

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Priv.-Doz. Dr. C.A. Deeg

# Identifikation differenziell exprimierter Proteine in peripheren Blut-Leukozyten von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis

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

von  
Roxane Leelanee Kramer  
aus  
Munstergeleen

München 2010

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. C.A. Deeg
Koreferenten:	Univ.-Prof. Dr. Matis Univ.-Prof. Dr. Potschka Univ.-Prof. Dr. Hirschberger Univ.-Prof. Dr. Dr. Erhard

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Für Rolf.

---

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>10</b>
<b>2 LITERATUR</b> .....	<b>12</b>
2.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis .....	12
2.2 Ätiologie und Pathogenese von equiner rezidivierender Uveitis.....	13
2.3 Immunhistopathologie.....	21
2.4 Vergleichende Proteomanalyse: Zweidimensionale Gelelektrophorese und die 2D-DIGE Technik .....	22
2.5 Identifikation potenzieller Biomarkerkandidaten bei der ERU mittels 2-DE und 2D-DIGE .....	23
2.6 Leukozyten in autoimmun-medierten Erkrankungen .....	25
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>28</b>
3.1.1 Puffer und Lösungen zur Lymphozytenpräparation.....	28
3.1.2 Puffer und Lösungen für die Proteinbestimmung .....	29
3.1.3 Puffer und Lösungen für die 1D und 2D Gelelektrophorese .....	29
3.1.4 Puffer und Lösungen für die Difference Gel Electrophoresis (DIGE) .....	31
3.1.5 Puffer und Lösungen für Western Blot .....	32
3.1.6 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie.....	34
3.1.7 Lösungen für die Zellstimulierung.....	34
3.1.8 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie .....	34
3.1.9 Färbelösungen.....	35
<b>3.2 Probenmaterial</b> .....	<b>35</b>
3.2.1 Gewinnung von peripheren Blut-Leukozyten (PBL) .....	36
3.2.2 Zählen und Differenzieren der gewonnenen Zellen.....	37
3.2.3 Aufbereitung der PBL Pellets.....	37
<b>3.3 Bestimmen der Proteinkonzentration der Zelllysate</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</b> .....	<b>39</b>
3.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese .....	39
3.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	41
3.4.3 Silberfärbung.....	45
3.4.4 Kolloidale Coomassie Färbung nach Kang et al.....	46
3.4.5 Aufbewahrung der gefärbten Gele.....	46

<b>3.5 2D-DIGE</b> .....	<b>46</b>
3.5.1 Vorbereitung der Proben für die Markierung mit den CyDyes.....	49
3.5.2 Herstellung des internen Standards .....	49
3.5.3 Fluoreszenzmarkieren der Proben .....	50
3.5.4 2D-DIGE-Experiment 1: Markierung der lymphozytären Proben mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen .....	50
3.5.5 2D-DIGE-Experiment 2: Markierung der gemischt granulo- und lymphozytären Proben mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen .....	51
3.5.6 Scannen der Gele .....	51
3.5.7 Statistische Auswertung der Fluoreszenzgele mittels DeCyder 6.5 Software .....	52
<b>3.6 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen</b> .....	<b>54</b>
3.6.1 Entfärben und Verdauen der Proteinspots .....	54
3.6.2 Massenanalyse .....	55
<b>3.7 Densitometrische Bildanalyse der eindimensionalen Immunoblots</b> .....	<b>59</b>
<b>3.8 Durchflusszytometrie</b> .....	<b>59</b>
3.8.1 Vorbereiten der Antikörper.....	60
3.8.2 Markieren der Zellen für die Durchflusszytometrie .....	60
3.8.3 Detektieren der Zellen mit dem FACSCalibur System .....	61
3.8.4 Auswertung der Durchflusszytometrie.....	62
<b>3.9 Zellproliferationsassay</b> .....	<b>62</b>
<b>3.10 Immunhistochemische Untersuchungen</b> .....	<b>64</b>
3.10.1 Paraffinschnittherstellung .....	64
3.10.2 Immunhistochemische Färbung.....	65
<b>3.11 Statistische Auswertung</b> .....	<b>67</b>
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>68</b>
<b>4.1 Erstellen einer Proteinlandkarte aus equinen peripheren Blut-Lymphozyten</b> .....	<b>68</b>
<b>4.2 Ermittlung differenziell exprimierter Proteine im Lymphozytenproteom von an ERU         erkrankten Pferden im Vergleich zu augengesunden Kontrollen mit Hilfe der 2D-DIGE         Methode (2D-DIGE-Experiment 1)</b> .....	<b>83</b>
4.2.1 Vergleichende Darstellung des equinen Lymphozytenproteoms in der Fluoreszenzansicht.....	83
4.2.2 Identifikation differenziell exprimierter Lymphozytenproteine bei an ERU erkrankten Pferden .....	86
4.2.3 Neun bei ERU differenziell exprimierte Proteine im Lymphozytenproteom.....	87
4.2.4 Reduzierte Septin 7-Expression in PBL von an ERU erkrankten Pferden .....	91

4.2.5 Phänotypisieren von Septin 7-positiven Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie .....	93
4.2.6 Expression von Septin 7 in bei ERU gebildeten Lymphfollikeln im Auge.....	95
4.2.7 Hemmung der polyklonalen Lymphozytenstimulation im Proliferationsassay mit anti-Septin 7-Antikörper .....	99
<b>4.3 Beschreibung differenzieller Proteinexpressionsmuster gemischt granulo- und lymphozytärer ERU-Proben im Vergleich zu augengesunden Pferden mittels 2D-DIGE Technologie (DIGE-Experiment 2) .....</b>	<b>100</b>
4.3.1 Darstellung des Expressionsmusters von Granulozytenproteinen und Lymphozytenproteinen in der Fluoreszenzansicht.....	100
4.3.2 Identifikation von 20 differenziell exprimierten Proteinen im gemischt lympho- und granulozytären PBL-Proteom von an ERU erkrankten Pferden .....	103
4.3.3 Verminderte Expression von Talin 1 im Granulozyten- und Lymphozytenproteom von an ERU erkrankten Pferden.....	111
4.3.4 Phänotypisierung der Talin 1-positiven Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie .....	112
4.3.5 Expression von Talin 1 im Gewebe .....	114
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>119</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>144</b>
<b>7 SUMMARY .....</b>	<b>146</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>148</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
3D	Dreidimensional
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
BVA	engl.: Biological Variation Analysis; Analyse der biologischen Varianz
°C	Grad Celsius
CD	engl.: Cluster of differentiation; Erkennungsmolekül an der Oberfläche von Zellen
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CID	engl.: Collision induced dissociation; Kollisionsinduzierte Dissoziation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
CPM	Counts per minute
CRALBP	engl.: Cellular retinaldehyde binding protein; zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
Cu	Kupfer
Cy2	3-(4-Carboxymethyl)phenylmethyl-3'-ethyloxycarbocyanine halide <i>N</i> -hydroxysuccinimidyl ester
Cy3	1-(5-Carboxypentyl)-1'-propylindocarbocyanine halide <i>N</i> - hydroxysuccinimidyl ester

## Abkürzungsverzeichnis

---

Cy5	1-(5-Carboxypentyl)-1'-methylindodicarbocyanine halide <i>N</i> -hydroxysuccinimidyl ester
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIA	engl.: Differential In-gel Analysis; differenzielle in-Gel-Analyse
DIGE	Difference-gel-electrophoresis
DMF	N,N Dimethyl Formamide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
dpi	engl.: Dots per inch; Bildpunkte pro Zoll
DTT	Dithiotreitol
EAE	Experimentelle Autoimmunencephalomyelitis
EAU	Experimentelle Autoimmunuveitis
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
FA	engl: Formic acid; Ameisensäure
FACS	engl.: Fluorescence activated cell sorting; Durchflusszytometrie
FCS	engl.: Fetal Calf Serum; Fetales Kälberserum
FL1	Fluoreszenzkanal 1
FL2	Fluoreszenzkanal 2
FLC	engl.: Forward Scatter; Vorwärtsstreulicht
FWHM	engl.: Full width at half maximum; Halbwertsbreite
g	Gramm
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
h	engl: hour; Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
hnRNP	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein

## Abkürzungsverzeichnis

---

ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN $\gamma$	Interferon gamma
iC3b	Spaltprodukt des Komplementfaktors C3
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IRBP	engl.: Interphotoreceptor retinoid-binding protein; Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
lat.	Latein
LC	engl.: Liquid chromatography; Flüssigchromatografie
LFA-1	engl.: Lymphocyte function-associated antigen 1; Lymphozyten Funktions-assoziiertes Antigen 1
LL	engl.: Lower left; unten links
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Ln	lat.: Lymphonodus; Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
LR	engl.: Lower right; unten rechts
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampère
MAC 1	Makrophagen Antigen 1
MALDI	engl.: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation; Matrix unterstützte Laserdesorption/Ionisation
MBq	Megabecquerel
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHC II	engl.: Major histocompatibility complex-II; Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II
min	Minute
ml	Milliliter

## Abkürzungsverzeichnis

---

mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	engl.: Messenger RNA; Boten-RNA
MS	Multiple Sklerose
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
NL	Nicht linear
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NOD	Non-obese diabetic
p	Signifikanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blut-Leukozyten
PBS	engl.: Phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCBP	Poly (rC) bindendes Protein
PDCD6IP	Programmed cell death 6-interagierendes Protein
PDIA	Protein Disulfid Isomerase
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
Pen/Strep	Antibiotikum: Penicillin/Streptomycin
PHA	Phytohämagglutinin
pI	Isoelektrischer Punkt
PBML	engl.: Peripheral blood-mononuclear cells; periphere mononukleäre Blutzellen
pmol	Picomol
PMT	Photomultiplier Tube

## Abkürzungsverzeichnis

---

POD	Peroxidase
PTM	Posttranslationale Modifikation
PTPN6	Tyrosin-Protein Phosphatase non-Rezeptor Typ 6
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PWM	Pokeweed Mitogen
RA	Rheumatoide Arthritis
rcf	engl.: Relative centrifugal force; relative Zentrifugalkraft
RNA	engl.: Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAFB	Scaffold Attachment Faktor B
S-Ag	S-Antigen
SAM	engl.: Senescence-Accelerated-Mice; Mäuse mit einem beschleunigten Alterungsprozess
SDS	Sodiumdodecylsulfat
si-RNA	engl.: small interfering RNA; aus wenigen Nukleotiden bestehendes RNA-Stück resultierend aus der Zerschneidung doppelsträngiger RNA
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SSC	engl.: Sideward Scatter; Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCR	engl: T cell receptor; T-Zell Rezeptor
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethyldiamin
TFA	engl: trifluoroacetic acid; Trifluoressigsäure
Th1	T-Helfer 1
Th2	T-Helfer 2
TNF	Tumornekrose-Faktor
TOF	Time of flight
TPI	Triosephosphat Isomerase
UL	engl.: upper left; oben links
UR	engl.: upper right; oben rechts
V	Volt

## Abkürzungsverzeichnis

---

VDAC	Voltage-dependent anion-selective channel Protein
VEGF	engl.: Vascular endothelial growth factor; vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vh	Voltstunden
W	Watt
WB	Western Blot
Zn	Zink

## 1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine spontan auftretende, autoimmun-medierte Erkrankung, die ungefähr 10% der Pferdepopulation betrifft und die häufigste Ursache von Erblindung bei Pferden darstellt (Deeg et al., 2008; Gilger et al., 1999; Romeike et al., 1998; Schwink, 1992). Zudem ist sie das einzige spontane Modell für die Autoimmunuveitis des Menschen (Deeg et al., 2002b).

Aus noch ungeklärten Gründen werden kurz vor Ausbruch einer Autoimmunuveitis Effektorzellen in der Peripherie sensibilisiert und können so, im aktivierten Zustand, die Blut-Retina-Schranke überwinden (Caspi, 2006). Diese Barriere schützt das Auge physiologischerweise vor einer Zellinfiltration (Schwink, 1992). Im Falle der ERU folgen periodisch-rezidivierende, schmerzhaft entzündungsschübe, die mit Retinitis, Vitreitis, Retinadegeneration, Netzhautablösung und schließlich Erblindung des betroffenen Auges einhergehen (Deeg et al., 2002a; Romeike et al., 1998). Ein Grund für das Passieren der Blut-Retina-Schranke durch aktivierte Lymphozyten können die mit der Aktivierung einhergehenden Änderungen in ihrer Proteinexpression sein (Deeg et al., 2006b). Die zweidimensionale Difference-gel-Electrophoresis (2D-DIGE) ist eine wertvolle Technik, die es ermöglicht, einen Einblick in diese Proteinexpressionsänderungen zu gewinnen (Timms and Cramer, 2008; Gorg et al., 2004).

Bislang gibt es zu T-Zell mediierten Autoimmunerkrankungen, wie die ERU eine ist, nur sehr wenige Studien, die das Leukozytenproteom differenziell beschreiben. Bei der T-Zell vermittelten, rheumatoiden Arthritis konnten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2-DE) bereits differenziell exprimierte Leukozytenproteine identifiziert werden (Schulz et al., 2007; Dotzlaw et al., 2004), hingegen sind Unterschiede im Leukozytenproteom bei Multipler Sklerose, einer ebenfalls T-Zell mediierten Autoimmunerkrankung, derzeit noch nicht charakterisiert (Hohlfeld et al., 2008).

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass Autoimmunuveitiden Th1-Zell-medierte Erkrankungen sind, jedoch wurden neuerdings im Mausmodell der experimentellen Autoimmunuveitis (EAU) auch Th17-Zellen mit der Pathogenese dieser und auch anderer Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Luger and Caspi, 2008; Tang et al., 2007; Caspi et al., 1996). Im Zusammenhang mit EAU

sowie der spontanen, periodisch auftretenden Autoimmunuveitis beim Pferd konnten bislang proteomisch wichtige Erkenntnisse über die Zielgewebe Retina (Hauck et al., 2007) und Glaskörper (Deeg et al., 2007a), sowie über das Serum (Zipplies et al., 2009a; Zipplies et al., 2009b) gewonnen werden, jedoch bleiben auch hier die Effektorzellen der Erkrankung auf Proteinebene bisher unbeschrieben.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, mittels vergleichender Proteomanalyse Unterschiede im Proteinexpressionsmuster von Leukozyten von gesunden und an ERU erkrankten Pferden zu detektieren und zu identifizieren, um somit bessere Einblicke in die Pathogenese der ERU zu gewinnen.

## 2 LITERATUR

### 2.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis

Uveitis bezeichnet eine Entzündung der mittleren Augenhaut, der Uvea, die sich aus Iris, Ziliarkörper und Choroidea zusammensetzt (Gilger and Michau, 2004). Diese kann lokal bedingt, zum Beispiel durch Traumata am Auge, systemisch bedingt, beispielsweise durch eine Bakteriämie oder Virämie, oder immun-mediert sein (Gilger and Michau, 2004; Schwink, 1992).

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine immun-medierte Panuveitis mit vorwiegender Inflammation von Retina, Glaskörper und Choroidea und betrifft Pferde jeden Alters, vorzugsweise jedoch jene zwischen 4 und 6 Jahren (Gilger and Michau, 2004). Das klinische Erscheinungsbild der equinen rezidivierenden Uveitis zeigt sich in einer Kombination aus Symptomen wie Blepharospasmus, Lichtscheue, vermehrter Lakrimation, Miosis, geröteter Konjunktivalschleimhaut, Korneaödem, Synechien von Iris und Linse, Katarakt, Trübungen im Glaskörper und Hypotension des Augapfels (Gilger and Michau, 2004; Schwink, 1992; Rebhun, 1979). Nicht jede Augenentzündung beim Pferd ist automatisch eine equine rezidivierende Uveitis (Gilger and Michau, 2004). Die Diagnose ERU lässt sich nur dann stellen, wenn die charakteristischen klinischen Signale mit periodisch auftretenden Entzündungsschüben einhergehen (Gilger and Michau, 2004).

Die ERU betrifft weltweit mindestens 10% der Pferdepopulation (Gilger et al., 1999; Schwink, 1992) und ist die häufigste Ursache von Erblindung bei adulten Pferden (Romeike et al., 1998). Ein von ERU betroffenes Auge wird, aufgrund der mit jedem periodischen Entzündungsschub häufig zunehmenden Schwere der Uveitis, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit blind (Schwink, 1992). Sind beide Augen aufgrund des Krankheitsverlaufes erblindet, führt dies zu erheblichen Einschränkungen, Schmerzen und Leiden für das als Fluchttier auf sein Sehvermögen angewiesene Pferd. Aus ethischen Gründen und aufgrund der Gefahr, die sie für ihre Umwelt bilden, müssen solche Tiere euthanasiert werden, auch wenn sie, abgesehen von dem Verlust ihrer Sehfähigkeit, in einer sehr guten körperlichen Verfassung sind. Daher ist die ERU eine Erkrankung, bei der langfristig eine kausale Therapie oder, noch besser, eine frühzeitige Erkennung entsprechend gefährdeter Tiere

wünschenswert wäre. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen zunächst weitere Erkenntnisse zur Ätiologie und Pathogenese der ERU gewonnen werden.

Aufgrund großer klinischer und immunopathologischer Ähnlichkeiten zu humaner autoimmuner Uveitis und vergleichbarer Immunreaktionen auf die retinalen Autoantigene S-Antigen (LeHoang et al., 2008; Wildner et al., 2008; Deeg et al., 2004; de Smet et al., 1993), IRBP (Deeg et al., 2002b) und CRALBP (Deeg et al., 2007c) in beiden Erkrankungen, stellt die ERU außerdem das einzige spontane Tiermodell für die periodische Uveitis des Menschen dar (Deeg et al., 2008; Hauck et al., 2007). Durch die unproblematischere Verfügbarkeit des equinen Probenmaterials, insbesondere frischer Gewebeproben aus erkrankten Augen, ist das Pferdmodell der autoimmunen rezidivierenden Uveitis somit sehr hilfreich, die humane Uveitis besser zu erforschen und zu verstehen (Deeg et al., 2002a).

Ein wichtiges Ziel dabei ist die Identifikation differenziell exprimierter Leukozytenproteine als mögliche krankheitsvorhersagende Biomarker zur frühen Diagnose und therapeutischen Intervention bei Autoimmunerkrankungen (Elkon and Casali, 2008), sowie zur Schaffung eines grundlegenden Verständnisses der Fehlregulation des Immunsystems bei diesen Erkrankungen.

## **2.2 Ätiologie und Pathogenese von equiner rezidivierender Uveitis**

Die Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis ist noch weitgehend ungeklärt. Die initiierenden Faktoren können bakterielle (*Leptospira interrogans*, *Streptococcus equi*) oder virale (equines Herpesvirus, Influenzavirus) Infektionen, sowie stumpfe oder penetrierende Traumata am Auge sein (Schwink, 1992). Auch Neoplasien, die zu einer systemischen Veränderung der Immunantwort führen, sind möglicherweise eine Ursache für ERU (Fruhauf et al., 1998; Schwink, 1992).

Die Pathogenese der ERU ist immun-mediert (Deeg et al., 2001; Fruhauf et al., 1998; Romeike et al., 1998). Dies zeigt sich durch den rezidivierenden und inflammatorischen Charakter der Erkrankung, sowie die Infiltration von Lymphozyten in die betroffenen Augenstrukturen (Romeike et al., 1998). Die vorliegende zellmedierte Immunität gegen uveale, also körpereigene, Antigene weist zudem auf einen autoimmunen Prozess, genauer eine T-Zell medierte Autoimmunantwort im uveitischen Auge hin (Deeg et al., 2006a; Deeg et al., 2001; Gilger et al., 1999). Unterstützt wird dies durch die auftretenden Immunreaktionen gegen die Retina-

spezifischen, Uveitis induzierenden Autoantigene Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein (IRBP), S-Antigen (S-Ag) (Deeg et al., 2001) und das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (cellular retinaldehyde-binding protein, CRALBP) (Deeg et al., 2006b) sowie den positiven Effekt von Kortikosteroiden und einen unzureichenden Therapieerfolg bei der Gabe von Antibiotika (Schwink, 1992).

### **2.2.1 Die Effektorzelle bei Uveitis: Th1 oder Th17?**

Ursprünglich wurde angenommen, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sich nach Sensibilisierung in eine der zwei Effektorzelltypen Th1 und Th2 differenzieren und dass Th1-Zellen bei der Infiltration des Auges während einer Autoimmunuveitis die Hauptrolle spielen (Caspi et al., 1996). Mit der Ausweitung des CD4-Effektorzellrepertoires auf Th17-Zellen (Harrington et al., 2006) und die Feststellung einer Beteiligung dieser Zellen an der autoimmunen Uveitis im Mausmodell (Amadi-Obi et al., 2007; Luger and Caspi, 2008; Tang et al., 2007), sowie dem Nachweis einer erhöhten Th17-Zellpopulation in humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von an Uveitis und Skleritis erkrankten Menschen (Amadi-Obi et al., 2007), wird die Pathogenität von Th1-Lymphozyten und ihre Alleinherrschaft bei der Infiltration von uveitischen Augen in Frage gestellt (Luger and Caspi, 2008). Experimentell konnte festgestellt werden, dass sowohl Th1-Zellen, als auch Th17-Zellen unabhängig voneinander Uveitis mit starken retinalen Veränderungen hervorrufen können (Luger and Caspi, 2008) und dass beide Effektor-T-Zelltypen in der Retina von Mäusen mit experimentell induzierter Autoimmunuveitis (EAU) vorhanden sind (Amadi-Obi et al., 2007). Noch nicht geklärt ist in dieser Hinsicht, ob und welcher der beiden T-Zell Effektortypen hierbei der dominierende Zelltyp ist (Luger et al., 2008). Um die Kaskade der experimentellen Autoimmunuveitis in der Maus und in der Ratte zu initiieren, reichen jedoch schon 15 aktivierte, antigenspezifische T-Zellen aus (Caspi, 2006).

Es liegen Erkenntnisse vor, dass Th1-Zellen und Th17-Zellen in der Retina von mit IRBP-induzierten EAU Mausmodellen zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich abundant vorkommen (Amadi-Obi et al., 2007). So sollen in diesen Mausmodellen auf B10.RIII- oder C57BL/6-Hintergrund, im frühen Stadium der Erkrankung vermehrt Th17-Zellen in der Retina akkumuliert sein, während im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf die infiltrierenden Zellen überwiegend den Th1-Phänotyp aufweisen. Diese Tatsache deutet auf eine Korrelation zwischen Th17 und der

Pathogenität in der EAU sowie zwischen Th1 und der Rekonvaleszenz der EAU hin. Daraus könnte geschlossen werden, dass Th1-Zellen paradoxerweise keine initiiierende, sondern eine protektive Funktion gegen chronische Uveitis haben (Amadi-Obi et al., 2007). Andere Studien besagen, die Gegebenheit einer Th1 oder Th17 Effektorantwort sei abhängig von der Art des genutzten EAU Modells (Caspi, 2008). Beim klassischen experimentellen Autoimmunuveitis Modell, welches durch Immunisierung der Mäuse mit IRBP in komplettem Freund's Adjuvans (FCA) oder durch adoptiven Transfer von sensibilisierten Lymphozyten induziert wird, kommt es sowohl zu einer Th1, als auch zu einer Th17 Effektorantwort. Jedoch können Th17-Zellen in IFN $\gamma$  knock-out Mäusen unabhängig von Th1 eine EAU auslösen (Caspi, 2008). Dies bekräftigt, dass Th17-Zellen die dominanten Effektoren in diesem Modell sind. Das alternative Modell, in dem eine EAU durch die Übertragung von mit Antigen stimulierten, dendritischen Zellen ausgelöst wird, zeigt eine gesteigerte IFN $\gamma$ - und reduzierte IL17-Produktion, was auf eine eher Th1 getriebene Immunantwort hindeutet (Caspi, 2008; Caspi et al., 2008). In letzterem Modell kommt es zu einer eher granulozytären Zellinfiltration ins uveitische Auge (Caspi, 2008), ein Phänomen, welches bereits bei spontan auftretender ERU beobachtet werden konnte (Deeg et al., 2001). In dieser Studie zeigten Deeg und Mitarbeiter, dass im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden die infiltrierenden Zellen überwiegend Lymphozyten sind, jedoch in einigen Fällen auch nahezu rein granulozytäre Zellinfiltrate vorliegen (Deeg et al., 2001).

### **2.2.2 Autoantikörper in EAU und ERU**

Die Netzhaut-spezifischen Antigene retinal soluble Antigen (S-Antigen), Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein (IRBP), Rhodopsin und Recoverin wirken uveitogen im Nagermodell (Gery and Streilein, 1994). S-Antigen und IRBP, die am besten charakterisierten Uveitogene, sind Komponenten der Photorezeptorzellen der Retina, ein Zelltyp, der bei der experimentell induzierten Autoimmunuveitis (EAU) im Nagermodell als erstes angegriffen und zerstört wird (Caspi et al., 1988). IRBP ist am Transport von Vitamin A-Derivaten zwischen den Photorezeptorzellen und dem retinalen Pigmentepithel beteiligt (Jin et al., 2009; Lai et al., 1982) und S-Antigen soll eine Wirkung in der Licht-Signal-Transduktion haben (Pfister et al., 1985). Eine experimentelle Autoimmunuveitis konnte durch diese beiden Autoantigene in mehreren Spezies erfolgreich induziert werden (Caspi et al.,

1988), dabei erfolgt die Auslösung der EAU in Ratten, Mäusen und Primaten durch beide Autoantigene gleichermaßen, in Kaninchen und Meerschweinchen nur durch IRBP (Caspi et al., 1988; Hirose et al., 1986; Faure, 1980). Neuere Untersuchungen ergaben hier, dass die EAU in Mäusen zwar durch S-Antigen und IRBP induziert werden kann, in diesem Modell IRBP jedoch bedeutend stärker uveitogen wirkt als S-Antigen (Caspi, 2003) und eine Induktion von Autoimmunuveitis durch S-Antigen nur in wenigen Mäusestämmen möglich ist (Caspi et al., 2008).

Die experimentelle autoimmune Uveitis in der Lewis Ratte kann, wie oben erwähnt, durch die Injektion von S-Antigen oder IRBP induziert werden und zeigt typischerweise einen akuten, monophasischen und kurzen Krankheitsverlauf (Caspi, 2003). Im Mausmodell hingegen ist die Induktion von EAU eher IRBP-abhängig und kann hier eine akut bis chronisch rezidivierende Uveitis mit spontanen, nicht beeinflussbaren Rezidiven auslösen (Caspi, 2003).

Im Pferd kann eine experimentell induzierte Uveitis ebenfalls primär durch IRBP ausgelöst werden und führt, ähnlich der spontan auftretenden equinen rezidivierenden Uveitis, zu einem rezidivierenden Krankheitsverlauf, bei dem Schübe gezielt re-induziert werden können (Deeg et al., 2002b; Deeg et al., 2001). S-Antigen hingegen hat ein weitaus geringeres uveitogenes Potenzial, hier konnte in einer Studie nur bei einem von fünf Pferden mittels Injektion von S-Antigen eine Uveitis ausgelöst werden (Deeg et al., 2004). Zudem war diese von außergewöhnlicher Stärke und trat monophasisch auf, was dem typischen Charakter der periodisch rezidivierend auftretenden ERU widerspricht (Deeg et al., 2004).

Neuere Untersuchungen haben zur Entdeckung eines weiteren Uveitogens, dem zellulären Retinaldehyd-bindenden Protein (cellular retinaldehyde-binding protein, CRALBP), geführt, welches im Pferd und in der Lewis Ratte Uveitis induzieren kann (Deeg et al., 2006b). CRALBP wird unter anderem in Zellen des retinalen Pigmentepithels, sowie in Müller-Glia-Zellen exprimiert und ist ein Schlüsselement im Zyklus des Sehvorgangs, indem es sich wesentlich an der Regeneration von 11-*cis*-Retinal beteiligt (Saari and Crabb, 2005). Die mittels CRALBP bei Pferden induzierte Uveitis beschränkt sich, im Gegensatz zu der S-Antigen- oder IRBP-induzierten Uveitis, auf den hinteren Teil des Auges, geht mit weniger klinischen Anzeichen von Schmerzen einher und kann, wie auch die durch Injektion von IRBP ausgelöste equine Uveitis, re-induziert werden (Deeg et al., 2006b). Diese Re-Induktion von Entzündungsschüben bei der Uveitis im Pferd mittels IRBP und

CRALBP ist für eine rezidivierende Autoimmunerkrankung bislang einmalig beschrieben. Histopathologisch steht bei dieser Form der induzierten Uveitis weniger die Zellinfiltration in das Gewebe, sondern eher die Zerstörung von Retinastrukturen und Gliose (Proliferation von Müller-Glia-Zellen) im Vordergrund (Deeg et al., 2006b). Interessanterweise konnte CRALBP auch im Menschen als mögliches Autoantigen für humane Autoimmunuveitis identifiziert werden (Deeg et al., 2007c).

Dies untermauert, wie wertvoll das Pferd als Modell für die Untersuchung der spontan auftretenden Autoimmunuveitis beim Menschen ist (Deeg et al., 2002b).

### **2.2.3 Das Auge und das Immunsystem**

Das Auge hat ein besonderes Verhältnis zum Immunsystem, es hat den Status eines immunprivilegierten Organs (Caspi, 2006; Simpson, 2006; Streilein, 2003).

Die Modifikation von Immunantworten auf okuläre Antigene durch das Auge selbst (Streilein et al., 1997b) und die Abgrenzung des Auges vom Abwehrsystem des Körpers dienen als Selbstschutz und werden aufrechterhalten durch die innere und äußere Blut-Retina-Schranke, sowie durch das anti-inflammatorisch und immunsuppressiv wirkende Milieu im Inneren des Auges (Caspi, 2006; Gery and Streilein, 1994). Bei der autoimmun-medierten Uveitis kommt es jedoch, trotz Immunprivileg, zur Sensibilisierung von T-Zellen gegen retinale Antigene und damit zur Infiltration des Auges. Warum lediglich aktivierte T-Lymphozyten die Blut-Retina-Schranke passieren können und auch das Immunprivileg das Auge nicht gegen Induktion und Expression von Uveitis schützt ist noch ungeklärt (Caspi, 2006). Neuere Untersuchungen haben sogar ergeben, dass das Phänomen Immunprivileg zu einer erhöhten Empfänglichkeit des Auges für sensibilisierte Lymphozyten führen könnte (Caspi, 2008).

Ob der Einbruch der Blut-Retina-Schranke im Zusammenhang mit autoimmuner Uveitis bereits vorliegen muss, damit Lymphozyten das Auge infiltrieren können, oder ob der Einbruch aus der Infiltration selbst resultiert, ist bislang ebenfalls noch ungeklärt (Xu et al., 2003).

### **2.2.4 EAU und Adoptiver Transfer**

Die experimentelle Autoimmunuveitis (EAU) in Ratten und Mäusen ist eine induzierte, T-Zell mediierte Autoimmunerkrankung, die als Modell für die spontan auftretende, humane Autoimmunuveitis dient (Caspi, 2003). Die Induktion von

EAU kann über die periphere Immunisierung mit Retina-spezifischen Antigenen wie IRBP oder S-Antigen erfolgen oder über einen adoptiven Transfer von sensibilisierten, Retina-Autoantigen spezifischen Lymphozyten (Caspi, 2003).

Der Mechanismus des adoptiven Transfers beschreibt das Auslösen einer EAU durch intraperitoneale (Mochizuki et al., 1985) oder intravenöse (Shao et al., 2005) Injektion von Lymphknoten- oder Milzzellen von Ratten, die mit einem retinalen Autoantigen (meist S-Antigen) immunisiert wurden, in ein Empfängertier (Mochizuki et al., 1985). Dabei werden die Zellen im Donortier durch die Immunisierung mit dem retina-spezifischen Antigen *in vivo* sensibilisiert, nach der Entnahme *in vitro* mit demselben Antigen aktiviert und schließlich in das Empfängertier transferiert (Mochizuki et al., 1985). Die Bestimmung der Zellverteilung im Organismus nach adoptivem Transfer erfolgte in einem Experiment durch Palestine und Mitarbeiter durch intraperitoneale Injektion von radioaktiv markierten (Indium-111), gegen S-Antigen sensibilisierten Lymphozyten (Palestine et al., 1986). Vierundzwanzig Stunden nach dem Lymphozytentransfer waren hier die transferierten Zellen aus dem Donortier auf die vier Hauptbereiche Leber, Milz, Thymus und Hoden verteilt und nur ein kleiner Anteil dieser Zellen ins Auge gelangt. Dieser kleine Anteil reichte jedoch aus, um eine EAU zu induzieren (Palestine et al., 1986).

Ebenfalls nachgewiesen ist die Induktion von EAU in der Lewis Ratte durch adoptiven Transfer von IRBP-spezifischen T-Zellen (Shao et al., 2005; McAllister et al., 1987). Dieses Modell zeigt eine für EAU in der Ratte unüblichen, chronisch-rezidivierenden Krankheitsverlauf (Shao et al., 2005), ähnlich wie die spontane humane Autoimmunuveitis und die equine rezidivierende Uveitis.

Die Induktion von Autoimmunuveitis im Rattenmodell durch adoptiven Transfer von sensibilisierten T-Lymphozyten gibt einen eindrucksvollen Aufschluss über die immunopathologischen Vorgänge in Autoimmunerkrankungen. Dies untermauert die Tatsache, dass die ERU ebenfalls eine T-Zell medierte Erkrankung ist und aktivierte, gegen uveale Antigene sensibilisierte T-Zellen bei der Pathogenese der ERU die Hauptrolle spielen.

### **2.2.5 Molekulare Mimikry**

Mikroorganismen können Strukturen enthalten, die denen körpereigener Proteinsequenzen ähnlich sind (Albert and Inman, 1999; Oldstone, 1998). Durch diese molekulare Mimikry kann es nach einer Infektionserkrankung zur Kreuzreaktion

zwischen einem Mikroorganismus und einem Autoantigen kommen, was schließlich zu einer Autoimmunitätsreaktion führen kann (Albert and Inman, 1999; Oldstone, 1998). Dabei muss gewährleistet sein, dass die homologen Sequenzen zwischen Infektionserreger und dem Autoantigen genügend Unterschiede aufweisen, um als fremd erkannt zu werden und das Immunsystem zu aktivieren, sie jedoch groß genug sind, um zu einer Autoimmunreaktion zu führen (Oldstone, 1998). Der Prozess der Autoimmunität klingt auch nach Entfernung des auslösenden Erregers nicht ab, was bedeutet, dass dieser nicht für die Aufrechterhaltung der Autoimmunantwort benötigt wird - er induziert sie lediglich nach einem „hit-and-run“ Prinzip (Oldstone, 1987). Demzufolge richtet sich die entstandene Immunantwort weiter gegen den Wirt, auch wenn das auslösende mikrobielle Agens bereits eliminiert wurde. Diese Autoimmunantwort führt zu Gewebeschädigungen, welche wiederum zu einer vermehrten Expression von gewebespezifischen, vorher kryptischen Epitopen führen und somit die Produktion von spezifischen Autoantikörpern oder autoreaktiven T-Zellen in einem ewigen, selbsterhaltenden Kreislauf erhöhen (Oldstone, 1987).

Die Molekulare Mimikry wird mit dem Krankheitsverlauf von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose (MS) in Verbindung gebracht (Harkiolaki et al., 2009) und auch als eine der möglichen auslösenden Faktoren von Uveitis angesehen (Wildner and Diedrichs-Mohring, 2003; Singh et al., 1990). Sie bildet zusammen mit den Mechanismen Bystander Aktivierung und Epitop Spreading ein Konzept, das hilft, die Induktion, den Verlauf und die Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen zu erklären und besser zu verstehen (Deeg et al., 2006a; Fujinami et al., 2006; Vanderlugt and Miller, 2002).

### **2.2.6 Bystander Aktivierung**

Neben der molekularen Mimikry kann es bei einer Infektionserkrankung auch zur Bystander Aktivierung kommen (Fujinami et al., 2006; Horwitz et al., 1998). Diese führt während einer primären Immunantwort auf ein bestimmtes, körperfremdes Peptid oder Antigen zu einer Schädigung von nicht infizierten, aber benachbarten Zellen durch Ausschüttung von Zytokinen, sowie sekundäre Aktivierung von T-Lymphozyten und Makrophagen (Fujinami et al., 2006; Vanderlugt and Miller, 2002). Dabei werden durch die Zellerstörung körpereigene Antigene exponiert, die eine Immunantwort gegen sich selbst, also eine Autoimmunreaktion, auslösen können (Vanderlugt and Miller, 2002). Die Bystander Aktivierung kann zudem durch schon

bestehende Autoimmunreaktionen und damit einhergehende Zellschädigung hervorgerufen werden (Fujinami et al., 2006). Somit kann die Aktivierung dieses Mechanismus als Auslöser für Autoimmunantworten nach initial infektionsbedingten Immunreaktionen oder als Folge von schon bestehenden Autoimmunreaktionen auftreten und ein erster Schritt in Richtung Epitop Spreading sein.

### **2.2.7 Epitop Spreading**

Das Schlüsselement der equinen rezidivierenden Uveitis, das periodische Auftreten und Abklingen von Entzündungsschüben im Auge, könnte unter anderem auf das Phänomen des Epitop Spreadings zurückgehen (Deeg et al., 2006a).

Ein Epitop ist eine kurze Peptidsequenz, die üblicherweise an der Oberfläche eines Antigenmoleküls exprimiert ist (Powell and Black, 2001). Jedes Antigen besitzt mehrere verschiedene Epitope, die im Organismus mit jeweils bestimmten Antikörpern in unterschiedlicher Affinität reagieren können. Man unterscheidet dominante, primäre Epitope, die der Immunantwort unmittelbar präsentiert werden (Powell and Black, 2001), und kryptische Epitope, die verborgen in einer nicht direkt exponierten Region des Antigenmoleküls lokalisiert sind und erst nach einer Immunantwort und daraus resultierender Zellzerstörung präsentiert werden (Vanderlugt and Miller, 2002).

Werden autoreaktive Lymphozyten aktiviert, richten sie sich zunächst gegen ein bestimmtes Epitop eines Autoantigens (Vanderlugt and Miller, 1996). Epitop Spreading beschreibt die Immunantwort auf sekundär freigesetzte Epitope im Verlauf einer chronischen Autoimmunantwort (Vanderlugt and Miller, 1996). Dieses Phänomen spielt eine wichtige Rolle in T-Zell mediierten Autoimmunerkrankungen wie der experimentellen autoimmun-medierten Encephalomyelitis (EAE) und Multipler Sklerose (MS), wo es auch ursprünglich entdeckt und charakterisiert wurde (Tuohy et al., 1998; Vanderlugt and Miller, 1996; Yu et al., 1996). In diesem Zusammenhang entwickeln sich aus einer erkrankungsauslösenden Autoimmunantwort gegen ein bestimmtes, körpereigenes Antigenepitop weitere, sekundäre Immunreaktionen gegen Epitope, die mit dem initiierenden Epitop nicht identisch sind (Vanderlugt and Miller, 1996). So wird durch eine sich ständig neu gestaltende Selbsterkennung der Entzündungsprozess aufrechterhalten und ein chronisch-progressiver Krankheitsverlauf ausgelöst (Tuohy et al., 1998). Unterschieden wird dabei zwischen intramolekularem Epitop Spreading, bei dem sich

die Autoimmunantwort auf unterschiedliche Epitope des ursprünglichen Antigens ausweitet, und intermolekularem Epitop Spreading, bei dem auf anderen Antigenen exprimierte Epitope weitere Immunantworten auslösen (Vanderlugt and Miller, 2002; Tuohy et al., 1998).

Der Mechanismus des Epitop Spreading ist möglicherweise auch für den rezidivierenden Krankheitsverlauf der ERU verantwortlich, denn die periodisch auftretenden Entzündungsschübe könnten als Schlüsselement der ERU durch einen fortlaufenden Shift in der Immunreaktion von einem bestimmten Epitop auf ein nächstes, neues Epitop erklärt werden (Deeg et al., 2006a).

### **2.3 Immunhistopathologie**

Im histologischen Augenpräparat von an ERU erkrankten Pferden zeigt sich im Vergleich zum gesunden Auge eine deutliche Zerstörung der Retinastrukturen, die mit fortschreitendem Krankheitsverlauf tendenziell immer ausgeprägter wird (Deeg et al., 2002b; Kalsow and Dwyer, 1998; Romeike et al., 1998). Diese Retinadegeneration beginnt im frühen Krankheitsstadium mit der Zerstörung der äußeren Segmente der Photorezeptorzellen (Deeg et al., 2002a), und wurde auch schon in den EAU-Modellen der Maus (Caspi et al., 1988) und der Ratte (Wacker et al., 1977) beschrieben. Im weiteren Verlauf kommt es zur Zerstörung der inneren Körnerschicht der sich, nach der Destruktion der Bipolar- und Horizontalzellen, auf die äußere Körnerschicht ausweitet (Deeg et al., 2002a). Die Müller-Glia-Zellen bleiben auch in stark degenerierten Retinae noch weitgehend unangetastet (Deeg et al., 2002a) und weisen teilweise sogar eine starke Gliose auf (Deeg et al., 2006b).

Ein weiteres typisches Merkmal der equinen rezidivierenden Uveitis ist eine diffuse T-Zell-Infiltration des okulären Gewebes und die Akkumulation der Zellen in Glaskörper und Retina (Deeg et al., 2002a; Romeike et al., 1998). Zudem kann es zur Bildung von Lymphfollikeln kommen, die aus einem kleinen, zentralen B-Zell-Kern und ansonsten überwiegend aus T-Zellen bestehen (Deeg et al., 2002a; Gilger et al., 1999; Romeike et al., 1998). Diese befinden sich in frühen Stadien der Erkrankung typischerweise im Ziliarkörper und in der Iris (Deeg et al., 2002a; Gilger et al., 1999; Dubielzig et al., 1997) und nach massiver Leukozyteininfiltration im fortgeschrittenen Krankheitsstadium subretinal in der Choroidea am Übergang der Pars optica retinae in die Pars caeca retinae (Deeg et al., 2002a). Ähnliche Lymphfollikelformationen

wurden bereits im IRBP-induzierten Mausmodell der EAU beschrieben (Caspi et al., 1988) und auch bei der rheumatoiden Arthritis, eine ebenfalls T-Zell medierte Erkrankung, kommt es nach chronischer Inflammation zur Bildung von Lymphfollikeln (Yanni et al., 1992).

