schädigung intraokularer Strukturen zu Grunde liegen, sind weitgehend unerforscht.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Kombination von zweidimensionaler Gelelektrophorese und massenspektrometrischen Untersuchungen die Proteinexpression in den Glaskörpern gesunder und an ERU erkrankter Pferde zu analysieren und durch die Identifizierung differenziell exprimierter Proteine Hinweise auf Mechanismen zu erhalten, die bei der Pathogenese der ERU von Bedeutung sind. Dabei wurde Material verwendet, das bei der therapeutischen Pars-plana Vitrektomie chirurgisch entfernt wird, was zu einer Reduktion weiterer Schübe führt.

Deutliche Unterschiede zwischen gesunden und uveitischen Augen zeigten sich bereits in einer signifikant erhöhten Proteinkonzentration der Glaskörper uveitischer Pferde ( $3,67 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 2,28 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  bei ERU im Vergleich zu  $0,15 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  bei gesunden). Die nach zweidimensionaler Gelelektrophorese des Glaskörpermaterials erhaltenen Proteinmuster der Glaskörper gesunder Augen waren sehr homogen. Ebenso zeigten die Proteinmuster der uveitischen Glaskörper untereinander nur geringe individuelle Unterschiede. Deutliche Unterschiede in der Proteinexpression waren jedoch beim Vergleich von Glaskörpern gesunder und uveitischer Augen festzustellen. Nach massenspektrometrischer Analyse der zweidimensional aufgetrennten Proteine wurden insgesamt elf differenziell exprimierte Proteine identifiziert. Hiervon waren in den Glaskörpern uveitischer Pferde, im Vergleich zu gesunden, sechs Proteine (Albumin, Gamma-Immunglobulin, Komplement C3, Apolipoprotein-AI, Carboxylesterase D1 und Histone deacetylase complex subunit SAP18) höher und fünf Proteine (Plasma Retinol-bindendes Protein, Prostaglandin-H2 D-isomerase, Dickkopf-related protein 3, Secreted frizzled-related protein 2 und Pigment epithelium-derived factor) niedriger exprimiert. Diese differenziell exprimierten Proteine sind im Zusammenhang mit der Blut-Retina-Schranke, mit Immunantworten und der Modulation des Wnt-Signalweges von Bedeutung. Interessant ist insbesondere eine mögliche Beteiligung des Wnt-Signalweges bei der ERU. Dieser wurde im Zusammenhang mit Uveitiden bisher nicht beschrieben.

Die signifikant reduzierte Expression konnte für sFRP-2 und PEDF darüber hinaus direkt im retinalen Gewebe gezeigt werden. Dabei konnte zusätzlich ein Zusammenhang zwischen niedrigem PEDF und auftretender VEGF-Expression in der Netzhaut nachgewiesen werden. Die Proteomanalyse hat sich somit als geeignetes Instrument bei der Identifizierung neuer, möglicherweise bei der Pathogenese der ERU relevanter Proteine und biologischer Signalwege erwiesen.

## 7 Summary

### **Differentially expressed proteins in healthy and ERU vitreous**

Equine recurrent uveitis is the most frequent eye disease in horses. However, the underlying pathogenic mechanisms leading to recurrences and immune mediated inflammatory reactions damaging intraocular tissue are poorly understood.

This study aimed at investigating the protein expression in the vitreous of healthy and ERU diseased horse eyes, by using 2D gel electrophoresis and mass spectrometry. This should enable to detect differentially expressed proteins which could give evidence of mechanisms and pathways involved in ERU pathogenesis. To this end vitreous specimen were used that had been removed surgically by therapeutic pars-plana vitrectomy, a surgery which reduces further inflammatory attacks.

Significant differences in total protein amount were observed between vitreous from healthy and diseased eyes ( $3,67 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 2,28 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  total protein in ERU versus  $0,15 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  in healthy eyes). Two dimensional gel electrophoresis of vitreous revealed reproducible protein patterns from healthy eyes. Similarly, protein patterns of ERU diseased vitreous showed only minor differences between each other. Clear differences in protein expression were observed when vitreous of healthy and ERU diseased eyes were compared. Eleven differentially expressed proteins could be identified by mass spectrometry. Of these, six proteins (Albumin, Immunoglobulin-gamma, Complement C3, Apolipoprotein-AI, Carboxylesterase D1 and Histone deacetylase complex subunit SAP18) were expressed at higher levels and five proteins (Plasma retinol-binding protein, Prostaglandin-H2 D-isomerase, Dickkopf-related protein 3, Secreted frizzled-related protein 2 and Pigment epithelium-derived factor) were expressed at lower levels in vitreous of horses suffering from ERU compared to healthy vitreous. These differentially expressed proteins are functionally associated with the maintenance of blood-retinal barrier, immune responses and modulation of Wnt-signaling pathway. In particular, the involvement of Wnt-signaling pathway in ERU is of interest since this has not yet been described to be associated with uveitis.

In addition to the vitreous, a significantly reduced expression of Secreted frizzled related protein 2 and Pigment epithelium-derived factor could also be demonstrated in retinal tissue. Further, low levels of PEDF in the ERU retina could be correlated

with emerging VEGF expression. Proteome analysis thus has proven to be a useful tool for the identification of new proteins and biological pathways possibly relevant in ERU pathogenesis.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adamus, G., Schmied, J. L., Hargrave, P. A., Arendt, A. und Moticka, E. J. (1992): Induction of experimental autoimmune uveitis with rhodopsin synthetic peptides in Lewis rats. *Curr Eye Res* 11, 657-67.
- Adamus, G. und Chan, C. C. (2002): Experimental autoimmune uveitides: multiple antigens, diverse diseases. *Int Rev Immunol* 21, 209-29.
- Adler, A. J. und Edwards, R. B. (2000): Human interphotoreceptor matrix contains serum albumin and retinol-binding protein. *Exp Eye Res* 70, 227-34.
- Alper, C. A., Johnson, A. M., Birtch, A. G. und Moore, F. D. (1969): Human C'3: evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science* 163, 286-8.
- Anderson, N. L., Matheson, A. D. und Steiner, S. (2000): Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr Opin Biotechnol* 11, 408-12.
- Anderson, N. L. und Anderson, N. G. (2002): The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1, 845-67.
- Azad, N. S., Rasool, N., Annunziata, C. M., Minasian, L., Whitely, G. und Kohn, E. C. (2006): Proteomics in clinical trials and practice: present uses and future promise. *Mol Cell Proteomics*.
- Baarsma, G. S., Priem, H. A. und Kijlstra, A. (1990): Association of birdshot retinochoroidopathy and HLA-A29 antigen. *Curr Eye Res* 9 Suppl, 63-8.
- Bahk, S. C., Lee, S. H., Jang, J. U., Choi, C. U., Lee, B. S., Chae, S. C., Song, H. J., Park, Z. Y., Yang, Y. S. und Chung, H. T. (2006): Identification of crystallin family proteins in vitreous body in rat endotoxin-induced uveitis: Involvement of crystallin truncation in uveitis pathogenesis. *Proteomics* 6, 3436-44.
- Barnett, K. C., Crispin, S. M., Lavach, J. D. und Matthews, A. G. (1998): Augenkrankheiten beim Pferd: Farbatlas für die Praxis, pp. 173-181. Schlütersche.
- Barnstable, C. J. und Tombran-Tink, J. (2004): Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* 23, 561-77.
- Barrantes Idel, B., Montero-Pedrazuela, A., Guadano-Ferraz, A., Obregon, M. J., Martinez de Mena, R., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Franz, T. J., Kalaydjiev, S., Klempt, M., Holter, S., Rathkolb, B., Reinhard, C., Morreale de Escobar, G., Bernal, J., Busch, D. H., Wurst, W., Wolf, E., Schulz, H., Shtrom, S., Greiner, E., Hrabe de Angelis, M., Westphal, H. und Niehrs, C. (2006): Generation and characterization of dickkopf3 mutant mice. *Mol Cell Biol* 26, 2317-26.
- Becker, M. D., Harsch, N., Zierhut, M., Davis, J. L. und Holz, F. G. (2003): [Therapeutic vitrectomy in uveitis: current status and recommendations]. *Ophthalmologie* 100, 787-95.
- Berhane, B. T., Zong, C., Liem, D. A., Huang, A., Le, S., Edmondson, R. D., Jones, R. C., Qiao, X., Whitelegge, J. P., Ping, P. und Vondriska, T. M. (2005): Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the HUPO Plasma Proteome Project pilot phase. *Proteomics* 5, 3520-30.
- Beuckmann, C. T., Gordon, W. C., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Marcheselli, V. L., Gerashchenko, D. Y., Urade, Y., Hayaishi, O. und Bazan, N. G. (1996): Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is located in pigment epithelial cells of rat retina and accumulates within interphotoreceptor matrix. *J Neurosci* 16, 6119-24.
- Beuckmann, C. T., Aoyagi, M., Okazaki, I., Hiroike, T., Toh, H., Hayaishi, O. und Urade, Y. (1999): Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type