Schließlich kommt es im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung durch inflammatorisch bedingte subretinale Exsudation häufig zu kompletten oder partiellen Netzhautablösungen (Deeg et al., 2002a) und zu im Krankheitsverlauf fortschreitender Hypertrophie und Hyperplasie der Pigmentepithelzellen (Romeike et al., 1998), was letzten Endes zum Verlust der Sehfähigkeit des betroffenen Auges führt.

Das beschriebene histologische Bild der spontan auftretenden ERU ist fast identisch mit dem der IRBP-induzierten EAU im murinen Nagermodell (Caspi et al., 1988) und der IRBP-induzierten ERU im Pferd (Deeg et al., 2002b).

#### **2.4 Vergleichende Proteomanalyse: Zweidimensionale Gelelektrophorese und die 2D-DIGE Technik**

Die Hauptzielsetzung der Proteomik beinhaltet die Identifizierung differenzieller Proteinexpressionen zwischen normalen und sich in erkranktem Zustand befindenden Zellen, Geweben oder Organismen (Viswanathan et al., 2006). Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) ermöglicht, im Gegensatz zu anderen proteomischen Methoden, eine Auftrennung komplexer Proteingemische nach dem Molekulargewicht und dem isoelektrischen Punkt der einzelnen Proteine (O'Farrell, 1975). Dies erlaubt die Analyse intakter Proteine, nicht nur einzelner Peptide, und gibt Aufschluss über differenzielle Proteinexpressionen, posttranslationale Modifikationen und das Auftreten von Protein-Isoformen im Proteom des zu untersuchenden Materials (Gorg et al., 2004). Trotz der vielen Vorteile der 2-DE Technik besteht das Defizit der schlechten Reproduzierbarkeit der Gele (Unlu et al., 1997). Kein Polyacrylamidgel gleicht exakt dem Anderen und diese starke Gel-zu-Gel Varianz erschwert bei vergleichenden Proteomanalysen den Abgleich der Proteinspots jedes einzelnen Gels sowie das Erkennen differenziell exprimierter Proteine (Lilley and Friedman, 2004; Unlu et al., 1997).

Two-dimensional Difference-gel-electrophoresis (2D-DIGE) ist eine leistungsstarke und sensitive Technik zur differenziellen Expressionsanalyse, die eine simultane und

gut reproduzierbare Auftrennung und Analyse von komplexen Proteingemischen, wie zum Beispiel Zell- oder Gewebelysaten, ermöglicht (Timms and Cramer, 2008; Gorg et al., 2004; Unlu et al., 1997). Im Gegensatz zu „eine-Probe-ein-Gel“-Methoden, wie der 2-DE, ist sie quantitativ präziser, da durch die Auftrennung von zwei verschiedenen, untereinander zu vergleichenden Proben (Unlu et al., 1997) sowie einem gepoolten internen Standard (Knowles et al., 2003) auf einem Gel keine Unterschiede im Laufverhalten und in der Proteinauftrennung auftreten (Lilley and Friedman, 2004; Unlu et al., 1997). Diese differenzielle Proteomanalyse mittels 2D-DIGE ist ein nicht-hypothesengetriebener Ansatz, der es erlaubt, das zu untersuchende Material unvoreingenommen und ganzheitlich vergleichend zu betrachten, um schließlich aus den gewonnenen Erkenntnissen neue Hypothesen generieren zu können (Lilley and Friedman, 2004).

## **2.5 Identifikation potenzieller Biomarkerkandidaten bei der ERU mittels 2-DE und 2D-DIGE**

### **2.5.1 Glaskörper und Retina**

Um einen Einblick in die an ERU beteiligten biologischen Pfade zu gewinnen und neue Biomarker und potenzielle therapeutische Angriffspunkte bei der equinen rezidivierenden Uveitis zu erforschen, wurde in ersten Studien das Zielgewebe der Erkrankung vergleichend proteomisch untersucht (Deeg et al., 2007a; Hauck et al., 2007). Retina und Glaskörperproben wurden mittels 2-DE Proteomanalyse aufgetrennt und auf differenziell exprimierte Proteine überprüft. In beiden Geweben konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, die bei an ERU erkrankten Pferden signifikante Abundanzunterschiede im Vergleich zu augengesunden Pferden aufwiesen. Übereinstimmend war in der Retina und auch im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden der neurotrophische Faktor Pigment epithelium-derived factor (PEDF) niedriger exprimiert als bei Kontrolltieren (Deeg et al., 2007a; Hauck et al., 2007). PEDF ist ein potenter Angiogeneseinhibitor und hemmt die Neovaskularisation von gefäßfreien Augeninnenstrukturen (Eichler et al., 2004; Steele et al., 1993). Außerdem reguliert es die Expression von Entzündungsfaktoren im Auge (Zhang et al., 2006). Experimentell konnte bewiesen werden, dass eine siRNA induzierte Verringerung der PEDF Expression in Endothelzellen retinaler

Kapillaren zu einer signifikant vermehrten Expression von retinalen Entzündungsfaktoren wie Vascular endothelial growth factor (VEGF) führt (Zhang et al., 2006), diese beiden Faktoren demnach negativ miteinander korrelieren. VEGF wird in uveitischen Augen von Müller-Glia-Zellen sekretiert und führt hier zu einer Permeabilisierung der Blut-Retina-Schranke (Deeg et al., 2006b). PEDF hingegen unterdrückt die Permeabilität von Endothelstrukturen durch Schutz von tight-junctions-Proteinen (Zhang et al., 2006).

Die verminderte Expression von PEDF im Zielorgan der ERU und die damit einhergehende Überexpression von VEGF trägt vermutlich maßgeblich zur Aufrechterhaltung von entzündlichen Prozessen und der fortschreitenden Gefäßpermeabilität im Verlaufe der ERU bei (Deeg et al., 2007a).

### **2.5.2 Serum**

Viele biologische Prozesse spiegeln sich durch Veränderungen im Serumproteom wider (Zipplies et al., 2009a). Da bei der autoimmun-medierten Uveitis autoreaktive T-Zellen in der Milz aktiviert werden (Streilein et al., 1997a) und von dort aus nach Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke direkt in das Zielorgan Auge migrieren, können diese kurz vor Auftreten eines Entzündungsschubes im peripheren Blut detektiert werden (Deeg et al., 2004; Deeg et al., 2002b). Serum ist besser zugänglich als die bereits beschriebenen Zielgewebe Retina oder Glaskörper und daher besonders gut zur Detektierung und Validierung von krankheitsvorhersagenden Markern geeignet (Zipplies et al., 2009a; Zipplies et al., 2009b). Mit dem Ziel, neue Biomarkerkandidaten für Uveitis zu erschließen und eine herannahende rezidivierende Inflammation der Augeninnenstrukturen vor Beginn des Ausbruchs anzeigen zu können, wurde vergleichend das Serumproteom von an ERU erkrankten und augengesunden Pferden mittels der 2D-DIGE Technologie untersucht (Zipplies et al., 2009a). Dabei wurden sieben differenziell regulierte Proteine gefunden, unter anderem erneut das auch im Serum von an ERU erkrankten Pferden niedriger exprimierte Protein PEDF. Da die Expression von PEDF bei equiner rezidivierender Uveitis nicht nur, wie bisher bereits beschrieben, in Retina und Glaskörper (Deeg et al., 2007a; Hauck et al., 2007), sondern auch im Serum niedriger ist, ist PEDF ein sich in allen drei untersuchten Medien überschneidender, denkbar vielversprechender Biomarker bei Uveitis (Zipplies et al., 2009a).

Weiterhin konnte im Serum von an ERU erkrankten Pferden ein erniedrigter Kininogengehalt detektiert werden (Zipplies et al., 2009b). Im Gegensatz dazu ist in Retina und Glaskörper von uveitischen Augen die Kininogen 1-Expression erhöht. Dies könnte mit dem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke im Verlauf der Uveitis zusammenhängen, denn Kininogen konnte in gesunden Retinae bisher nicht nachgewiesen werden (Zipplies et al., 2009b). Die Kininogen 1-Expression liegt fokal und nicht zellgebunden an Stellen vor, wo die Retina durch Entzündungsprozesse schon zerstört ist und ist möglicherweise an der Neovaskularisation und inflammatorischen Prozessen bei der ERU beteiligt (Zipplies et al., 2009b). Interessanterweise konnte an den gleichen Stellen der Kininogen 1-Expression auch eine erhöhte Expression von VEGF detektiert werden (Zipplies et al., 2009b).

Diese Ergebnisse zeigen, dass proteomische Untersuchungen mittels der 2-DE und insbesondere der 2D-DIGE Methode eine erfolgreiche Annäherung an die Detektion von differenziell exprimierten Proteinen in den an Uveitis beteiligten Strukturen Retina, Glaskörper und Serum darstellen, die Biomarker-Potenzial haben könnten oder wertvolle Informationen über die an der Pathogenese der ERU beteiligten Pfade offenbaren.

## **2.6 Leukozyten in autoimmun-medierten Erkrankungen**

Leukozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese und dem Verlauf von Erkrankungen (Borro et al., 2007; Wang et al., 2004). Insbesondere T-Lymphozyten sind bei autoimmun-medierten Erkrankungen verschiedener Organe von großer Bedeutung (Becker et al., 2000). Ein Lymphozyt kann 5000 verschiedene, zellphysiologisch funktionelle Proteine synthetisieren (Willard-Gallo et al., 1988), von denen einige eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen spielen können (Wang et al., 2004). Änderungen in der Proteinexpression von Lymphozyten spiegeln Unterschiede in ihrer Funktionalität als Reaktion auf bestimmte Stimuli wider (Grant et al., 2007) und sind mittels der 2-DE und 2D-DIGE Technologie detektierbar (Larbi and Jefferies, 2009; Vergara et al., 2008).

Studien zur generellen Charakterisierung des Leukozytenproteoms mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und daraus resultierende Proteindatenbanken sind bereits für den Menschen (Vergara et al., 2008), das Schwein (Ramirez-Boo et

al., 2006) und die Maus (Lenchik et al., 2005) verfügbar, ebenso für aktivierte humane T-Helferzellen (Nyman et al., 2001). Zudem wurden kürzlich Lymphozyten aus der Milz von SAM-Mäusen (Senescence-Accelerated-Mice) untersucht (Luo et al., 2009). SAM-Mäuse dienen der Studie von altersbedingten Erkrankungen. B- und T-Zellen aus dem schnell alternden Mausstamm SAMP8 und dem als Kontrolle genutzten, physiologisch alternden Stamm SAMR1 wurden in dieser Studie proteomisch verglichen. Dabei konnten 14 differenziell exprimierte Proteine detektiert und identifiziert werden (Luo et al., 2009).

Die proteomisch vergleichende Analyse peripherer Blut-Leukozyten wurde bereits bei der autoimmun-medierten rheumatischen Arthritis (RA) beschrieben (Schulz et al., 2007; Dotzlaw et al., 2004). Bei Menschen mit rheumatoider Arthritis kommt es durch Infiltration von aktivierten mononukleären Zellen (Makrophagen, Fibroblasten und T-Lymphozyten) in die entzündeten Gelenke zur schrittweisen Zerstörung der Gelenkknorpel (Schulz et al., 2007). Um Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zu detektieren, wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus dem peripheren Blut gewonnene, nicht gesortete, mononukleäre Zellen von 32 klinisch diagnostizierten RA Patienten und 33 gesunden Individuen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und miteinander verglichen. Dabei konnten 16 differenziell exprimierte Proteine identifiziert werden, welche als potenzielle Marker für die Diagnose und Charakterisierung der rheumatischen Arthritis (Schulz et al., 2007), sowie die Identifikation von Biomarkerkandidaten zur gezielten therapeutischen Intervention (Dotzlaw et al., 2004) klinisch hochrelevant sein könnten.

Diabetes Mellitus vom Typ1 ist eine sehr häufig auftretende, chronische Autoimmunerkrankung des Menschen (Notkins and Lernmark, 2001). Bei dieser Erkrankung führen autoreaktive T-Zellen am Pankreas zur Schädigung der Insulinproduzierenden Inselzellen und damit zu einem Mangel an Insulinausschüttung in den Organismus (Notkins and Lernmark, 2001). Mit der Initiierung von Diabetes Mellitus Typ1 werden virale Infektionen assoziiert, die über Bystander Aktivierung und molekulare Mimikry zu T-Zell medierten Autoimmunreaktionen führen (von Herrath et al., 1998). In einer Studie von Gerling und Mitarbeitern wurde das Leukozytenproteom von NOD- (Non-obese diabetic) Mäusen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2-DE) aufgetrennt und mit dem von C57BL/6-Mäusen verglichen (Gerling et al., 2006). Die Datensätze aus der 2-DE wurden dann

mit einer Gen-expressions-Software analysiert, um eine noch effektivere Einsicht in krankheitsassoziierte Pfade zu erlangen (Gerling et al., 2006; Lenchik et al., 2005). Daraus resultierten 37 zwischen den Stämmen differenziell exprimierte Spots, von denen 27 identifiziert werden konnten, die wiederum 24 Proteine repräsentierten (Gerling et al., 2006).

Im Zusammenhang mit der equinen rezidivierenden Uveitis, der humanen Autoimmunuveitis und der induzierten Uveitis im Nagermodell gibt es bislang keine veröffentlichten Daten zur vergleichenden Proteomanalyse von Leukozyten (PubMed Recherche, Stand 16.10.2009).

### **2.6.1 Leukozytenproteine als wertvolle Biomarker in Autoimmunerkrankungen**

Leukozyten können unproblematisch und in großer Zahl gewonnen werden (Vergara et al., 2008; Borro et al., 2007) und eignen sich somit, wie bereits für Serum beschrieben (Zipplies et al., 2009a), gut zur Detektion von krankheitsvorhersagenden Markern und zur Evaluierung von Modifikationen in der Genexpression unter physiologischen und pathologischen Umständen (Borro et al., 2007). Sie reagieren schnell und sensibel auf externe Reize (Samy et al., 2001) und ändern je nach Variation der Stimuli ihr Proteinexpressionsmuster (Borro et al., 2007; Grant et al., 2007). Die Identifikation von Autoantigenen hilft bei der Bestimmung der Spezifität und der Zielgewebe von Autoimmunantworten (Robinson et al., 2002). Autoreaktive Leukozyten sind daher besonders wertvoll als Biomarker zur Vorhersage und therapeutischen Intervention bei Autoimmunerkrankungen (Elkon and Casali, 2008).

Die Erforschung der Zielgewebe der ERU (Retina und Glaskörper), sowie des Serums konnte bereits zahlreiche Aufschlüsse über beteiligte Pfade, Entzündungsmediatoren und mögliche Biomarker dieser Autoimmunerkrankung geben (Zipplies et al., 2009a; Zipplies et al., 2009b; Deeg et al., 2007a; Deeg et al., 2007b; Hauck et al., 2007). Da die equine rezidivierende Uveitis auf einer T-Zell-medierten Autoimmunantwort basiert, und es zudem in diesem Zusammenhang bislang keine vergleichenden Leukozytenproteomanalysen mittels 2-DE und 2D-DIGE gibt, soll zur Vervollständigung der proteomischen Charakterisierung der ERU in dieser Studie zuletzt das equine Leukozytenproteom vergleichend untersucht werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Puffer und Lösungen

#### 3.1.1 Puffer und Lösungen zur Lymphozytenpräparation

##### **Trennlösung zur Isolierung von PBL während der Dichtegradientenzentrifugation**

Biocoll Trennlösung 1,0<sup>1</sup>, gebrauchsfertig.

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

NaCl <sup>2</sup> (136,9 mM)	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,4 mM)	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (8,1 mM)	1,45 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.

##### **Lysepuffer**

Harnstoff <sup>3</sup> (9 M)	27,00 g
Thioharnstoff <sup>4</sup> (2 M)	7,60 g
CHAPS <sup>5</sup> (4%)	2,00 g
DTT <sup>6</sup> (65 mM)	0,50 g

ad 50 ml Aqua bidest.

Bei Raumtemperatur (RT) fünf Stunden rühren, dann zu je 1 ml aliquotieren und bei -20°C bis zur Weiterverwendung aufbewahren. Direkt vor Gebrauch wurden pro 1 ml Lysepuffer 0,1 ml Aqua bidest. zugesetzt.

---

<sup>1</sup> Fa. Biochrom AG, Berlin

<sup>2</sup> Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien: Fa. AppliChem, Darmstadt

<sup>3</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>4</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>5</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

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

### 3.1.2 Puffer und Lösungen für die Proteinbestimmung

#### Bradford Reagenzien

Bradford Reagenz<sup>7</sup>, gebrauchsfertig.

#### Bovine Serum Albumin (BSA)-Stammlösung

BSA-Stammlösung (10%), aliquotieren und bei -20°C lagern.

### 3.1.3 Puffer und Lösungen für die 1D und 2D Gelelektrophorese

#### Acrylamid-Lösung

Acrylamide-Bis Lösung, 33%<sup>8</sup> gebrauchsfertig.

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

Tris (1 M)	12,11 g
------------	---------

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

#### Äquibrierungslösung

1 M Tris-HCl pH 6,8	50,00 ml
Glycerin	300,00 ml
Harnstoff <sup>9</sup> (6 M)	360,00 g
SDS (1,8%)	18,00 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

#### Agarose Lösung:

Agarose <sup>10</sup> (0,5%)	0,25 g
------------------------------	--------

ad 50 ml Elektrophoresepuffer.

Nach dem Aufkochen die Lösung auf 58°C temperieren.

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

---

<sup>7</sup> Fa. BioRad, München

<sup>8</sup> Fa. Serva, Heidelberg

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

<sup>10</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

**Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung 10%**

Ammoniumpersulfat (10%) 0,10 g

ad 1 ml Aqua bidest.

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

Tris (120 mM) 15,00 g

Glycin (960 mM) 72,00 g

SDS (0,05%) 5,00 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

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

**Gelpuffer, pH 8,8**

Tris (1,5 M) 18,15 g

mit 5M HCl auf pH 8,8 titrieren.

ad 100 ml Aqua bidest.

**Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10%**

Na-dodecylsulfat (35 mM) 10,00 g

ad 100ml Aqua bidest. Lösung bei Raumtemperatur lagern.

**Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 20%**

Na-dodecylsulfat (70 mM) 20,00 g

ad 100ml Aqua bidest. Lösung bei Raumtemperatur lagern.

**Probenpuffer (reduzierend)**

Aqua bidest. 4,00 ml

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 1,00 ml

Glycerin, wasserfrei 0,80 ml

SDS-Lösung (10%) 1,60 ml

Bromphenolblau-Lösung 0,20 ml

2-Mercaptoethanol<sup>11</sup> 0,40 ml

ergeben 8,00 ml Probenpuffer.

---

<sup>11</sup> Fa. BioRad, München

### **Sammelgelpuffer, pH 6,8**

Tris (0,5 M) 6,00 g

ad 100 ml Aqua bidest.

Lösung mit 5 M HCl auf pH 6,8 titrieren.

## **3.1.4 Puffer und Lösungen für die Difference Gel Electrophoresis (DIGE)**

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

Tris (30 mM) 182,00 mg

Harnstoff (7 M) 21,00 g

Thioharnstoff (2 M) 7,60 g

CHAPS (4%) 2,00 g

ad 50 ml Aqua bidest.

Lösung mit 5 M HCl auf pH 8,5 titrieren.

### **Ettan DALTsix Elektrophoresepuffer-Stammlösung**

Tris (240 mM) 60,50 g

Glycin (1,92 M) 288,00 g

SDS (0,1%) 20,00 g

ad 2000 ml Aqua bidest.

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

### **Polares organisches Lösungsmittel zum Lösen der CyDyes**

N,N-Dimethylformamid<sup>12</sup> (DMF), gebrauchsfertig.

### **Lysin-Lösung**

Lysin<sup>13</sup> 18,00 mg

ad 10 ml Aqua bidest.

---

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

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

### 3.1.5 Puffer und Lösungen für Western Blot

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

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

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

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

#### Kathodenpuffer, pH 9,4

Tris	3,03 g
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure <sup>14</sup>	5,25 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

#### Ponceau-Färbelösung

Ponceau-S <sup>15</sup> (0,2%)	0,20 g
Trichloressigsäure (3%)	3,00 g
ad 100 ml Aqua bidest.	

#### PBS-Tween Lösung (PBS-T)

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

---

<sup>14</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>15</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

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

Polyvinylpyrrolidone<sup>16</sup> (PVP40) 10,00 g  
ad 1000 ml PBS-T.

**ECL Lösung A**

Tris-HCL, pH 8,6 (0,1 M) 2,42 g  
Luminol<sup>17</sup> 0,05 g

ad 200 ml Aqua bidest.

Lagerung bei 4 °C.

**ECL Lösung B**

Para-Hydroxycoumarinsäure<sup>18</sup> 110,00 mg

in 100 ml DMSO lösen.

Dunkel und bei RT lagern.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)**

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

Lsg. A	1,00 ml
Lsg. B	0,10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,00 µl

**Stripping Puffer**

NaOH (0,1 M)	10,00 ml
Aqua Dest	90,00 ml
SDS (2%)	2,00 g
DTT (0,5%)	0,50 g

Membranen eine Stunde bei 55 °C im Stripping Puffer inkubieren.

---

<sup>16</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>17</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>18</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

### 3.1.6 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

#### Fluoreszenzpuffer (Fluo-Puffer)

BSA	5,00 g
NaN <sub>3</sub> (10%)	0,50 ml

ad 500 ml PBS.

Bei 4 °C lagern.

#### Zellpermeabilisierungs Lösung

Fixations/Permeabilisierung Lösung<sup>19</sup> gebrauchsfertig.

#### Waschlösung

Perm/Wash Puffer<sup>20</sup> gebrauchsfertig.

### 3.1.7 Lösungen für die Zellstimulierung

#### RPMI Medium

RPMI 1640 Medium mit Glutamin<sup>21</sup>

+ 1% Pen/Strep<sup>22</sup>

+ 10% inaktiviertes FCS<sup>23</sup>

### 3.1.8 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

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

EDTA <sup>24</sup>	29,22 g
--------------------	---------

ad 1000 ml Aqua dest.

---

<sup>19</sup> Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

<sup>20</sup> Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

<sup>21</sup> Fa. Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

<sup>22</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>23</sup> Fa. Life Technologies, Karlsruhe

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

### **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 TBS) zugesetzt.

### **3.1.9 Färbelösungen**

#### **Pappenheim-Färbelösungen für die Zytologie**

Methanol (99%)	5 min fixieren
May-Grünwald-Lösung	4 min inkubieren
Aqua dest.	kurz spülen
Giemsa-Lösung	20 min inkubieren

spülen in Aqua dest. und die Präparate an der Luft bei RT trocknen lassen.

### **3.2 Probenmaterial**

Für diese Arbeit wurden die Proben von insgesamt 41 gesunden und 34 an ERU erkrankten Pferden untersucht. Die an ERU erkrankten Pferde waren Patienten der Klinik für Pferde der Ludwigs-Maximilians-Universität München (Vorstand Prof. Dr. H. Gerhards). Die Diagnose der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) erfolgte anhand klinischer Kriterien (Gilger and Michau, 2004; Schwink, 1992). Für die Experimente gab es keine Vorauswahl der Proben; es wurden die Blut- und Gewebeproben des jeweils nächsten in der Klinik vorgestellten ERU-Patienten in die Untersuchung miteinbezogen. Die Kontrollgruppe wurde dann entsprechend in Alter, Geschlecht und Rasse passend zu den ERU-Patienten ausgesucht.

Zur vergleichenden Proteomanalyse von equinen peripheren Blut-Leukozyten (PBL) wurden die Blutproben von 37 verschiedenen augengesunden und 33 verschiedenen, an ERU erkrankten Pferden untersucht.

Für die immunhistochemische Charakterisierung wurden die Mandibularlymphknoten von 4 augengesunden Pferden und der Lymphfollikel eines an ERU erkrankten Pferdes verwendet.

Die Proben einiger Pferde wurden in mehreren verschiedenen Experimenten eingesetzt. Für die einzelnen Experimente wurde die folgende Anzahl von Pferden untersucht:

2D-DIGE 1	5 gesunde + 5 an ERU erkrankte Pferde (insgesamt 10)
2D-DIGE 2	6 gesunde + 6 an ERU erkrankte Pferde (insgesamt 12)
WB Septin 7	13 gesunde + 11 an ERU erkrankte Pferde (insgesamt 24)
WB Talin 1	10 gesunde + 10 an ERU erkrankte Pferde (insgesamt 20)
FACS Septin 7	4 gesunde Pferde
FACS Talin 1	4 gesunde Pferde
Immunhistologie	4 gesunde + 1 an ERU erkranktes Pferd (insgesamt 5)
Poliferationsassay	5 Pferde

### 3.2.1 Gewinnung von peripheren Blut-Leukozyten (PBL)

Nach Desinfektion der Injektionsstelle mit einem Hautdesinfektionsmittel<sup>25</sup> wurde den Pferden Blut aus der Vena jugularis entnommen und in mit Lithium-Heparin präparierte Probenröhren zur Plasmagewinnung<sup>26</sup> abgefüllt. Die Blutproben wurden zur Sedimentierung 10-20 Minuten bei Raumtemperatur aufgestellt, dann konnte das Plasma mit einer sterilen Pipette entnommen und separat in 15 ml Falcons<sup>27</sup> zu gleichen Teilen auf Biocoll Trennlösung<sup>28</sup> geschichtet werden. Die nach der Dichtegradientenzentrifugation (25°C, 290 rcf, 25 min, Bremse ausgeschaltet) zwischen Plasma und Biocoll entstandene leukozytenreiche Interphase wurde, unter möglichst minimaler Aspiration der Biocoll Trennlösung, abgenommen. Ab diesem Schritt wurden die Zellen durchgehend gekühlt (4°C) weiterpräpariert. Die Zellsuspension wurde mit kaltem PBS zwei Mal zehn Minuten gewaschen. Anschließend wurde der nach Zentrifugation bei 453 rcf entstehende Überstand dekantiert und das gewonnene Pellet mit frischem PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann zur Zellzählung und -differenzierung sowie in der Durchflusszytometrie oder im Proliferationsassay verwendet. Zur weiteren proteomischen Analyse mittels Gelelektrophorese wurde die Suspension je nach

---

<sup>25</sup> Fa. Dr. Schumacher, Melsungen

<sup>26</sup> KABE Labortechnik

<sup>27</sup> Fa. Sarstedt, Nürnberg

<sup>28</sup> Fa. Biochrom AG, Berlin

Zellzahl aliquotiert und erneut bei 453 rcf zentrifugiert. Die gebildeten Leukozytenpellets wurden dann in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.2.2 Zählen und Differenzieren der gewonnenen Zellen

Zum Festlegen der Zellzahl der Probe wurden je 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und von dieser Mischung 10 µl in eine Neubauer-improved Zählkammer<sup>29</sup> gegeben. Dann wurden von den vorliegenden 25 Gruppenquadraten diagonal 5 Gruppenquadrate ausgezählt und zur Bestimmung der Zellzahl pro ml die Anzahl der Zellen mit  $5 \times 10^4$  multipliziert. Zur Berücksichtigung der Verdünnung mit Trypanblau, wurde der errechnete Wert zudem mit 2 multipliziert. Die Zellzahl wurde demnach wie folgt errechnet: gezählte Zellen  $\times 5 \times 10^4 \times 2 =$  Zellen pro ml.

Zur Differenzierung wurden weitere  $1 \times 10^5$  Zellen mittels Zytospinzentrifugation auf einen Objektträger<sup>30</sup> übertragen. Zu diesem Zweck wurde das entsprechende Zellsuspensionsvolumen mit 200 µl PBS in den Kaminaufsatz für die Zytozentrifuge<sup>31</sup> gegeben und zwei Mal, unter Wechseln des Kamins, vier bis fünf Minuten bei 170 rcf zentrifugiert. Um die Zellen in den zytologischen Präparaten differenzieren zu können, wurden diese nach zehn bis 30 Minuten Lufttrocknung mittels der Färbung nach Pappenheim angefärbt. Bei 100-facher Vergrößerung wurden anschließend im Mikroskop 100 Zellen mäanderförmig ausgezählt und den jeweiligen Leukozytenpopulationen zugeordnet.

### 3.2.3 Aufbereitung der PBL Pellets

Zur späteren Verwendung der Zellproteine in der ein- und zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden die Zellstrukturen der PBL durch Zugabe von 200 bis 500 µl (je nach Größe des Zellpellets) Lysepuffer zerstört.

Zur weiteren Verarbeitung der Proben musste die bei der Lyse der Zellen entstandene gallertartige Masse (DNA Gallerte) aus dem Zelllysate entfernt werden. Dabei wurden zwei Methoden, vorzugsweise jedoch die als zweites beschriebene, angewendet.

---

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

<sup>30</sup> Menzel-Gläser, Braunschweig

<sup>31</sup> Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

### **Optima TLX Ultrazentrifuge 120000 rpm**

Die Zellysate wurden in der Optima TLX Ultrazentrifuge 120000 rpm<sup>32</sup> 50 Minuten mit 53000 rcf bei 22°C zentrifugiert. Dabei setzte sich die gallertartige Masse pelletartig an der Wand der Beckmann Centrifuge Tubes<sup>33</sup> ab. So konnte durch Abpipettieren des proteinhaltigen Überstandes die Probe von der DNA Gallerte getrennt werden. Die Zellysate wurden entweder zur späteren Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

### **QIAshredder Zellysat Homogenisator**

Durch Übertragen der Probe in den QIAshredder Zellysat Homogenisator<sup>34</sup> und anschließender zweiminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit (16100 rcf) wurde die gallertartige Masse aus der Probe extrahiert. Die so behandelten Proben wurden direkt weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

### **3.3 Bestimmen der Proteinkonzentration der Zellysate**

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

H <sub>2</sub> O	800 µl
Bradford-Reagenz <sup>35</sup>	200 µl

Die Erstellung einer Eichkurve erfolgte mit einem zehnpromzentigen BSA Standard, der in den Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8 µg/ml Reaktionslösung gemessen wurde. Von den Proben wurden jeweils 1 bis 10 µl zu der Reaktionslösung gegeben. Das Volumen der zu messenden Proteinlösung wurde dabei so gewählt, dass die Messwerte im linearen Bereich der Eichkurve lagen. Die photometrische Bestimmung

---

<sup>32</sup> Fa. Beckman Coulter, Krefeld

<sup>33</sup> Fa. Beckman Coulter, Krefeld

<sup>34</sup> Fa. QIAGEN, Hilden

<sup>35</sup> Fa. BioRad, München

der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde dann entsprechend an der Eichgerade abgelesen und gemäß der eingesetzten Probenmenge berechnet.

### 3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### 3.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Die eindimensionale Auftrennung der Leukozytenproteine erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). In einer Mini Protean II Cell Gießkammer<sup>36</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 8% mit einem Sammelgel von 2 cm Länge und mit einer Acrylamidkonzentration von 4% überschichtet. Zur Herstellung von zwei Gelen wurden folgende Lösungen angesetzt:

	<b>Trenngel 8%</b>	<b>Sammelgel 4%</b>
<b>Aqua bidest.</b>	4,84 ml	6,17 ml
<b>Gelpuffer pH 8,8</b>	2,50 ml	--
<b>Sammelgelpuffer pH 6,8</b>	--	2,50 ml
<b>Acrylamidlösung 30%</b>	2,66 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. Das Trenngel wurde sofort nach Abschluss des Gießens mit Isopropanol überschichtet. Dieses wurde nach der Polymerisierung des Trenngels entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Um eine Auftrennung mehrerer Proben in einem Gel zu ermöglichen, wurde vor der Polymerisierung in das Sammelgel ein Kamm zur Vorformung von Probenaschen eingelassen. Die aufzutrennende Proteinpräparation wurde im Verhältnis 1:3 mit reduzierendem Probenpuffer verdünnt und fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Um später die Bandenhöhe ablesen zu können, wurde in einer der vorgeformten Taschen ein

---

<sup>36</sup> Fa. BioRad, München

Molekulargewichtsmarker<sup>37</sup> aufgetrennt, der Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht enthielt. Die restlichen Taschen wurden mit je 20 µl des Probengemisches bestückt und die Gele in die Elektrophoresekammern eingesetzt. Diese wurden dann mit Elektrophoresepuffer befüllt. Während der ersten zehn Minuten erfolgte die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 10 mA pro Gel, danach wurde schrittweise auf eine konstante Stromstärke von 25 bis 30 mA pro Gel erhöht (Power Pac 300 Power Supply<sup>38</sup>).

#### **3.4.1.1 Western Blot**

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in einem Semi-dry-Elektroblotter (Blue Flash-L)<sup>39</sup> vom Gel auf eine PVDF Transfer Membran<sup>40</sup> überführt. Die Blot-Papiere<sup>41</sup> und die PVDF Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und übereinander geschichtet. Auf die anodische Platte des Elektroblotters wurden zwei in Anodenpuffer I getränkte Blot-Papiere und ein in Anodenpuffer II getränktes Blot-Papier gelegt. Dann wurde die zuvor in Methanol und Aqua bidest. getränkte PVDF Membran und anschließend das SDS-Gel aufgelegt. Zum Abschluss wurden drei in Kathodenpuffer getränkte Blot-Papiere auf dem Gel platziert. Mit einer Glaspipette wurden sämtliche, die Elektrophorese störenden Luftblasen ausgestrichen und anschließend die kathodische Platte aufgesetzt. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte mit Hilfe eines BP 500 Plus Power Supply<sup>42</sup> bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm<sup>2</sup> und einer Transferzeit von 30 Minuten.

#### **3.4.1.2 Ponceau-Färbung der geblotteten Membranen**

Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die PVDF Membran nach Beendigung des Blots zehn Minuten in Ponceau-S-Färbelösung gefärbt und anschließend, um die Proteinbanden sichtbar zu machen, dreimal kurz mit Aqua bidest. gewaschen. Die Sensitivität der Ponceau-Färbung liegt bei 250-500 ng Protein (Salinovich and Montelaro, 1986). Die Membranen wurden im Anschluss mit PBS-T wieder entfärbt.

---

<sup>37</sup> Fa. Fermentas, St. Leon-Rot

<sup>38</sup> Fa. BioRad, München

<sup>39</sup> Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

<sup>40</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>41</sup> Fa. Machery-Nagel, Düren

<sup>42</sup> Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

### **3.4.1.3 Immunoblot**

Nach Blockierung der Membran mit einer PBS-Tween-Polyvinylpyrrolidone-Lösung (PBS-T-PVP, Inkubationszeit: eine Stunde bei RT) wurde diese dreimal je zehn Minuten mit PBS-T gewaschen und bei 4°C über Nacht mit einem Antigen-spezifischen, primären Antikörper in geeigneter Verdünnung inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut drei Mal je zehn Minuten mit PBS-T gewaschen. Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem zweiten, in PBS-T verdünnten, Peroxidase (POD)-konjugierten Antikörper inkubiert. Dann folgte ein letzter, sechs Mal zehn Minuten langer Waschschrift in PBS-T. Das Signal der POD-markierten Proteinbanden wurde durch die Enhanced Chemilumineszenz (ECL)-Entwicklung visualisiert. Zu diesem Zweck wurde die ECL-Lösung, wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben, angesetzt, auf die Membran aufgetragen und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte anschließend mit einem Röntgenfilm (SUPER-2000G, ortho, Fa.FUJI)<sup>43</sup> bei einer Belichtungszeit zwischen 30 Sekunden und drei Minuten, je nach Stärke des Signals. Die densitometrische Bildanalyse der Immunoblots erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben.

## **3.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

### **3.4.2.1 Rehydrierung der IPG Streifen**

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden auf 24 cm langen Kunststoffstreifen fixierte, getrocknete Polyacrylamidgele mit einem immobilisierten, nichtlinearen pH-Gradienten von 3-11 eingesetzt (Immobiline DryStrip pH 3-11 NL<sup>44</sup> (IPG-Strip), 24 cm). Mittels Rehydrierung wurden die Proteine auf die Streifen übertragen, indem die Proben mit Lysepuffer zu einem konstanten Volumen aufgefüllt (das Gesamtvolumen bestimmt die Dicke des zu rehydrierenden Gels) und mit Trägersubstanzen für die isoelektrische Fokussierung (Pharmalyte) versetzt wurden.

---

<sup>43</sup>,Fa. Christiansen, Planegg

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

Die Rehydrierungslösung für die 24-cm-Streifen setzte sich folgendermaßen zusammen:

Probe mit Lysepuffer	460,00 µl
Pharmalyte 3-10 <sup>45</sup>	04,60 µl
Bromphenolblau <sup>46</sup>	02,30 µl

Nach der Verteilung der Rehydratationslösung in die Vertiefung einer Quellkammer, wurde die Schutzfolie vom trockenen IPG-Streifen abgezogen und dieser unter Vermeidung von Luftblasenbildung, mit der Gelfläche auf die Probe aufgelegt. Um zu verhindern, dass der im Lysepuffer enthaltene Harnstoff auskristallisiert, wurde der Streifen anschließend mit entgastem Paraffinöl überschichtet. Die Rehydrierung der trockenen Streifen durch Aufnahme der Probe erfolgte innerhalb von fünf Stunden (In-Gel Hydrations-Methode).

### 3.4.2.2 Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer Multiphor II Elektrophoreseeinheit<sup>47</sup>. Beim Aufbau der Elektrophoreseeinheit wurde zwischen Kühlplatte und Wanne, sowie zwischen Wanne und Streifenhalter möglichst luftblasenfrei Paraffinöl pipettiert, um während der Fokussierung eine gleichmäßige Temperatur von 20 °C aufrechtzuerhalten. Die rehydrierten Streifen wurden mit der gequollenen Gelseite nach oben so auf dem Streifenhalter positioniert, dass ihre saure Seite zur Kathode und die basische Seite zur Anode zeigte. Nach dem Auflegen der angefeuchteten Elektrodenstreifen<sup>48</sup>, wurden die Elektroden platziert und die IPG-Streifen mit entgastem Paraffinöl überschichtet.

Durchgeführt wurde die isoelektrische Fokussierung der 24 cm langen IPG-Streifen mit Hilfe eines EPS 3501 XL Electrophoresis Power Supply<sup>49</sup>. Dafür wurden die in der folgenden Tabelle aufgezeigten Einstellungen festgelegt:

---

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

<sup>46</sup> Fa. Merck, Darmstadt

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

<sup>48</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

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

Phase	1	2	3	4
Spannung (V)	50	600	2000	3000
Max. Stromstärke (mA)	2	10	10	10
Max. Wirkleistung (W)	5	10	10	10
Zeit (h)	2	11	4	12

Die Fokussierung der 24 cm langen Streifen wurde bei einer Summe von ca. 50000 Vh beendet. Im Anschluss wurden die IPG-Streifen direkt für die zweite Dimension vorbereitet oder zur späteren Weiterverwendung in Klarsichthüllen bei -20°C gelagert.

### 3.4.2.3 Herstellung großer Gele

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurden sechs 12% Gele mit einer Schichtdicke von 1,0 mm und einer Größe von 25 x 20 cm in einem Ettan DALTsix Gel Caster<sup>50</sup> zeitgleich gegossen. Für die 12%Gele wurde folgende Lösung angesetzt:

Acrylamid (30%)	188,00 ml
Tris-Cl (1,5 M, pH 8,8)	113,00 ml
Aqua bidest.	140,00 ml
10% SDS	4,50 ml
Bromphenolblau-Lösung	0,75 ml

Unmittelbar vor dem Einfüllen der Lösung in die Kassetten wurden 3,0 ml 10% APS und 325 µl TEMED zugefügt. Durch die Zugabe von Bromphenolblau-Lösung konnte beim Einlaufen der Gel-Lösung in die Kassetten die ansteigende Gelfront besser beobachtet und der Gel-Fluss rechtzeitig unterbrochen werden. Die Gele wurden nach Abschluss des Gießvorganges mit Isopropanol überschichtet und nach einer Auspolymerisierungszeit von drei Stunden direkt in der zweiten Dimension eingesetzt oder über Nacht im Gel Caster bei 4°C feucht aufbewahrt.

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

#### 3.4.2.4 Äquilibrierung der IPG-Streifen und zweite Dimension

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

Reduktionslösung: Äquilibrierungslösung + DTT<sup>51</sup> (0,3 g/30 ml),

Carbamylierungslösung: Äquilibrierungslösung + Jodacetamid<sup>52</sup> (1,44 g/30 ml).

Der Carbamylierungspuffer enthielt außerdem 0,01% Bromphenolblau<sup>53</sup>, um die Lauffront bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese sichtbar zu machen. Ein Zusatz von DTT zum ersten Äquilibrierungspuffer diente der kompletten Reduktion von Disulfidbrücken zu SH-Gruppen, die anschließend mit Jodacetamid in stabile Carbamidomethyl-Gruppen umgewandelt wurden. Um das Auftreten elektroosmotischer Effekte während des Proteintransfers zu reduzieren, war in der Äquilibrierungslösung Harnstoff und Glycerin enthalten.

Nach der Äquilibrierung wurden die Streifen, unter Vermeidung von Luftblasenbildung zwischen Gel und Streifen, auf das Polyacrylamidgel aufgelegt, und anschließend mit in Laufpuffer aufgekochter und auf 56 °C temperierter Agarose (0,5%) überschichtet. Nach Abkühlung und damit Aushärtung der Agarose wurden die Gele in die Elektrophoresekammern eingesetzt und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Gele liefen 45 Minuten bei konstant 1,5 Watt pro Gel ein und wurden dann auf konstante 15 Watt pro Gel erhöht (BP 500 Plus Power Supply<sup>54</sup>).

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

---

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

<sup>52</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>53</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>54</sup> Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

### 3.4.3 Silberfärbung

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

Färbeschritt	Zeit	Lösung	Herstellung von 1 Liter
<b>Fixierung</b>	2 x 20 Min	50% Methanol 12% Essigsäure 0,0185% Formaldehyd	500 ml Methanol + 200 ml 60% Essigsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O + 500 µl Formaldehyd 37%
<b>Inkubation</b>	3 x 10 Min	50% Ethanol	500 ml Ethanol + 500 ml H <sub>2</sub> O
<b>Inkubation</b>	1 x 0,2 Min	0,8 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	200 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>55</sup> /1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Waschen</b>	2 x kurz	H <sub>2</sub> O	
<b>Silberimprägnierung</b>	1 x 20 Min	11,8 mM AgNO <sub>3</sub> 0,028% Formaldehyd	2 g AgNO <sub>3</sub> /1000 ml H <sub>2</sub> O + 750 µl Formaldehyd 37%
<b>Waschen</b>	1 x kurz	H <sub>2</sub> O	
<b>Entwicklung</b>	variabel	0,57 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,02 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,0185% Formaldehyd	60 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /1000 ml H <sub>2</sub> O + 25 ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Lösung (s.o.) + 500 µl Formaldehyd 37%
<b>Stoppen</b>	>10 Min	50% Methanol 12% Essigsäure	500 ml Methanol + 200 ml 60% Essigsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Konservierung</b>	>20 Min	20% Ethanol 2% Glycerin	200 ml Ethanol + 25 ml 80% Glycerin ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

**Tab 3.1.:** Entwicklungslösungen für die Silberfärbung eines Polyacrylamidgels.

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

### 3.4.4 Kolloidale Coomassie Färbung nach Kang et al.

Die Sensitivität dieser kolloidalen Coomassie-Färbemethode liegt bei 1 ng Protein (Kang et al., 2002).

	Zeit	Lösung	Herstellung von 1 Liter
<b>Waschen</b>	3 x 10 Min	H <sub>2</sub> O	
<b>Inkubieren</b>	Übernacht	0,02% Coomassie Brilliant Blue G250 2% Phosphorsäure 5% Aluminiumsulfat 10% Ethanol	20 g Coomassie Brilliant Blue G250 + 23,5 ml 85% Phosphorsäure + 50,0 g Aluminiumsulfat + 100 ml Ethanol ad 1000 ml Aqua bidest.
<b>Waschen</b>	2 x 10 Min	H <sub>2</sub> O	
<b>Entfärben</b>	beliebig	10% Ethanol 2% Phosphorsäure	100 ml Ethanol + 23,5 ml 85% Phosphorsäure Ad 1000 ml Aqua bidest.
<b>Waschen</b>		H <sub>2</sub> O	

**Tab. 3.2:** Kolloidale Coomassie Färbung eines Polyacrylamidgels nach Kang et al.

### 3.4.5 Aufbewahrung der gefärbten Gele

Zur Konservierung der gefärbten Gele, wurden diese falten- und luftblasenfrei unter Zugabe großer Mengen Wasser zwischen zwei Zellglasbögen<sup>56</sup> ausgestrichen, in Plastikrahmen eingespannt und für mindestens drei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Rahmen entfernt, das überstehende Zellophan abgeschnitten und die Gele in Klarsichtfolien aufbewahrt.

## 3.5 2D-DIGE

Für den Vergleich der PBL-Proben wurde die 2D-DIGE Technologie gewählt, um differenziell exprimierte Proteine zu quantifizieren und anschließend mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF oder LC-MSMS) zu identifizieren. Die Proben wurden mit der Minimal-Fluoreszenzmarkierungs-Methode (Viswanathan *et al.* 2006; Lilley and Friedman 2004) markiert. Die Sensitivität der Proteindetektion bei

<sup>56</sup> Fa. DETI GmbH, Meckesheim

dieser Methode liegt bei 0,1-0,2 ng Protein (Miller *et al.* 2006; Viswanathan *et al.* 2006; Lilley and Friedman 2004).

In diesem Zusammenhang binden die drei unterschiedlichen CyDye Fluorchrome (Cy2/Cy3/Cy5)<sup>57</sup> an die  $\epsilon$ -Aminoreste des Lysins der Proteine. Bei der Markierungsreaktion nach dem Minimalprinzip werden nur 3% der jeweiligen Proteine markiert und aus diesen 3% nur ein Lysin pro Protein, die restlichen Proteine bleiben unmarkiert. Jeder der drei Farbstoffe besitzt das gleiche Molekulargewicht (500 Da) und eine positive Ladung. Das zusätzliche Molekulargewicht der Farbstoffe beeinflusst das Laufmuster der Proteine kaum und auch der isoelektrische Punkt der Proteine ändert sich durch die Markierung mit den Fluorchromen nicht, da die positive Ladung des Lysins durch die positive Ladung des Farbstoffs ersetzt wird. Die Fluoreszenzmarkierung der Proben erfolgt vor der zweidimensionalen Proteinauftrennung und ist mit der massenspektrometrischen Proteinidentifikation kompatibel (da nur 3% der Gesamtmenge des Proteins markiert ist und die anderen 97% unverändert bleiben).

Nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden die Gele zwischen den Glasplatten mit Hilfe eines Laser-Fluoreszenz-Scanners (Typhoon Trio<sup>69</sup>)<sup>58</sup> eingescannt und so die Cy-Farbstoffe in ihren entsprechenden Wellenlängen detektiert. Typhoon Trio<sup>69</sup> scannt in drei Kanälen mit je einem blauen Laser bei 488 nm, einem grünen Laser bei 532 nm sowie einem roten Laser bei 633 nm Wellenlänge und produziert so aus einem SDS-Gel drei digitale Fluoreszenz Bilder. Diese wurden mit der ImageQuant TL Software<sup>59</sup> visualisiert, digital zugeschnitten und mit der DeCyder Version 6.5 Software<sup>60</sup> ausgewertet.

Um das Proteinmuster im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen wurden die Gele nach dem Scannen silbergefärbt, die mit der DeCyder 6.5 Software ermittelten differenziell exprimierten Spots auf dem dazu passenden Silbergel lokalisiert, ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF oder LC-MSMS) identifiziert.

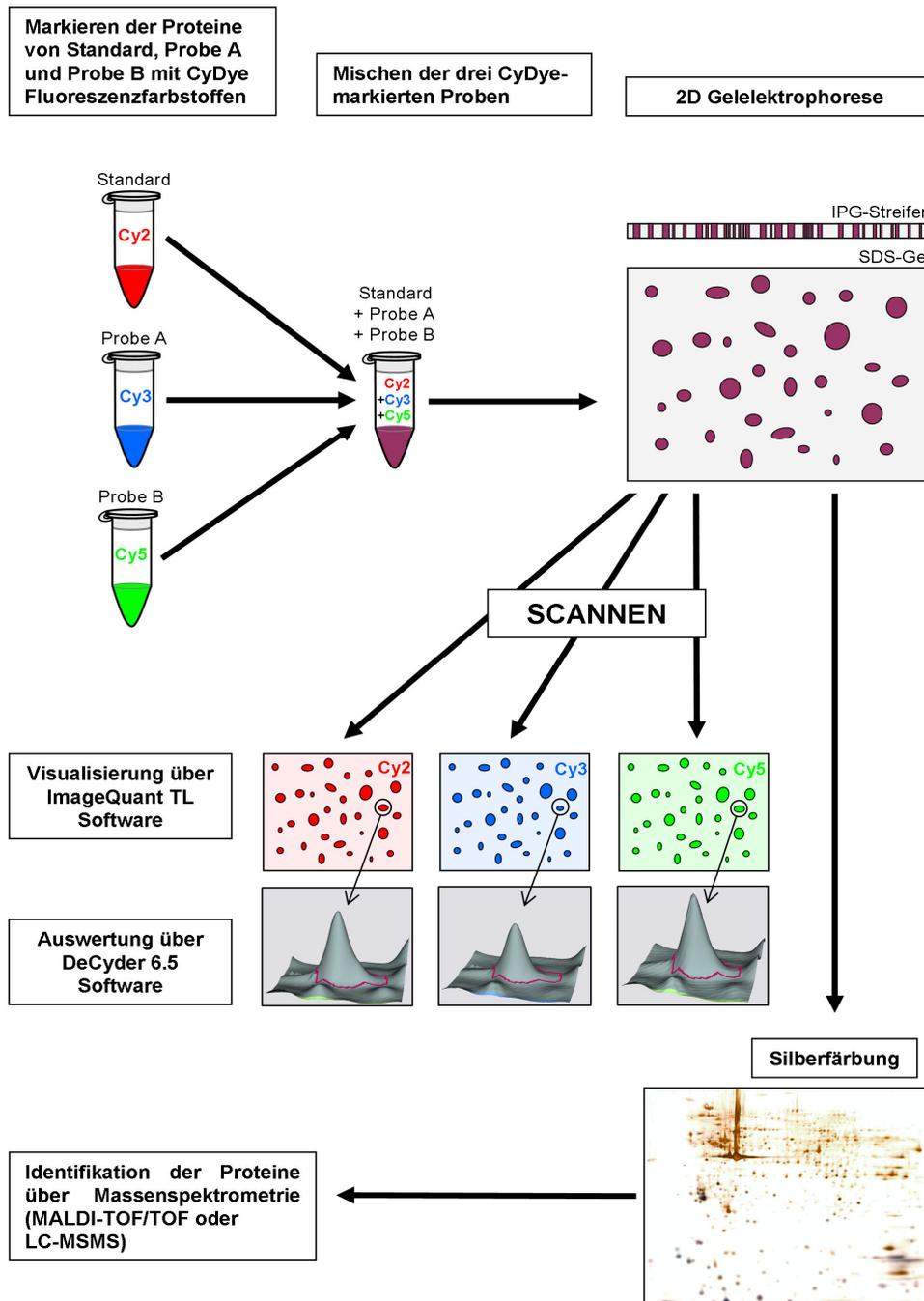
---

<sup>57</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>58</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>59</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

<sup>60</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der 2D-DIGE Methode.

Die PBL-Proben von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder Cy5 markiert, der interne Standard mit Cy2. Im Anschluss wurden die drei verschiedenen Proben gemischt und in einem Gel mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Einscannen der Gele mit Hilfe des Laser-Fluoreszenz-Scanners Typhoon Trio<sup>69</sup> entstanden drei digitale Fluoreszenzbilder, entsprechend der drei verschiedenen Farbstoffe. Zur Lokalisierung von differenziell exprimierten Spots wurden die Rohdaten aus dem Scanner mit der DeCyder 6.5 Software ausgewertet. Anschließend wurden die Gele silbergefärbt, die entsprechenden differenziell exprimierten Proteine ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF/TOF oder LC-MSMS massenspektrometrisch identifiziert.

### 3.5.1 Vorbereitung der Proben für die Markierung mit den CyDyes

Jede für die 2D-DIGE-Experimente ausgewählte PBL-Probe (Tab. 3.3 und 3.4) wurde unmittelbar nach dem Auftauen in DIGE Probenpuffer gelöst und entsprechend Kapitel 3.2.3 bearbeitet. Da für eine erfolgreiche Markierung der Proben mit den Fluoreszenzfarbstoffen (CyDyes) ein pH-Wert von über 8,0 gewährleistet sein muss (Viswanathan et al., 2006), wurden die Zellen in DIGE-Probenpuffer lysiert und nicht, wie sonst für die zweidimensionale Gelelektrophorese üblich, in Lysepuffer. Von jeder Probe wurden dann drei bis vier 50 µg-Aliquots vorbereitet. Abschließend wurde der pH-Wert mittels eines pH-Streifens<sup>61</sup> überprüft und die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die bei -20° C gelagerten CyDyes mussten vor Gebrauch in DMF<sup>62</sup> gelöst werden und wurden unmittelbar vor ihrer Rekonstitution bei Raumtemperatur aufgetaut. Zu jedem Farbstoffröhrchen wurden pro 5 nmol CyDye je 5 µl DMF hinzugegeben, die Lösungen 30 Sekunden gemischt und anschließend 30 Sekunden bei 12000 rcf zentrifugiert. Die so entstandene Lösung diente als konzentrierte Stammlösung. Zur Markierung der Proben wurde aus der konzentrierten Stammlösung durch eine 1:2,5 Verdünnung mit DMF eine verdünnte Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 400 pmol Farbstoff/µl erstellt.

### 3.5.2 Herstellung des internen Standards

Der interne Standard enthält zu gleichen Teilen alle im jeweiligen Experiment verwendeten Proben und dient bei der Auswertung der Gele zur Normalisierung der Gel-zu-Gel Schwankungen. Zur Herstellung des Standards wurde von jeder im Experiment vorkommenden ERU- und Kontrollprobe (Tab. 3.3 oder Tab. 3.4) jeweils ein Aliquot (à 50 µg) zusammengefasst und dann das resultierende Gesamtvolumen durch die Anzahl der Proben des Experiments dividiert. Die so entstanden 50 µg-Aliquots repräsentieren alle im jeweiligen Experiment vorkommenden Proben.

So enthält zum Beispiel Experiment 2 insgesamt 12 unterschiedliche Proben bestehend aus sechs ERU- und sechs Kontrollproben. Zur Herstellung des internen Standards wurden je 50 µg von jeder der 12 Proben zu einer großen Portion zusammengefasst und gemischt. Dieser, insgesamt 600 µg Protein enthaltende,

---

<sup>61</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>62</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

interne Standard wurde zur Weiterverwendung in 12 Portionen zu je 50 µg aliquotiert und in jedem Gel gemeinsam mit den zu vergleichenden Proben aufgetrennt.

### 3.5.3 Fluoreszenzmarkieren der Proben

Zu den vorbereiteten, auf Eis gelagerten Aliquots (je 50 µg Protein) wurde gemäß Markierungsschema in Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 je 1 µl (400 pmol/50 µg Protein) des entsprechenden Farbstoffs dazugegeben. Um eine einseitige Beeinflussung der Auswertung durch die einzelnen CyDyes auszuschließen, wurden die Farbstoffe Cy3 und Cy5 zwischen den beiden Probengruppen Gesund und ERU ausgetauscht („Reverse Labeling“). Cy2 wurde in beiden Experimenten für den internen Standard benutzt. Nach Zugabe der Farbstoffe wurden die Proben kurz gemischt und zur Inkubation 30 Minuten auf Eis gestellt.

Die anschließende Zugabe von 1 µl Lysin zu jeder Probe beendete durch kompetitive Verdrängung des Farbstoffes die Markierungsreaktion. Nach weiteren zehn Minuten Inkubationszeit wurden jeweils eine ERU- und eine Probe eines gesunden Pferdes, sowie einer der internen Standards zusammengefügt. Anschließend wurden die Proben für die isoelektrische Fokussierung entsprechend Kapitel 3.4.2 aufbereitet.

### 3.5.4 2D-DIGE-Experiment 1: Markierung der lymphozytären Proben mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

Im DIGE-Experiment 1 wurden die Lymphozytenproben (93 +/- 4% Lymphozyten) von fünf an ERU erkrankten und fünf gesunden Pferden verglichen. Die im Experiment verwendeten Pferde und die entsprechende Markierung der Proteine mit den verschiedenen CyDye Fluoreszenzfarbstoffen sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Gel	PBL-Probe Kontrollen	Farbstoff	PBL-Probe ERU	Farbstoff	Interner Standard	Farbstoff
1	Gino	Cy3	Carter	Cy5	interner Standard	Cy2
2	Fenja	Cy3	Landino	Cy5	interner Standard	Cy2
3	Quidditch	Cy3	Melly	Cy5	interner Standard	Cy2
4	Siera	Cy5	Sacramento	Cy3	interner Standard	Cy2
5	Messina	Cy5	Gigolo	Cy3	interner Standard	Cy2

**Tab. 3.3:** Markierungsschema der lymphozytären Proben mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.

### 3.5.5 2D-DIGE-Experiment 2: Markierung der gemischt granulo- und lymphozytären Proben mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

Im zweiten DIGE-Experiment wurden gemischt granulo- und lymphozytäre Proben untersucht (60 +/- 5% Lymphozyten), wobei die peripheren Blut-Leukozyten sechs gesunder und sechs an ERU erkrankter Pferde mit einander verglichen wurden. Die Proteinmarkierung mit den Fluorchromen erfolgte entsprechend der Tabelle 3.4.

Gel	PBL-Probe Kontrollen	Farbstoff	PBL-Probe ERU	Farbstoff	Interner Standard	Farbstoff
6	Sisko	Cy3	Quincy G	Cy5	interner Standard	Cy2
7	Paul	Cy3	Senela	Cy5	interner Standard	Cy2
8	Florence	Cy3	Prime Joy	Cy5	interner Standard	Cy2
9	Future	Cy5	Psayad	Cy3	interner Standard	Cy2
10	Piaster	Cy5	Moritz	Cy3	interner Standard	Cy2
11	Shiva	Cy5	Carrigane	Cy3	interner Standard	Cy2

**Tab. 3.4:** Markierungsschema der gemischt granulo- und lymphozytären Proben mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.

### 3.5.6 Scannen der Gele

Im Anschluss an die 2D-Gelelektrophorese wurden die Gele zwischen den Glasplatten in den entsprechenden Wellenlängen (siehe Tab. 3.5) der CyDye Fluorchrome mit Hilfe des Typhoon Trio<sup>69</sup> Scanners<sup>63</sup> einscannet.

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

**Tab. 3.5:** Einstellungen für den Typhoon Trio<sup>69</sup> Scanner.

Zunächst wurde eine Voransicht des Gels bei 1000 microns durchgeführt, um einen optimalen PMT (Photomultiplier Tube)-Wert zu erzielen. Der PMT-Wert legt die

<sup>63</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

gewünschte Pixelintensität fest, die von dem ImageQuant TL Programm<sup>64</sup> berechnet wird und 95000 nicht überschreiten sollte. Der endgültige Scan der Gele erfolgte mit einer Auflösung von 100 micrones.

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

### **3.5.7 Statistische Auswertung der Fluoreszenzgele mittels DeCyder 6.5 Software**

Die einzelnen Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe der ImageQuant TL Software digital so zugeschnitten, dass beim Scannen entstandene Artefakte, zum Beispiel die überproportional starke Fluoreszenz des IPG-Streifens, die folgende Bildanalyse nicht weiter behinderten. Anschließend wurden sie in das DIA (Differential In-gel Analysis)-Modul der DeCyder 6.5 Software importiert. Die statistische Auswertung erfolgte über den Student's *t*-Test.

#### **3.5.7.1 Differential In-gel Analysis – DIA**

Ein Fluoreszenzgel besteht aus drei digitalen, den unterschiedlichen Fluorchromen entsprechenden Einzelbildern. Im DIA-Modul, dem ersten Schritt der DeCyder Gelauswertung, werden diese Einzelbilder in einer Intra-Gel Analyse (Tannu and Hemby, 2006) untereinander verglichen. Neben der Spotdetektion wird im DIA eine Normalisierung des Volumens der Cy3 (Probe 1) und Cy5 (Probe 2) markierten Spots im Bezug zu den Cy2 (interner Standard) markierten Spots durchgeführt (Cy3/Cy2 und Cy5/Cy2). Die Normalisierung der Proben gegen den internen Standard erlaubt die spätere Anwendung des Student's *t*-Tests.

Nach dem Importieren der Gel-Daten wurden zunächst die Parameter für die Spotzahlermittlung bestimmt und die Farbstoffe den Einzelgelbildern zugeordnet. Die geschätzte Spotanzahl wurde auf 2500 Spots pro Gel festgelegt. Um richtig positive Spots ein- und falsch positive Spots auszuschließen, wurden die Ausschlußparameter Slope > 2 (zu steiler Anstieg und damit ein Hinweis auf Staubartefakte) und Spotvolumen < 30000 definiert. Anschließend wurde eine automatische Spotdetektion, sowie die manuelle Überprüfung und Nachbesserung der einzelnen Spotübereinstimmungen durchgeführt. Nach der händischen Korrektur

---

<sup>64</sup> Fa.GE Healthcare, Freiburg

mussten die Gele re-normalisiert werden. Jedes Gel der Auswertung wurde separat im DIA-Modul bearbeitet. Durch den Intra-Gel Vergleich im DIA wurden für jedes eingescannte Gel die Spots detektiert und dann aus den drei verschiedenen Datensätzen pro Gel die Abundanzunterschiede der Proteine verglichen. Darauf folgte der Inter-Gel-Vergleich im BVA.

### 3.5.7.2 Biological Variation Analysis – BVA

Das BVA (Biological Variation Analysis)-Modul dient dem Vergleich der Gele untereinander (Inter-Gel Vergleich) (Tannu and Hemby 2006).

Alle im DIA-Modul bearbeiteten Gele eines Experiments wurden in das BVA-Modul importiert. Zunächst mussten die zu vergleichenden Gruppen (ERU-/Kontrollproben) mit den entsprechenden Gelen, Farbstoffen und Rahmenparametern festgelegt werden:

Interner Standard:	Cy2
Gruppe 1 (Kontrollproben):	Cy3 oder Cy5
Gruppe 2 (ERU-Proben):	Cy5 oder Cy3

Dann folgte ein erster, automatisierter Vergleich aller Gele untereinander. Das Gel mit der besten Auflösung und den meisten Spots wurde als Master-Gel definiert und die restlichen Gele des Experiments wurden dann an diesem Master abgeglichen. Der Vergleich der restlichen Gele mit dem Master-Gel wurde manuell überprüft und verbessert. Zusätzlich wurden, um den Abgleich der Gele untereinander zu optimieren, definierte Referenzpunkte auf den verschiedenen Einzelbildern festgelegt. Nach diesem Bearbeitungsschritt erfolgte abschließend ein automatisierter Neuabgleich unter allen Gelen. Für den Vergleich der Proteinexpression in den zwei Gruppen (ERU- und Kontrollproben) wurde der Student's *t*-Test angewendet und die Abweichungen in der Proteinexpression wurden zusätzlich noch mit dem Volumenverhältnis (average ratio) der unterschiedlich markierten Proben dargestellt.

Das BVA-Modul ermöglicht die Darstellung der Gele in verschiedenen Ansichten, so können die unterschiedlichen Spots vergleichend zwei- und dreidimensional erfasst werden. Zusätzlich zeigen eine Übersichtsgrafik und eine tabellarische Auflistung mit den statistischen Parametern die Einordnung der jeweiligen Spots eines Gels im Vergleich zu den korrespondierenden Spots in den anderen Gelen an. Die

Übersichtsgrafik ermöglicht zudem die Beurteilung des Expressionsmusters eines bestimmten Spots in allen Gelen des jeweiligen Experiments.

Die differenziell exprimierten Spots wurden auf einer von der Software erstellten Übersichtskarte (Abb. 4.4 DIGE 1 und Abb. 4.12 DIGE 2) farblich markiert. Von dieser Karte wurde ein maßstabsgetreuer Ausdruck auf einer transparenten Folie angefertigt und anhand dieser Folie konnten die Spots auf dem silbergefärbten Gel lokalisiert, ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF oder LC-MSMS) identifiziert werden.

### 3.6 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen

#### 3.6.1 Entfärben und Verdauen der Proteinspots

Die massenspektrometrisch zu analysierenden Spots wurden mit einem Skalpell<sup>65</sup> aus den zwischen Zellglasbögen verpackten, silbergefärbten Gelen ausgeschnitten. Bei der Rehydrierung der Spots in je 100 µl Millipore-Wasser wurden die Zellglasbögen<sup>66</sup> von den Gelstücken entfernt und die silbergefärbten Spots mit folgenden Lösungen entfärbt:

30 mM Kaliumferricyanid<sup>67</sup> (98,76 mg ad 10 ml H<sub>2</sub>O)

100 mM Natriumthiosulfat<sup>68</sup> (248,18 mg ad 10 ml H<sub>2</sub>O)

Die frisch hergestellten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung im Verhältnis 1:2 gemischt. Die Gelstücke blieben bis zur sichtbaren Entfärbung in einer 96-Loch-Polystyrol-Platte<sup>69</sup> in je 100 µl der Entfärbelösung und wurden anschließend einmal eine Minute und zweimal je fünf Minuten in Aqua bidest. sowie dreimal für je 15 Minuten in Acetonitril<sup>70</sup> (40%) gewaschen.

Zum Verdau der Spots wurde eine Trypsin-Lösung (0,5 µg Trypsin<sup>71</sup>/µl) mit einer Tris-Lösung (1 mM, pH 9,5) im Verhältnis 1:50 verdünnt und pro Spot maximal 10 µl von dieser Lösung zugegeben. Dieser Spotverdau mit Trypsin führte durch die

---

<sup>65</sup> Fa. Neo Lab, Heidelberg

<sup>66</sup> Fa. DETI GmbH, Meckesheim

<sup>67</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>68</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>69</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>70</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>71</sup> Fa. Promega, Mannheim

Spaltung der Proteine zwischen den Aminosäuren Arginin und Lysin zur Entstehung genau definierter Proteinfragmente. Die Gelstücke wurden über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C in der Verdauungslösung inkubiert.

### 3.6.2 Massenanalyse

Die massenspektrometrische Analyse der verdauten Proteinspots erfolgte entweder mittels MALDI-TOF peptide mass fingerprinting und MS/MS in einem MALDI-TOF/TOF Tandem Massenspektrometer (ABI 4700 Proteomics Analyzer)<sup>72</sup> oder mittels LC-MSMS in einem Ultimate3000 nano HPLC System, welches online an ein LTQ OrbitrapXL Massenspektrometer mit einer nano Ionen-Sprüh Quelle gekoppelt ist.

#### 3.6.2.1 MALDI-TOF/TOF

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

2,5 mg  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure<sup>73</sup> pro  
1 ml 70% Acetonitril<sup>74</sup> + 0,1% Trifluoressigsäure<sup>75</sup>

Auf dem Probenhalter wurden je 0,5  $\mu$ l dieser Lösung mit 0,5  $\mu$ l der verdauten Probe vermischt. Nach Verdunsten des Lösungsmittels und der damit einhergehenden Kokristallisation der Analytmoleküle mit den Matrixmolekülen, konnte der Probenhalter in das Massenspektrometer eingelegt werden. Nach Erzeugung eines Hochvakuums erfolgte der Beschuss der Kristalle mit einem UV-Laser. Die Auftrennung der durch den Laserimpuls gebildeten und innerhalb der Ionenquelle beschleunigten Ionen erfolgte mittels eines Flugzeitanalysators (TOF-Analysator, engl.: time-of-flight), der die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z-Verhältnis) auftrennt, wobei das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung dem Quadrat der Flugzeit proportional ist. Die Detektion der Ionen erfolgte mit Hilfe eines Sekundärelektronenvervielfachers

---

<sup>72</sup>,Fa. Applied Biosystems, Darmstadt

<sup>73</sup> Fa. Bruker Daltonics, Bremen

<sup>74</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>75</sup> Fa. PerkinElmer, Rodgau - Jügesheim

(SEV) zur Signalverstärkung und eines Transientenrekorders zur Digitalisierung des Signals. Das digitalisierte Signal wurde in einen Computer eingelesen und mit einem Datenverarbeitungsprogramm kalibriert und analysiert. Zusätzlich zur Messung der Massenspektren der jeweiligen Peptide (peptide mass fingerprinting, PMF) erfolgte eine Sequenzanalyse der im PMF signalstärksten Peptide (MS/MS).

Zur Ermittlung der Spektren im positiven Ionen Reflektor Modus wurden 2500 Laserschüsse gemittelt und mit Hilfe einer externen Kalibrierung analysiert. Die Kalibrierung erfolgte anhand der Standardpeptide Angiotensin-2-acetat mit einer monoisotopischen Masse des  $[M+H]^+$  Ionensignals bei 1046.54 Da, Substanz P (1347.74 Da), Bombesin (1619.82 Da), und ACTH 18-3 (2465.20 Da)<sup>76</sup>.

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

### Datenbanken

Mit Hilfe der in eine GPS-Explorer Software integrierten MASCOT Datenbank Suchmaschine (Version 02.02.06)<sup>77</sup>, wurden die kombinierten PMF- und MS/MS-Peptid-Massenlisten mit den Einträgen in den öffentlichen Proteindatenbanken verglichen. Die Pferdesequenzen wurden von dem UCSC (genome browser) heruntergeladen (erste Freistellung 1. Januar 2007). Später waren die Pferdesequenzen in der UniRef100 Datenbank integriert. Zur Identifikation wurde die UniRef100 (UniProt) Datenbank vom 19.02.2009 (7309845 Sequenzen; 2612309257 residues) verwendet, unter Beachtung folgender Parameter: Einträge beschränkt auf Mammalia (514806 Sequenzen), 65 ppm Massentoleranz für Peptide, 0,3 Da

---

<sup>76</sup> Alle Kalibrationspeptide von Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>77</sup> ABI, Matrix Science Ltd., UK

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 ( $p < 0,05$ ) war (Scores größer als 54 waren signifikant für das Suchen in der Pferdedatenbank, Scores größer als 70 für die Suche in UniRef100).

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

Mascot:	<a href="http://www.matrixscience.com">http://www.matrixscience.com</a>
USCS:	<a href="http://www.genome.ucsc.edu">http://www.genome.ucsc.edu</a>
UniProt	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>

### 3.6.2.2 LC-MSMS

Die Liquid-chromatography mass spectrometry (LC-MSMS) Analyse wurde mit einem Ultimate3000 nano HPLC System durchgeführt, welches online an ein LTQ OrbitrapXL Massenspektrometer mittels einer Nano Spray Ionenquelle gekoppelt ist. Zunächst wurden die Proben aus dem in-Gel-Verdau unter ständigem Schütteln bei 4 °C für 15 Minuten in 30 µl 2% Acetonitril, 0,5% TFA extrahiert.

Das HPLC System ist mit einer Nano Trap Säule<sup>78</sup> (100 µm i.d. x 2 cm, gepackt mit Acclaim PepMap100C18, 5 µm, 100Å Material) und einer analytischen Säule<sup>79</sup> (75 µm i.d. x 15 cm, Acclaim PepMap 100 C18, 3 µm, 100Å Material) ausgestattet.

Die Probe wurde dann automatisch injiziert und mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/Minute in 5% Puffer B (98% Acetonitril, 0,1% FA in HPLC reinem Wasser) und 95% Puffer A (2% Acetonitril und 0,1% FA in HPLC reinem Wasser) auf die Nano Trap Säule geladen.

Nach fünf Minuten wurden die Peptide eluiert und auf der analytischen Säule aufgetrennt. Diese Auftrennung fand durch einen Gradienten von 5-40% Puffer B bei einer Flussrate von 300 nl/Minute über eine Zeit von 60 Minuten statt. Auf der Säule

---

<sup>78</sup> Dionex GmbH, Idstein

<sup>79</sup> Dionex GmbH, Idstein

verbleibende Peptide wurden durch einen 5 minütigen Gradienten von 40-100% Puffer B eluiert.

Die eluierten Peptide wurden direkt mittels Nano Spray Ionisierung ionisiert und in einem LTQ OrbitrapXL Massenspektrometer analysiert. Dazu wurden die fünf intensivsten Peptidionen aus dem Orbitrap MS Vorscan für die Fragmentanalyse in der linearen Ionenfalle ausgewählt. Als Auswahlkriterien wurden eine Intensität von mindestens 200 sowie eine minimal doppelte Ladung des Peptides festgesetzt.

Die normalisierte Kollisionsenergie für CID (collision induced dissociation) wurde auf einen Wert von 35 festgesetzt und die sich daraus ergebenden Fragmente mit einer normalen Auflösung in der linearen Ionenfalle detektiert.

Während der Fragmentanalyse wurde in der Orbitrap ein hochauflösendes MS-Spektrum (60000 FWHM) mit einer Massenbandbreite von 300 bis 2000 Da aufgenommen.

Um jedes Spektrum kalibrieren zu können wurde die LockMass Option aktiviert und die Ionen der Umgebungsluft mit einer Masse von 445,120020 Da als LockMass genutzt. Dieses Ion wird in der C-Trap gelagert und dann zusammen mit den Proben-Ionen in die Orbitrap injiziert. Jedes Spektrum wurde automatisch auf dieses Ion kalibriert um eine höchstmögliche Massengenauigkeit zu erreichen. Jedes Ion, das für die Fragmentierung selektiert wurde, wurde 30 Sekunden durch dynamischen Ausschluß ausgeschlossen.

### **Spektrumauswahl und Datenbanksuche**

Für die Datenbanksuche wurden die aufgenommenen Spektren mit der Bioworks Browser Software analysiert. Dazu wurde eine Peptidetoleranz von 10 ppm und die Fragmentionentoleranz von 1 Da festgelegt. Für die Analyse der Fragmentspektren wurden nur b- und y-Ionen verwendet und Cystein Carbamidomethylierung als feste, Methionin Oxidierung als variable Modifikation angegeben.

Als Datenbank wurde die Uniref100 (UniRef100 20090219 mit 7309845 Sequenzen; 2612309257 Residuen) mit allen Sequenzen, die von Säugetiereinträgen (514806 Sequenzen) stammen, ausgewählt.

### **Datenanalyse mit Scaffold**

Die Mascot-Ergebnisdateien wurden mit der Scaffold Software analysiert. Diese Software nutzt den PeptideProphet<sup>68-70</sup> Algorithmus um aus den Mascot Ergebnissen eine einfache Wahrscheinlichkeitswerte für die Peptididentifikationen zu berechnen. Die Suchergebnisse wurden in die Scaffold Software importiert und analysiert, wobei die gleichen Datenbanken und Modifikationen benutzt wurden wie für die Datenbanksuche.

Nach der Datenanalyse wurden folgende minimal Anforderungen für die Proteinidentifikationen festgelegt: 80% Wahrscheinlichkeit für Peptid Identifikationen, ein Minimum von zwei Peptiden pro Protein und ein Protein Wahrscheinlichkeits-Schwellenwert von 95%.

### **3.7 Densitometrische Bildanalyse der eindimensionalen Immunoblots**

Zur quantitativen Analyse der Intensität der Antikörperbindung in den eindimensionalen Immunblots wurden die Schwärzungsgrade der Immunblot-Signale densitometrisch bestimmt.

Hierzu wurden die entwickelten Röntgenfilme mit einem Scanner (ImageScanner)<sup>80</sup> unter Verwendung der Software LabScan 5.0<sup>81</sup> mit einer Auflösung von 600 dpi eingescannt. Die Bestimmung der Intensitäten der Signale erfolgte mit dem 1D-Analyseprogramm ImageQuant TL<sup>82</sup>. Dabei entspricht die Intensität der Stärke der Pixelintensität der jeweiligen Bande.

### **3.8 Durchflusszytometrie**

Um genauer identifizieren zu können, in welchen Lymphozytensubpopulationen die Proteine Septin 7 und Talin 1 exprimiert sind, wurden equine PBL mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) phänotypisiert. Die Gewinnung der Lymphozyten erfolgte, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, über die Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll Trennlösung.

---

<sup>80</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>81</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>82</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

Folgende primäre Antikörper wurden zur Phänotypisierung von Septin 7- und Talin 1-exprimierenden Zellen eingesetzt:

Antikörper	Entwickelt in	Spezifität	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
anti-Septin 7	Ziege	anti-Human	polyklonal	Everest Biotech	1:10 in Fluo-Puffer
anti-Talin 1	Maus	anti-Human	monoklonal	Serotec	1:15 in Fluo-Puffer
anti-CD4	Maus	anti-Pferd	monoklonal	Serotec	1:2 in Fluo-Puffer
anti-CD8	Maus	anti-Pferd	monoklonal	Serotec	1:2 in Fluo-Puffer
anti-Ki67	Maus	anti-Human	monoklonal	Dako	1:2 in Fluo-Puffer
anti-MHCII	Maus	anti-Pferd	monoklonal	Serotec	1:2 in Fluo-Puffer
anti-CD11a	Maus	anti-Human	monoklonal	Serotec	1:10 in Fluo-Puffer
anti-CD11b	Maus	anti-Human	monoklonal	Serotec	1:10 in Fluo-Puffer
anti-CD29	Maus	anti-Human	monoklonal	Serotec	1:10 in Fluo-Puffer
anti-CD49a	Kaninchen	anti-Ratte	polyklonal	Lifespan	1:5 in Fluo-Puffer
anti-iC3b	Maus	anti-Human	monoklonal	Quidel	1:20 in Fluo-Puffer

**Tab. 3.6:** für die Durchflusszytometrie verwendete, primäre Antikörper

### 3.8.1 Vorbereiten der Antikörper

Anti-Septin 7 und anti-Talin 1-Antikörper wurden direkt mit dem Fluorchrom Alexa488<sup>83</sup> gekoppelt. Dabei wurden jeweils 100 µg jedes Antikörpers mit Hilfe des Alexa Fluor 488 Antibody Labeling Kits<sup>84</sup> eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Alexa Fluor 488 Farbstoff inkubiert und der markierte Antikörper im Anschluss über eine Gel-Säule aufgereinigt. Alexa488 wird im FL1 Kanal des Durchflusszytometers detektiert.

Anti-CD4, CD8, Ki67, MHC II, CD11a, CD11b, iC3B, CD29 und CD49a Antikörper wurden zur Lymphozytenfärbung zusammen mit einem entsprechend passenden, Phycoerythrin gekoppelten sekundären Antikörper (Verdünnung 1:300 in Fluo-Puffer) eingesetzt. Phycoerythrin wird im FL2 Kanal detektiert.

### 3.8.2 Markieren der Zellen für die Durchflusszytometrie

Zunächst wurden die gewonnenen Lymphozyten mit PBS auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und dann je 100 µl dieser Zellsuspension in die Dellen

<sup>83</sup>Fa. Invitrogen, Karlsruhe

<sup>84</sup>Fa. Invitrogen, Karlsruhe

einer 96-Rundboden Lochplatte einpipettiert. Dies entspricht einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Delle.

Nach Zentrifugieren der Platte (10 s, 652 rcf, 4°C) wurde der Überstand aus den Dellen ein Mal kräftig dekantiert, die verbleibenden Zellpellets in einer Mischung aus Fluoreszenz (Fluo)-Puffer und Antikörper (Septin 7 oder Talin 1) resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Antikörper, durch Zentrifugieren, Dekantieren und Resuspendieren in Fluo-Puffer, zwei Mal ausgewaschen und anschließend die Zellen 30 Minuten bei 4°C mit Mäuseserum blockiert.

Nach einem erneuten Waschschrift inkubierten die Lymphozyten nun 30 Minuten mit je einem der oben aufgelisteten Antikörper pro Delle, wurden abermals zwei Mal mit Fluo-Puffer gewaschen und schließlich mit einem sekundären, Phycoerythrin gekoppelten Antikörper weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Darauf folgten wiederum zwei Waschgänge. Schlussendlich wurden die Zellpellets in je 100 µl Fluo-Puffer resuspendiert, in FACS Röhren überführt und die Zellsuspension mit Fluo-Puffer auf ein Endvolumen von je 400 µl aufgefüllt.

Um die intrazytoplasmatische Expression von Septin 7 zu detektieren, wurde ein Teil der Zellen vor Beginn der Markierung 20 Minuten bei 4°C mit der „Fixation/Permeabilization solution“ eines Permeabilisierung Kits (Cytifix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit<sup>85</sup>) inkubiert. Der Fluo-Puffer wurde hier, bis auf den letzten Wasch Schritt und die Überführung in die FACS Röhren, durch den im Kit enthaltenen „Perm/Wash buffer“ ersetzt.

### **3.8.3 Detektieren der Zellen mit dem FACSCalibur System**

Mit dem FACSCalibur Immunozytometrie System<sup>86</sup> können tausende Zellen pro Sekunde detektiert werden. Das System besteht aus einem Argonlaser (488 nm) und einer roten Laserdiode (633 nm) und kann über bestimmte Filter bis zu vier verschiedene Emissionsspektren gleichzeitig registrieren. Das für die Fluoreszenz benötigte Anregungslicht muss in den jeweiligen Emissionsspektren der zur Zellmarkierung genutzten Fluorochrome enthalten sein. So lassen sich diese durch die gleiche Wellenlänge anregen, haben jedoch unterschiedliche, Farbstoff-spezifische Emissionsspektren, die in verschiedenen Kanälen registriert werden und so eine Phänotypisierung der Zellen ermöglichen.

---

<sup>85</sup> Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

<sup>86</sup> Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

Die fluoreszenzmarkierten Lymphozyten wurden aus den FACS Röhrcchen in das FACSCalibur System eingespeist und passierten durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette den gebündelten Argonlaserstrahl. Bei passender Wellenlänge wurden die Elektronen der Fluorochrome auf ein höheres Energieniveau gehoben und fielen, nach Beendigung der Anregung, unter Abgabe von Energie in Form von Photonen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Diese fluorchrom-spezifische Emission wurde über einen Photodetektor (photomultiplier tube, PMT) mit optischem Filter registriert und in elektrische Impulse umgewandelt, um anschließend über einen Analog-Digital-Wandler graphisch dargestellt werden zu können.

### **3.8.4 Auswertung der Durchflusszytometrie**

Die detektierten Zellen stellen sich im Histogramm als Punktwolke dar (Abb. 4.7 und 4.15). Jeder Punkt repräsentiert jeweils eine vom Laser registrierte Zelle. Das Histogramm zeigt zwei Parameter, den FL1- und den FL2 Kanal, an und ist in vier Quadranten unterteilt.

Im unteren linken Quadranten (LL) sind doppelt negative Ereignisse dargestellt, also nicht-Fluorchrom-gekoppelte Zellen, zum Beispiel Negativkontrollen. Im unteren rechten Quadranten (LR) sind einfach positive Zellen zu sehen, die mit dem Alexa488-gekoppelten Antikörper reagiert haben und aufgrund ihres spezifischen Emissionsspektrums im FL1 Kanal detektiert wurden. Lymphozyten, an die einer der Phycoerythrin-gekoppelten Antikörper gebunden hat werden im FL2 Kanal detektiert und sind im oberen linken Quadranten (UL) dargestellt. Im oberen rechten Quadranten (UR) erscheint nur dann ein Ereignis, wenn an einen Lymphozyten beide Fluorchrom-Antikörper gebunden sind, dieser somit zwei verschiedene Emissionsspektren hat, in beiden Kanälen registriert wird, und demnach doppelt positiv ist.