- prostaglandin D synthase. *Biochemistry* **38**, 8006-13.
- Bishop, P. N. (2000): Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res* **19**, 323-44.
- Boehmelt, G., Antonio, L. und Iscove, N. N. (1998): Cloning of the murine transcriptional corepressor component SAP18 and differential expression of its mRNA in the hematopoietic hierarchy. *Gene* **207**, 267-75.
- Boie, Y., Sawyer, N., Slipetz, D. M., Metters, K. M. und Abramovitz, M. (1995): Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem* **270**, 18910-6.
- Boyle, C., Cosby, S. L., Markey, G. M., Alexander, H. D. und Morris, T. C. (2000): Quantitative deficiency of monocyte-specific esterase (MSE) mRNA in monocyte esterase deficiency (MED). *Br J Haematol* **110**, 699-703.
- 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.
- Bresgen, M., Martiny, B., Weller, M., Heimann, K. und Wiedemann, P. (1991): [Analysis of the protein pattern in physiologic and pathologic vitreous bodies by electrophoresis and immunologic identification]. *Fortschr Ophthalmol* **88**, 665-70.
- Bresgen, M., Baum, U., Esser, P., Wiedemann, P. und Heimann, K. (1994): [Protein composition of the vitreous body in proliferative diabetic retinopathy. An analysis with 2-D-electrophoresis]. *Ophthalmologie* **91**, 758-62.
- Bresnihan, B., Gogarty, M., FitzGerald, O., Dayer, J. M. und Burger, D. (2004): Apolipoprotein A-I infiltration in rheumatoid arthritis synovial tissue: a control mechanism of cytokine production? *Arthritis Res Ther* **6**, R563-6.
- Cao, W., Tombran-Tink, J., Chen, W., Mrazek, D., Elias, R. und McGinnis, J. F. (1999): Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res* **57**, 789-800.
- Carroll, M. C. (2004): The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* **5**, 981-6.
- Caspi, R. R., Roberge, F. G., Chan, C. C., Wiggert, B., Chader, G. J., Rozenszajn, L. A., Lando, Z. und 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., Chan, C. C., Leake, W. C., Higuchi, M., Wiggert, B. und Chader, G. J. (1990): Experimental autoimmune uveoretinitis in mice. Induction by a single eliciting event and dependence on quantitative parameters of immunization. *J Autoimmun* **3**, 237-46.
- Caspi, R. R. (1999): Immune mechanisms in uveitis. *Springer Semin Immunopathol* **21**, 113-24.
- Cayouette, M., Smith, S. B., Becerra, S. P. und Gravel, C. (1999): Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. *Neurobiol Dis* **6**, 523-32.
- Chang, J. T., Esumi, N., Moore, K., Li, Y., Zhang, S., Chew, C., Goodman, B., Rattner, A., Moody, S., Stetten, G., Campochiaro, P. A. und Zack, D. J. (1999): Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* **8**, 575-83.
- Chen, G., Gharib, T. G., Huang, C. C., Taylor, J. M., Misesk, D. E., Kardia, S. L., Giordano, T. J., Iannettoni, M. D., Orringer, M. B., Hanash, S. M. und Beer, D. G. (2002): Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* **1**, 304-13.
- Clausen, R., Weller, M., Hilgers, R. D., Heimann, K. und Wiedemann, P. (1990): [Quantitative

- determination of 5 vitreal proteins in the normal vitreous body and proliferative retinal diseases]. *Fortschr Ophthalmol* 87, 283-6.
- Cook, C. S., Peiffer, R. L. und Harling, D. E. (1983): Equine recurrent uveitis. *Equine Vet J Suppl.* 15, 57-60.
- Cross, R. S. (1966): Equine periodic ophthalmia. *Vet Rec* 78, 8-13.
- Cunha-Vaz, J. G. (1976): The blood-retinal barriers. *Doc Ophthalmol* 41, 287-327.
- Davidson, M. G., Nasisse, M. P. und Roberts, S. M. (1987): Immunodiagnosis of leptospiral uveitis in two horses. *Equine Vet J* 19, 155-7.
- Davies, J. M. (1997): Molecular mimicry: can epitope mimicry induce autoimmune disease? *Immunol Cell Biol* 75, 113-26.
- de Smet, M. D., Bitar, G., Roberge, F. G., Gery, I. und Nussenblatt, R. B. (1993): Human S-antigen: presence of multiple immunogenic and immunopathogenic sites in the Lewis rat. *J Autoimmun* 6, 587-99.
- de Smet, M. D., Bitar, G., Mainigi, S. und Nussenblatt, R. B. (2001): Human S-antigen determinant recognition in uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 3233-8.
- DeCoster, M. A., Schabelman, E., Tombran-Tink, J. und Bazan, N. G. (1999): Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 56, 604-10.
- Deeg, C. A., Kaspers, B., Gerhards, H., Thurau, S. R., Wollanke, B. und Wildner, G. (2001): Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 393-8.
- Deeg, C. A., Ehrenhofer, M., Thurau, S. R., Reese, S., Wildner, G. und Kaspers, B. (2002a): Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* 75, 127-33.
- Deeg, C. A., Thurau, S. R., Gerhards, H., Ehrenhofer, M., Wildner, G. und Kaspers, B. (2002b): Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* 32, 2598-606.
- Deeg, C. A., Reese, S., Gerhards, H., Wildner, G. und Kaspers, B. (2004): The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2286-92.
- Deeg, C. A., Amann, B., Raith, A. J. und Kaspers, B. (2006a): Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 652-6.
- 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. und Ueffing, M. (2006b): Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 5, 1462-70.
- Dev, S., Mieler, W. F., Pulido, J. S. und Mittra, R. A. (1999): Visual outcomes after pars plana vitrectomy for epiretinal membranes associated with pars planitis. *Ophthalmology* 106, 1086-90.
- Dolmer, K. und Sottrup-Jensen, L. (1993): Disulfide bridges in human complement component C3b. *FEBS Lett* 315, 85-90.
- Donoso, L. A., Merryman, C. F., Sery, T. W., Shinohara, T., Dietzschold, B., Smith, A. und Kalsow, C. M. (1987): S-antigen: characterization of a pathogenic epitope which mediates experimental autoimmune uveitis and pinealitis in Lewis rats. *Curr Eye Res* 6, 1151-9.
- Drukier, A. K., Grigoriev, I., Brown, L. R., Tomaszewski, J. E., Sainsbury, R. und Godovac-Zimmermann, J. (2006): Looking for Thom's biomarkers with proteomics. *J Proteome Res* 5, 2046-8.