### **3.9 Zellproliferationsassay**

Lymphozyten eines gesunden Pferdes wurden, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, über Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Nach Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellsuspension in RPMI 1640<sup>87</sup> + 10% inaktiviertem FCS<sup>88</sup> +

---

<sup>87</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

1% Pen/Strep<sup>89</sup> auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt. Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Lymphozyten wurden anschließend in Triplikaten in sterile 96-Flachboden Lochplatten<sup>90</sup> eingesät und mit folgenden Mitogenen polyklonal stimuliert:

Concanavalin A (ConA) <sup>91</sup>	Endkonzentration 3,125 µg/ml
Phytohämagglutinin (PHA) <sup>92</sup>	Endkonzentration 3,125 µg/ml
Pokeweed Mitogen (PWM) <sup>93</sup>	Endkonzentration 3,125 µg/ml
Lipopolysacharid (LPS) <sup>94</sup>	Endkonzentration 25,00 µg/ml.

Um die Wirkung des Antikörpers Anti-Septin 7 (polyklonal, Entwickelt in der Ziege, Spezifität: anti-Human, Everest Biotech) auf polyklonal stimulierte periphere Blut-Lymphozyten zu untersuchen, wurde dieser im Zellproliferationsassay in einer Endkonzentration von 6 µg/ml eingesetzt.

Die Triplikate wurden nach folgenden Schemata pipettiert und anschließend mit Medium (RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strp) auf ein Volumen von 200µl aufgefüllt:

1. Zellsuspension
2. Zellsuspension + ConA
3. Zellsuspension + PHA
4. Zellsuspension + PWM
5. Zellsuspension + LPS
6. Zellsuspension + ConA + Anti-Septin 7
7. Zellsuspension + PHA + Anti-Septin 7
8. Zellsuspension + PWM + Anti-Septin 7
9. Zellsuspension + LPS + Anti-Septin 7
10. Zellsuspension + Anti-Septin 7

Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank<sup>95</sup> (CO<sub>2</sub> Auto-Zero) bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5%, wurden die Zellen mit [methyl-<sup>3</sup>H]Thymidin<sup>96</sup> radioaktiv

<sup>88</sup> Fa. Life Technologies, Karlsruhe

<sup>89</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>90</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>91</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>92</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>93</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>94</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

markiert (3,7 MBq/Kavität) und weitere 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Der Einbau des radioaktiven [methyl-<sup>3</sup>H]Thymidin in die DNA gibt Aufschluss über die proliferative Aktivität der Zellen.

Anschließend wurden die Lymphozyten mit dem Harvester<sup>97</sup> geerntet. Dabei wurden die Zellen aus den Kavitäten gespült, lysiert und die freigesetzte DNA an einem Glasfaserfilter<sup>98</sup> aufgefangen. Die Filter wurden 30 min bei 80°C im Trockenschrank getrocknet, danach in Omni Filterkassetten<sup>99</sup> eingelegt und mit Szintillationsflüssigkeit (20 µl/Kavität)<sup>100</sup> aufpipettiert.

Die [<sup>3</sup>H]-Aktivität wurde im Beta-Counter (TopCount NXT Microplate)<sup>101</sup> in counts per minute (CPM) gemessen.

Die Stimulationsindizes wurden folgendermaßen errechnet:

- [<sup>3</sup>H]-Radioaktivität der durch Mitogen stimulierten Zellen dividiert durch die Kontrolle (Zellen ohne Mitogen),
- die durch Mitogen stimulierten und mit Anti-Septin 7 inkubierten Zellen dividiert durch die Kontrolle und
- die mit Anti-Septin 7 stimulierten Lymphozyten dividiert durch die Kontrolle.

### 3.10 Immunhistochemische Untersuchungen

#### 3.10.1 Paraffinschnittherstellung

Von den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM360)<sup>102</sup> Schnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt. Diese wurden im Wasserbad auf beschichtete Objektträger<sup>103</sup> gezogen und anschließend auf einer Wärmeplatte (40°C) getrocknet. Um ein Abschwimmen der Präparate während der histologischen Färbeprozesse zu verhindern, wurden die Objektträger für mindestens 24 Stunden im Trockenschrank bei 39°C gelagert.

---

<sup>95</sup> Fa. Heraeus Instruments, München

<sup>96</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>97</sup> Fa. Packard, Dreieich

<sup>98</sup> Fa. Packard, Groningen

<sup>99</sup> Fa. Packard, Dreieich

<sup>100</sup> Fa. Perbio Science, Bonn

<sup>101</sup> Fa. Packard, Dreieich

<sup>102</sup> Fa. Microm, Walldorf

<sup>103</sup> Super Frost Plus, Fa. Neo Lab, Heidelberg

### 3.10.2 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden folgende primäre Antikörper verwendet:

Antikörper	Entwickelt in	Spezifität	Klonalität	Firma/Herkunft
anti-Septin 7	Ziege	anti-Human	polyklonal	Everest Biotech
anti-Talin 1	Maus	anti-Human	monoklonal	Abcam
anti-CD3ε	Ratte	anti-Human	monoklonal	Zellkulturüberstand
anti-Ki67	Maus	anti-Human	monoklonal	Dako
anti-MHCII	Maus	anti-Pferd	monoklonal	Serotec
anti-CD11a	Maus	anti-Human	monoklonal	Serotec
anti-CD11b	Maus	anti-Human	monoklonal	Serotec
anti-CD29	Maus	anti-Human	monoklonal	Serotec
anti-CD49a	Kaninchen	anti-Ratte	polyklonal	Lifespan
anti-iC3b	Maus	anti-Human	monoklonal	Quidel
anti-IFNγ	Ziege	anti-Pferd	polyklonal	R&D Systems

**Tab. 3.7:** Verwendete primäre Antikörper für die immunhistochemische Untersuchung

#### 3.10.2.1 Vorbereiten der Paraffinschnitte

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 in folgenden Puffern für die immunhistochemische Färbung demaskiert:

0,1 M EDTA-Puffer (pH 8,0)	15 Minuten kochen
TBS-T	3 x 5 Minuten waschen

### 3.10.2.2 Immunhistochemische Färbung von Septin 7 und Talin 1

Blockieren mit 1% BSA in TBS-T + 4% FCS für 45 Minuten.

Inkubation mit dem ersten primären Antikörper (direkt gelabelt mit Alexa488<sup>104</sup>)

anti-Septin 7                      1:20 in TBS-T + 1% BSA

anti-Talin 1                        1:20 in TBS-T + 1% BSA

über Nacht bei 4 °C.

3 x 5 Minuten waschen in TBS-T.

Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper

anti-CD3                            pur (Zellkulturüberstand)

anti-Ki67                           1:50 in TBS-T + 1% BSA

anti-MHCII                        1:50 in TBS-T + 1% BSA

anti-CD49a                        1:50 in TBS-T + 1% BSA

anti-CD29                         1:50 in TBS-T + 1% BSA

anti-CD11a                        1:50 in TBS-T + 1% BSA

anti-CD11b                        1:50 in TBS-T + 1% BSA

anti-IFN $\gamma$                         15  $\mu$ g/ml TBS-T + 1% BSA

anti-iC3B                         1:100 in TBS-T + 1% BSA

über Nacht bei 4 °C .

3 x 5 Minuten waschen in TBS-T.

Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper

Ziege-anti-Maus-IgG Alexa568<sup>105</sup>      1:500 in TBS-T

Ziege-anti-Ratte-IgG Alexa568<sup>106</sup>      1:500 in TBS-T

Ziege-anti-Kaninchen-IgG Alexa568<sup>107</sup> 1:500 in TBS-T

30 Minuten bei RT.

Die Kernfärbung erfolgte gleichzeitig mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)<sup>108</sup>.

---

<sup>104</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

<sup>105</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

<sup>106</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

<sup>107</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

3 x 5 Minuten waschen in TBS-T.

Abschließend wurden die Schnitte mit Dako fluorescent Mounting Medium<sup>109</sup> eingedeckelt. Die Färbung wurde mit dem Mikroskop Axio Imager M1<sup>110</sup> und der Software AxioVision 4.10<sup>111</sup> beurteilt und dokumentiert.

### **3.11 Statistische Auswertung**

In der Auswertung der DIGE-Experimente mittels der DeCyder Software 6.5 wurde für den Vergleich der Proteinexpression zwischen der ERU- und der Kontrollgruppe der Student's *t*-Test angewendet.

Für die Auswertung der Western Blots wurden über Imagequant die Schwärzungsgrade der jeweiligen Septin 7 oder Talin 1 Banden ermittelt und diese, ERU- und Kontrollproben vergleichend, mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf ihre Normalverteilung geprüft. Für Septin 7 war dieser Test nicht signifikant, womit eine Normalverteilung vorlag und die statistische Auswertung daher mit dem Student's *t*-Test erfolgte. Der Kolmogorov-Smirnov Test war für Talin 1 signifikant, somit lag keine Normalverteilung vor und wurde der Mann-Whitney Test zur statistischen Auswertung verwendet.

---

<sup>108</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

<sup>109</sup> Fa. DAKO, Hamburg

<sup>110</sup> Carl Zeiss AG, Oberkochen

<sup>111</sup> Carl Zeiss AG, Oberkochen

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Erstellen einer Proteinlandkarte aus equinen peripheren Blut-Lymphozyten

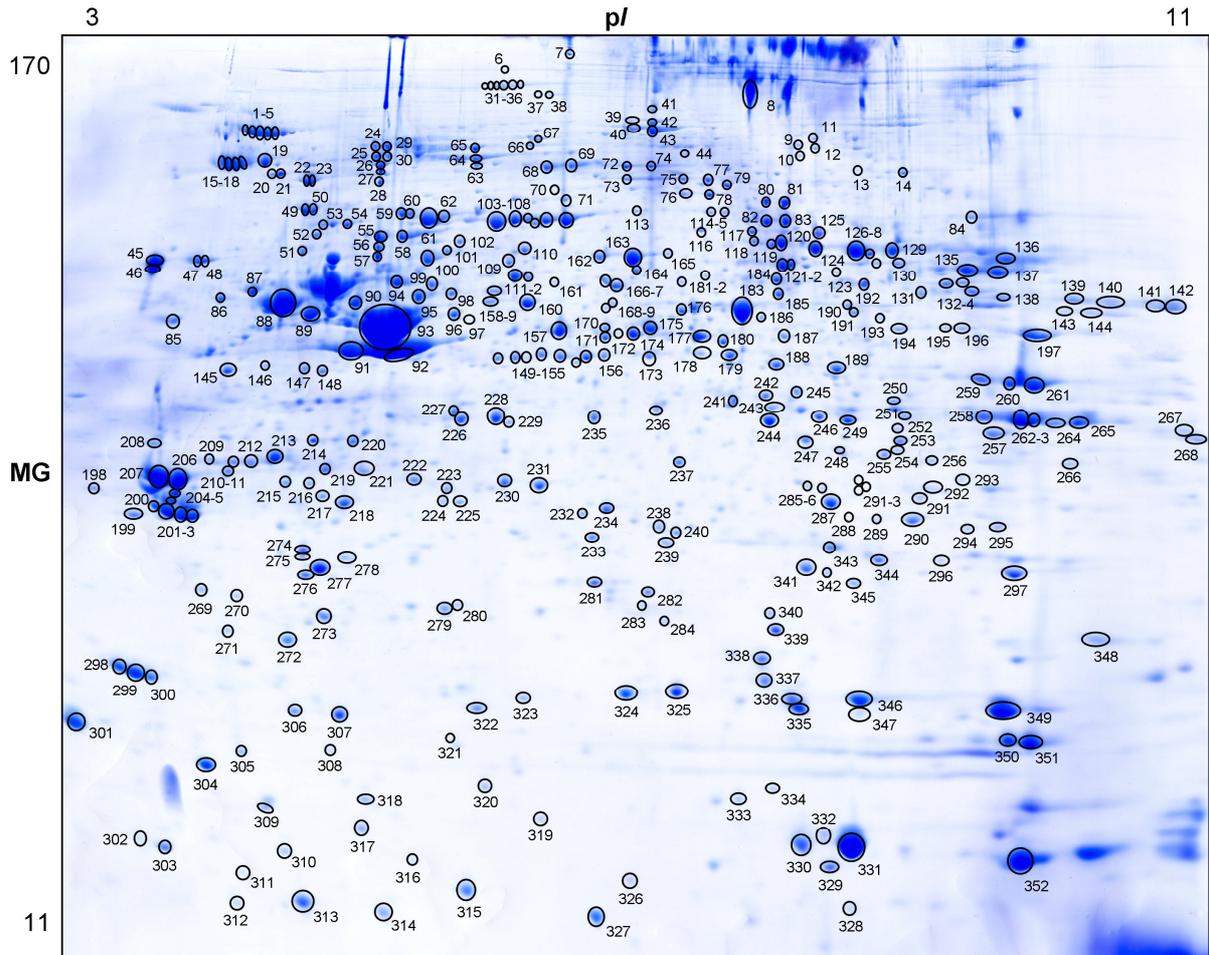
Aus Vollblut gewonnene Lymphozytenproteine von gesunden Pferden wurden zunächst auf einem 24 cm langen IPG-Streifen mit einem nichtlinearen Gradienten von pH 3-11 nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. In der zweiten Dimension erfolgte dann die Separation der einzelnen Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine liefen hier in einem zwölfprozentigen SDS-Gel und konnten in einem Gewichtsbereich von ca. 170-11 kDa hochauflösend aufgetrennt werden.

In Abbildung 4.1 ist ein repräsentatives, mit einem Milligramm Lymphozytenprotein beladenes Gel dargestellt. Bei der isoelektrischen Fokussierung laufen die basischen Proteine im Vergleich zu den sauren eine weitere Strecke durch den IPG-Streifen. Horizontal liegen somit die sauren Proteine im linken und die basischen im rechten Abschnitt des Gels. Vertikal können kleinere Proteine aufgrund ihrer geringen Masse weiter in den unteren Bereich des Gels wandern, wohingegen sich sehr große Proteine schon nach kurzer Laufstrecke weiter oben in der Gelstruktur festsetzen. So entsteht von links oben nach rechts unten ein Proteingefälle von groß und sauer nach klein und basisch.

Die mit kolloidaler Coomassie-Färbung nach Kang et al. sichtbar gemachten Proteine (Kang et al., 2002) waren gleichmäßig über das Gel verteilt und zeigten eine gute Auftrennung (Abb. 4.1). Das hier gezeigte Proteinmuster war in allen angefertigten SDS-Gelen gleich und gut reproduzierbar.

Mittels der DeCyder Software konnten in einem repräsentativen Gel aus dem DIGE-Experiment 1 (Abschnitt 4.2) insgesamt 1581 Spots ermittelt werden. Die Mehrzahl dieser detektierten Spots wurde anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

Die überwiegende Anzahl der ausgeschnittenen Spots konnte eindeutig massenspektrometrisch identifiziert werden, entweder mit einem Tandemmassenspektrometer (MALDI-TOF/TOF) oder aber mit dem Ionenfallenmassenspektrometer (LC-MSMS). 352 der ausgeschnittenen Spots hatten einen, je nach Datenbank, signifikanten Proteinscore und repräsentieren 229 unterschiedliche Proteine. Sie sind entsprechend mit ihren Proteinidentifikationen in Tabelle 4.1 in numerischer Reihenfolge aufgelistet.



**Abb. 4.1:** Peripheres Blut-Lymphozytenproteom eines augengesunden Pferdes, kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang et al.

Die Auftrennung der Lymphozytenproteine über zweidimensionale Gelelektrophorese erfolgte zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI 3-11) und dann auf einem zwölfprozentigen SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht (Mw 170-11 kDa). Von links oben nach rechts unten sind die Proteine von groß und sauer nach klein und basisch verteilt. Die massenspektrometrisch identifizierten Proteine mit signifikanter Auswertung sind nummeriert und in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Spot Nr. <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Accession Nummer <sup>d</sup>	Theoretical		Score <sup>g</sup>
				MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
1	Platelet glycoprotein IIb	Equus caballus	Q7YRP8	114943	5.53	564
2	Fruktose-Bisphosphat Aldolase A	Equus caballus	UPI0001796FD9	39889	8.30	399
3	Platelet glycoprotein IIb	Equus caballus	Q7YRP8	114943	5.53	744
4	Platelet glycoprotein IIb	Equus caballus	Q7YRP8	114943	5.53	622
5	Platelet glycoprotein IIb	Equus caballus	Q7YRP8	114943	5.53	713

Ergebnisse

6	Talin-1	Equus caballus	UPI0001797952	271880	5.75	112
7	Serpin B10	Equus caballus	B8K249	45484	6.13	215
8	Alpha-Enolase Isoform 1	Equus caballus	UPI000155DDF2	47509	6.37	358
9	Glykogen Phosphorylase, brain form	Equus caballus	UPI0001560179	90855	6.05	263
10	Glykogen Phosphorylase, brain form	Equus caballus	UPI0001560179	90855	6.05	347
11	Eukaryotischer Translations-Elongations Faktor 2	Equus caballus	UPI000179638C	96162	6.51	227
12	Eukaryotischer Translations-Elongations Faktor 2	Equus caballus	UPI000179638C	96162	6.51	290
13	Laktotransferrin	Equus caballus	O77811	75991	8.30	150
14	Aconitsäure Hydratase, mitochondrielle Isoform 1	Equus caballus	UPI0001560540	86301	7.36	491
15	von Willebrand factor	Equus caballus	UPI0001796184	305473	5.26	120
16	von Willebrand factor	Equus caballus	UPI0001796184	305473	5.26	353
17	von Willebrand factor	Equus caballus	UPI0001796184	305473	5.26	227
18	von Willebrand factor	Equus caballus	UPI0001796184	305473	5.26	136
19	Tumor rejection antigen 1 Isoform 10	Pan troglodytes	UPI0000E2335E	87865	4.75	632
20	Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	Equus caballus	UPI000155FDCB	54169	4.80	355
21	Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	Equus caballus	UPI000155FDCB	54169	4.80	461
22	Heat shock protein HSP 90-alpha (Fragment)	Equus caballus	Q9GKX7	83046	5.00	666
23	Heat shock protein HSP 90-alpha (Fragment)	Equus caballus	Q9GKX7	83046	5.00	456
24	Fibrinogen gamma	Equus caballus	UPI0001795BCD	51706	5.29	456
25	Fibrinogen gamma	Equus caballus	UPI0001795BCD	51706	5.29	497
26	Valosin	Equus caballus	UPI000179791F	91239	5.17	451
27	Aktin	Canis lupus familiaris	UPI0000EB1E88	45596	6.26	364
28	Aktin	Canis lupus familiaris	UPI0000EB1E88	45596	6.26	285
29	Fibrinogen gamma	Equus caballus	UPI0001795BCD	51706	5.29	375
30	Fibrinogen gamma	Equus caballus	UPI0001795BCD	51706	5.29	382
31	Talin-1	Equus caballus	UPI0001797952	271880	5.75	128
32	Talin-1	Equus caballus	UPI0001797952	271880	5.75	381
33	Talin-1	Equus caballus	UPI0001797952	271880	5.75	353

Ergebnisse

34	Talin 1 Isoform 12	Canis lupus familiaris	UPI00005A2478	269244	5.72	506
35	Talin 1	Equus caballus	UPI0001797952	271880	5.75	539
36	Talin 1	Equus caballus	UPI0001797952	271880	5.75	424
37	Talin 1	Equus caballus	UPI0001797952	271880	5.75	105
38	Talin 1	Equus caballus	UPI0001797952	271880	5.75	228
39	Vinculin Isoform 2	Equus caballus	UPI00017959E0	124363	5.50	242
40	Vinculin Isoform 1	Equus caballus	UPI00017959E1	117232	5.83	563
41	Vinculin Isoform 2	Equus caballus	UPI00017959E0	124363	5.50	240
42	Vinculin Isoform 2	Equus caballus	UPI00017959E0	124363	5.50	454
43	Vinculin Isoform 1	Equus caballus	UPI00017959E1	117232	5.83	500
44	Programmed cell death 6-interagierendes Protein	Homo sapiens	PDC6I_HUMAN	96590	6.13	69
45	Calreticulin	Equus caballus	UPI00015612A0	47517	4.33	272
46	Calreticulin	Equus caballus	UPI00015612A0	47517	4.33	535
47	Heat shock protein HSP 90-alpha (Fragment)	Equus caballus	Q9GKX7	83046	5.00	542
48	Lymphocyte-specific protein 1	Equus caballus	UPI000156159F	28336	4.42	262
49	Heat shock 70kDa protein 5	Equus caballus	UPI0001797A00	83020	5.21	936
50	Heat shock 70kDa protein 5	Equus caballus	UPI0001797A00	83020	5.21	899
51	Serin/Threonin-Protein Phosphatase 2A 65 kDa regulatorische Untereinheit A alpha Isoform	Homo sapiens	B4DQY1	61482	5.00	246
52	Alpha-1B-Glykoprotein	Equus caballus	UPI0001796AE1	68222	8.74	104
53	Calreticulin	Equus caballus	UPI00015612A0	47517	4.33	272
54	Heat shock protein HSP 90-alpha (Fragment)	Equus caballus	Q9GKX7	83046	5.00	542
55	Plastin-2 (L-plastin)	Equus caballus	UPI000155FADA	70175	5.25	215
56	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K Isoform 2	Pan troglodytes	UPI0000E21F0F	45262	5.27	154
57	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K Isoform 2	Pan troglodytes	UPI0000E21F0F	45262	5.27	154
58	Plastin-2	Equus caballus	UPI000155FADA	70175	5.25	226
59	Plastin-2	Equus caballus	UPI000155FADA	70175	5.25	285
60	Plastin-2	Equus caballus	UPI000155FADA	70175	5.25	266
61	Heat shock cognate 71 kDa Protein	Eutheria	P11142	70854	5.37	531

Ergebnisse

62	Splicing Faktor, Arginin/Serin-rich 10	Homo sapiens	Q59GA1	32255	11.08	221
63	Vinculin Isoform 1	Equus caballus	UPI00017959E1	117232	5.83	398
64	Advillin	Equus caballus	UPI000155E590	91883	5.43	690
65	Advillin	Equus caballus	UPI000155E590	91883	5.43	613
66	Glucosidase, alpha; neutral AB Isoform 1	Equus caballus	UPI000155F4B5	106944	5.60	171
67	Lung resistance-related Protein	Equus caballus	UPI000155F551	99353	5.56	495
68	Gelsolin	Equus caballus	Q28372	80777	5.58	95
69	Gelsolin	Equus caballus	Q28372	80777	5.58	178
70	Laktotransferrin	Equus caballus	TRFL_HORSE	75991	8.3	100% (8)
71	Albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5.95	69
72	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide	Equus caballus	UPI0001797674	83277	5.85	215
73	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide	Equus caballus	UPI0001797674	82821	5.85	102
74	Laktotransferrin (Fragment)	Equus caballus	O77811	75943	8.30	62
75	Moesin	Equus caballus	UPI0001560D86	67827	5.98	197
76	Moesin	Equus caballus	UPI0001560D86	67827	5.98	311
77	Moesin	Equus caballus	UPI0001560D86	67827	5.98	529
78	Moesin	Equus caballus	UPI0001560D86	67827	5.98	397
79	Ezrin	Equus caballus	UPI0001797D9D	69439	6.06	521
80	WD repeat domain 1	Equus caballus	UPI0001795F89	70060	6.29	146
81	WD repeat domain 1	Equus caballus	UPI0001795F89	70858	6.29	683
82	WD repeat domain 1	Equus caballus	UPI0001795F89	70060	6.29	255
83	WD repeat domain 1	Equus caballus	UPI0001795F89	70858	6.29	504
84	Transketolase	Equus caballus	UPI0001797236	54294	7.16	492
85	Nucleosome assembly Protein 1-like 1	Homo sapiens	B7Z9C2	40772	4.46	321
86	Histon-bindendes Protein RBBP4	Eutheria	Q09028	47626	4.74	194
87	Protein Disulfid Isomerase (P4HB Protein)	Equus caballus	UPI0001796A77	71363	5.34	763
88	Tubulin beta-2A chain	Euarchonto glires	Q13885	49875	4.78	588
89	Mitochondrielle ATP Synthase, H <sup>+</sup> transporting F1 complex beta subunit	Equus caballus	UPI00017963F7	56223	5.15	728
90	Fibrinogen gamma	Equus caballus	UPI0001795BCD	51706	5.29	569

Ergebnisse

91	Aktin, cytoplasic 1 (Beta-Aktin)	Canis lupus familiaris	UPI0000EB3482	43825	5.47	686
92	Beta Aktin Isoform 2	Monodelphis domestica	UPI0000F2DFFC	42311	5.56	685
93	Beta Aktin Variante (Fragment)	Homo sapiens	Q53G99	41738	5.37	495
94	60 kDa heat shock Protein, mitochondrial	Equus caballus	UPI000155FCAD	60920	5.83	553
95	Tubulin, beta 1	Equus caballus	UPI00017977C2	46321	4.98	436
96	Fibrinogen gamma	Equus caballus	UPI0001795BCD	51706	5.29	544
97	Succinyl-CoA Ligase beta-chain	Sus scrofa	SUCB2_PIG	47116	5.77	117
98	Tubulin alpha-2 chain	Canis lupus familiaris	UPI00005A5AA9	51037	4.98	469
99	Fibrinogen gamma	Equus caballus	UPI0001795BCD	51706	5.29	528
100	RNA binding motif Protein 12	Equus caballus	UPI00017977D0	150920	7.00	324
101	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K Isoform 12	Canis lupus familiaris	UPI000059FCC2	44247	8.19	543
102	Heat shock Protein 8 Isoform 3	Canis lupus familiaris	UPI00005A09CA	63782	5.42	615
103	Heat shock Protein 70	Equus caballus	UPI000155FDB3	70113	5.55	653
104	Annexin A6	Equus caballus	UPI000155F748	75708	5.51	337
105	Albumin	Equus caballus	P35747	70550	5.95	190
106	Annexin A6	Equus caballus	UPI000155F748	75708	5.51	82
107	Albumin	Equus caballus	P35747	68554	5.95	286
108	Albumin	Equus caballus	P35747	68554	5.95	328
109	Chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta) Isoform 1	Equus caballus	UPI0001560700	60212	5.51	396
110	T-complex Protein 1 subunit epsilon	Equus caballus	UPI000179772A	60193	5.58	428
111	WARS Protein	Equus caballus	UPI00017978B0	52994	5.62	632
112	Aktin-related Protein 3	Eutheria	P61158	47797	5.61	358
113	Albumin	Equus caballus	P35747	70550	5.95	138
114	12-Lipoxygenase	Equus caballus	UPI0001796D96	95468	7.14	92
115	Succinat Dehydrogenase complex, subunit A, Flavoprotein (Fp)	Equus caballus	UPI000179777F	86555	8.66	98
116	Collapsin response mediator Protein-2A Isoform 1	Sus scrofa	UPI00017F02FB	62682	5.95	402
117	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonucleotid Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase	Equus caballus	UPI00017961BA	66963	6.65	85

Ergebnisse

118	EH-domain containing 3	Equus caballus	UPI0001797226	60846	6.16	125
119	Fibrinogen beta	Equus caballus	UPI000155DF1E	55398	8.53	83
120	Coronin-1A	Equus caballus	UPI000155F57A	51680	6.40	287
121	Coronin-1A	Equus caballus	UPI000155F57A	51680	6.40	363
122	Leukocyte elastase inhibitor	Equus caballus	P05619	43036	5.78	430
123	Tyrosin-Protein Phosphatase non-Rezeptor Typ 6	Homo sapiens	PTN6_HUMAN	67918	7.65	82
124	Fibrinogen beta	Equus caballus	UPI000155DF1E	56082	8.53	406
125	Stress-indiziertes-Phosphoprotein 1	Equus caballus	UPI0001796CA8	67861	7.83	516
126	Fibrinogen beta	Equus caballus	UPI000155DF1E	56082	8.53	486
127	Catalase	Equus caballus	UPI0001796D9F	61507	7.33	633
128	UPF0027 Protein C22orf28	Eutheria	UPI000156076E	55674	6.77	183
129	Fibrinogen beta	Equus caballus	UPI000155DF1E	56082	8.53	406
130	Adenylylcyclase-assoziiertes Protein 1 (CAP 1)	Equus caballus	UPI000155DE95	51755	7.16	458
131	Integrin linked Kinase Isoform 4	Canis lupus familiaris	UPI00004A6506	51869	8.30	362
132	ATP Synthase subunit alpha, mitochondrial	Equus caballus	UPI0001796793	59784	9.23	553
133	ATP Synthase subunit alpha, mitochondrial	Equus caballus	UPI0001796793	59784	9.23	242
134	Fibrinogen A-alpha (Fragment)	Equus caballus	O97641	49591	6.45	230
135	Fibrinogen beta	Equus caballus	UPI000155DF1E	56082	8.53	426
136	Fibrinogen beta	Equus caballus	UPI000155DF1E	56082	8.53	386
137	Fibrinogen beta	Equus caballus	UPI000155DF1E	56082	8.53	326
138	Fibrinogen alpha	Equus caballus	UPI0001795BE4	97398	5.75	384
139	Fibrinogen alpha	Equus caballus	UPI0001795BE4	97398	5.75	481
140	Fibrinogen alpha	Equus caballus	UPI0001795BE4	97398	5.75	197
141	Eukaryotischer Translations-Elongations Faktor 1 alpha 1 Isoform 3	Equus caballus	UPI000155FE24	46878	9.13	255
142	Eukaryotischer Translations-Elongations Faktor 1 alpha 1 Isoform 4	Equus caballus	UPI000155FE24	46878	9.13	331
143	Septin 7	Equus caballus	UPI0001795EE2	49619	8.52	350
144	Septin 7	Equus caballus	UPI0001795EE2	49619	8.52	353
145	Ribosomales Protein SA	Equus caballus	UPI0001795FAD	31982	4.69	424

Ergebnisse

146	Spermin Synthase Isoform 2	Equus caballus	UPI00015608F4	38125	4.87	90
147	Ubiquitäres Tropomodulin U-Tmod	Equus caballus	UPI0001795BA7	39634	5.02	154
148	Ubiquitäres Tropomodulin U-Tmod	Equus caballus	UPI0001795BA7	39634	5.02	165
149	Glutaredoxin 3	Mus musculus	Q9CQM9	37778	5.42	100% (12)
150	Serin Proteinase Inhibitor Stamm B10	Equus caballus	UPI000155EBF0	45383	5.73	164
151	Scaffold attachment Faktor B	Equus caballus	UPI00017963D0	45401	5.66	100% (12)
152	Selenide, water dikinase 1	Homo sapiens	SPS1_HUMAN	43396	5.64	92.80
153	Serin Proteinase Inhibitor Stamm B10	Equus caballus	UPI000155EBF0	45383	5.73	255
154	Galactokinase	Canis lupus familiaris	Q9GKK4	42094	5.46	113
155	Leukocyte elastase inhibitor	Equus caballus	P05619	42979	5.78	173
156	Serpin B10	Equus caballus	B8K249	45484	6.13	392
157	Serin Proteinase Inhibitor Stamm B10	Equus caballus	UPI000155EBF0	45383	5.73	474
158	Fibrinogen gamma	Equus caballus	UPI0001795BCD	52333	5.29	196
159	Aktin-related Protein 3	Equus caballus	UPI0001797316	59545	6.86	235
160	Aktin-related Protein 3	Equus caballus	UPI0001797316	59146	6.86	368
161	Aldehyd Dehydrogenase	Equus caballus	ALDH2_HORSE	54532	5.7	152
162	Protein Disulfid Isomerase-A3 Isoform 1	Equus caballus	UPI0001795AEA	69311	8.50	501
163	Protein Disulfid Isomerase-A3 Isoform 1	Equus caballus	UPI0001795AEA	69311	8.50	799
164	T-complex Protein 1 subunit beta	Mus musculus	P80314	57441	5.97	98
165	Protein Disulfid Isomerase-associated 3 Isoform 1	Equus caballus	UPI0001795AEA	69996	8.50	262
166	Aldehyd Dehydrogenase, mitochondrial	Equus caballus	P12762	54532	5.70	359
167	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein H	Equus caballus	UPI0001796F82	49442	6.48	291
168	Alpha-Enolase Isoform 1	Equus caballus	UPI000155DDF2	47509	6.37	130
169	Tubulin, beta 1	Equus caballus	UPI00017977C2	46949	4.98	90
170	Tubulin, beta 1	Equus caballus	UPI00017977C2	46949	4.98	134
171	Tubulin, beta 1	Equus caballus	UPI00017977C2	46949	4.98	443
172	NCK Adapter Protein 1	Homo sapiens	NCK1_HUMAN	42864	6.06	100% (4)
173	Serpin B10	Equus caballus	B8K249	45484	6.13	497
174	Pleckstrin	Equus caballus	UPI000155F781	40314	8.31	304

Ergebnisse

175	Serin Proteinase Inhibitor Stamm B10	Equus caballus	UPI000155EBF0	45497	5.73	532
176	Rab GDP dissoziations Inhibitor beta	Canis lupus familiaris	UPI00004BD162	49285	7.65	630
177	PWP1-interagierendes Protein	Homo sapiens	DJB11_HUMAN	40514	5.81	100% (5)
178	Poly (rC) bindendes Protein 2 Isoform b	Homo sapiens	Q59HD4_HUMAN	39525	6.72	100% (5)
179	Makrophagen-capping Protein	Equus caballus	UPI0001797150	39022	6.17	361
180	Septin-2 (Protein NEDD5)	Equus caballus	UPI000155E706	41755	6.19	590
181	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	Equus caballus	UPI0001797C05	45169	5.42	122
182	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	Equus caballus	UPI0001797C05	45169	5.42	246
183	Alpha-enolase Isoform 1	Equus caballus	UPI000155DDF2	47509	6.37	460
184	Cytosol Aminopeptidase (Leucin Aminopeptidase)	Equus caballus	UPI0001795F71	56031	7.57	393
185	Septin 11 Isoform 2	Equus caballus	UPI0001797D25	48763	6.35	236
186	Elongationsfaktor Tu	Equus caballus	UPI000155F57F	49623	6.75	478
187	Pleckstrin	Equus caballus	UPI000155F781	40314	8.31	195
188	Fruktose-Bisphosphat Aldolase C (Brain-type aldolase) Isoform 1	Equus caballus	UPI000155F20E	39740	6.21	524
189	Fibrinogen A-alpha (Fragment)	Equus caballus	O97641	49591	6.45	254
190	C-src Tyrosin Kinase	Equus caballus	UPI000155D7A7	51135	6.61	358
191	6-Phosphogluconat Dehydrogenase, decarboxylierend	Equus caballus	UPI0001795CC2	66840	8.97	583
192	Glutamat Dehydrogenase 1, mitochondrial (GDH)	Equus caballus	UPI00017959A1	60733	8.36	427
193	mSUG1 Protein Isoform 7	Eutheria	UPI000013C62B	43266	8.5	187
194	Fibrinogen A-alpha (Fragment)	Equus caballus	O97641	49591	6.45	267
195	Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase,	Equus caballus	UPI0001795E71	55772	9.03	71
196	Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase	Equus caballus	UPI0001561592	48218	8.80	497
197	Phosphoglycerate kinase 1	Equus caballus	UPI0001560C32	48409	7.97	458
198	Tat-assoziiertes Protein	Equus caballus	UPI0001796B78	34540	4.98	156
199	Eukaryotischer Translations-Elongations Faktor 1 beta 2	Equus caballus	UPI0001797478	21704	4.92	212
200	14-3-3 Protein theta	Eutheria	P27348	28032	4.68	579
201	14-3-3 Protein zeta/delta	Eutheria	P63104	27899	4.73	764
202	Kurze Isoform von 14-3-3 Protein beta/alpha	Eutheria	P31946-2	27947	4.76	579

Ergebnisse

203	14-3-3 eta	Equus caballus	UPI00017966BF	40769	5.98	392
204	14-3-3 Protein zeta/delta	Eutheria	P63104	27899	4.73	614
205	Tropomyosin 1, alpha	Rattus norvegicus	Q6AZ25	28679	4.75	367
206	Tropomyosin 3 Isoform 6	Equus caballus	UPI0001560C2A	27374	4.77	789
207	Tropomyosin alpha-4 chain	Equus caballus	P02561	28620	4.65	381
208	SET translocation (myeloid leukemia-associated)	Equus caballus	UPI0001797A6D	30017	4.10	80
209	Protein Phosphatase 2A Inhibitor-2 I-2PP2A Isoform 2	Mus musculus	UPI000155315B	29512	4.34	111
210	Coatomer Proteinkomplex, subunit epsilon Isoform 1	Equus caballus	UPI00015612D9	34397	4.86	596
211	Cytoplasmic beta-Aktin Isoform 5	Canis lupus familiaris	UPI00005A0F4F	31394	5.04	105
212	Aktin, cytoplasmic 2 (Gamma-Aktin)	Rattus norvegicus	UPI0000DA3670	59163	5.67	228
213	Annexin A5	Equus caballus	UPI000155DD00	36034	4.98	669
214	N-ethylmaleimide sensitive fusion Protein attachment Protein alpha	Equus caballus	UPI000155EFEA	33595	5.23	167
215	EF-hand domain-containing Protein D2	Bos taurus	A5D7A0	26902	5.09	299
216	EF-hand domain-containing Protein D2	Bos taurus	A5D7A0	26902	5.09	459
217	Multicatalytic Proteinase subunit K Isoform 2	Equus caballus	UPI000156030D	27859	5.20	405
218	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase	Equus caballus	UPI0001560B23	25675	5.29	484
219	Splicing Faktor, Arginin/Serin-rich 1 (ASF/SF2) Isoform 8	Canis lupus familiaris	UPI00005A1CCC	26576	10.23	450
220	N-ethylmaleimide sensitive fusion Protein attachment Protein alpha	Equus caballus	UPI000155EFEA	33595	5.23	611
221	Chloride intracellular channel Protein 1	Equus caballus	UPI000155FF6D	27317	5.18	340
222	Proteasom Aktivator Komplex Untereinheit 2	Equus caballus	UPI0001560E39	27529	5.43	246
223	Aktin, cytoplasmic 1	Camelus dromedarius	P84336	42174	5.30	354
224	Beta Aktin Variante (Fragment)	Homo sapiens	Q53G99	42080	5.37	367
225	Prohibitin	Equus caballus	UPI000155F0F7	29873	5.57	606
226	F-Aktin-capping Protein Untereinheit alpha-1	Bos taurus	A4FUA8	32911	5.53	505
227	Guanin Nukleotid-binding Protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Cricetulus griseus	Q6TMK6	37394	5.61	98
228	F-Aktin-capping Protein Untereinheit alpha-2	Equus caballus	Q2QLA8	32931	5.57	495
229	Lactat Dehydrogenase B Isoform 2	Equus caballus	UPI000155E658	36500	5.85	523

Ergebnisse

230	F-Aktin capping Protein Untereinheit beta	Homo sapiens	UPI000022AECA	34015	6.46	448
231	Proteasom Aktivator Komplex Untereinheit 1	Homo sapiens	Q06323	28876	5.78	555
232	Peroxiredoxin-4	Homo sapiens	Q13162	30749	5.86	480
233	Growth factor receptor-bound Protein 2	Eutheria	P62993	25304	5.89	572
234	Non-Selen Glutathion Phospholipid Hydroperoxid Peroxidase	Equus caballus	UPI000155E3D2	25052	5.73	730
235	Fibrinogen A-alpha (Fragment)	Equus caballus	O97641	49477	6.45	284
236	Malat Dehydrogenase, cytoplasmic (Cytosolic malate dehydrogenase)	Equus caballus	UPI000155F7AE	36646	6.16	334
237	Proteasom (Prosom, Macropain) Untereinheit alpha Typ 1, Isoform 1	Equus caballus	UPI000155E78E	29853	6.00	280
238	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	Sus scrofa	P80895	24745	6.71	555
239	Antioxidant Protein Isoform 2	Equus caballus	UPI000155D78E	27047	7.74	355
240	Heat-shock Protein	Equus caballus	UPI0001560FB5	23161	6.13	681
241	LIM and SH3 domain Protein 1	Equus caballus	UPI0001796B28	29037	6.61	326
242	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein H3	Homo sapiens	P31942	36903	6.37	128
243	Alkohol Dehydrogenase Isoform 2	Equus caballus	UPI000155DB66	36569	6.32	141
244	Annexin A1	Equus caballus	Q8HZM6	38713	6.57	197
245	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein D-like	Gallus gallus	UPI0000ECC43C	37466	8.73	230
246	Aldose Reduktase	Equus caballus	UPI0001560CFD	35998	6.56	279
247	Esterase D/Formylglutathion Hydrolase Isoform 1	Equus caballus	UPI000155FAD8	31955	6.54	253
248	Caspase 6 Isoform alpha	Equus caballus	UPI0001795E62	34728	6.01	132
249	Annexin A2	Equus caballus	B2B9I8	38847	6.92	545
250	Fibrinogen A-alpha (Fragment)	Equus caballus	O97641	49477	6.45	290
251	Fibrinogen A-alpha (Fragment)	Equus caballus	O97641	49477	6.45	279
252	Fibrinogen A-alpha (Fragment)	Equus caballus	O97641	49477	6.45	325
253	Voltage-dependent anion-selective channel Protein 2	Oryctolagus cuniculus	VDAC2_RABIT	32074	7.49	176
254	Aktin related Protein 2/3 complex subunit 2	Equus caballus	UPI00017961D0	38157	7.75	654
255	Translationally-controlled Tumor Protein	Equus caballus	UPI00017972DF	27434	6.76	225
256	Guanin Nucleotid-binding Protein beta subunit 2-like 1	Canis lupus familiaris	UPI00005A22D1	33763	7.06	124