- Dubielzig, R. R., Render, J. A. und Morreale, R. J. (1997): Distinctive morphologic features of the ciliary body in equine recurrent uveitis. *Vet Comp Ophthalmol* 7, 163-167.
- Dwyer, A. E., Crockett, R. S. und Kalsow, C. M. (1995): Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993). *J Am Vet Med Assoc* 207, 1327-31.
- Ehrenhofer, M. C., Deeg, C. A., Reese, S., Liebich, H. G., Stangassinger, M. und Kaspers, B. (2002): Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol* 5, 39-47.
- Eichler, W., Yafai, Y., Keller, T., Wiedemann, P. und Reichenbach, A. (2004): PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res* 299, 68-78.
- Faber, N. A., Crawford, M., LeFebvre, R. B., Buyukmihci, N. C., Madigan, J. E. und 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.
- Forrester, J. V. (1991): Uveitis: pathogenesis. *Lancet* 338, 1498-501.
- Fruhauf, B., Ohnesorge, B., Deegen, E. und Boeve, M. (1998): Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy. *Vet Ophthalmol* 1, 137-151.
- Gelatt, K. N. (1991): *Veterinary Ophthalmology*, 2nd, pp. 139-140. Lea & Febiger.
- Gerashchenko, D. Y., Beuckmann, C. T., Marcheselli, V. L., Gordon, W. C., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Hayaishi, O. und Bazan, N. G. (1998): Localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in iris, ciliary body, and eye fluids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 198-203.
- Gerhards, H., Wollanke, B. und Brem, S. (1999): Vitrectomy as a diagnostic and therapeutic approach for equine recurrent uveitis (ERU). *AAEP Proceedings* 45, 89-93.
- Gerhards, H. und Wollanke, B. (2001): Uveitis bei Pferden - Diagnose und Therapie. *Pferdeheilkunde* 17, 319-329.
- Gery, I., Wiggert, B., Redmond, T. M., Kuwabara, T., Crawford, M. A., Vistica, B. P. und Chader, G. J. (1986): Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27, 1296-300.
- Giles, R. H., van Es, J. H. und Clevers, H. (2003): Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653, 1-24.
- Gilger, B. C., Malok, E., Cutter, K. V., Stewart, T., Horohov, D. W. und 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., Ashton, P., Smith, T., Jaffe, G. J. und Allen, J. B. (2000): Long-term effect on the equine eye of an intravitreal device used for sustained release of cyclosporine A. *Vet Ophthalmol* 3, 105-110.
- Gilger, B. C. und Allen, J. B. (2001): A review of recent advancements in the surgical treatment of equine recurrent uveitis. *AAEP Proceedings* 47, 32-35.
- Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A. M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F. H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W. N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J. A., Beighton, P., Black, G. C., Boles, R. G., Boon, L. M., Borrone, C., Brunner, H. G., Carle, G. F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M. L., Hall, B., Hennekam, R. C., Hirose, T., Jans, A., Juppner, H., Kim, C. A., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R. S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M. J., Van Hul, W.,

- Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B. R. und Warman, M. L. (2001): LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513-23.
- Gorg, A., Postel, W. und Gunther, S. (1988a): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-46.
- Gorg, A., Postel, W., Gunther, S., Weser, J., Strahler, J. R., Hanash, S. M., Somerlot, L. und Kuick, R. (1988b): Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes concentrations. *Electrophoresis* 9, 37-46.
- Gorg, A., Weiss, W. und Dunn, M. J. (2004): Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-85.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. und Aebersold, R. (1999): Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19, 1720-30.
- Gygi, S. P. und Aebersold, R. (2000): Mass spectrometry and proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 4, 489-94.
- Hackam, A. S., Strom, R., Liu, D., Qian, J., Wang, C., Otteson, D., Gunatilaka, T., Farkas, R. H., Chowers, I., Kageyama, M., Leveillard, T., Sahel, J. A., Campochiaro, P. A., Parmigiani, G. und Zack, D. J. (2004): Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2929-42.
- Hanash, S. (2003): Disease proteomics. *Nature* 422, 226-32.
- Hines, M. T., Jarpe, A. und Halliwell, R. E. (1990): Equine Recurrent Uveitis: Immunization of ponies with retinal S Antigen Prog. in *veterinary & comparative ophthalmology* 2, 3-11.
- Ho, T. C., Yang, Y. C., Cheng, H. C., Wu, A. C., Chen, S. L. und Tsao, Y. P. (2006): Pigment epithelium-derived factor protects retinal pigment epithelium from oxidant-mediated barrier dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 372-8.
- Hoang, B. H., Kubo, T., Healey, J. H., Yang, R., Nathan, S. S., Kolb, E. A., Mazza, B., Meyers, P. A. und Gorlick, R. (2004): Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Res* 64, 2734-9.
- Hoey, S., Grabowski, P. S., Ralston, S. H., Forrester, J. V. und Liversidge, J. (1997): Nitric oxide accelerates the onset and increases the severity of experimental autoimmune uveoretinitis through an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 159, 5132-42.
- Hoffmann, A., Bachner, D., Betat, N., Lauber, J. und Gross, G. (1996): Developmental expression of murine Beta-trace in embryos and adult animals suggests a function in maturation and maintenance of blood-tissue barriers. *Dev Dyn* 207, 332-43.
- Holekamp, N. M., Bouck, N. und Volpert, O. (2002): Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 134, 220-7.
- Hortin, G. L., Jortani, S. A., Ritchie, J. C., Jr., Valdes, R., Jr. und Chan, D. W. (2006): Proteomics: a new diagnostic frontier. *Clin Chem* 52, 1218-22.
- Horwitz, M. S., Bradley, L. M., Harbertson, J., Krahl, T., Lee, J. und Sarvetnick, N. (1998): Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 4, 781-5.
- Huelsken, J. und Behrens, J. (2002): The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 115, 3977-8.
- Hugli, T. E. (1975): Human anaphylatoxin (C3a) from the third component of complement. Primary structure. *J Biol Chem* 250, 8293-301.
- Hyka, N., Dayer, J. M., Modoux, C., Kohno, T., Edwards, C. K., 3rd, Roux-Lombard, P. und