Ergebnisse

257	Lactat Dehydrogenase-A	Equus caballus	UPI000155E7C6	36861	8.17	637
258	Glycerinaldehyd 3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	Mammalia	A0SNU7	28035	6.77	251
259	Fruktose-Bisphosphat Aldolase A	Equus caballus	UPI0001796FD9	39433	8.30	350
260	Fruktose-Bisphosphat Aldolase A	Equus caballus	UPI0001796FD9	39889	8.30	490
261	Fruktose-Bisphosphat Aldolase A (Muscle-type aldolase)	Equus caballus	UPI0001796FD9	39889	8.30	648
262	Heterogenes nukleäres Ribonukleoproteins A2/B1	Canis lupus familiaris	UPI0000EB1FFE	34474	9.24	355
263	Glycerinaldehyd-3-phosphate dehydrogenase	Sus scrofa	G3P_PIG	36041	8.51	170
264	Mitochondrial Malat Dehydrogenase 2, NAD	Equus caballus	UPI0001796EC6	36045	8.82	598
265	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A2/B1 Isoform 2 Isoform 24	Canis lupus familiaris	UPI00005A2C02	37365	8.37	567
266	Voltage-dependent anion-selective channel Protein 1	Eutheria	P45879	30836	8.62	310
267	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A1	Homo sapiens	Q6IPF2	34273	9.28	367
268	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A1	Homo sapiens	Q6IPF2	34273	9.28	524
269	Glyoxalase I	Equus caballus	UPI000155FDBC	20743	5.09	298
270	Proteasom Untereinheit beta Typ 9-like Protein	Equus caballus	UPI0001797566	23305	5.10	148
271	Myosin light chain 6 (Fragment)	Eutheria	B0FZM4	15981	4.60	492
272	Sorcin	Equus caballus	UPI000155E084	21290	5.00	391
273	Alpha-1 acid Glykoprotein	Equus caballus	UPI0001797AB3	27634	6.32	253
274	Rho GDP dissoziations Inhibitor (GDI) alpha	Canis lupus familiaris	UPI00005A1A12	23436	5.12	468
275	Rho GDP-dissoziations Inhibitor 1	Murinae	Q99PT1	23450	5.12	248
276	Alpha1-Glycoprotein acid	Equus caballus	UPI00015603D4	23369	5.09	468
277	D4-GDP-dissoziations Inhibitor	Equus caballus	UPI000155E637	22904	5.17	428
278	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	Eutheria	P61086	22507	5.33	133
279	Adenin Phosphoribosyltransferase	Canis lupus familiaris	UPI00005A0D8C	19850	6.16	186
280	UMP-CMP Kinase	Equus caballus	UPI0001795A5C	20216	5.14	319
281	Splicing factor (Fragment)	Canis lupus familiaris	Q9XSU6	15635	11.15	166
282	Splicing factor (Fragment)	Canis lupus familiaris	Q9XSU6	15635	11.15	208
283	Glutathion Peroxidase 1	Equus caballus	UPI00017972C9	22321	6.74	236
284	Peroxiredoxin 1	Equus caballus	UPI000155DB67	22348	8.26	252

Ergebnisse

285	Purin Nucleosid Phosphorylase	Equus caballus	UPI000155DAAC	32225	6.71	282
286	Purine Nucleosid Phosphorylase Isoform 2	Equus caballus	UPI000155DA89	32192	6.75	332
287	Phosphoglycerat Mutase 1 Isoform 1	Canis lupus familiaris	UPI00004A6DC4	28918	6.67	640
288	Triosephosphat Isomerase 1	Equus caballus	UPI00017961B4	30624	6.25	48
289	Triosephosphat Isomerase 1	Equus caballus	UPI00017961B4	30966	6.25	590
290	Triosephosphat Isomerase 1	Equus caballus	UPI00017961B4	30624	6.25	290
291	Adenylat Kinase Isoenzym 2, mitochondriell	Equus caballus	UPI000155DC85	26843	6.97	358
292	Isoform 2 of Splicing Faktor, Arginin/Serin-rich 7	Homo sapiens	Q16629-2	15792	9.84	142
293	Ras suppressor Protein 1	Equus caballus	UPI00015608E0	31453	8.56	100
294	Triosephosphat Isomerase 1	Equus caballus	UPI00017961B4	30966	6.25	355
295	Fibrinogen alpha	Equus caballus	UPI0001795BE4	96657	5.75	165
296	Proteasom (Prosom, Macropain) Untereinheit beta Typ 1	Equus caballus	UPI00015609D4	26516	7.63	172
297	Peroxiredoxin 1	Equus caballus	UPI000155DB67	22348	8.26	636
298	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric (Myosin RLC) Isoform 6	Macaca mulatta	UPI00006D3D88	19794	4.66	367
299	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric (Myosin RLC) Isoform 6	Macaca mulatta	UPI00006D3D88	19794	4.66	326
300	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric (Myosin RLC) Isoform 6	Macaca mulatta	UPI00006D3D88	19794	4.66	499
301	Tubulin alpha-6 chain	Bos taurus	UPI000179EF14	14039	5.11	326
302	SH3 domain binding glutamic acid-rich Protein like 3	Homo sapiens	Q5T123	9375	9.42	266
303	Cytochrom c Oxidase subunit 5A, mitochondrial	Rattus norvegicus	P11240	16119	6.08	222
304	Myeloid cathelicidin 2	Equus caballus	O62841	18426	4.98	593
305	Coactosin-like 1	Equus caballus	UPI0001795DE0	16041	5.15	360
306	Eukaryotischer Translations-Initiations Faktor 5A, partiell	Macaca mulatta	UPI0000D9E168	21488	9.06	400
307	Glia maturation Faktor, gamma	Equus caballus	UPI000155EF35	17003	5.37	267
308	Cofactor A	Equus caballus	UPI000155F5E2	10078	4.57	328
309	Myotrophin	Eutheria	P58546	12887	5.27	249
310	Barrier-to-autointegration Faktor	Mus musculus	O54962	10096	5.79	133
311	Protein S100-P (S100 calcium-binding Protein P)	Equus caballus	UPI000155DFC8	10363	5.07	76

Ergebnisse

312	Protein S100-A8	Equus caballus	UPI00017960AF	10386	5.09	231
313	Protein S100-A8	Equus caballus	UPI00017960AF	10443	5.09	369
314	S100 calcium-binding Protein A4 Isoform 2	Equus caballus	UPI0001560BF2	11753	5.85	218
315	Enhancer of rudimentary homolog	Tetrapoda	UPI00015506E4	14328	5.38	97
316	Thioredoxin	Equus caballus	O97508	11729	5.15	238
317	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like Protein	Equus caballus	UPI0001560928	12738	5.22	506
318	Fatty acid binding Protein 5	Babyrousa babyrousa	B0LPC6	15199	7.59	169
319	Calcium-binding Protein in Amnionflüssigkeit 1	Equus caballus	UPI0001560BF1	10504	5.68	377
320	Fibrinogen alpha (Fragment)	Equus caballus	Q7M2U4	27635	6.55	277
321	Nudix-Typ Motiv 2	Equus caballus	UPI0001560432	17000	5.53	180
322	Aktin-related Protein 2/3 complex subunit 5	Gallus gallus	Q5ZMV5	16499	5.43	244
323	Stathmin 1	Homo sapiens	B5BU83	17320	5.76	542
324	Transgelin 2	Equus caballus	UPI0001560EBB	22582	8.76	410
325	Cu-Zn Superoxid Dismutase	Equus caballus	SODC_HORSE	16232	6.03	89
326	S100 calcium binding Protein A11	Equus caballus	UPI0001560AB3	11197	6.73	64
327	Platelet basic Protein	Equus caballus	UPI0001795DED	15786	7.64	184
328	Platelet basic Protein	Equus caballus	UPI0001795DED	16071	7.64	90
329	Beta-2-Microglobulin	Equus caballus	P30441	13532	6.40	118
330	Hemoglobin subunit beta	Equus caballus	P02062	16055	6.52	730
331	Hemoglobin subunit beta	Equus caballus	P02062	16055	6.52	543
332	Cystatin B	Equus caballus	UPI000156065F	11116	6.90	408
333	Hemoglobin subunit beta	Equus caballus	P02062	16055	6.52	142
334	40S ribosomales Protein S12 Isoform 2	Pan troglodytes	UPI0000E22C62	14950	6.82	275
335	Glutathion S-Transferase subunit pi	Equus caballus	UPI000155F496	24944	7.05	248
336	Protein S100-A9	Equus caballus	UPI0001560B0B	14898	6.32	275
337	Protein S100-A9	Equus caballus	UPI0001560B0B	14898	6.32	149
338	Protein S100-A9	Equus caballus	UPI0001560B09	17879	5.89	196
339	D4-GDP-dissoziations Inhibitor	Equus caballus	UPI000155E637	22904	5.17	308
340	Parkinson disease Protein 7	Equus caballus	UPI000155DE21	20107	6.84	218

## Ergebnisse

341	Glutathion S-Transferase , class-pi	Equus caballus	UPI000155F3A7	23428	6.41	442
342	Proteasom Untereinheit beta Typ-2	Equus caballus	UPI000155DC61	22815	6.59	220
343	PAF Acetylhydrolase 29 kDa subunit	Equus caballus	UPI000155EF91	25905	6.59	269
344	GTP-binding nuclear Protein Ran	Canis lupus familiaris	UPI0000EB051F	24703	6.58	338
345	Superoxid Dismutase [Mn], mitochondrial	Equus caballus	Q9XS41	24952	8.94	399
346	Transgelin 2	Equus caballus	UPI0001560EBB	22582	8.76	474
347	Cofilin-1	Eutheria	P23528	18719	8.22	196
348	Transgelin 2	Equus caballus	UPI0001560EBB	22582	8.76	218
349	Cofilin-1	Eutheria	P23528	18719	8.22	808
350	Peptidyl-Pro cis trans Isomerase Isoform 1	Equus caballus	UPI000155E21A	18159	8.27	399
351	Peptidyl-Pro cis trans Isomerase Isoform 1	Equus caballus	UPI000155E21A	18159	8.27	445
352	Horse BII alpha-2 globin	Equus caballus	Q28383	15277	7.98	433

**Tab. 4.1:** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus dem Lymphozytenproteom eines gesunden Pferdes. Bedeutung der hochgestellten Buchstaben:

a) Nummer des korrespondierenden Spots aus dem Master-Gel in Abbildung 4.1.

b) Name des identifizierten Proteins, wie in UniRef100/UniProt (<http://www.uniprot.org>) und EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/picr>) geführt.

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

d) Schlüsselnummer oder -name, wie in UniRef100 (<http://www.uniprot.org>) und EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/picr>) geführt.

e) Theoretisches Molekulargewicht (MG) des identifizierten Proteins (Dalton).

f) Theoretischer isoelektrischer Punkt (pI) des identifizierten Proteins.

g) Wahrscheinlichkeitsbasierter MOWSE Score, wie von Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 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 54 signifikant für die Pferdedatenbank und Scores größer als 70 signifikant für die UniRef100-Datenbank waren.

## **4.2 Ermittlung differenziell exprimierter Proteine im Lymphozytenproteom von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu augengesunden Kontrollen mit Hilfe der 2D-DIGE Methode (2D-DIGE-Experiment 1)**

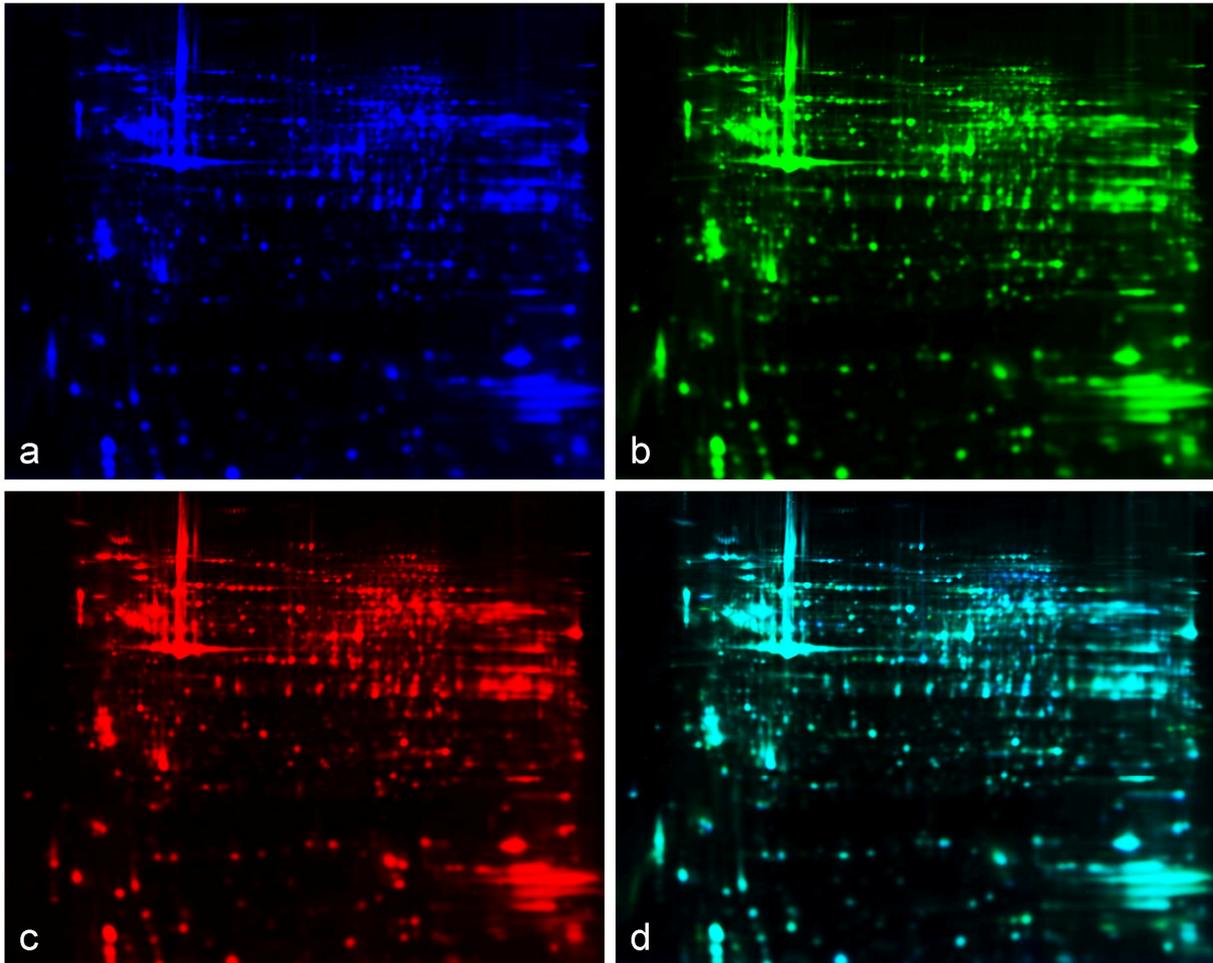
### **4.2.1 Vergleichende Darstellung des equinen Lymphozytenproteoms in der Fluoreszenzansicht**

Für das erste DIGE-Experiment wurden insgesamt zehn hoch lymphozytäre Proben (93% +/- 4% Lymphozyten) gewählt, bestehend aus fünf Proben von augengesunden Pferden (93% +/- 3% Lymphozyten) und fünf ERU-Proben (93% +/- 4% Lymphozyten), die in ihrem Proteinexpressionsmuster miteinander verglichen wurden. Als interne Ladungskontrolle und für die spätere statistische Evaluierung kam zu den oben genannten Probenpaaren ein für das Experiment spezifischer interner Standard hinzu.

Die 2D-DIGE Technik, also das Markieren von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen vor der zweidimensionalen Auftrennung, hat den Vorteil, dass Unterschiede im Laufverhalten und in der Proteinauftrennung zwischen den Probenpaaren und dem dazugehörigen internen Standard ausgeschlossen werden können und so der quantitative Proteinexpressionsvergleich zwischen Kontrolle und ERU präziser wird. In Abbildung 4.2 sind vier Fluoreszenzbilder dargestellt, die nach Erfassen der drei CyDye Fluoreszenzfarbstoffe im Laser-Fluoreszenz-Scanner Typhoon Trio<sup>69</sup> und mit Hilfe der ImageQuant TL Software aus einem repräsentativen Gel des Experiments entstanden sind. Die Cy3 markierte PBL-Probe eines gesunden Pferdes ist in blau dargestellt (Abb. 4.2a), die Cy5 markierte ERU-Probe in grün (Abb. 4.2b) und in rot erscheint der Cy2 gekoppelte interne Standard (Abb. 4.2c). Überlagert man mit Hilfe der ImageQuant TL Software die Cy3 und Cy5 Ansicht, können nun allein schon visuell ohne weitere analytische Hilfsmittel Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zwischen der Kontrolle und der ERU-Probe festgestellt werden (Abb. 4.2d). Vermehrt exprimierte Proteine in Lymphozyten von gesunden Pferden stellen sich als blaue, erhöhte Proteinexpressionen in den ERU-Proben als grüne Fluoreszenzareale dar. Sind die überlagerten Proteinmuster identisch erscheinen sie dagegen in türkis.

Ein weiterer Vorteil der 2D-Gelelektrophorese-Technik ist, dass nicht nur Veränderungen in der Gesamt-Proteinmenge detektiert werden können, sondern auch Unterschiede in der Modifikation eines Proteins zwischen gesundem und

krankem Zustand. Diese Modifikationen stellen sich als Proteinspots mit einer Verschiebung im pH-Bereich im Vergleich zum nicht oder anders modifizierten Protein dar. So können zwischen den Proteinen nicht nur quantitative, sondern auch funktionelle Unterschiede erfasst werden.

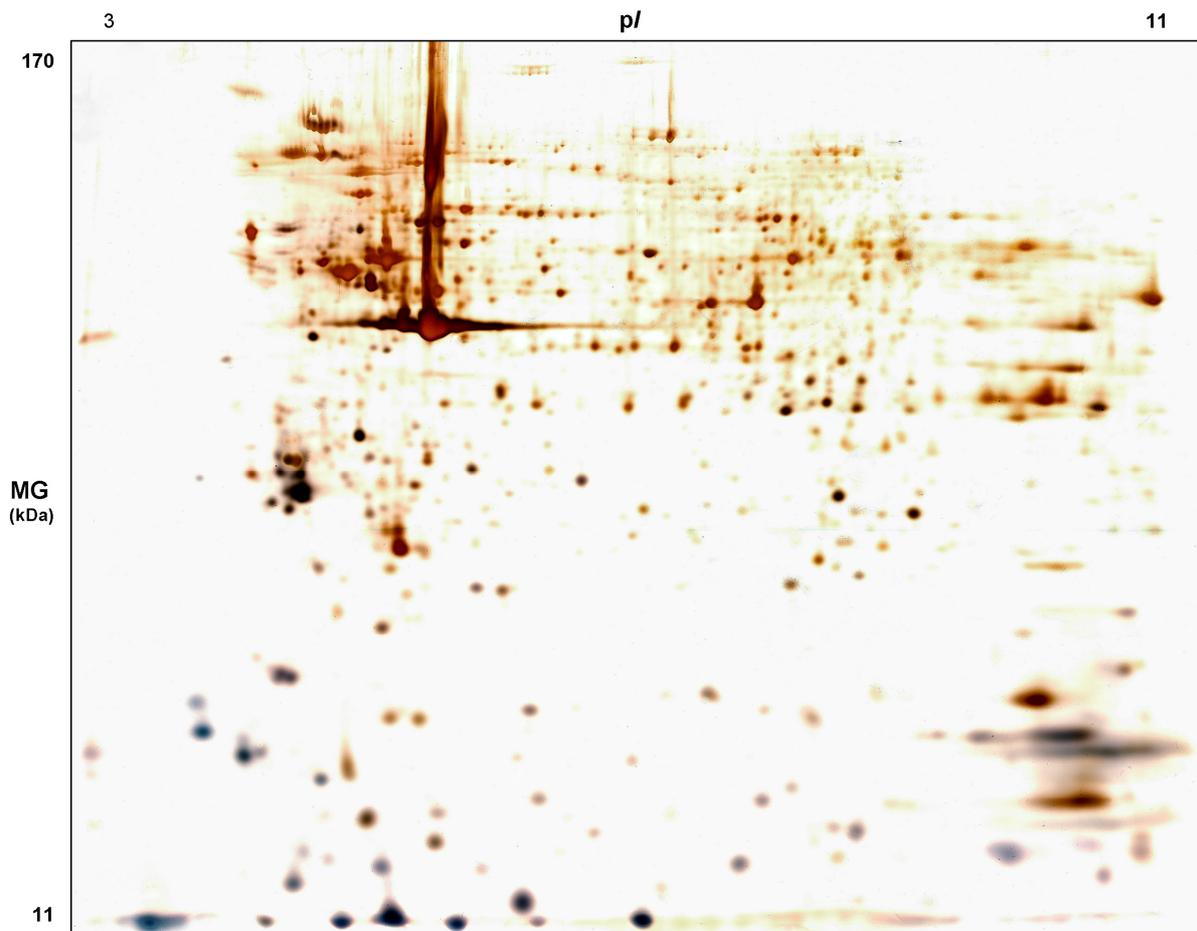


**Abb. 4.2:** Fluoreszenzdarstellung eines Gels aus dem 2D-DIGE-Experiment 1: Drei PBL-Proben (Kontrolle, ERU, interner Standard) wurden mit jeweils verschiedenen CyDye Farbstoffen markiert, gemeinsam zweidimensional aufgetrennt, mit dem Typhoon Trio<sup>69</sup> Scanner eingescannt und mit der ImageQuant TL Software veranschaulicht.

(a) Cy3 markierte Kontrolle, (b) Cy5 markierte ERU-Probe, (c) Cy2 markierter interner Standard. (d) Die Überlagerung des Cy3 und Cy5 Bildes zeigt Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zwischen der Kontrolle (blau) und der ERU-Probe (grün), gleiche Expression stellt sich in türkis dar.

Um die Spots auf dem SDS-Gel lokalisieren zu können wurde nach der digitalen Datenverarbeitung das den Fluoreszenzbildern entsprechende SDS-Gel silbergefärbt und eingescannt (Abb. 4.3). Das Proteinmuster entsprach hier denen der Fluoreszenzdarstellung und zeigte eine gleichmäßige Verteilung, sowie eine gute

Auftrennung. In Abbildung 4.3 sind das Lymphozytenproteom des an ERU erkrankten, sowie des gesunden Pferdes und des internen Standards in einem einheitlichen Muster zu sehen und es kann nicht mehr zwischen den einzelnen Proben differenziert werden. Das Zuordnen der unterschiedlichen Proteinspots zu den jeweiligen Proben ist lediglich über die Fluoreszenzanregung der CyDyes möglich. Für die weitere Identifikation im Massenspektrometer wurden die differenziellen Kandidatenproteine aus dem Silbergel ausgeschnitten.



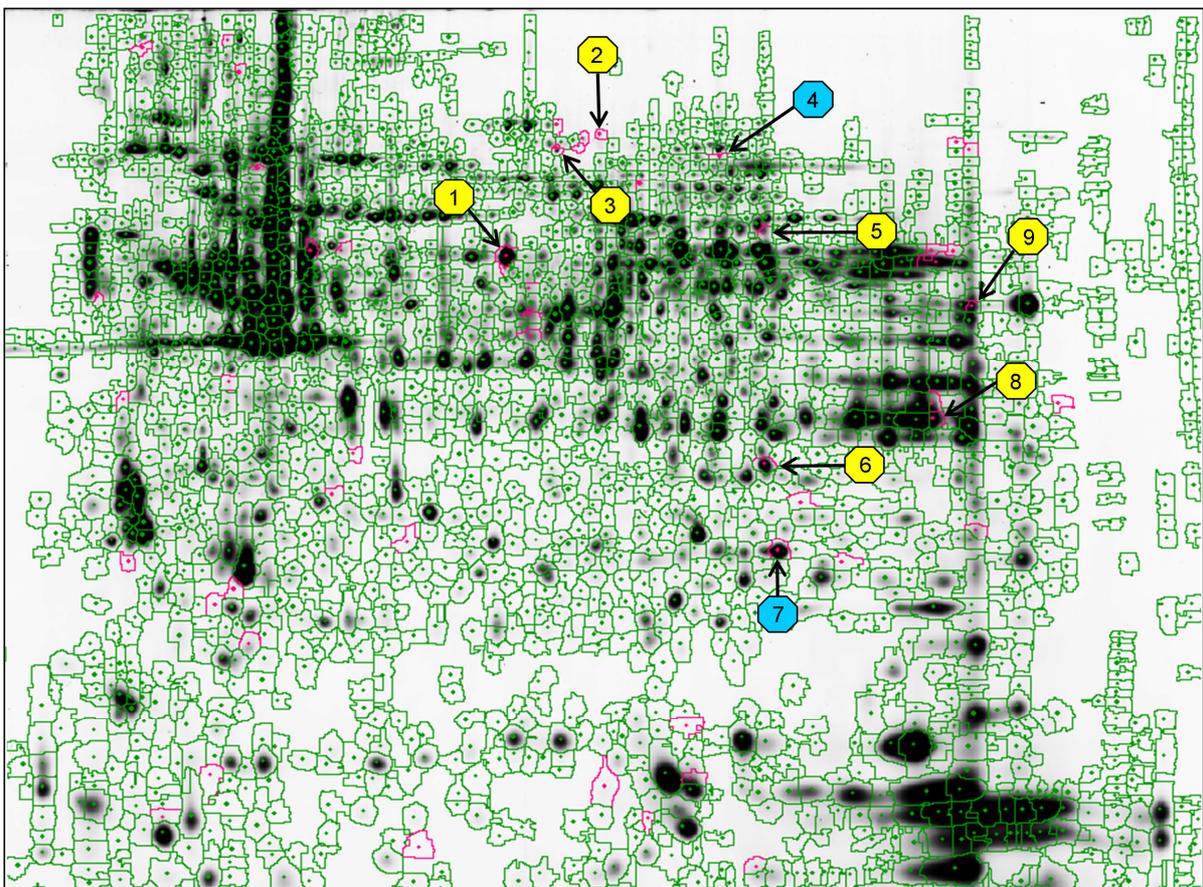
**Abb. 4.3:** Repräsentatives silbergefärbtes Gel aus dem 2D-DIGE-Experiment 1.

In diesem Gel wurden insgesamt 150 µg CyDye-markiertes Lymphozytenprotein aufgetrennt. Die Zuordnung der Spots zu der jeweiligen Kontroll-, ERU- oder internen Standardprobe kann nur durch Fluoreszenzanregung erfolgen. Nach der Auswertung mittels der DeCyder 6.5 Software konnten die differenziell exprimierten Spots bestimmt und händisch mit dem passenden silbergefärbten Gel abgeglichen werden. Die differenziellen Kandidatenproteine wurden dann aus dem silbergefärbten Gel für die weitere Identifikation im Massenspektrometer ausgeschnitten.

#### 4.2.2 Identifikation differenziell exprimierter Lymphozytenproteine bei an ERU erkrankten Pferden

Nach Darstellung der DIGE-Gele in der Fluoreszenzansicht (Abb. 4.2) wurden diese mit Hilfe der 2D DeCyder 6.5 Software weiter analysiert. In mehreren Schritten konnte über die Module Image Loader, DIA und BVA nach händischer Kontrolle der Spotübereinstimmung und Korrektur von falsch gepaarten Spots eine digitale Proteinübersichtskarte mit abgegrenzten Spotarealen erstellt werden.

Insgesamt wurden alle fünf DIGE-Gele in die Auswertung einbezogen. Die Proteinübersichtskarte des Master-Gels dieses Experiments wird in der BVA Ansicht in Abbildung 4.4 gezeigt.



**Abb. 4.4:** Proteinlandkarte aus fluoreszenzmarkierten und zweidimensional aufgetrennten peripheren Blut-Lymphozyten, generiert mit DeCyder 6.5 Software. Alle von der Software erkannten Spots sind in grün dargestellt, differenziell exprimierte Proteine mit statistischer Relevanz (Student's t-Test  $p < 0,05$ ) in rosa. Insgesamt wurden 50 differenziell exprimierte Spots detektiert. Die 9 massenspektrometrisch identifizierten Spots sind entsprechend der Tabelle 4.2 fortlaufend nummeriert. Gelb gekennzeichnete Nummern verweisen auf identifizierte Proteine, die bei ERU-Proben niedriger exprimiert sind im Vergleich zu den Kontrollen, blau unterlegte Nummern auf erhöhte Expression in den ERU-Proben. Differenzielle, aber nicht identifizierte Spots sind in der Abbildung nicht mit einer Nummer versehen.

Bei der Erstellung der neuen DeCyder Arbeitsdatei wurde automatisch die Spotkarte mit den meisten Spots als Master-Spotkarte festgesetzt und alle anderen Übersichtskarten des Experiments dann mit diesem Master abgeglichen. Insgesamt konnten mit dieser Methode 50 differenziell exprimierte Spots detektiert werden, welche für die massenspektrometrische Identifikation aus dem silbergefärbten Gel ausgeschnitten wurden.

Neun der 50 unterschiedlich abundanten Spots konnten klar identifiziert werden und wurden auf der Übersichtskarte in Abbildung 4.4 mit einer fortlaufenden Nummer versehen. Sieben Spots mit gelber Nummerierung waren in den ERU-Proben im Vergleich zur Kontrolle niedriger exprimiert, bei den zwei mit einer blauen Nummer markierten Spots lag die Proteinexpression in den ERU-Proben höher. Die differenziellen, aber nicht identifizierten Spots sind in Abbildung 4.4 nicht mit einer Nummer versehen.

#### **4.2.3 Neun bei ERU differenziell exprimierte Proteine im Lymphozytenproteom**

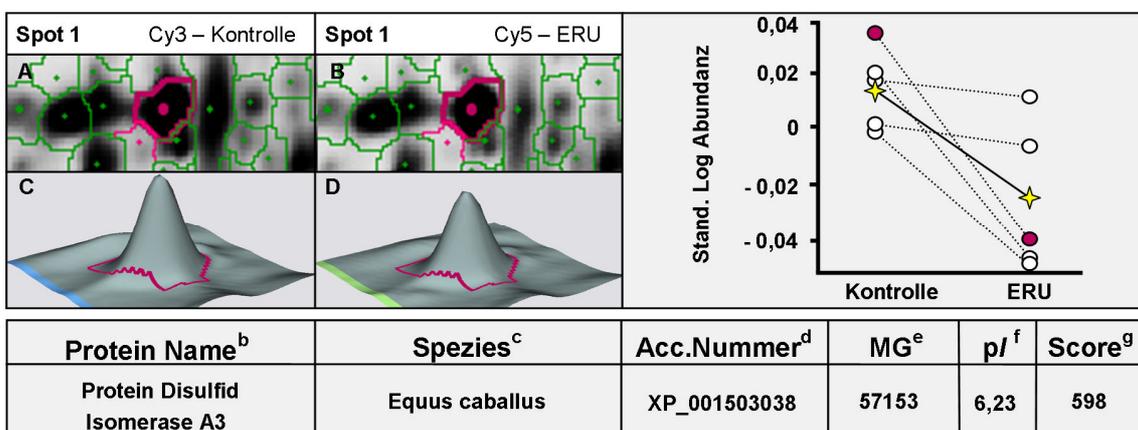
Sieben der neun differenziellen Spots, die mit Hilfe der DeCyder 6.5 Software detektiert wurden, waren in den Lymphozyten der an ERU erkrankten Pferde niedriger exprimiert im Vergleich zu den Gesunden (Abb. 4.4: gelb unterlegte Spotnummern). Mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF und LC-MSMS) wurden diese Spots als Protein Disulfid Isomerase A3 (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.2: Spot Nr. 1), Ezrin (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.2: Spot Nr. 2), Programmed cell death 6-interagierendes Protein (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.2: Spot Nr. 3), Tyrosin-Protein Phosphatase non-Rezeptor Typ 6 (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.2: Spot Nr. 5), Voltage-dependent anion-selective channel Protein 2 (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.2: Spot Nr. 6), Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.2: Spot Nr. 8), sowie Septin 7 (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.2: Spot Nr. 9) identifiziert.

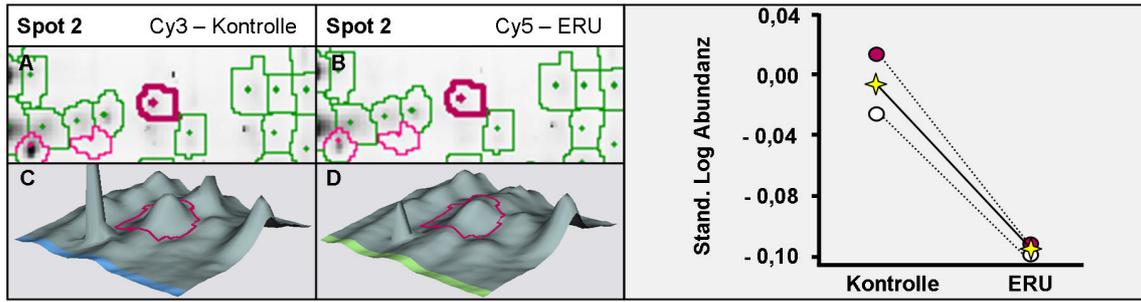
Dagegen waren die Proteine Laktotransferrin (Spot Nr. 4 in Abb. 4.4, Abb. 4.5 und Tab. 4.2) und Triosephosphat Isomerase (Spot Nr. 7 in Abb. 4.4, Abb. 4.5 und Tab. 4.2) in den ERU-Proben höher exprimiert im Vergleich zu den Proben augengesunder Pferde (Spots sind in Abb. 4.4 blau unterlegt).

In Abbildung 4.5 ist eine vergleichende Zusammenstellung jedes einzelnen der neun differenziellen Spots im BVA sowie die dazugehörigen Proteinidentifikationen zu sehen. Jeder Spot ist hier auf drei verschiedene Weisen illustriert.

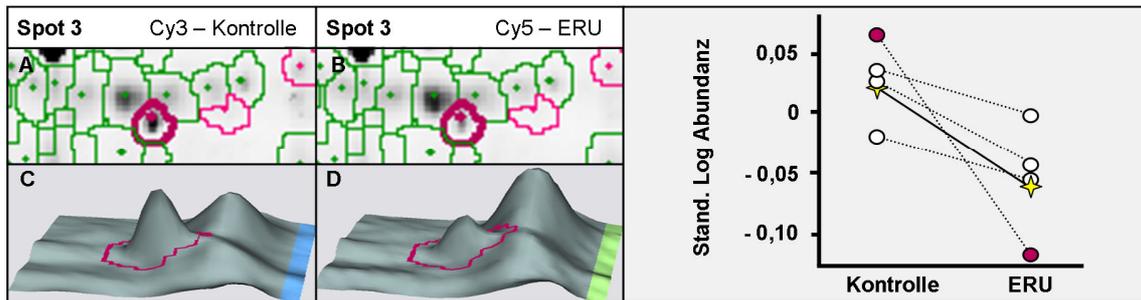
Zunächst sind das ausgewählte Spotareal und seine nähere Umgebung in vergrößerter Ansicht dargestellt (Abb. 4.5A und B). Es wird jeweils im selben Gel ein Spot aus der ERU-Probe mit dem dazugehörigen Spot aus der Kontrolle verglichen. Dabei kann anhand der divergierenden Intensität der Spotschwärzung ein Unterschied in der Proteinexpression beobachtet werden. Unterstützt werden diese Abundanzunterschiede durch die dreidimensionale Ansicht in Abbildung 4.5 C und D. Dieser Intra-Gel-Vergleich eines einzelnen Spotpaares wird in der rechten Grafik auf alle Gele des DIGE-Experiments 1 ausgeweitet, in denen der ausgewählte Spot detektiert wurde. Die Verbindung der zueinander gehörenden Kreise kennzeichnet die Spotpaare, die in einem Gel zusammen gelaufen sind, die roten Kreise repräsentieren den in Abbildung 4.5 A bis D dargestellten Spot, in weiß sind die jeweiligen Spots aus den restlichen Gelen des Experiments abgebildet. Am gelb gekennzeichneten internen Standard lässt sich zusammenfassend die Schwärzung der Spots in allen Gelen ablesen.

Die identifizierten Proteine mit den Spotnummern 1 (Protein Disulfid Isomerase A3), 6 (Voltage-dependent anion-selective channel Protein 2), 7 (Triosephosphat Isomerase), 8 (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) und 9 (Septin 7) wurden mit Hilfe der DeCyder 6.5 Software in allen Gelen des Experiments detektiert, Spot 3 (Programmed cell death 6-interagierendes Protein) konnte in vier von fünf Gelen und Spots 2 (Ezrin), 4 (Laktotransferrin) und 5 (Tyrosin-Protein Phosphatase non-RezeptorTyp 6) in zwei von fünf Gelen gefunden werden (Abb. 4.5: Grafik).

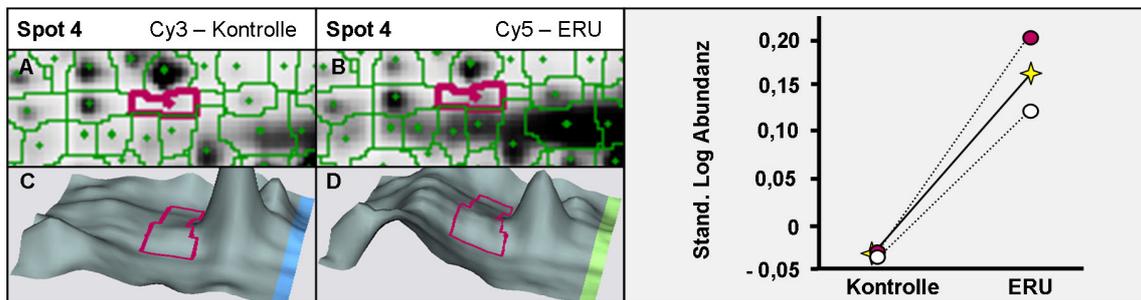




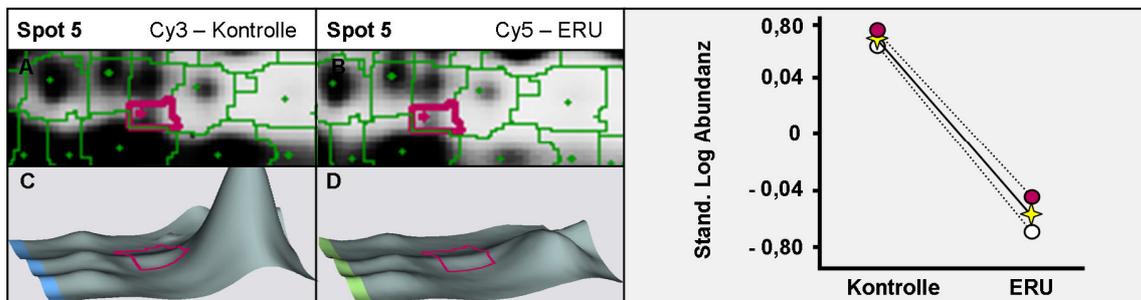
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Ezrin	Equus caballus	UPI0001797D9D	69439	6,06	521



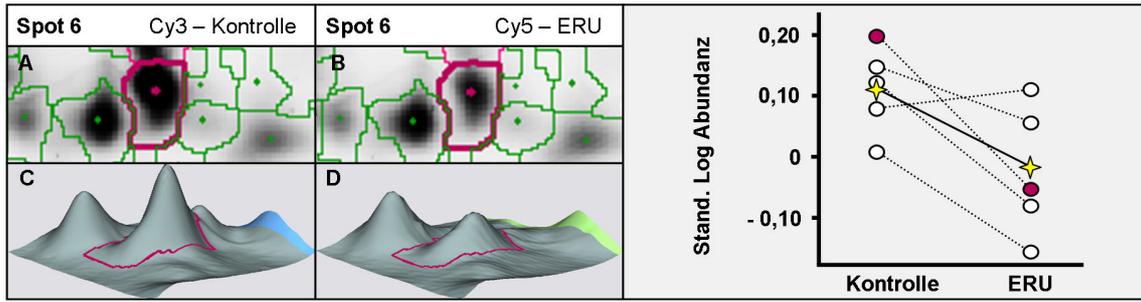
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Programmed cell death 6-interagierendes Protein	Homo sapiens	PDC6I_HUMAN	96590	6,13	69



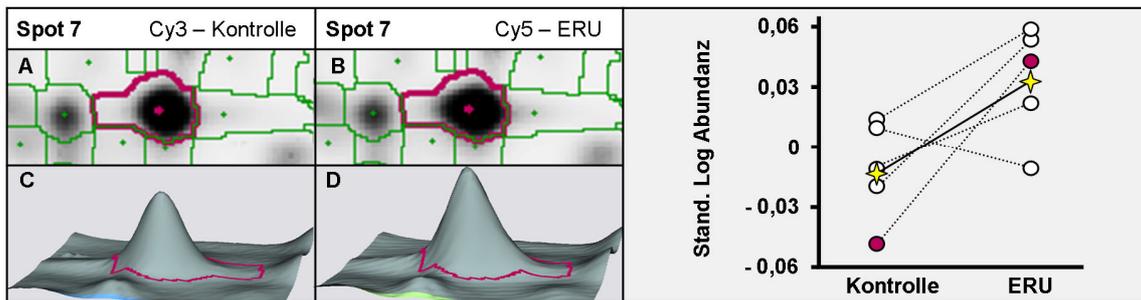
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Laktotransferrin	Equus caballus	TRFL_HORSE	77938	8,30	150



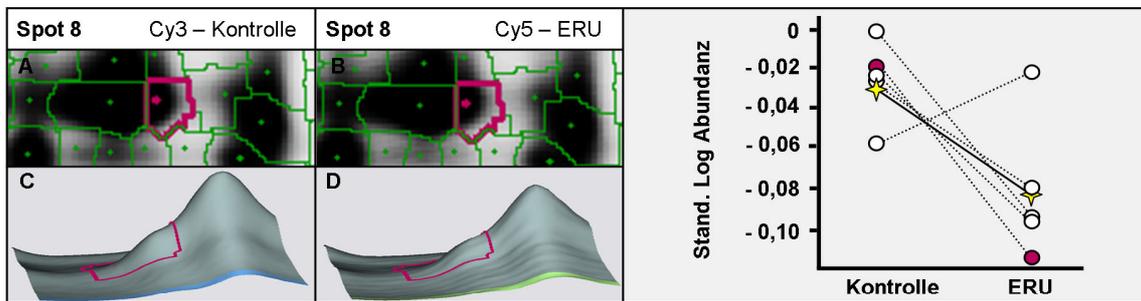
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Tyrosin-Protein Phosphatase nR Typ 6	Homo sapiens	Q53XS4_HUMAN	68076	7,65	92



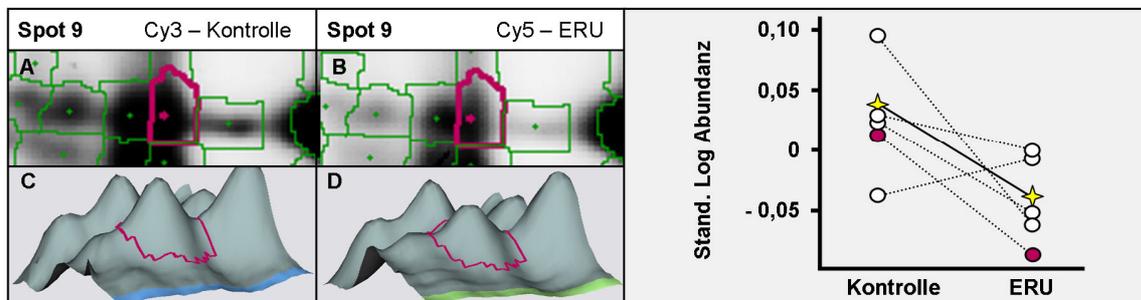
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Voltage-dependent anion-selective channel Protein 2	Oryctolagus cuniculus	VDAC2_RABIT	32704	7,49	176



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Triosephosphat Isomerase	Equus caballus	UPI00017961B4	30624	6,25	290



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	Sus scrofa	G3P_PIG	36041	8,51	348



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Septin 7	Equus caballus	UPI0001795EE2	49619	8,52	353

**Abb. 4.5:** DeCyder Auswertung des DIGE-Experiments 1: Darstellung der neun differenziell exprimierten, massenspektrometrisch identifizierten Proteine aus dem lymphozytären Experiment. (A)(B) Vergrößerte Darstellung differenziell exprimierter Spots aus der zweidimensionalen Proteinlandkarte im BVA. Es wird jeweils ein Spot aus der ERU-Probe mit dem dazugehörigen Spot aus der Kontrolle aus dem selben Gel verglichen. (C)(D) Gegenüberstellende dreidimensionale Ansicht des entsprechenden Proteinareals. (Grafik) Direkter Abundanzvergleich des ausgewählten Spots zwischen ERU und Kontrolle in allen Gelen des DIGE-Experimentes 1. Der interne Standard ist in gelb gezeigt. Die roten Kreise repräsentieren den in A-D dargestellten Spot, in weiß sind die jeweiligen Spots aus den anderen Gelen des Experiments dargestellt. Die zusammengehörigen Spots aus einem Gel sind verbunden.