- Burger, D. (2001): Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 97, 2381-9.
- Jablonski, M. M., Tombran-Tink, J., Mrazek, D. A. und Iannaccone, A. (2000): Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J Neurosci* 20, 7149-57.
- Jablonski, M. M., Tombran-Tink, J., Mrazek, D. A. und Iannaccone, A. (2001): Pigment epithelium-derived factor supports normal Muller cell development and glutamine synthetase expression after removal of the retinal pigment epithelium. *Glia* 35, 14-25.
- Jaworowski, A., Fang, Z., Khong, T. F. und Augusteyn, R. C. (1995): Protein synthesis and secretion by cultured retinal pigment epithelia. *Biochim Biophys Acta* 1245, 121-9.
- Jha, P., Sohn, J. H., Xu, Q., Nishihori, H., Wang, Y., Nishihori, S., Manickam, B., Kaplan, H. J., Bora, P. S. und Bora, N. S. (2006a): The complement system plays a critical role in the development of experimental autoimmune anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 1030-8.
- Jha, P., Sohn, J. H., Xu, Q., Wang, Y., Kaplan, H. J., Bora, P. S. und Bora, N. S. (2006b): Suppression of complement regulatory proteins (CRPs) exacerbates experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). *J Immunol* 176, 7221-31.
- Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Stewart, H. J. und Neal, M. J. (2000): Altered expression of secreted frizzled-related protein-2 in retinitis pigmentosa retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1297-301.
- Jones, T. C. (1942): Equine Periodic Ophthalmia. *Am. J. Vet. Res.* 3, 45-71.
- Kalsow, C. M. und Wacker, W. B. (1978): Pineal gland involvement in retina-induced experimental allergic uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 774-83.
- Kalsow, C. M., Dwyer, A. E., Smith, A. W. und Nifong, T. P. (1993): Pinealitis accompanying equine recurrent uveitis. *Br J Ophthalmol* 77, 46-8.
- Kalsow, C. M. und Dwyer, A. E. (1998): Retinal immunopathology in horses with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 6, 239-51.
- Kalsow, C. M., Dubielzig, R. R. und Dwyer, A. E. (1999): Immunopathology of pineal glands from horses with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1611-5.
- Karakousis, P. C., John, S. K., Behling, K. C., Surace, E. M., Smith, J. E., Hendrickson, A., Tang, W. X., Bennett, J. und Milam, A. H. (2001): Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis* 7, 154-63.
- Kawano, Y. und Kypta, R. (2003): Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627-34.
- Kim, S. J., Kim, S., Park, J., Lee, H. K., Park, K. S., Yu, H. G. und Kim, Y. (2006): Differential expression of vitreous proteins in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 31, 231-40.
- Krupnik, V. E., Sharp, J. D., Jiang, C., Robison, K., Chickering, T. W., Amaravadi, L., Brown, D. E., Guyot, D., Mays, G., Leiby, K., Chang, B., Duong, T., Goodearl, A. D., Gearing, D. P., Sokol, S. Y. und McCarthy, S. A. (1999): Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238, 301-13.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lee, J. L., Chang, C. J., Wu, S. Y., Sargan, D. R. und Lin, C. T. (2004a): Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) is highly expressed in canine mammary gland tumors but not in normal mammary glands. *Breast Cancer Res Treat* 84, 139-49.