Spot Nr. <sup>a</sup>	▲ ▼	Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Accession Nummer <sup>d</sup>	Theoretical		Score <sup>g</sup>
					MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
1	▼	Protein Disulfid Isomerase A3	Equus caballus	XP_001503038	57153	6,23	598
2	▼	Ezrin	Equus caballus	UPI0001797D9D	69439	6,06	521
3	▼	Programmed cell death 6-interagierendes Protein	Homo sapiens	PDC6I_HUMAN	96590	6,13	69
4	▲	Laktotransferrin	Equus caballus	TRFL_HORSE	77938	8,30	150
5	▼	Tyrosin-Protein Phosphatase nR Typ 6	Homo sapiens	Q53XS4_HUMAN	68076	7,65	92
6	▼	Voltage-dependent anion-selective channel Protein 2	Oryctolagus cuniculus	VDAC2_RABIT	32704	7,49	176
7	▲	Triosephosphat Isomerase	Equus caballus	UPI00017961B4	30624	6,25	290
8	▼	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	Sus scrofa	G3P_PIG	36041	8,51	348
9	▼	Septin 7	Equus caballus	UPI0001795EE2	49619	8,52	353

**Tab. 4.2:** Mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF und LC-MSMS) signifikant identifizierte, differenziell exprimierte Proteine aus dem lymphozytären DIGE-Experiment. Die Expression der Proteine in den ERU-Proben im Vergleich zu den Kontrollen ist in der zweiten Spalte angegeben. Die Bedeutung der hochgestellten Buchstaben ist in der Legende zu Tabelle 4.1 erklärt.

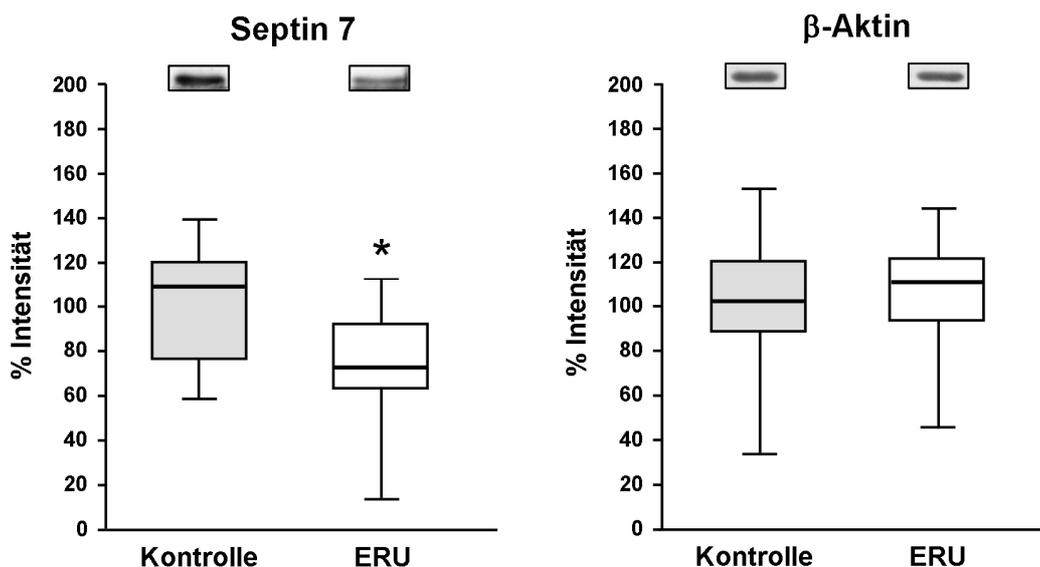
#### 4.2.4 Reduzierte Septin 7-Expression in PBL von an ERU erkrankten Pferden

Um den Rückgang der Septin 7-Expression zu verifizieren und zu quantifizieren, wurden die Lymphozytenproben von dreizehn gesunden und elf an ERU erkrankten Pferden im Western Blot mit einem polyklonalen anti-Septin 7-Antikörper<sup>112</sup> in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml inkubiert. In neun von elf getesteten ERU-Proben

<sup>112</sup> Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

konnte dabei ebenfalls eine signifikante Verminderung der Septin 7-Expression im Vergleich zur physiologischen Expression beobachtet werden.

In Abbildung 4.6 ist im Box Plot exemplarisch die unterschiedliche Expression von Septin 7 dargestellt. Die Septin 7-Expression ging hier in den ERU-Proben um 30% zurück. Der Rückgang der Expression war statistisch signifikant (Student's *t*-Test  $p < 0,05$ ). Um Expressionsunterschiede von Septin 7 aufgrund unterschiedlich aufgetragener Proteinmengen auszuschließen, wurde anschließend eine interne Ladungskontrolle auf der gleichen Blotmembran durchgeführt. Dabei wurde die Expression von  $\beta$ -Aktin untersucht. Diese wies im Unterschied zur Septin 7-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden getesteten Gruppen auf (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6:** Verifikation der reduzierten Septin 7-Expression in PBL von an ERU erkrankten Pferden im Western Blot.

Dargestellt ist die Schwärzungsintensität der Septin 7 Banden im Box Plot, Kontrolle (graue Säule mit Standardabweichung) und ERU-Probe (weiße Säule mit Standardabweichung) vergleichend. Die Septin 7-Expression in den ERU-Proben ist im Vergleich zu den Kontrollen um 30% verringert. Die mit \* gekennzeichnete Säule hat im Student's *t*-Test eine Signifikanz von  $p < 0,05$ .

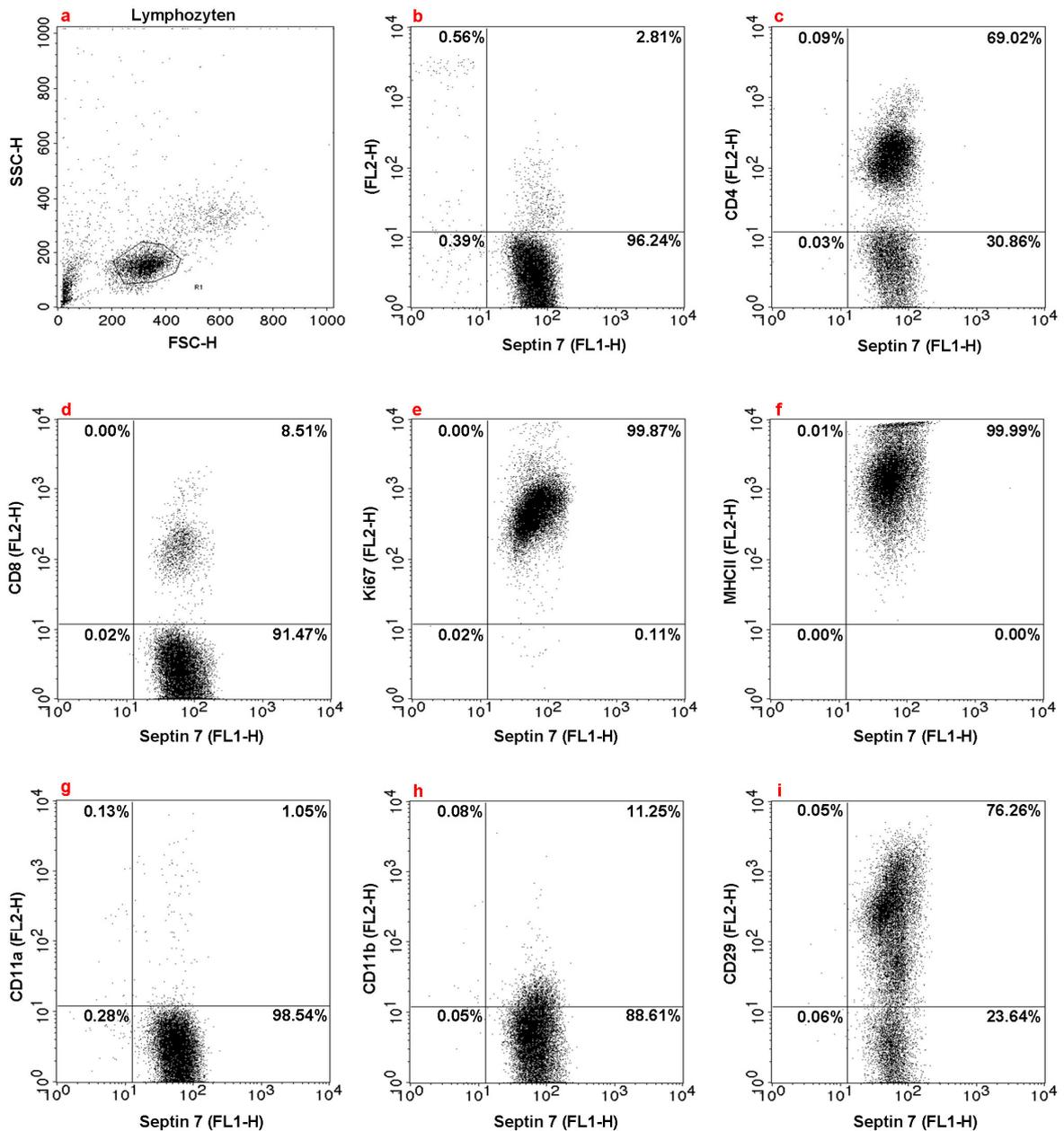
Zur Ladungskontrolle wurde auf den gleichen Blotmembranen die Schwärzungsintensität der  $\beta$ -Aktin Banden gemessen (graue Säule: Kontrollen, weiße Säule: ERU). Die Schwärzung wies hier keine signifikanten Unterschiede auf.

#### **4.2.5 Phänotypisieren von Septin 7-positiven Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie**

Um genau identifizieren zu können, auf welchen Lymphozytensubpopulationen Septin 7 exprimiert ist, wurden die Septin 7-positiven Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) weiter phänotypisiert. Dabei war Septin 7 auf 99,05% der untersuchten Lymphozyten exprimiert (Abb. 4.7a: Lymphozyten-Gate R1, Abb. 4.7. b: Die Septin 7-positiven Zellen finden sich im LR- (96,24%) und UR-Quadranten (2,81%)). Bei der näheren Charakterisierung zeigte sich, dass alle Pferde-T-Zellen Septin 7-positiv waren (siehe Doppelfärbungen im UR-Quadranten in Abb. 4.7c: CD4 und Septin 7, Abb. 4.7d: CD8 und Septin 7).

Des Weiteren waren alle proliferierenden Zellen (Ki67-positive Zellen, Abb. 4.7e: doppelt positive im UR Quadranten 99,87%) und nahezu alle MHCII-exprimierenden Zellen beim Pferd Septin 7-positiv (Abb. 4.7f: UR 99,99% doppelt positive).

Die Septin 7-Expression war kaum doppelt positiv mit der LFA-1- (CD11a-positive Zellen, Abb. 4.7g) und MAC1-Expression (CD11b-exprimierende Zellen, Abb. 4.7h) auf den Pferdezellen, wohingegen die beta 1 Integrin-exprimierenden Zellen (CD29-positive) gleichzeitig alle Septin 7 ko-exprimierten (Abb. 4.7i: UR 76,26% doppelt positive Zellen).



**Abb. 4.7:** Expression von Septin 7 auf Subpopulationen von Pferdelymphozyten.

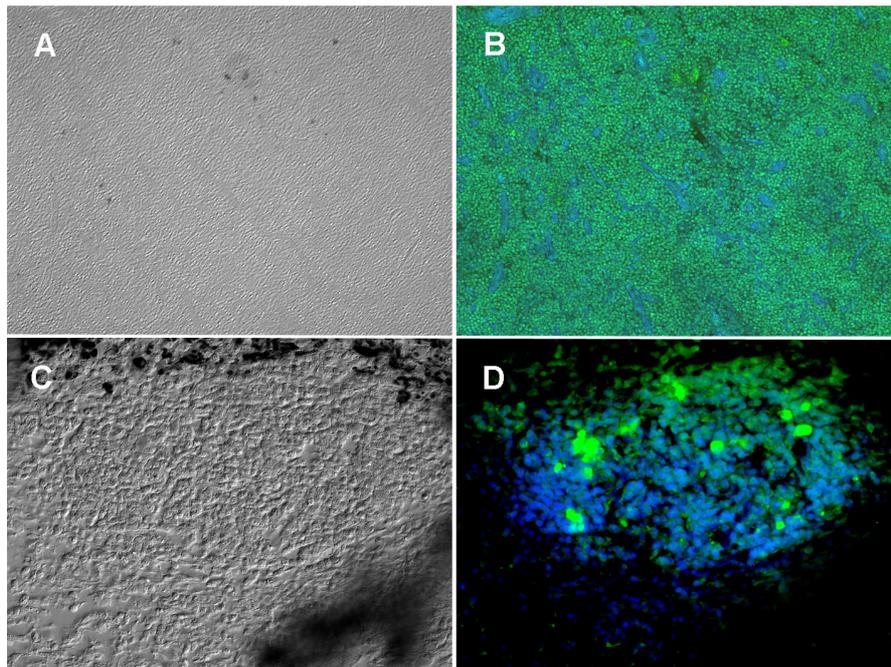
Septin 7-positive Lymphozyten erscheinen im unteren rechten Quadranten (LR) im FL1 Kanal. Die entsprechenden Antikörper für die weitere Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen sind im FL2 Kanal positiv und somit im oberen linken Quadranten (UL) dargestellt. Doppelt positive Zellen erscheinen im oberen rechten Quadranten (UR) und die doppelt negativen im unteren linken Quadranten (LL). Die Prozentzahl der im jeweiligen Quadranten detektierten, entsprechend positiven Zellen ist in jedem Quadranten einzeln angegeben.

(a) Eingrenzungsbereich der zu untersuchenden Lymphozyten. Alle Ereignisse, die im Gate R1 gemessen wurden sind in den folgenden Abbildungen zu sehen. (b) Einzelfärbung mit anti-Septin 7-Antikörper. (c)-(i) Doppelfärbungen mit anti-Septin 7-Antikörper und (c) anti-CD4-Antikörper, (d) anti-CD8-Antikörper, (e) anti-Ki67-Antikörper, (f) anti-MHCII-Antikörper, (g) anti-CD11a-Antikörper, (h) anti-CD11b-Antikörper, (i) anti-CD29-Antikörper.

#### 4.2.6 Expression von Septin 7 in bei ERU gebildeten Lymphfollikeln im Auge

Die Expression von Septin 7 (grün fluoreszierend in Abb. 4.8 und 4.8.1- 4.8.6), wurde in Lymphfollikeln analysiert, die charakteristisch bei ERU in erkrankten Augen gebildet werden (Abb. 4.8C: Lymphfollikel in Normarski, Abb. 4.8D: Septin 7-positive Zellen, grün). Da gesunde Augen keine Lymphfollikel aufweisen, wurde als Kontrollgewebe Mandibularlymphknoten verwendet (Abb. 4.8A: Normarski, Abb. 4.8B: Septin 7 Färbung).

Im untersuchten Mandibularlymphknoten waren nahezu alle Zellen Septin 7-positiv (Abb. 4.8A: Normarski, Abb. 4.8B: Septin 7-positive Zellen, grün, Kernfärbung mit DAPI, blaue Fluoreszenz). Dagegen war in dem im Auge gebildeten Lymphfollikel nur etwa die Hälfte der Zellen ebenso deutlich Septin 7-positiv (Abb. 4.8C: Normarski, Abb. 4.8D: grüne Fluoreszenz Septin 7).

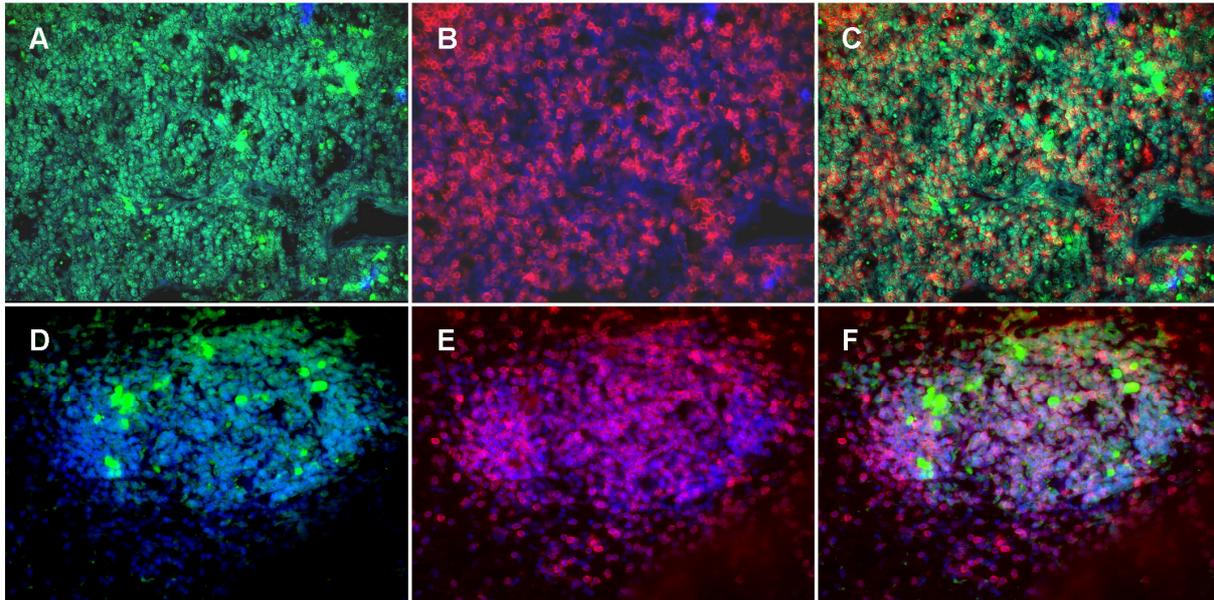


**Abb. 4.8:** Expression von Septin 7 im Mandibularlymphknoten und im Lymphfollikel. Dargestellt sind der Ausschnitt eines Mandibularlymphknotens eines augengesunden Pferdes (A)(B) sowie der Lymphfollikel eines an ERU erkrankten Pferdes (C)(D).

(A)(C) Normarski. (B)(D) Septin 7-positive Zellen (grün), DAPI gefärbte Zellkerne (blau).

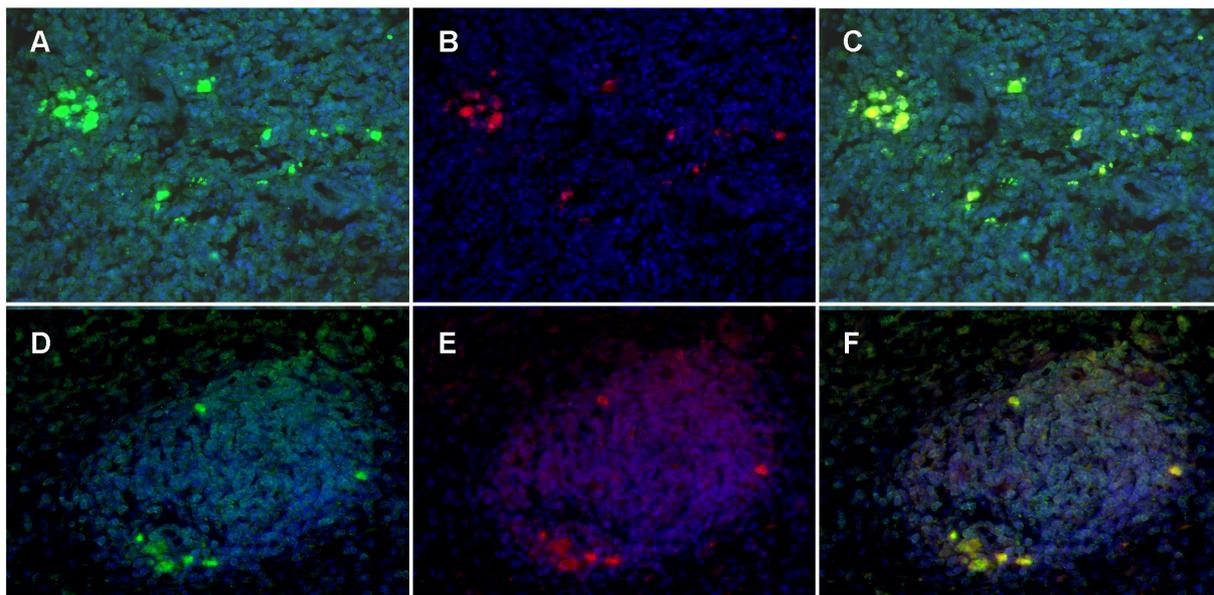
Bei der näheren Charakterisierung der Septin 7-positiven Zellen im Gewebe (Abb. 4.8.1-4.8.6A-C: jeweils Mandibularlymphknoten, A Septin 7-Expression in grün, B zu testende Ko-Expression (rot), C Überlagerung der Bilder aus A und B, 4.8.1-4.8.6 D-F: entsprechende Färbungen auf Lymphfollikel) waren die doppelt positiven Zellen im

Mandibularlymphknoten und im Follikel überwiegend T-Zellen (CD3-positive Zellen, Abb. 4.8.1A-C: Mandibularlymphknoten, Abb. 4.8.1D-F: Lymphfollikel).



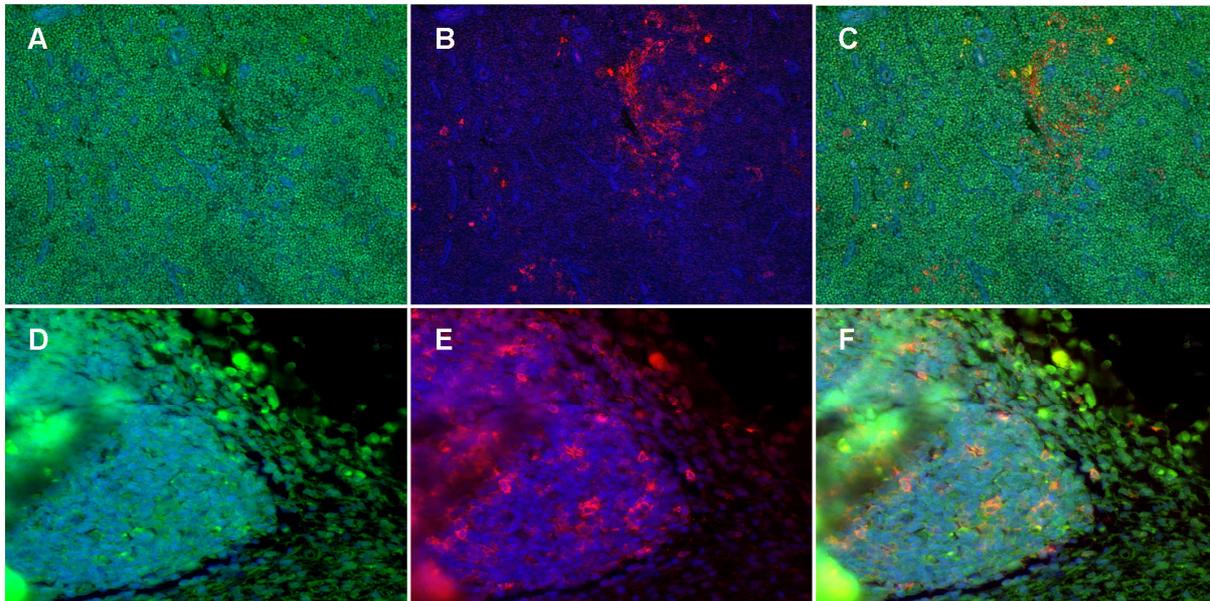
**Abb. 4.8.1:** Expression von Septin 7 (grün) und CD3 (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Nahezu alle Zellen exprimieren Septin 7 und CD3 (C und F: Ko-Lokalisation).

Proliferierende Zellen (Ki67-positiv, rot, Abb. 4.8.2B: Mandibularlymphknoten, Abb. 4.8.2E: Follikel) waren in beiden untersuchten Geweben alle doppelt positiv (Septin 7 und Ki67 Überlagerung in gelb, Abb. 4.8.2C: Mandibularlymphknoten und F: Follikel).



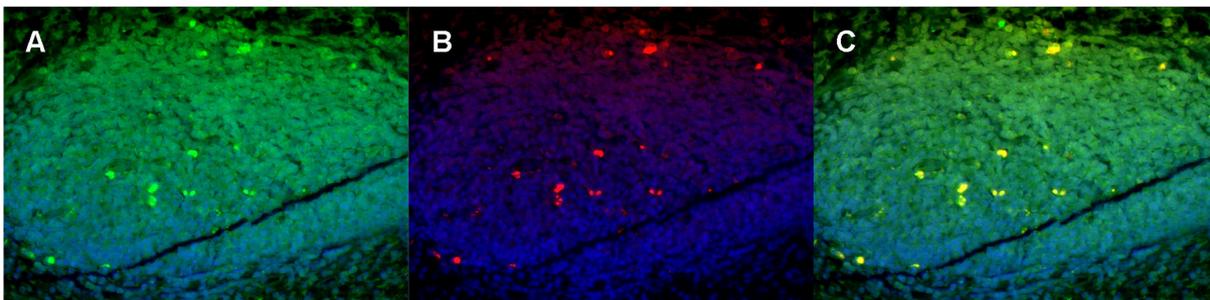
**Abb. 4.8.2:** Expression von Septin 7 (grün) und Ki67 (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Alle Ki67 exprimierenden Zellen sind auch Septin 7-positiv (C und F: Überlagerung, gelb).

MHCII-exprimierende Zellen (rot, Abb. 4.8.3B: Mandibularlymphknoten, Abb. 4.8.3E: Follikel) schienen in beiden Geweben weitestgehend nicht doppelt positiv mit Septin 7 zu sein (Abb. 4.8.3C: Mandibularlymphknoten und Abb. 4.8.3F: Follikel).

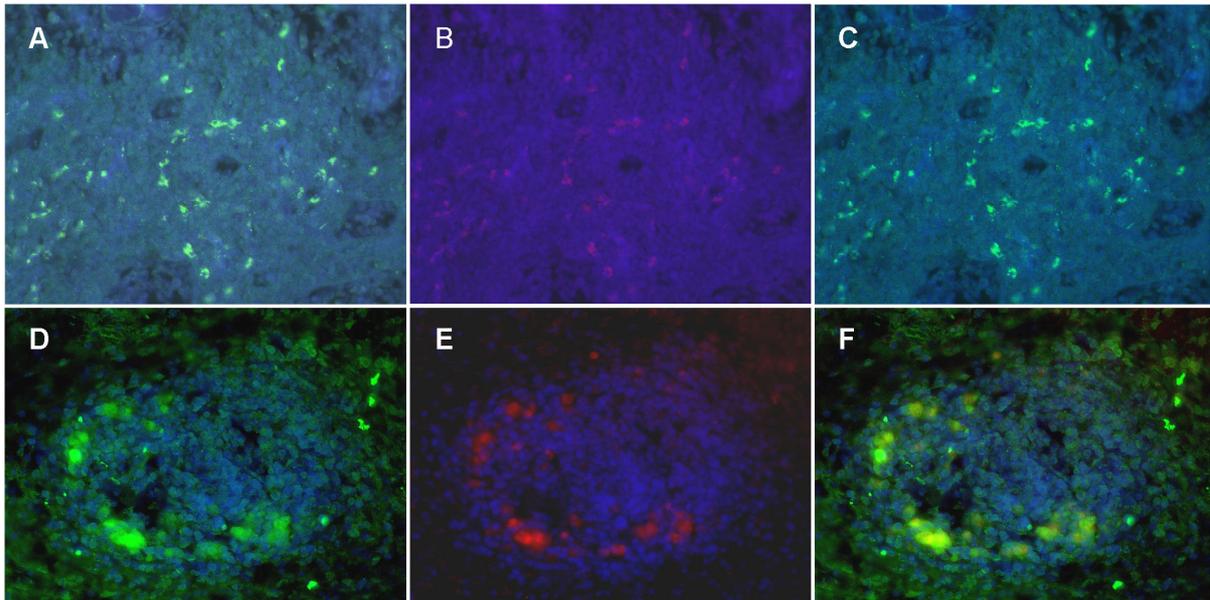


**Abb. 4.8.3:** Expression von Septin 7 (grün) und MHCII (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). MHCII- und Septin 7-exprimierende Zellen kommen in beiden Geweben auf verschiedenen Zellpopulationen vor (C und F).

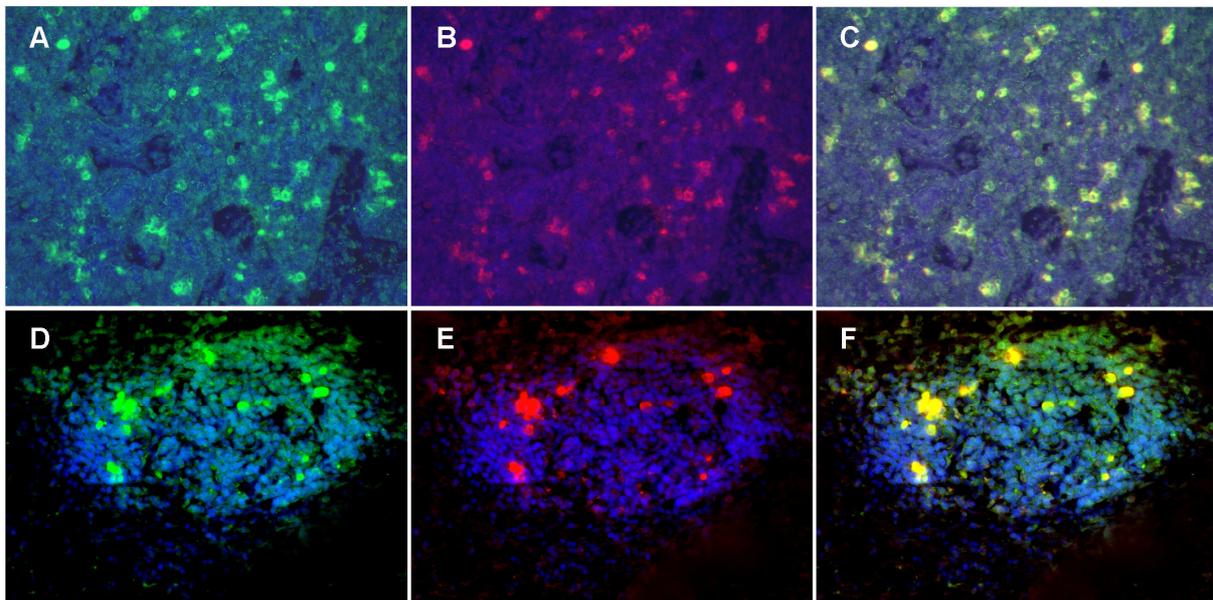
Bei der Untersuchung der Ko-Expression von Integrin und Septin 7 im Gewebe des Pferdes fiel auf, dass in beiden untersuchten Strukturen, die Zellen, die entweder MAC1 (CD11b-positive Zellen, Abb. 4.8.4B: Lymphfollikel) oder Integrin-beta 1 (CD29-positive Zellen, Abb. 4.8.5B: Mandibularlymphknoten, E: Lymphfollikel), oder Integrin-alpha 1 exprimieren (CD49a-positive Zellen, Abb. 4.8.6B und E), immer auch Septin 7 positiv sind (die Überlagerung der Expression fluoresziert gelb, CD11b und Septin 7 in Abb. 4.8.4C: Mandibularlymphknoten und F: Lymphfollikel, CD29 und Septin 7 in Abb. 4.8.5C und F, CD49a und Septin 7 in Abb. 4.8.6C und F).



**Abb. 4.8.4:** Expression von Septin 7 (grün) und CD11b (rot) im Lymphfollikel (A-C), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Alle CD11b-exprimierenden Zellen sind mit Septin 7 doppelt positiv (C: Überlagerung, gelb).



**Abb. 4.8.5:** Expression von Septin 7 (grün) und CD29 (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). CD29-positive Zellen sind auch Septin 7-positiv (C und F: in der Überlagerung gelb fluoreszierend).



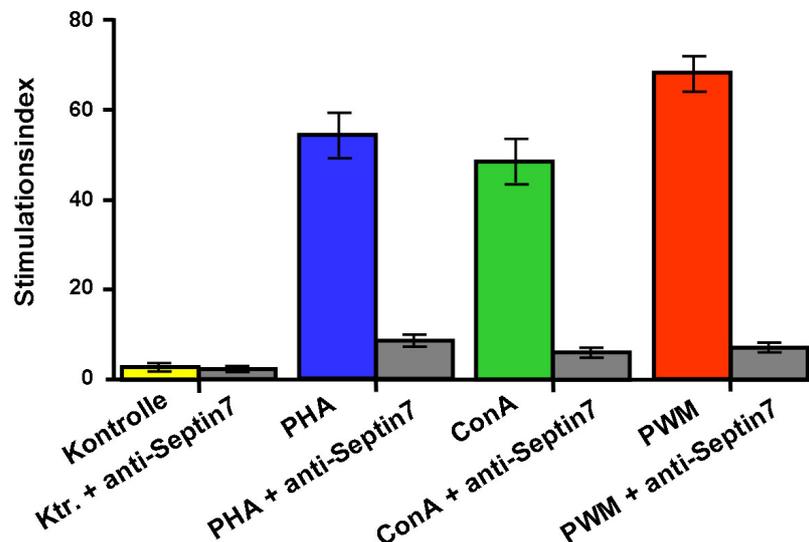
**Abb. 4.8.6:** Expression von Septin 7 (grün) und CD49a (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). CD49a-positive Zellen sind alle auch Septin 7-positiv (C und F: Überlagerung, gelb).

#### 4.2.7 Hemmung der polyklonalen Lymphozytenstimulation im Proliferationsassay mit anti-Septin 7-Antikörper

Da die Septin 7-Expression mit proliferierenden Zellen assoziiert war (Ki67-positive Zellen, siehe Abb. 4.7e und Abb. 4.8.2), wurden die Auswirkungen der Blockierung von Septin 7 im Zellproliferationsassay bei polyklonaler Stimulation der Zellen untersucht.

Periphere Blut-Leukozyten von augengesunden Pferden wurden zu diesem Zweck mit den drei Mitogenen Concanavalin A (ConA), Phytohämagglutinin (PHA) und Pokeweed Mitogen (PWM) stimuliert. Die polyklonale Stimulation bewirkte eine deutliche Steigerung der Zellproliferation um die Faktoren 45 (PHA, blaue Säule), 34 (ConA, grüne Säule) und 55 (PWM, rote Säule) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen (gelbe Säule) (Abb. 4.9).

Wurde zu den nativen Leukozyten zeitgleich mit den Mitogenen zusätzlich ein polyklonaler anti-Septin 7-Antikörper<sup>113</sup> in einer Dosis von je 1,2 µg pro Delle zugegeben, führte dies zu einer fast vollständigen Hemmung der Zellproliferation bei allen drei eingesetzten Mitogenen (graue Säulen, Abb. 4.9).



**Abb. 4.9:** Hemmung polyklonaler Lymphozytenstimulation mit anti-Septin 7-Antikörper.

Dargestellt ist die PHA- (blaue Säule), ConA- (grüne Säule) und PWM- (rote Säule) induzierte Zellproliferation von Lymphozyten augengesunder Pferde sowie eine unstimulierte Negativkontrolle (gelbe Säule) anhand ihres Stimulationsindex. Die Zugabe von jeweils 1,2 µg anti-Septin 7-Antikörper zu den Lymphozyten hemmt die Zellproliferation nach der Inkubation mit PHA, ConA und PWM (graue Säulen).

<sup>113</sup> Everest Biotech (über Acris, Herford)

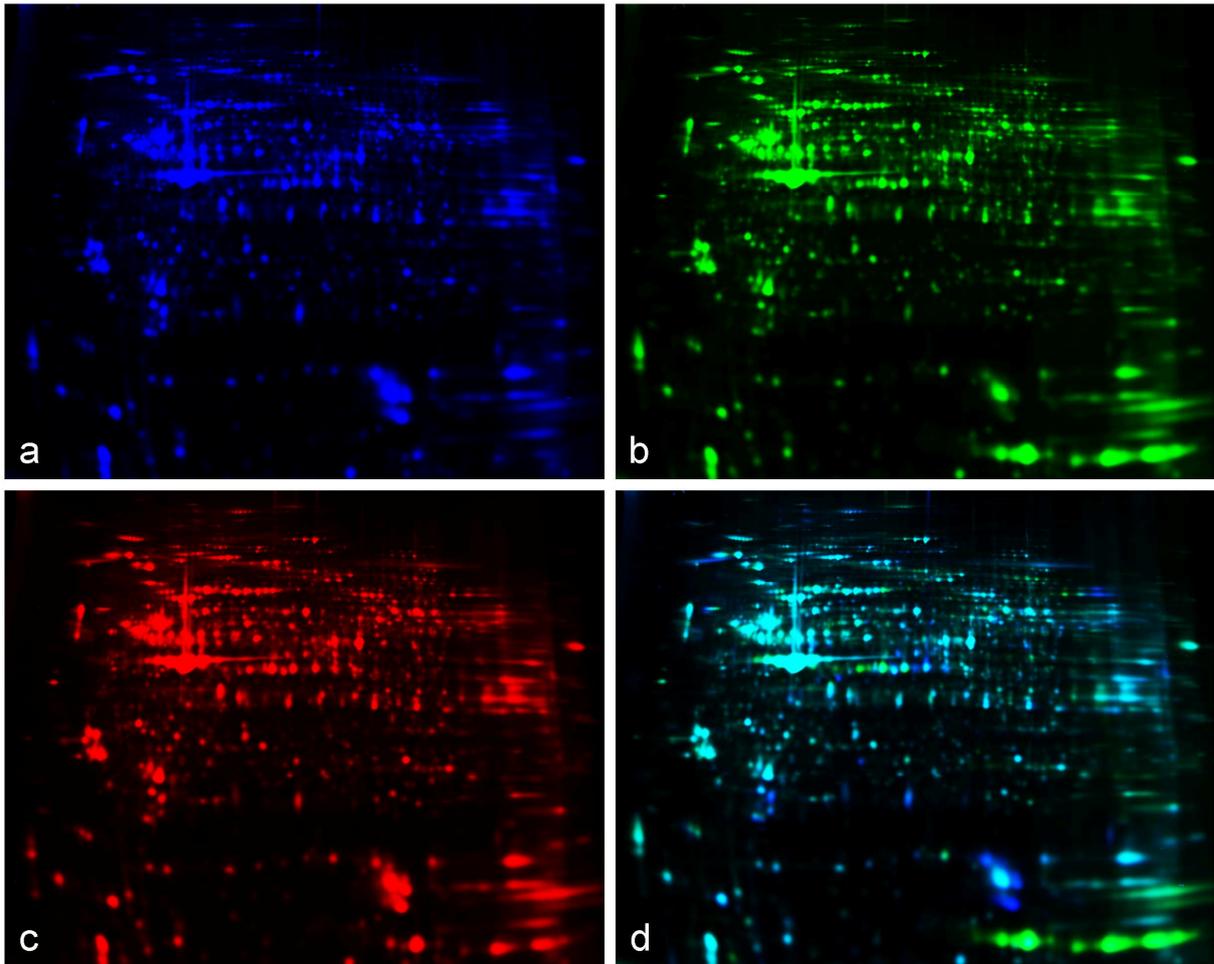
### **4.3 Beschreibung differenzieller Proteinexpressionsmuster gemischt granulo- und lymphozytärer ERU-Proben im Vergleich zu augengesunden Pferden mittels 2D-DIGE Technologie (DIGE-Experiment 2)**

#### **4.3.1 Darstellung des Expressionsmusters von Granulozytenproteinen und Lymphozytenproteinen in der Fluoreszenzansicht**

Um festzustellen, ob vom ersten, lymphozytären Experiment abweichende, differenziell exprimierte Proteine auftreten, wenn auch Granulozyten mit berücksichtigt werden, wurden im zweiten DIGE-Experiment gemischt granulo- und lymphozytäre Proben untersucht.

Insgesamt wurden für dieses Experiment zwölf gemischt granulo- und lymphozytäre Proben (60% +/- 5% Lymphozyten) herangezogen, bestehend aus sechs PBL-Proben gesunder Pferde (59% +/- 5% Lymphozyten) und sechs ERU-Proben (62% +/- 5% Lymphozyten). Zu den oben genannten Probenpaaren kam für die spätere statistische Evaluierung je ein für das Experiment spezifischer interner Standard hinzu.

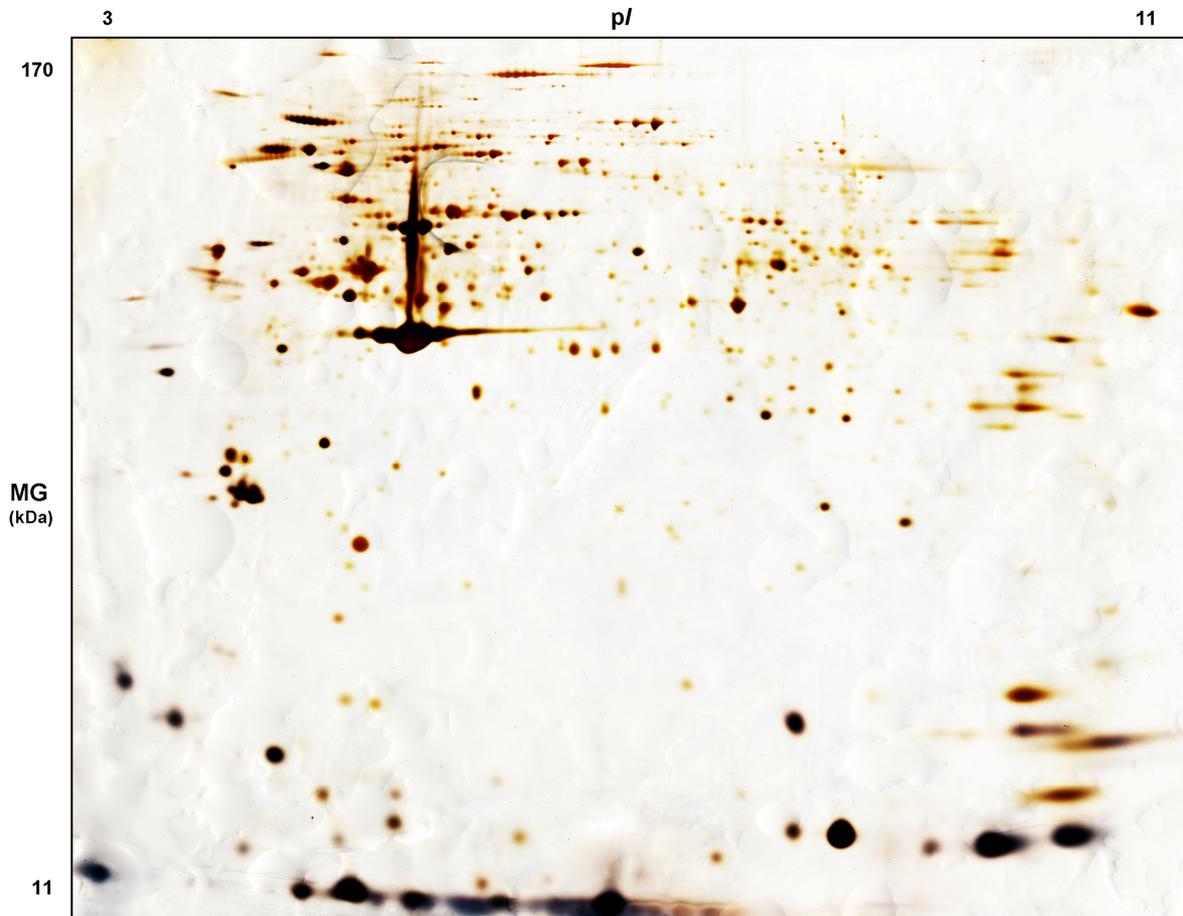
In Abbildung 4.10 sind vier Fluoreszenzbilder aus einem repräsentativen Gel des Experiments dargestellt. Auch bei der Analyse der gemischten Zellpopulationen sind schon in der Fluoreszenzdarstellung Unterschiede zwischen dem gesunden Pferd (Abb. 4.10a, Cy3 markiert, blaue Darstellung), und der Probe des an ERU erkrankten Pferdes (Abb. 4.10b, Cy5, grün) erkennbar. Bei der Überlagerung der Proben (Abb. 4.10d) können mehrere bei ERU niedriger exprimierte Spots (Abb. 4.10d, blau), sowie einige in ERU höher exprimierte Spots (Abb. 4.10d, grün) von den in beiden Proben deckungsgleich repräsentierten Proteinen (Abb. 4.10d, türkis) abgegrenzt werden. Der interne Standard ist in rot dargestellt (Abb. 4.10c, Cy2, rot).



**Abb. 4.10:** Fluoreszenzdarstellung eines Gels aus dem 2D-DIGE-Experiment 2: Drei PBL-Proben (Kontrolle, ERU, interner Standard) wurden mit jeweils verschiedenen CyDye Farbstoffen markiert, gemeinsam zweidimensional aufgetrennt, mit dem Typhoon Trio<sup>69</sup> Scanner eingescannt und mit der ImageQuant TL Software veranschaulicht.

(a) Cy3 markierte Kontrolle, (b) Cy5 markierte ERU-Probe, (c) Cy2 markierter interner Standard. (d) Die Überlagerung des Cy3- und Cy5-Bildes zeigt Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zwischen der Kontrolle (blau) und der ERU-Probe (grün), gleiche Expression stellt sich in türkis dar.

Nach der Fluoreszenzanalyse wurde das entsprechende Gel silbergefärbt, um die differenziellen Kandidatenproteine für die weitere Identifikation im Massenspektrometer auszuschneiden.



**Abb. 4.11:** Repräsentatives silbergefärbtes Gel aus dem 2D-DIGE-Experiment 2.

In diesem Gel wurden insgesamt 150 µg CyDye-markiertes Leukozytenprotein aufgetrennt. Die Zuordnung der Spots zu der jeweiligen Kontroll-, ERU-Probe oder dem internen Standard kann nur durch Fluoreszenzanregung erfolgen. Nach der Auswertung mittels der DeCyder 6.5 Software konnten die differenziell exprimierten Spots bestimmt und händisch mit dem passenden silbergefärbten Gel abgeglichen werden. Die differenziellen Kandidatenproteine wurden dann aus dem silbergefärbten Gel für die weitere Identifikation im Massenspektrometer ausgeschnitten.

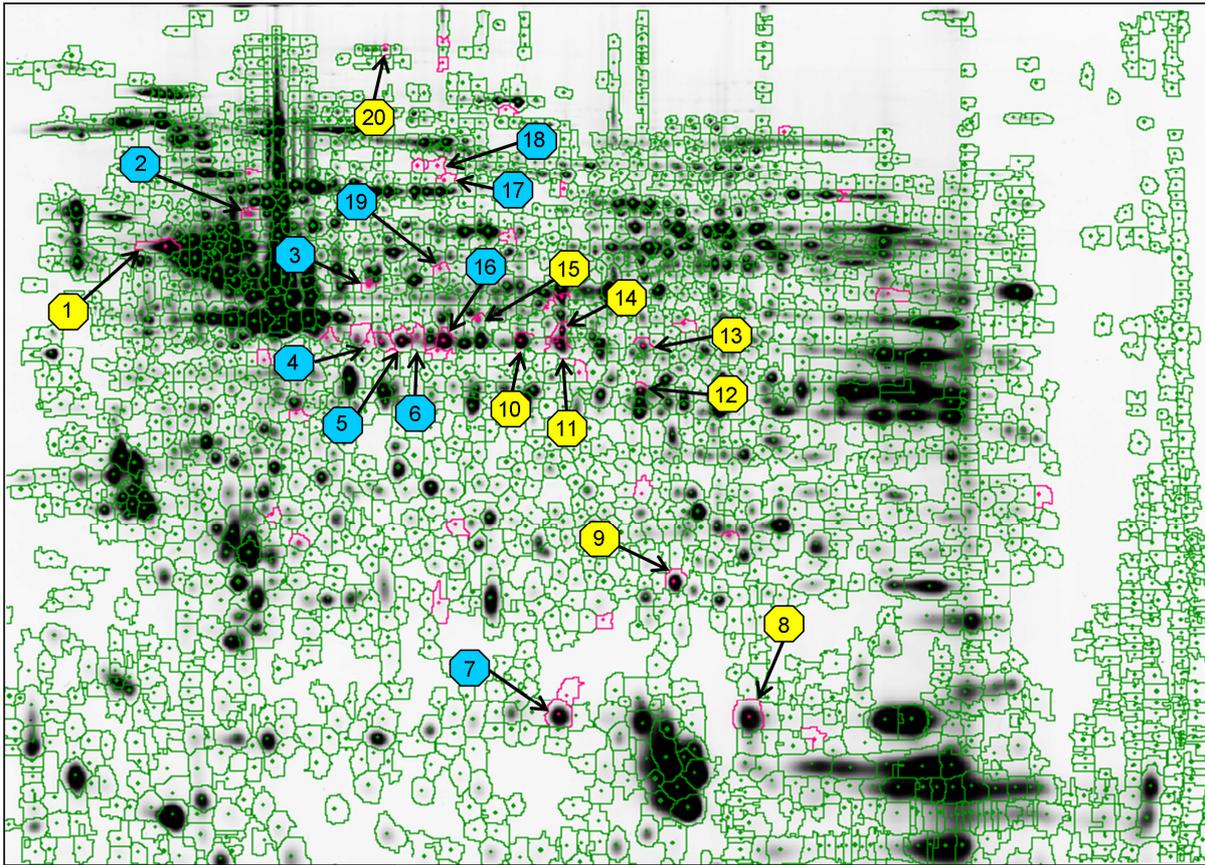
### **4.3.2 Identifikation von 20 differenziell exprimierten Proteinen im gemischt lympho- und granulozytären PBL-Proteom von an ERU erkrankten Pferden**

Im zweiten Experiment wurden sechs DIGE-Gele in die Auswertung einbezogen. In Abbildung 4.12 wird die Proteinübersichtskarte des Master-Gels dieses Experiments in der BVA Ansicht gezeigt.

Es wurden mit Hilfe der DeCyder 6.5 Software Module Image Loader, DIA und BVA nach händischer Kontrolle der Spotübereinstimmung und Korrektur von falsch gepaarten Spots insgesamt 50 differenziell exprimierte Spots detektiert. Zwanzig der 50 differenziellen Spots konnten massenspektrometrisch signifikant identifiziert werden. Diese wurden auf der Übersichtskarte in Abbildung 4.12 fortlaufend durchnummeriert.

Zehn der 20 differenziellen Spots, die mit Hilfe der DeCyder 6.5 Software detektiert wurden, waren in den Zellpräparationen der an ERU erkrankten Pferde höher exprimiert im Vergleich zu den Gesunden (Abb. 4.12: blau unterlegte Spotnummern). Mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF und LC-MSMS) wurden diese zehn Spots als Laktotransferrin (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 18), Albumin (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 17), Cu-Zn Superoxid Dismutase (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 7), Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 2), Glutaredoxin 3 (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 4), Aldehyd Dehydrogenase (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 19), Succinyl-CoA Ligase, beta Kette (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 3), Selenid Wasser-Dikinase 1 (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 6), Serin Proteinase Inhibitor Stamm B10 (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 16) und Scaffold Attachment Faktor B (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 5) identifiziert.

Im Gegensatz dazu waren die Proteine Fruktose-Bisphosphat Aldolase C (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 13), Protein Disulfid Isomerase (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 1), Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein H3 (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 12), Poly (rC) bindendes Protein 2, Isoform b (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 11), Glutathion S-Transferase P (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 9), Transgelin 2 (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 8), PWP1-interagierendes Protein (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 14), Serpin B10 (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 10), NCK Adapter Protein 1 (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 15) sowie Talin 1 (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 20) in den ERU-Proben geringer exprimiert (Abb. 4.12: gelb unterlegte Spotnummern).

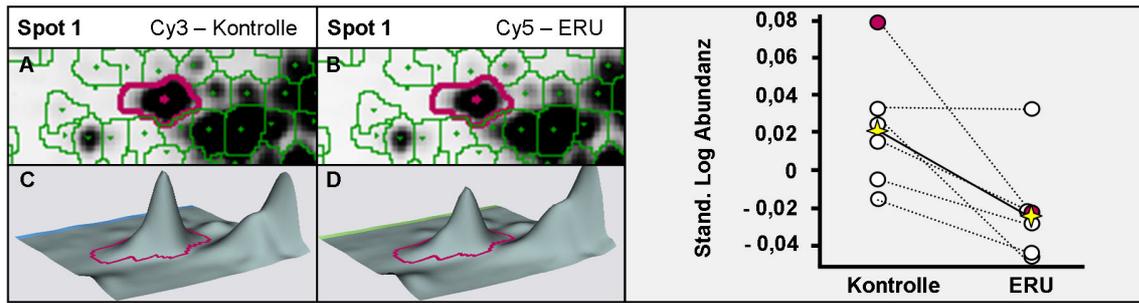


**Abb. 4.12:** Proteinlandkarte aus fluoreszenzmarkierten und zweidimensional aufgetrennten peripheren Blut-Leukozyten im DIGE-Experiment 2, generiert mit DeCyder 6.5 Software. Alle von der Software erkannten Spots sind in grün dargestellt, differenziell exprimierte Proteine mit statistischer Relevanz (Student's t-Test  $p < 0,05$ ) in rosa.

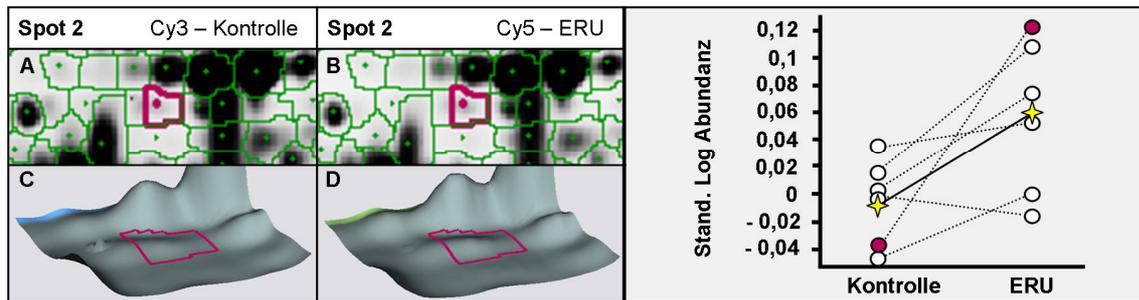
Insgesamt wurden 50 differenziell exprimierte Spots detektiert. Die 20 massenspektrometrisch identifizierten Spots sind entsprechend der Tabelle 4.3 fortlaufend nummeriert. Gelb gekennzeichnete Nummern verweisen auf identifizierte Proteine die bei ERU-Proben niedriger exprimiert sind im Vergleich zu den Kontrollen, blau unterlegte Nummern auf erhöhte Expression in den ERU-Proben. Differenzielle, aber nicht identifizierte Spots sind in der Abbildung nicht mit einer Nummer versehen.

In Abbildung 4.13 ist eine vergleichende Zusammenstellung jedes einzelnen Spots im BVA sowie die dazugehörigen Proteinidentifikationen (analog zu Abschnitt 4.2.3, Abbildung 4.5) dargestellt. Achtzehn der 20 identifizierten Proteine konnten mit der DeCyder 6.5 Software in allen Gelen des Experiments detektiert werden, das NCK Adapter Protein 1 (Spot Nr. 15) und Albumin (Spot Nr. 17) wurden jeweils in fünf von sechs Gelen gefunden (Abb. 4.13, Grafiken).

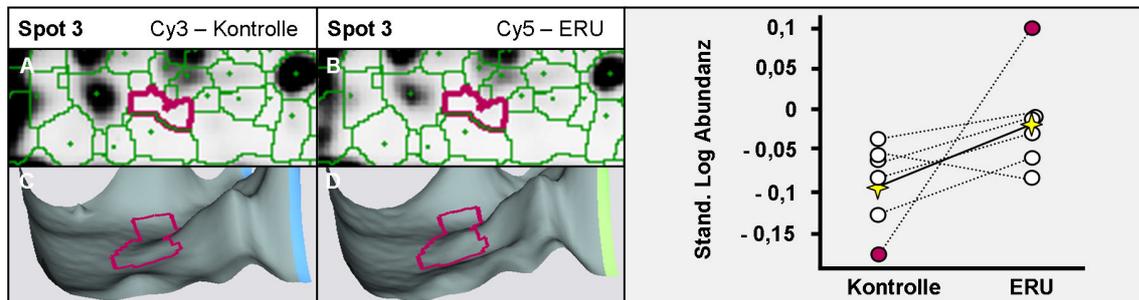
Ergebnisse



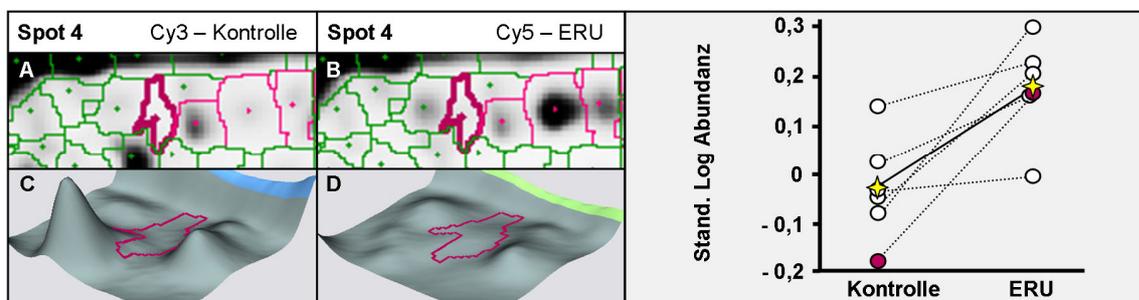
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Protein Disulfid Isomerase	Rattus norvegicus	PDIA1_RAT	57315	4,82	87



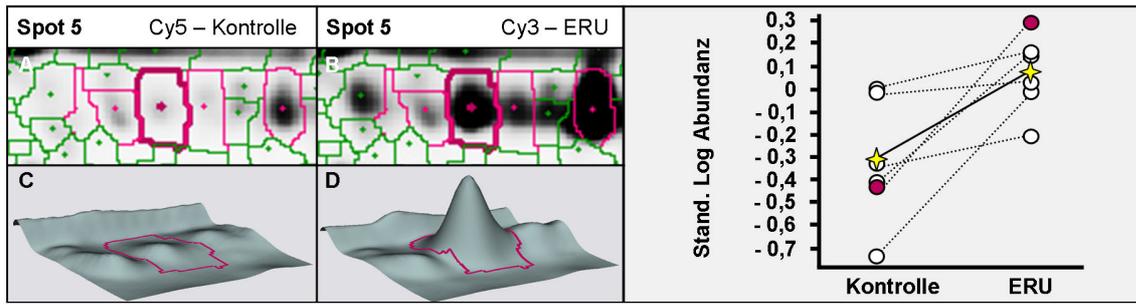
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K	Mus musculus	B2M1R6	48562	5,38	100% (19)



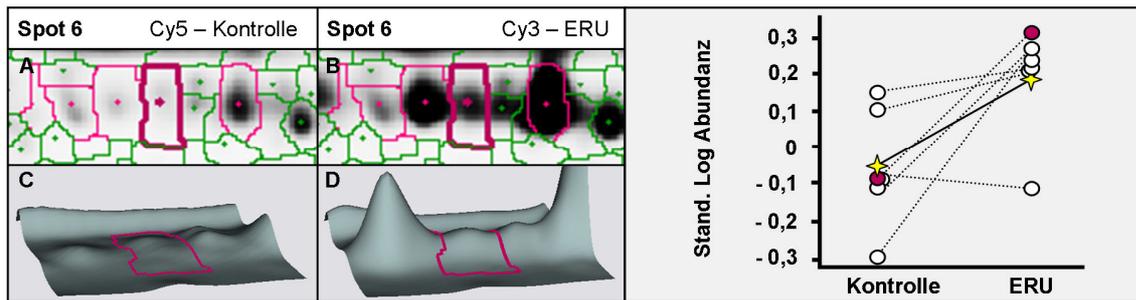
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Succinyl-CoA Ligase, beta Kette	Sus scrofa	SUCB2_PIG	47116	5,77	117



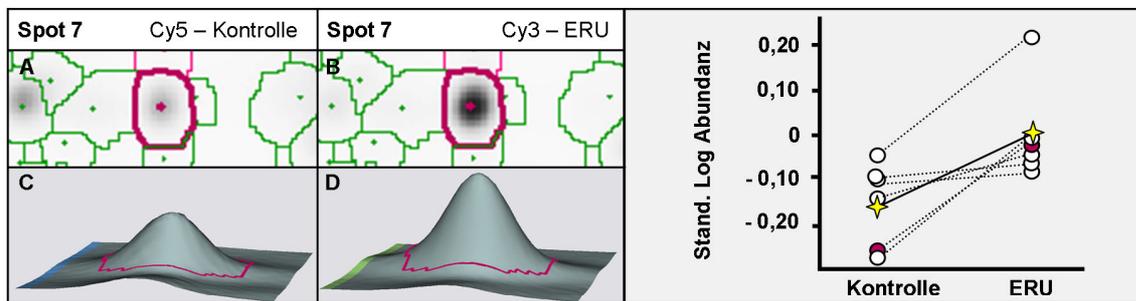
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Glutaredoxin 3	Mus musculus	Q9CQM9	37778	5,42	100% (12)



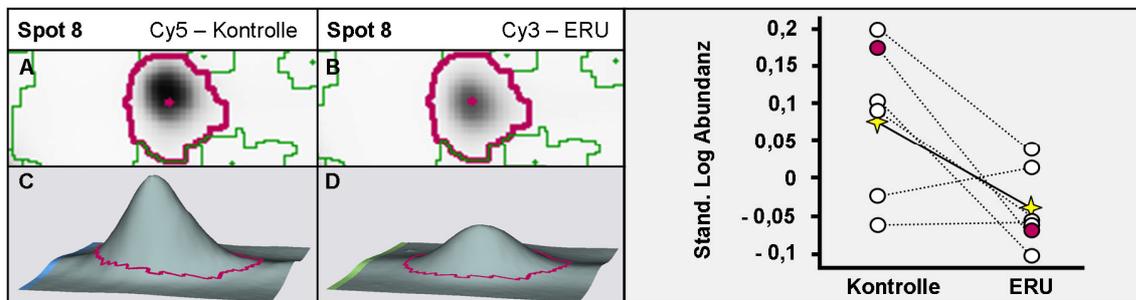
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Scaffold Attachment Faktor B	Equus caballus	UPI00017963D0	45401	5,66	100% (12)



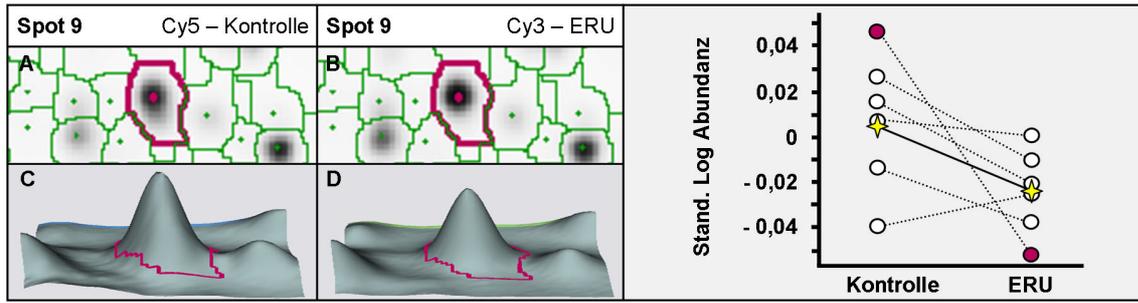
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Selenid Wasser-Dikinase 1	Homo sapiens	SPS1_HUMAN	43396	5,64	93



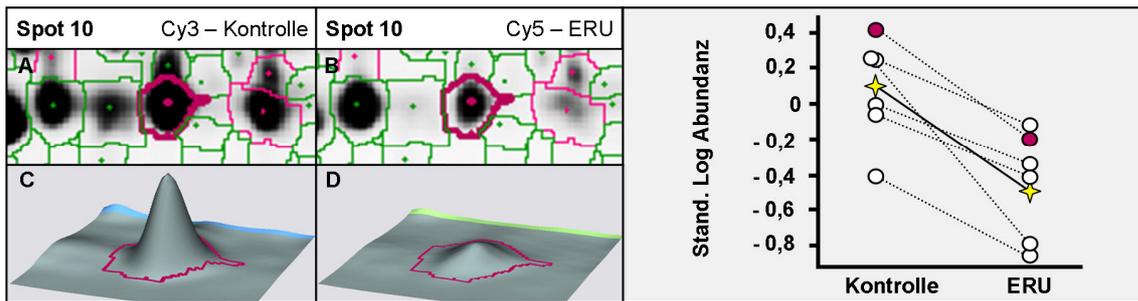
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Cu-Zn Superoxid Dismutase	Equus caballus	SODC_HORSE	16232	6,03	89



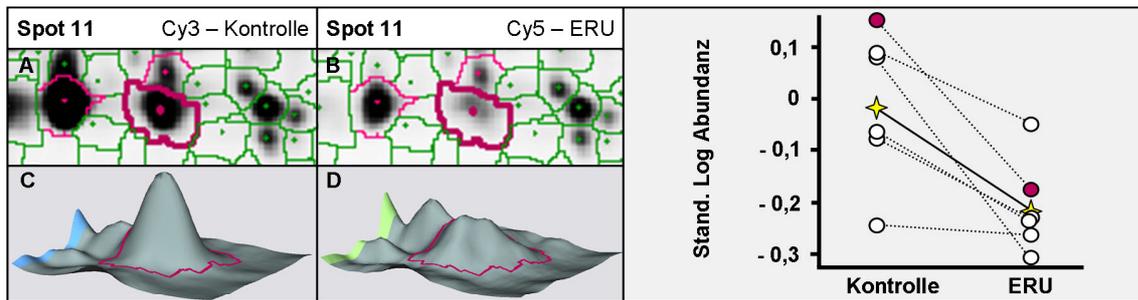
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Transgelin 2	Equus caballus	UPI0001560EBB	22582	8,76	474



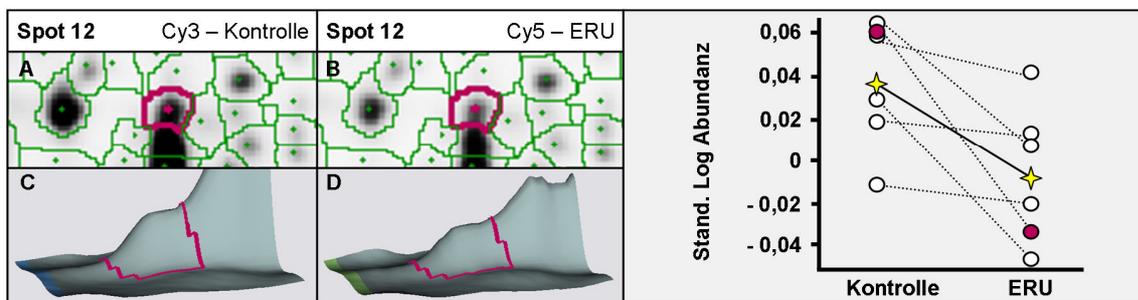
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Glutathion S-Transferase P	Equus caballus	UPI000155F3A7	23428	6,41	442



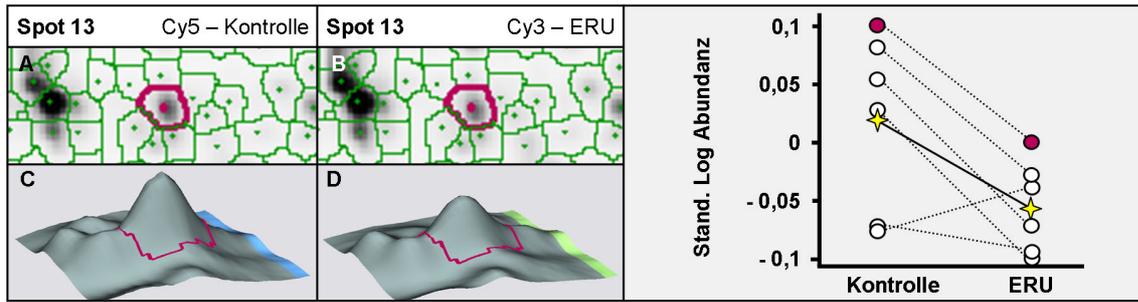
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Serpin B10	Equus caballus	B8K249	45484	6,13	497



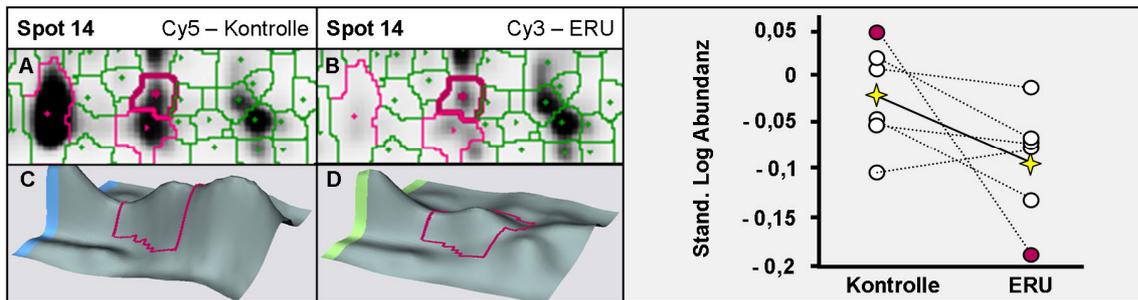
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Poly (rC) bindendes Protein 2, Isoform b	Homo sapiens	Q59HD4_HUMAN	39525	6,72	100% (5)



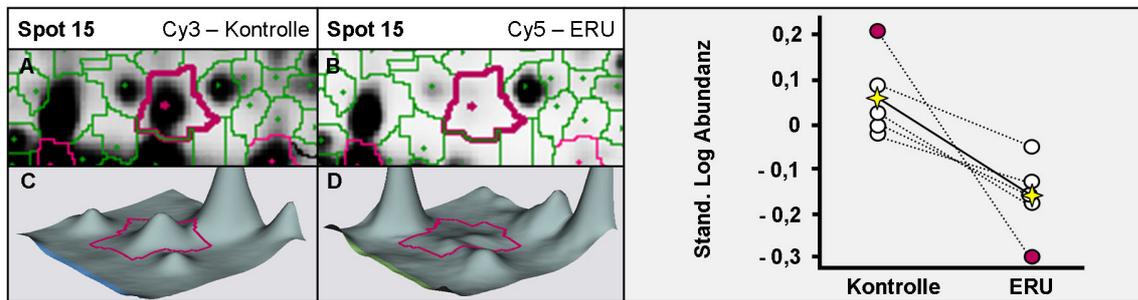
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein H3	Homo sapiens	P31942	36903	6,37	128



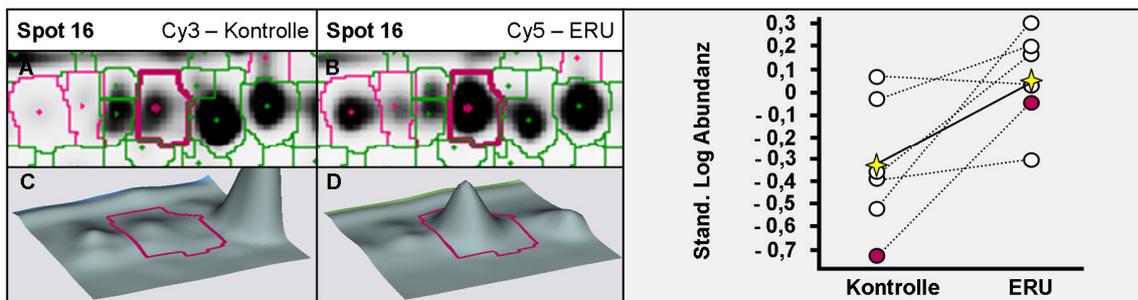
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Fructose-Bisphosphat Aldolase C	Macaca fascicularis	ALDOC_MACFA	39796	6,41	122



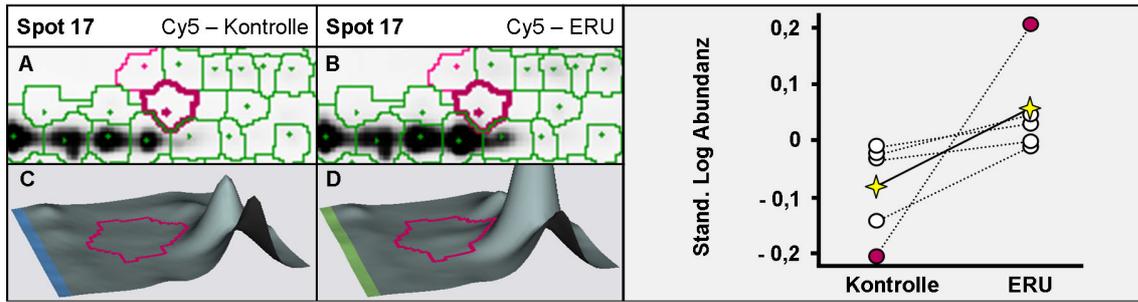
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
PWP1-interagierendes Protein	Homo sapiens	DJB11_HUMAN	40514	5,81	100% (5)



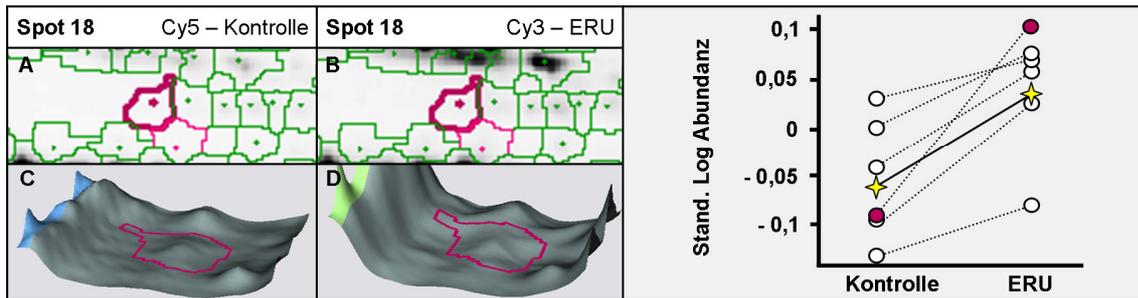
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
NCK Adapter Protein 1	Homo sapiens	NCK1_HUMAN	42864	6,06	100% (4)



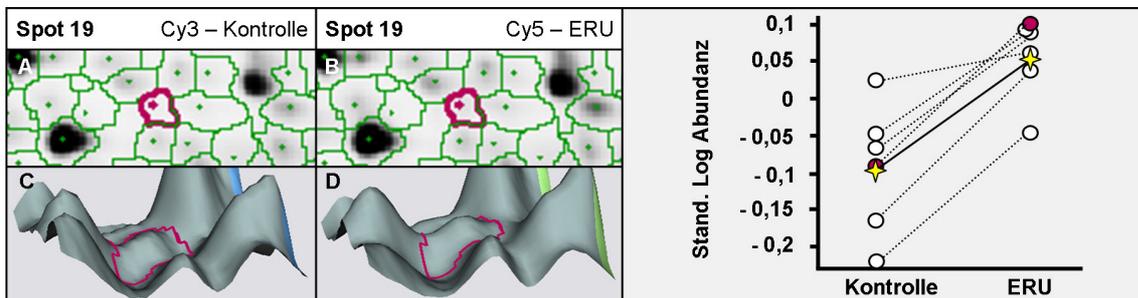
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Serin Proteinase Inhibitor Stamm B10	Equus caballus	UPI000155EBF0	45383	5,73	255



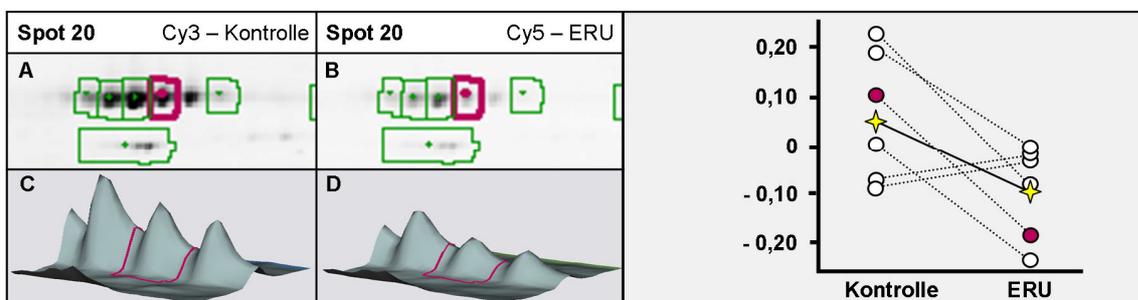
Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	69



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Laktotransferrin	Equus caballus	TRFL_HORSE	75991	8,30	100% (8)



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Aldehyd Dehydrogenase	Equus caballus	ALDH2_HORSE	54532	5,7	152



Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Acc.Nummer <sup>d</sup>	MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Score <sup>g</sup>
Talin1	Homo sapiens	TLN1_HUMAN	271766	5,77	147

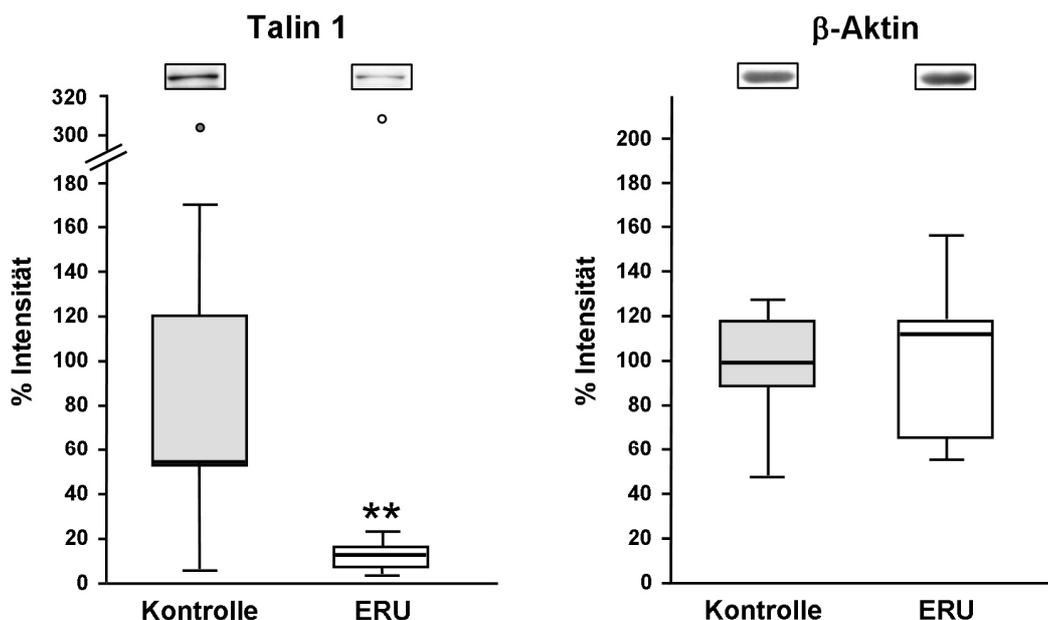
**Abb. 4.13:** DeCyder Auswertung des DIGE-Experiments 2: Darstellung der 20 differenziell exprimierten, massenspektrometrisch identifizierten Proteine aus dem gemischt granulo- und lymphozytären Experiment. Die Darstellung ist analog zu Abbildung 4.5.

Spot Nr. <sup>a</sup>	▲ ▼	Protein Name <sup>b</sup>	Spezies <sup>c</sup>	Accession Nummer <sup>d</sup>	Theoretical		Score <sup>g</sup>
					MG <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	
1	▼	Protein Disulfid Isomerase	Rattus norvegicus	PDIA_RAT	57315	4,82	87
2	▲	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K	Mus musculus	B2M1R6	48562	5,38	100% (19)
3	▲	Succinyl-CoA Ligase beta Kette	Sus scrofa	SUCB2_PIG	47116	5,77	117
4	▲	Glutaredoxin 3	Mus musculus	Q9CQM9	37778	5,42	100% (12)
5	▲	Scaffold Attachment Faktor B	Equus caballus	Gi149721231	45401	5,66	100% (12)
6	▲	Selenid, Wasser Dikinase 1	Homo sapiens	SPS1_HUMAN	43396	5,64	93
7	▲	Cu-Zn Superoxid Dismutase	Equus caballus	SODC_HORSE	16232	6,03	89
8	▼	Transgelin 2	Equus caballus	UPI0001560EBB	22582	8,76	474
9	▼	Glutathion S-Transferase P	Capra hircus	Q9TTY8	23630	7,65	78
10	▼	Serpin B10	Equus caballus	B8K249	45484	6,13	497
11	▼	Poly (rC) bindendes Protein 2 Isoform B	Homo sapiens	Q59HD4_HUMAN	39525	6,72	100% (5)
12	▼	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein H3	Homo sapiens	P31942	36903	6,37	128
13	▼	Fruktose-Bisphosphat Aldolase C	Macaca fascicularis	ALCOC_MACFA	39796	6,41	122
14	▼	PWP1-interagierendes Protein	Homo sapiens	DJB11_HUMAN	40514	5,81	100% (5)
15	▼	NCK Adapter Protein 1	Homo sapiens	NCK1_HUMAN	42864	6,06	100% (4)
16	▲	Serin Proteinase Inhibitor Stamm B10	Equus caballus	UPI000155EBF0	45383	5,73	255
17	▲	Albumin	Equus caballus	ALBU_HORSE	70550	5,95	69
18	▲	Laktotransferrin	Equus caballus	TRFL_HORSE	75991	8,30	100% (8)
19	▲	Aldehyd Dehydrogenase	Equus caballus	ALDH2_HORSE	54532	5,7	152
20	▼	Talin 1	Homo sapiens	TLN1_HUMAN	271766	5,77	147

**Tab. 4.3:** Massenspektrometrisch (MALDI-TOF/TOF und LC-MSMS) identifizierte, differenziell exprimierte Proteine aus dem DIGE-Experiment 2. Die Expression der Proteine in den ERU-Proben im Vergleich zu den Kontrollen ist in der zweiten Spalte angegeben. Die Bedeutung der hochgestellten Buchstaben ist in der Legende zu Tabelle 4.1 erklärt.