- Lee, J. L., Lin, C. T., Chueh, L. L. und Chang, C. J. (2004b): Autocrine/paracrine secreted Frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis: a possible mechanism of mammary tumorigenesis. *J Biol Chem* 279, 14602-9.
- Lehmann, P. V., Forsthuber, T., Miller, A. und Sercarz, E. E. (1992): Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358, 155-7.
- Li, C. M., Chung, B. H., Presley, J. B., Malek, G., Zhang, X., Dashti, N., Li, L., Chen, J., Bradley, K., Kruth, H. S. und Curcio, C. A. (2005): Lipoprotein-like particles and cholesteryl esters in human Bruch's membrane: initial characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2576-86.
- Li, Q., Fujino, Y., Caspi, R. R., Najafian, F., Nussenblatt, R. B. und Chan, C. C. (1992): Association between mast cells and the development of experimental autoimmune uveitis in different rat strains. *Clin Immunol Immunopathol* 65, 294-9.
- Liu, H., Ren, J. G., Cooper, W. L., Hawkins, C. E., Cowan, M. R. und Tong, P. Y. (2004): Identification of the antivasopermeability effect of pigment epithelium-derived factor and its active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6605-10.
- Logan, C. Y. und Nusse, R. (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Luna, J. D., Chan, C. C., Derevjani, N. L., Mahlow, J., Chiu, C., Peng, B., Tobe, T., Campochiaro, P. A. und Vinore, S. A. (1997): Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J Neurosci Res* 49, 268-80.
- Mair, T. S. und Crispin, S. M. (1989): Immunological mechanisms in uveitis. *Equine Vet J* 21, 391-393.
- Matthews, A. G., Waitkins, S. A. und 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.
- Maxwell, S. A., Hurt, D., Brightman, A. H. und Takemoto, D. (1991): Humoral responses to retinal proteins in horses with recurrent uveitis. *Progress in Veterinary & Comparative Ophthalmology* 1, 155-162.
- Menezo, V., Lau, C., Comer, M. und Lightman, S. (2005): Clinical outcome of chronic immunosuppression in patients with non-infectious uveitis. *Clin Experiment Ophthalmol* 33, 16-21.
- Moter, H., Wiedemann, P., Weller, M. und Heimann, K. (1989): [Isoelectric focusing and electroblotting of human vitreous body proteins]. *Fortschr Ophthalmol* 86, 399-402.
- Muller-Eberhard, H. J. (1988): Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 57, 321-47.
- Munger, J. S., Shi, G. P., Mark, E. A., Chin, D. T., Gerard, C. und Chapman, H. A. (1991): A serine esterase released by human alveolar macrophages is closely related to liver microsomal carboxylesterases. *J Biol Chem* 266, 18832-8.
- Nakanishi, T., Koyama, R., Ikeda, T. und Shimizu, A. (2002): Catalogue of soluble proteins in the human vitreous humor: comparison between diabetic retinopathy and macular hole. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 776, 89-100.
- Naylor, H. M. und Newcomer, M. E. (1999): The structure of human retinol-binding protein (RBP) with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP. *Biochemistry* 38, 2647-53.
- Neal, R. E., Bettelheim, F. A., Lin, C., Winn, K. C., Garland, D. L. und Zigler, J. S., Jr. (2005): Alterations in human vitreous humour following cataract extraction. *Exp Eye Res* 80,

337-47.

- Nusse, R. (2005): Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15, 28-32.
- Nussenblatt, R. B. und Gery, I. (1996): Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease. *J Autoimmun* 9, 575-85.
- O'Farrell, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-21.
- Ogata, N., Wang, L., Jo, N., Tombran-Tink, J., Takahashi, K., Mrazek, D. und Matsumura, M. (2001): Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res* 22, 245-52.
- Ogata, N., Nishikawa, M., Nishimura, T., Mitsuma, Y. und Matsumura, M. (2002): Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 134, 348-53.
- Okada, A. A. und Forrester, J. V. (2000): Ocular inflammatory disease in the new millennium. *Arch Ophthalmol* 118, 116-9.
- Omenn, G. S. (2004): The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses. *Proteomics* 4, 1235-40.
- Ong, D. E., Davis, J. T., O'Day, W. T. und Bok, D. (1994): Synthesis and secretion of retinol-binding protein and transthyretin by cultured retinal pigment epithelium. *Biochemistry* 33, 1835-42.
- Ortego, J., Escribano, J., Becerra, S. P. und Coca-Prados, M. (1996): Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium. Synthesis and secretion into the aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 2759-67.
- Ouchi, M., West, K., Crabb, J. W., Kinoshita, S. und Kamei, M. (2005): Proteomic analysis of vitreous from diabetic macular edema. *Exp Eye Res* 81, 176-82.
- Parma, A. E., Santisteban, C. G., Villalba, J. S. und Bowden, R. A. (1985): Experimental demonstration of an antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. *Vet Immunol Immunopathol* 10, 215-24.
- Parma, A. E., Cerone, S. I. und Sansinanea, S. A. (1992a): Biochemical analysis by SDS-PAGE and western blotting of the antigenic relationship between *Leptospira* and equine ocular tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 33, 179-85.
- Parma, A. E., Cerone, S. I., Sansinanea, S. A. und Ghezzi, M. (1992b): C3 fixed in vivo to cornea from horses inoculated with *Leptospira interrogans*. *Vet Immunol Immunopathol* 34, 181-7.
- Petersen, S. V., Valnickova, Z. und Enghild, J. J. (2003): Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. *Biochem J* 374, 199-206.
- Pfeffer, B. A., Becerra, S. P., Borst, D. E. und Wong, P. (2004): Expression of transthyretin and retinol binding protein mRNAs and secretion of transthyretin by cultured monkey retinal pigment epithelium. *Mol Vis* 10, 23-30.
- Powell, A. M. und Black, M. M. (2001): Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol* 26, 427-33.
- Prendergast, R. A., Iliff, C. E., Coskuncan, N. M., Caspi, R. R., Sartani, G., Tarrant, T. K., Lutty, G. A. und McLeod, D. S. (1998): T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 754-62.
- Rebhun, W. C. (1979): Diagnosis and treatment of equine uveitis. *J Am Vet Med Assoc* 175, 803-8.

- Rebhun, W. C. (1999): Immune-Mediated Uveitis. In: P. T. Colahan, I. G. Mayhen, A. M. Merrit und J. N. Moore, Eds., *Equine Medicine and Surgery*, pp. 1255-1258. Mosby Verlag.
- Rehm, H. (2002): *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 4. Spektrum, Akad. Verl.
- Romeike, A., Brugmann, M. und Drommer, W. (1998): Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol* **35**, 515-26.
- Rose, N. R. und Bona, C. (1993): Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* **14**, 426-30.
- Satoh, T. und Hosokawa, M. (1998): The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 257-88.
- Satoh, T., Hemmerlein, B., Zschunke, F. und Radzun, H. J. (1999): In situ detection of human monocyte/macrophage serine esterase-1 mRNA expression in human tissues. *Pathobiology* **67**, 158-62.
- Schwerk, C., Prasad, J., Degenhardt, K., Erdjument-Bromage, H., White, E., Tempst, P., Kidd, V. J., Manley, J. L., Lahti, J. M. und Reinberg, D. (2003): ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Mol Cell Biol* **23**, 2981-90.
- Schwink, K. L. (1992): Equine uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* **8**, 557-74.
- Seto, E. S. und Bellen, H. J. (2004): The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol* **14**, 45-53.
- Sillerud, C. L., Bey, R. F., Ball, M. und Bistner, S. I. (1987): Serologic correlation of suspected *Leptospira interrogans* serovar pomona-induced uveitis in a group of horses. *J Am Vet Med Assoc* **191**, 1576-8.
- Sohn, J. H., Kaplan, H. J., Suk, H. J., Bora, P. S. und Bora, N. S. (2000): Chronic low level complement activation within the eye is controlled by intraocular complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 3492-502.
- Sorci-Thomas, M. G. und Thomas, M. J. (2002): The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 121-8.
- Spiess, B. M. (1997): Zur equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **139**, 126-133.
- Streilein, J. W., Ohta, K., Mo, J. S. und Taylor, A. W. (2002): Ocular immune privilege and the impact of intraocular inflammation. *DNA Cell Biol* **21**, 453-9.
- Tanaka, T., Urade, Y., Kimura, H., Eguchi, N., Nishikawa, A. und Hayaishi, O. (1997): Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J Biol Chem* **272**, 15789-95.
- Terrada, C., Fisson, S., De Kozak, Y., Kaddouri, M., Lehoang, P., Klatzmann, D., Salomon, B. L. und Bodaghi, B. (2006): Regulatory T cells control uveoretinitis induced by pathogenic Th1 cells reacting to a specific retinal neoantigen. *J Immunol* **176**, 7171-9.
- Tombran-Tink, J., Shivaram, S. M., Chader, G. J., Johnson, L. V. und Bok, D. (1995): Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* **15**, 4992-5003.
- Tombran-Tink, J., Mazuruk, K., Rodriguez, I. R., Chung, D., Linker, T., Englander, E. und Chader, G. J. (1996): Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* **2**, 11.
- Tuohy, V. K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J. A., Johnson, J. M., Mathisen, P. M., Weinstock-Guttman, B. und Kinkel, R. P. (1998): The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* **164**, 93-100.

- Tyers, M. und Mann, M. (2003): From genomics to proteomics. *Nature* 422, 193-7.
- Uphoff, C. C. und Drexler, H. G. (2000): Biology of monocyte-specific esterase. *Leuk Lymphoma* 39, 257-70.
- Urade, Y., Fujimoto, N. und Hayaishi, O. (1985): Purification and characterization of rat brain prostaglandin D synthetase. *J Biol Chem* 260, 12410-5.
- Urade, Y., Fujimoto, N., Kaneko, T., Konishi, A., Mizuno, N. und Hayaishi, O. (1987): Postnatal changes in the localization of prostaglandin D synthetase from neurons to oligodendrocytes in the rat brain. *J Biol Chem* 262, 15132-6.
- Urade, Y., Kitahama, K., Ohishi, H., Kaneko, T., Mizuno, N. und Hayaishi, O. (1993): Dominant expression of mRNA for prostaglandin D synthase in leptomeninges, choroid plexus, and oligodendrocytes of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9070-4.
- Vanderlugt, C. J. und Miller, S. D. (1996): Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 8, 831-6.
- Veenstra, T. D., Conrads, T. P., Hood, B. L., Avellino, A. M., Ellenbogen, R. G. und Morrison, R. S. (2005): Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics* 4, 409-18.
- Verma, A., Artiushin, S., Matsunaga, J., Haake, D. A. und Timoney, J. F. (2005): LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. *Infect Immun* 73, 7259-66.
- Wacker, W. B. und Lipton, M. M. (1965): Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* 206, 253-4.
- Wagner, B., Brandt, K., Sheoran, A., Holmes, M. A., Deegen, E. und Leibold, W. (1997): Nachweis von Immunglobulinisotypen im Glaskörper als Beitrag zur Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 104, 467-470.
- Watanabe, K., Urade, Y., Mader, M., Murphy, C. und Hayaishi, O. (1994): Identification of beta-trace as prostaglandin D synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 203, 1110-6.
- Werry, H. und Gerhards, H. (1992): [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax* 20, 178-86.
- West, K. A., Yan, L., Shadrach, K., Sun, J., Hasan, A., Miyagi, M., Crabb, J. S., Hollyfield, J. G., Marmorstein, A. D. und Crabb, J. W. (2003): Protein database, human retinal pigment epithelium. *Mol Cell Proteomics* 2, 37-49.
- Whaley, K. (1980): Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med* 151, 501-16.
- Wiechens, B., Reichelt, J. A., Urvat, C. und Nolle, B. (2003): [Pars plana vitrectomy in cystoid macular edema of different forms of chronic uveitis]. *Ophthalmologie* 100, 33-43.
- Williams, R. D., Morter, R. L., Freeman, M. J. und Lavignette, A. M. (1971): Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis. *Invest Ophthalmol* 10, 948-54.
- Winterberg, A. (1997): Langzeitergebnisse der Pars-plana-Vitrektomie bei equiner rezidivierender Uveitis. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Wissdorf, H., Gerhards, H., Huskamp, B. und Deegen, E. (2002): Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes, pp. 147-148. Schaper.
- Wittmann-Liebold, B., Graack, H. R. und Pohl, T. (2006): Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics* 6, 4688-4703.
- Wollanke, B., Gerhards, H., Brem, S., Kopp, H. und Meyer, P. (1998): [Intraocular and serum antibody titers to *Leptospira* in 150 horses with equine recurrent uveitis (ERU) subjected

- to vitrectomy]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 111, 134-9.
- Wollanke, B., Rohrbach, B. W. und Gerhards, H. (2001): Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis. *J Am Vet Med Assoc* 219, 795-800.
- Wollanke, B., Gerhards, H., Brem, S., Meyer, P. und Kopp, H. (2004): Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Autoimmunkrankheit oder intraokulare Leptospireninfektion? *Pferdeheilkunde* 20, 327-340.
- Wu, C. W., Sauter, J. L., Johnson, P. K., Chen, C. D. und Olsen, T. W. (2004): Identification and localization of major soluble vitreous proteins in human ocular tissue. *Am J Ophthalmol* 137, 655-61.
- Wu, G. S., Zhang, J. und Rao, N. A. (1997): Peroxynitrite and oxidative damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1333-9.
- Wucherpfennig, K. W. (2001): Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 108, 1097-104.
- Yamane, K., Minamoto, A., Yamashita, H., Takamura, H., Miyamoto-Myoken, Y., Yoshizato, K., Nabetani, T., Tsugita, A. und Mishima, H. K. (2003): Proteome analysis of human vitreous proteins. *Mol Cell Proteomics* 2, 1177-87.
- Yanagisawa, K., Shyr, Y., Xu, B. J., Massion, P. P., Larsen, P. H., White, B. C., Roberts, J. R., Edgerton, M., Gonzalez, A., Nadaf, S., Moore, J. H., Caprioli, R. M. und Carbone, D. P. (2003): Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 362, 433-9.
- Yoshida, Y., Yamagishi, S. I., Matsui, T., Nakamura, K., Imaizumi, T., Yoshimura, K. und Yamakawa, R. (2006): Elevated levels of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol*.
- Yu, J., He, S., Friedman, J. S., Akimoto, M., Ghosh, D., Mears, A. J., Hicks, D. und Swaroop, A. (2004): Altered expression of genes of the Bmp/Smad and Wnt/calcium signaling pathways in the cone-only *Nrl*<sup>-/-</sup> mouse retina, revealed by gene profiling using custom cDNA microarrays. *J Biol Chem* 279, 42211-20.
- Zhang, S. X., Wang, J. J., Gao, G., Parke, K. und Ma, J. X. (2006a): Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 37, 1-12.
- Zhang, S. X., Wang, J. J., Gao, G., Shao, C., Mott, R. und Ma, J. X. (2006b): Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *Faseb J* 20, 323-5.
- Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Reinberg, D. (1997): Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89, 357-64.



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger danke ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. C. Deeg für die Überlassung des Themas und die erstklassige fachliche Betreuung bedanken. Aufgrund ihrer optimistischen und motivierenden Art, der jederzeitigen Diskussionsbereitschaft und einer immerwährenden zuverlässigen Unterstützung hat die Anfertigung dieser Arbeit sehr viel Spaß gemacht.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. S. Hauck vom Institut für Humangenetik der GSF Neuherberg für ihre konstruktiven Anregungen und die jederzeit freundlich gewährte Hilfe bei proteomischen Fragestellungen.

Frau Stefanie Schöffmann, vom Institut für Humangenetik der GSF Neuherberg, danke ich für die Einarbeitung in proteomische Arbeitstechniken sowie für ihre große Hilfsbereitschaft bei den massenspektrometrischen Untersuchungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau B. Amann für Ihre freundschaftliche und großzügige Hilfe im Labor. Ihre Tipps und ihre konstruktive Kritik waren mir in manchen Situationen eine große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. H. Gerhards danke ich für die zur Verfügungstellung der Glaskörperproben, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der Klinik für Pferde der LMU München für die Unterstützung beim Sammeln der Proben.

Herrn Dr. Marius Ueffing danke ich für den an der GSF zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und für das Ermöglichen der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Bei meinen Kollegen Herrn Dr. Albert Raith, Frau Christina Buse und Frau Johanna Zipplies möchte ich mich für die stetige gegenseitige Hilfsbereitschaft und die hervorragende Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich während des Studiums und der anschließenden Durchführung dieser Arbeit immer unterstützt hat.