### 4.3.3 Verminderte Expression von Talin 1 im Granulozyten- und Lymphozytenproteom von an ERU erkrankten Pferden

Zur Verifizierung und Quantifizierung der Expressionsverminderung von Talin 1 wurden Leukozytenproben von zehn gesunden und zehn an ERU erkrankten Pferden im Western Blot mit einem monoklonalen anti-Talin 1 Antikörper<sup>114</sup> in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml inkubiert. Der signifikante Rückgang der Talin 1-Expression in den Leukozyten der an ERU erkrankten Pferde bestätigte sich in diesem Experiment (Abb. 4.14, Box Plot). Die Talin 1-Expression reduzierte sich bei den an ERU erkrankten Pferden auf 11% des bei gesunden Pferden gefundenen Wertes (auf 100% festgelegt). Die interne Ladungskontrolle auf β-Aktin zeigte wiederum, dass die Unterschiede in der Talin 1-Expression nicht durch unterschiedliche Proteinmengen hervorgerufen wurden (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14:** Verifizierung der reduzierten Talin 1-Expression in Granulozyten und Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden im Western Blot.

Die Schwärzungsintensität der Talin 1 Bande ist im Box Plot dargestellt, Kontrolle (graue Säule) und ERU-Probe (weiße Säule) vergleichend. Die Expression in den ERU-Proben war um 89% geringer als bei den Kontrollen (\*\* = Der Unterschied der Talin 1-Expression bei den an ERU erkrankten Pferden ist im Mann-Whitney Test mit  $p \leq 0,01$  hochsignifikant). Die Ladungskontrolle erfolgte mit β-Aktin.

<sup>114</sup> Serotec, Düsseldorf

#### 4.3.4 Phänotypisierung der Talin 1-positiven Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie

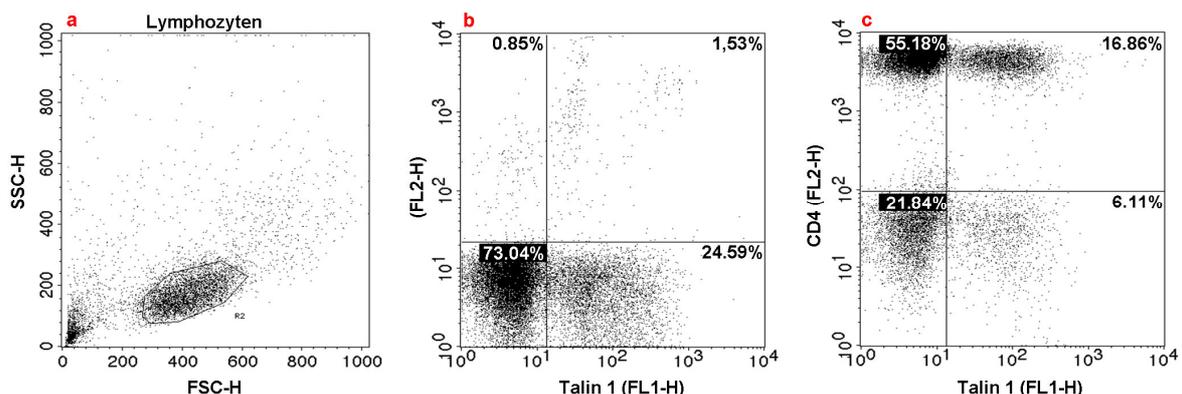
Um exakt ermitteln zu können, auf welchen Lymphozytensubpopulationen Talin 1 exprimiert ist, wurden die Talin 1-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) weiter phänotypisiert. Talin 1 konnte dabei auf 26,12% der untersuchten Lymphozyten detektiert werden (Abb. 4.15a: Lymphozyten-Gate R2, Abb. 4.15b: Die Talin 1-positiven Zellen finden sich im LR- (24,95%) und UR-Quadranten (1,53%) im FL1 Kanal, doppelt negative Zellen im LL-Quadranten).

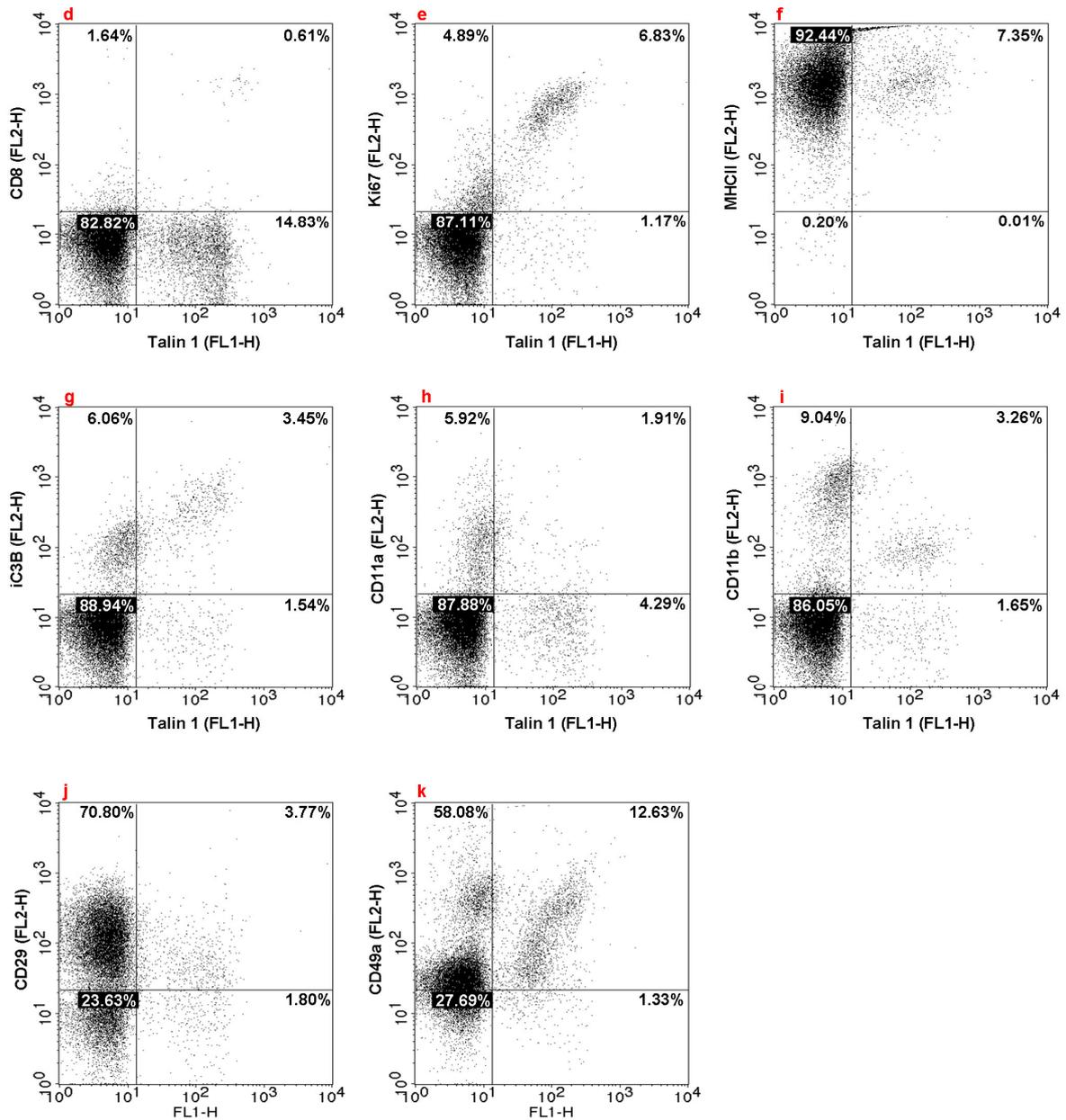
Zwei Drittel der Talin 1-positiven Pferde-Lymphozyten ko-exprimierten CD4 (Abb.4.15c: LR 6,11% + UR 16,86% Talin 1-positive Zellen; UR 16,86% doppelt positive Zellen), dagegen waren CD8 Zellen des Pferdes nicht Talin 1-positiv (Abb. 4.15d). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Talin 1-exprimierende Zellen Ki67 (Abb. 4.15e: UR 6,83% doppelt positive Zellen) und MHCII ko-exprimieren (Abb. 4.15f: UR 7,35% doppelt positive Zellen).

In den untersuchten peripheren Blut-Leukozyten war ca. ein Drittel der iC3b-exprimierenden Zellen gleichzeitig auch Talin 1-positiv (Abb. 4.15g: UR 3,45% doppelt positive).

Bei der Ko-Expression von Integrinen und Talin 1 war beim untersuchten Pferd festzustellen, dass Talin 1-positive Zellen nicht LFA-1 ko-exprimieren (CD11a Abb. 4.15h). Ein Viertel der Talin 1-positiven Zellen war auch MAC1-positiv (CD11b, Abb. 4.15i: UR 3,26% doppelt positive Zellen, LR 1,65% Talin 1-positive Zellen), wohingegen Talin 1-exprimierende Zellen kaum beta 1 Integrine ko-exprimierten (CD29, Abb. 4.15j: UR 3,77% doppelt positive Zellen).

Abschließend zeigte dieses FACS Experiment, dass Talin 1-positve Zellen (Abb. 4.15k, FL1 Kanal) gleichzeitig alpha 1 Integrine exprimieren (CD49a-Expression, FL2 Kanal: UR 12,63% doppelt positive Zellen).





**Abb. 4.15:** Expression von Talin 1 auf Subpopulationen von Pferdelymphozyten.

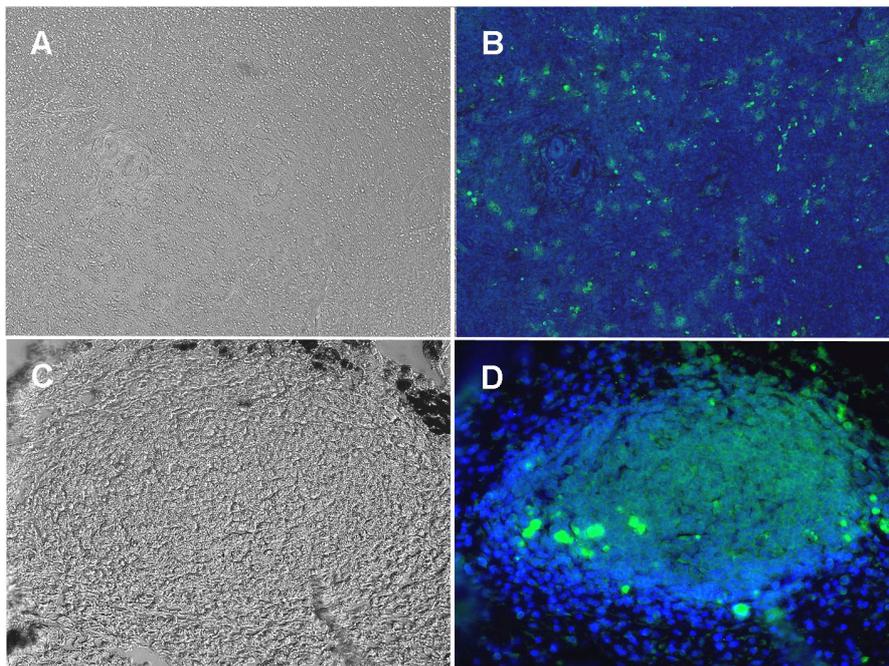
Talin 1-positive Lymphozyten erscheinen im unteren rechten Quadranten (LR) im FL1 Kanal. Die entsprechenden Antikörper für die weitere Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen sind im FL2 Kanal positiv und somit im oberen linken Quadranten (UL) dargestellt. Doppelt positive Zellen erscheinen im oberen rechten Quadranten (UR) und die doppelt negativen im unteren linken Quadranten (LL). Die Prozentzahl der im jeweiligen Quadranten detektierten, entsprechend positiven Zellen ist in jedem Quadranten einzeln angegeben.

(a) Eingrenzungsbereich der zu untersuchenden Lymphozyten. Alle Ereignisse, die im Gate R2 gemessen wurden sind in den folgenden Abbildungen zu sehen. (b) Einzelfärbung mit anti-Talin 1-Antikörper. (c)-(k) Doppelfärbungen mit anti-Talin 1-Antikörper und (c) anti-CD4-Antikörper, (d) anti-CD8-Antikörper, (e) anti-Ki67-Antikörper, (f) anti-MHCII-Antikörper, (g) anti-iC3B-Antikörper, (h) anti-CD11a-Antikörper, (i) anti-CD11b-Antikörper, (j) anti-CD29-Antikörper, (k) anti-CD49a-Antikörper.

#### 4.3.5 Expression von Talin 1 im Gewebe

Auch die Expression von Talin 1 (grün fluoreszierend in Abb. 4.16 und 4.16.1-4.16.7), wurde in Lymphfollikeln analysiert, die typischerweise in den erkrankten Augen bei Pferden mit ERU entstehen (Abb. 4.16C: Lymphfollikel in Normarski, Abb. 4.16D: Talin 1-positive Zellen).

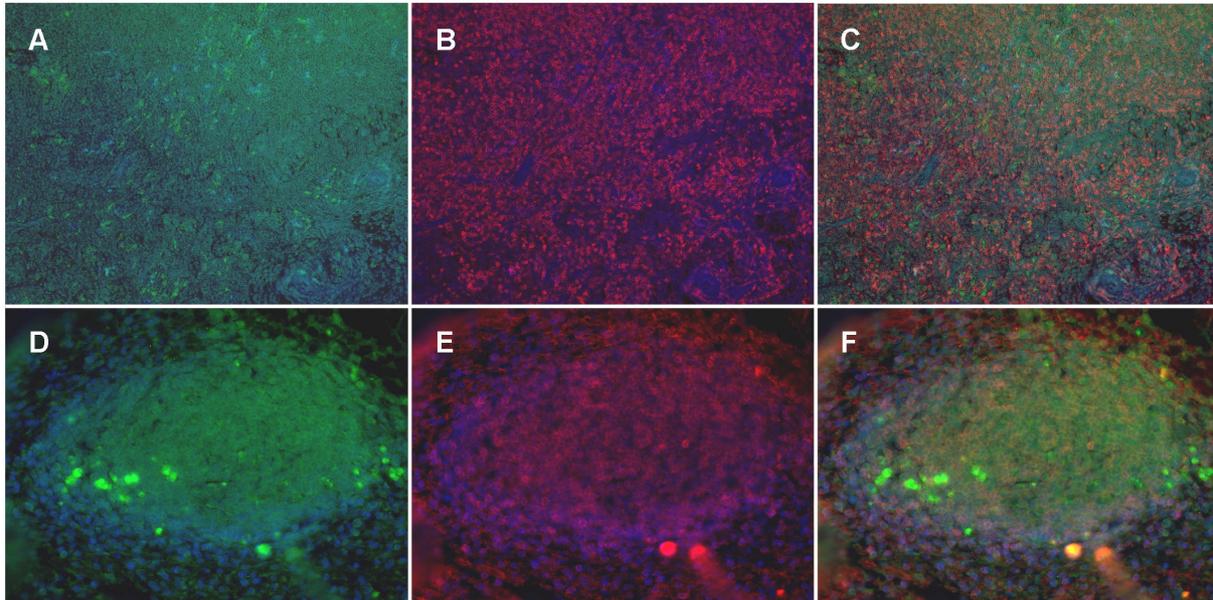
Im gezeigten Ausschnitt des als Kontrollgewebe eingesetzten Mandibularlymphknotens waren ca. 40% der Zellen Talin 1-positiv (Abb. 4.16A: Normarski, B: Talin 1-positive Zellen in grün, Kernfärbung mit DAPI, blaue Fluoreszenz). Im Gegensatz dazu war die überwiegende Zahl der Lymphozyten in dem im Auge gebildeten Lymphfollikel stark Talin 1-positiv (70-80%), dabei waren nur an einem Teil des äußeren Follikelrandes keine Talin 1-exprimierenden Zellen zu sehen (Abb.4.16C: Normarski, D: Talin 1 Färbung, grün). Die Darstellung der Abbildungen ist analog zu Abschnitt 4.2.6 (Abb. 4.8 und 4.8.1-4.8.6), in Panel A und D sind die Gewebe entsprechend mit anti-Talin 1-Antikörper gefärbt. In Abbildung 4.16.2 und 4.16.4 wird nur der Lymphfollikel gezeigt.



**Abb. 4.16:** Expression von Talin 1 im Mandibularlymphknoten und im Lymphfollikel. Dargestellt sind ein Ausschnitt aus dem Mandibularlymphknoten eines augengesunden Pferdes (A)(B) sowie der Lymphfollikel eines an ERU erkrankten Pferdes (C)(D).

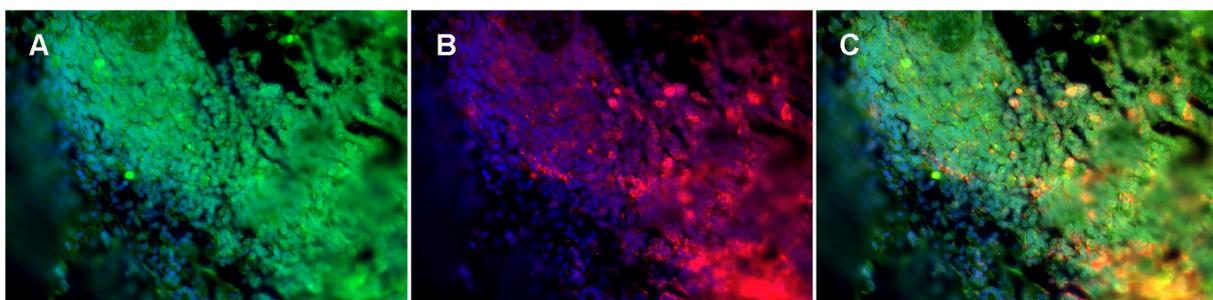
(A)(C) Normarski. (B)(D) Talin 1-positive Zellen (grün), DAPI gefärbte Zellkerne (blau).

Die Talin 1-positiven Zellen (grün) waren im Lymphfollikel des Auges weitestgehend auch CD3-positiv (rot), bis auf einige große Zellen am Rande, die ausschließlich Talin 1-positiv waren (Abb. 4.16.1F). Die Färbung im Mandibularlymphknoten sah anders aus, die deutlich Talin 1-positiven Zellen scheinen hier nicht CD3-positiv zu sein (Abb. 4.16.1C).



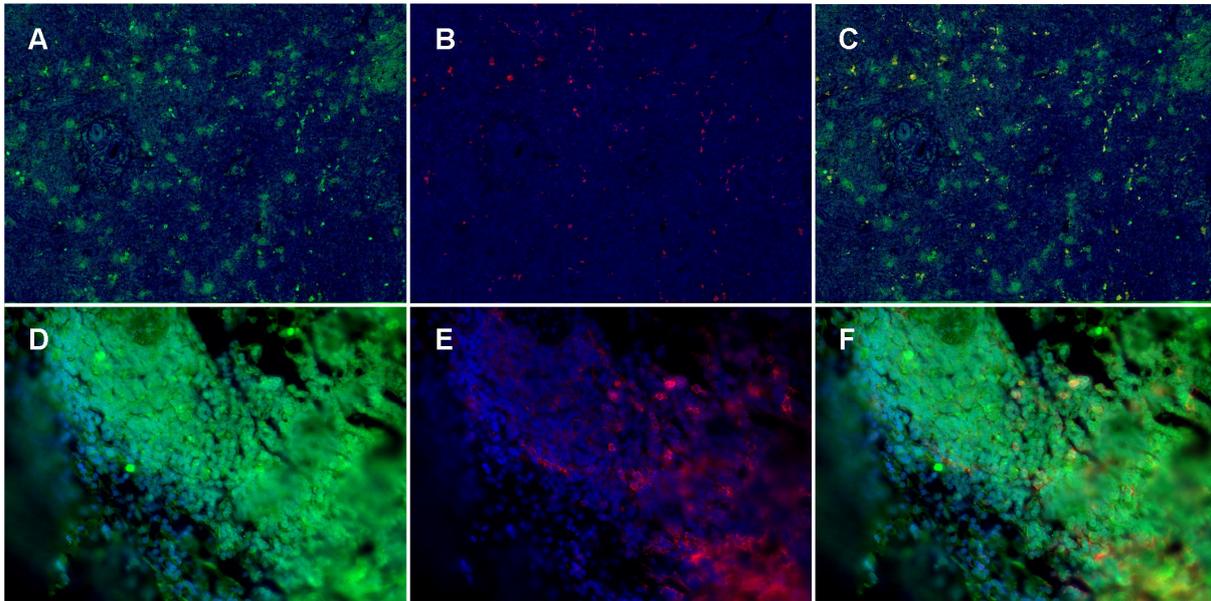
**Abb. 4.16.1:** Expression von Talin 1 (grün) und CD3 (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Die CD3-positiven Zellen im Mandibularlymphknoten sind nicht gleichzeitig Talin 1-positiv (C). Alle CD3-positiven Zellen sind im Lymphfollikel auch Talin 1-positiv (F).

Im untersuchten Follikel des Auges sind alle MHCII-exprimierenden Zellen (Abb. 4.16.2B: ca. 40% der Zellen) auch Talin 1-positiv (Abb. 4.16.2C, die Überlagerung von MHCII und Talin 1 fluoresziert gelb).



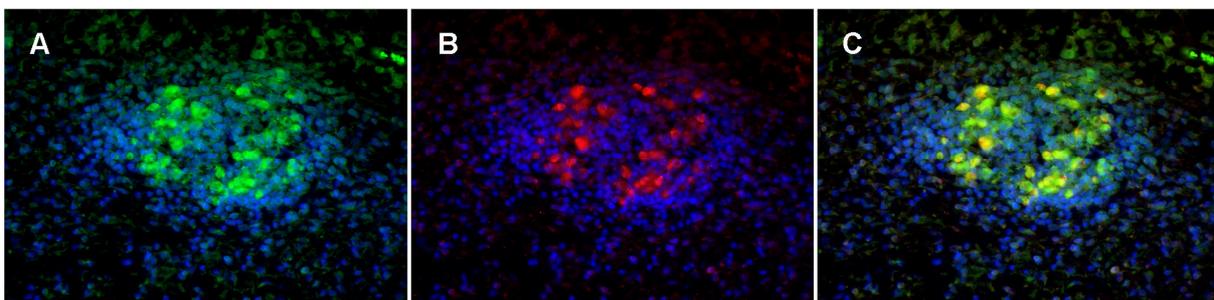
**Abb. 4.16.2:** Expression von Talin 1 (grün) und MHCII (rot) im Lymphfollikel (A-C), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Alle MHCII-exprimierenden Zellen sind auch Talin 1-positiv (C: Überlagerung ist gelb).

Die proliferierenden Zellen (Ki67-positiv, rot, Abb. 4.16.3B: Mandibularlymphknoten, Abb. 4.16E: Lymphfollikel) im Gewebe waren in beiden Strukturen mit Talin 1 doppelt positiv (Abb. 4.16C und F: Überlagerung ist gelb).



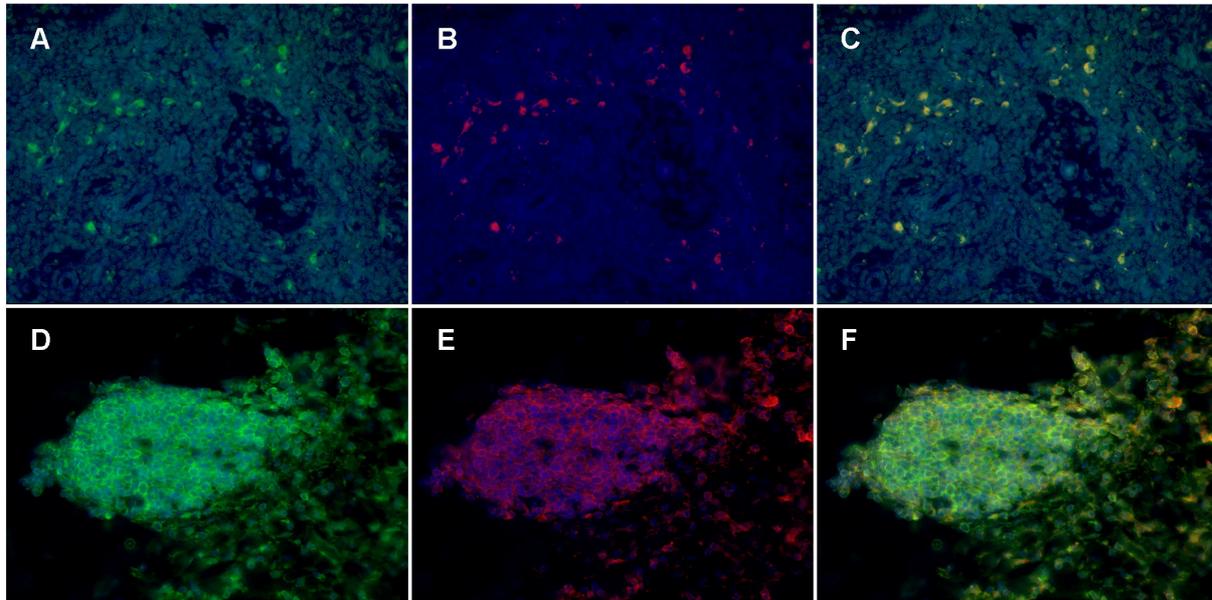
**Abb. 4.16.3:** Expression von Talin 1 (grün) und Ki67 (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Alle Ki67-exprimierenden Zellen sind auch Talin 1-positiv (C und F: Überlagerung, gelb).

Im Lymphfollikel waren alle iC3b-exprimierenden Zellen auch Talin 1-positiv (Abb. 4.16.4C: Überlagerung von Talin 1 und iC3b fluoresziert gelb).



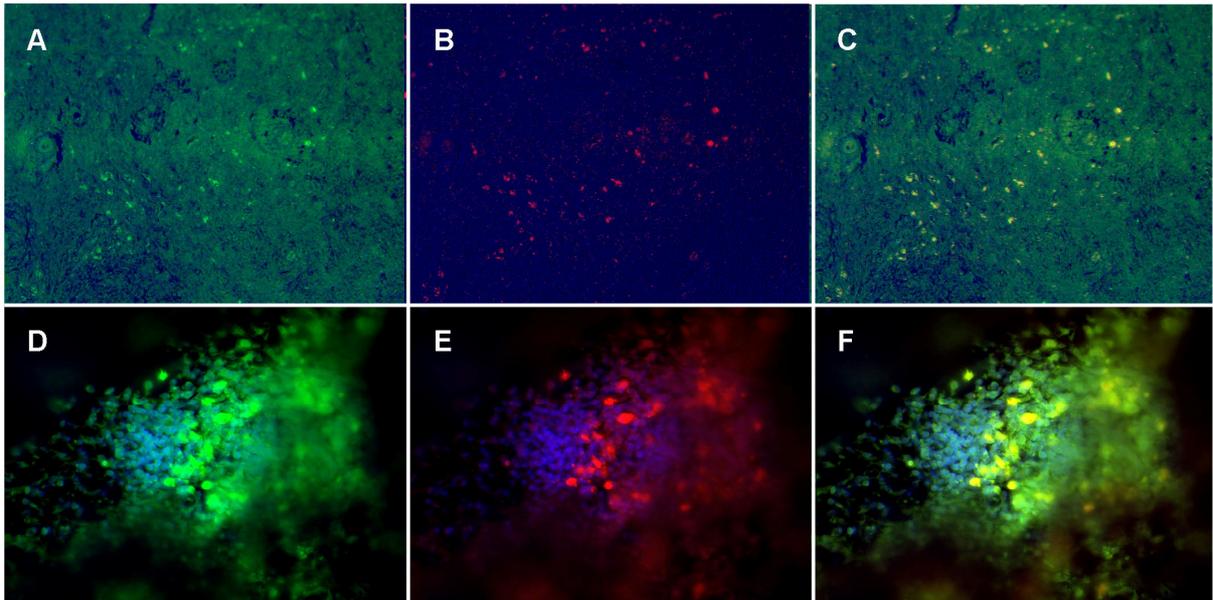
**Abb. 4.16.4:** Expression von Talin 1 (grün) und Komplementfaktor iC3b (rot) im Lymphfollikel (A-C), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Alle iC3b-exprimierenden Zellen sind auch Talin 1-positiv (C, Überlagerung ist gelb).

Nahezu alle Zellen des im Auge gebildeten Follikels exprimierten  $\text{IFN}\gamma$  (rot, Abb. 4.16.5E), im Gegensatz zum Mandibularlymphknoten (Abb. 4.16.5B: Ausschnitt mit  $\text{IFN}\gamma$ -positiven Zellen, rot). In beiden Geweben ko-exprimierten die  $\text{IFN}\gamma$ -positiven Zellen auch Talin 1 (Abb. 4.16.5C und F, Überlagerung gelb fluoreszierend).

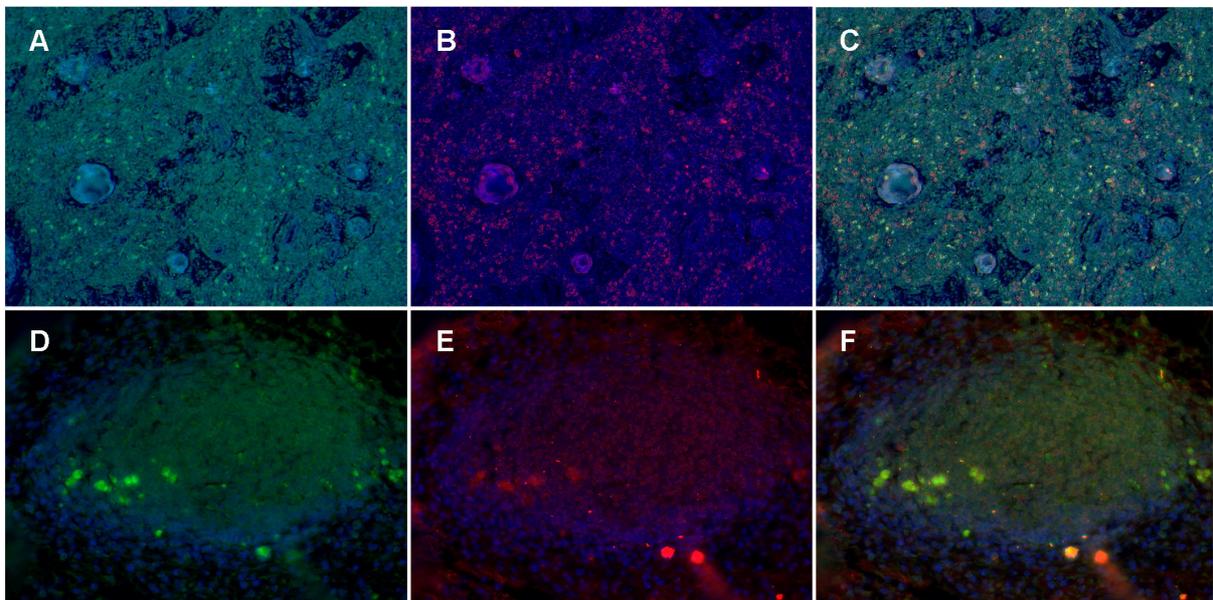


**Abb. 4.16.5:** Expression von Talin 1 (grün) und  $\text{IFN}\gamma$  (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau).  $\text{IFN}\gamma$ -positive Zellen sind auch Talin 1-positiv (in der Überlagerung gelb fluoreszierend, Panel C und F).

Bei der Untersuchung der Doppelsexpression mit Integrinen waren im Mandibularlymphknoten und Augenfollikel alle LFA-1-exprimierenden Zellen (CD11a-positive Zellen, Abb. 4.16.6F: ca. 15% im Auge und Abb. 4.16.6C: ca. 3% im Mandibularlymphknoten) auch Talin 1-positiv, wohingegen bei der Untersuchung der alpha-1-Integrin (CD49a)-Expression gezeigt wurde, dass die CD49a-positiven Zellen kein Talin exprimieren (Abb. 4.16.7C: Mandibularlymphknoten und F: Follikel).



**Abb. 4.16.6:** Expression von Talin 1 (grün) und CD11a (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). CD11a-positive Zellen sind auch Talin 1-positiv (C und F: in der Überlagerung gelb fluoreszierend).



**Abb. 4.16.7:** Expression von Talin 1 (grün) und CD49a (rot) im Mandibularlymphknoten (A-C) und im Lymphfollikel (D-F), Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). CD49a-exprimierende Zellen sind nicht Talin 1-positiv (Panel C und F).

## 5 DISKUSSION

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine T-Zell-medierte, spontan und in periodischen Schüben auftretende Entzündung der Augeninnenstrukturen, die ungefähr 10% der Pferdepopulation betrifft (Deeg et al., 2008; Gilger et al., 1999; Schwink, 1992). Sie ist die häufigste Ursache von Erblindung bei Pferden und führt bei betroffenen Tieren zu erheblichen Schmerzen und Leiden (Romeike et al., 1998). Bei Verlust der Sehfähigkeit beider Augen kommt es zu großen Einschränkungen für das als Fluchttier auf sein Augenlicht angewiesene Pferd. Folglich müssen solche Tiere aus ethischen Gründen und aufgrund der Gefahr, die sie für ihre Umwelt bilden euthanasiert werden, auch wenn, abgesehen von der beidseitigen Erblindung, keine weiteren körperlichen Schäden vorliegen.

Durch die periodisch wiederkehrenden Entzündungen (Deeg et al., 2006a), den positiven Effekt von Kortikosteroiden (Spiess, 1997) und Ciclosporinen (Gilger et al., 2006; Gilger et al., 2000), sowie die insuffiziente Wirkung von Antibiotika, wird die ERU als immun-medierte Erkrankung eingestuft (Deeg et al., 2001). Dabei kommt es zur Sensibilisierung von Lymphozyten gegen körpereigene, augenspezifische Antigene, also zu einer Autoimmunreaktion (Gilger et al., 1999).

Die bei der autoimmun-medierten Uveitis über die Blut-Retina-Schranke in das Auge infiltrierenden Zellen sind CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen (Caspi et al., 1996), die diffus im Glaskörper und in der Retina verteilt sind und bei der ERU zudem in Iris und Ziliarkörper charakteristische Lymphfollikel bilden (Deeg et al., 2002a; Romeike et al., 1998). Neuere Untersuchungen in der experimentellen Autoimmunuveitis (EAU) im Mausmodell haben ergeben, dass Th17-Effektorzellen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Autoimmunuveitis spielen (Amadi-Obi et al., 2007).

Die Mechanismen der molekularen Mimikry (Harkiolaki et al., 2009; Zhao et al., 1998), der Bystander Aktivierung (Fujinami et al., 2006; Horwitz et al., 1998) und des Epitop Spreadings (Powell and Black, 2001; Vanderlugt and Miller, 1996) könnten eine Erklärung für die Entstehung und die Aufrechterhaltung von spontan und periodisch auftretenden Autoimmunerkrankungen wie der ERU sein. Dabei schließen sie sich nicht gegenseitig aus, sondern treten mit großer Wahrscheinlichkeit sogar zusammen auf und interagieren untereinander (Deeg, 2008).

Die ERU gilt als einziges spontanes Tiermodell der humanen Autoimmunuveitis (Deeg et al., 2008; Hauck et al., 2007). Beide Erkrankungen treten, im Gegensatz zur

experimentellen Autoimmunuveitis (EAU) im viel untersuchten Nagermodell, spontan auf und gehen mit periodischen Entzündungsschüben einher (Deeg et al., 2008; Shao et al., 2005; Gilger and Michau, 2004; Thureau et al., 1997).

Da die Pathogenese der humanen und der equinen Autoimmunuveitis noch viele Fragen aufwirft, könnte die proteomische Analyse der an ERU beteiligten Strukturen und die Identifizierung unterschiedlich exprimierter Proteine hilfreich sein, diese weiter zu charakterisieren. Zur differentiellen Proteomanalyse von Zielgewebe, sowie Serum und Zellen bei Autoimmunerkrankungen wie der equinen rezidivierenden Uveitis, bietet die 2D-DIGE Methode die Möglichkeit, Expressionsunterschiede im Proteinmuster der zu untersuchenden Proben unvoreingenommen zu studieren (Lilley and Friedman, 2004). Dabei wird nicht primär von einer bereits bestehenden Hypothese ausgegangen, sondern werden durch die objektive und ganzheitliche Analyse des Untersuchungsmaterials Informationen gewonnen, die letztlich die Aufstellung neuer Hypothesen ermöglichen (Lilley and Friedman, 2004). Diese Technik erlaubt so ein weitgefächertes Screening zur Detektion potenziell interessanter Kandidatenproteine. Bisher hat sich die Anwendung der 2D-DIGE Methode zur Darstellung differentieller Proteinexpression bereits in der Retina (Hauck et al., 2007), im Glaskörper (Deeg et al., 2007a; Deeg et al., 2001) und auch im Serum (Zipplies et al., 2009a; Zipplies et al., 2009b) bewährt. Die Charakterisierung der peripheren Blut-Leukozyten in dieser Studie schließt somit die vergleichende proteomische Untersuchung der an ERU beteiligten und der von ERU betroffenen Strukturen im Auge ab.

Da Lymphozyten eine tragende Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielen (Faustman and Davis, 2009; Deeg et al., 2008; Hohlfeld et al., 2008; Schulz et al., 2007) wurden in einem ersten Experiment zunächst hoch lymphozytäre Proben (93% +/- 6% Lymphozyten) mittels 2D-DIGE zweidimensional aufgetrennt und vergleichend analysiert. Im Nagermodell verursacht der adoptive Transfer S-Antigen sensibilisierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Empfängertier eine autoimmun-medierte Entzündung der Augeninnenstrukturen (Mochizuki et al., 1985), was belegt, dass Lymphozyten die experimentelle Autoimmunuveitis in Maus und Ratte auslösen. Bei der spontan auftretenden ERU wurden infiltrierende T-Zellen im Auge nachgewiesen, die durch ihre Akkumulation und die Bildung subretinaler Follikel als die Verursacher der Schädigungen der mittleren Augenhaut angesehen werden (Deeg et al., 2001; Romeike et al., 1998). Daher werden bei der ERU

ebenfalls die Lymphozyten als Vermittler der Autoimmunreaktion vermutet und diese in der hiesigen Studie näher untersucht.

Zur Ermittlung differenziell exprimierter Proteine im Lymphozytenexpressionsmuster von Pferden mit ERU wurden die Lymphozytenproteine fünf erkrankter und fünf augengesunder Pferde mittels 2D-DIGE Technologie aufgetrennt und mit Hilfe der DeCyder 6.5 Software verglichen. Dabei konnten aus 50 unterschiedlich abundanten Spots neun differenziell exprimierte Kandidatenproteine identifiziert werden, davon waren sieben bei den an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu den Kontrolltieren niedriger (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.2: Protein Disulfid Isomerase A3, Programmed cell death 6-interagierendes Protein, Tyrosin-Protein Phosphatase non-Rezeptor Typ 6, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Voltage-dependent anion-selective channel Protein 2, Ezrin und Septin 7) und zwei höher exprimiert (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.2: Laktotransferrin und Triosephosphat Isomerase). Einundvierzig der differenziell exprimierten Proteine konnten nicht identifiziert werden. Dies könnte an einer zu geringen Konzentration dieser Proteine im Polyacrylamid-Gel liegen oder an der Tatsache, dass sie zu pferdespezifisch sind und sich somit nicht mit den momentan zur Verfügung stehenden Datenbanken abgleichen ließen. Die genutzte Pferdegenomdatenbank, der Horse-Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), wurde Anfang 2007 vom Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/mammals/horse>) im Rahmen des Horse-Genome Projektes (<http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/>) veröffentlicht. Sie weist zurzeit noch etliche Annotierungsfehler auf, die jedoch laufend ausgebessert werden. Die Charakterisierung der unidentifizierten Lymphozytenproteine wird in Zukunft mit der zunehmend besseren Erforschung des Pferdegenoms weiter nachverfolgt werden.

Das erste, in den Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden höher exprimierte Protein **Laktotransferrin** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 13, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 4), ist ein von den meisten Schleimhautzellen sezerniertes, Eisen-bindendes Glykoprotein, das in etlichen biologischen Flüssigkeiten, wie Milch, Tränen, Synovia und Pankreassekret vorkommt (Lonnerdal and Iyer, 1995). Zudem ist es eine der Hauptkomponenten der Granula in neutrophilen Granulozyten (Crouch et al., 1992) sowie ein wachstumsstimulierender Faktor für humane B- und T-Lymphozyten (Hashizume et al., 1983). Die in der hiesigen Studie erhöhte Expression von Laktotransferrin in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden könnte demnach auf proliferierende und aktivierte T-Zellen

hindeuten, denn ruhende Lymphozyten aus dem peripheren Blut weisen, im Gegensatz zu aktivierten, weder an der Zelloberfläche, noch intrazellulär Laktotransferrinrezeptoren auf (Mazurier et al., 1989). Interessant ist, dass auch im zweiten, gemischt granulo- und lymphozytären 2D-DIGE-Experiment Laktotransferrin in den ERU-Proben im Vergleich zu den Kontrollen überexprimiert war, jedoch in den zwei Experimenten an verschiedenen Stellen detektiert wurde. Dies deutet auf posttranslationale Modifikationen (PTM) von Laktotransferrin hin, die hier unterschiedlich exprimiert werden. Welche Modifikationen dies genau sind, ist sehr interessant, da PTM die Proteinfunktion entsprechend beeinflussen. In weiteren Experimenten sollen diese Veränderungen entsprechend ermittelt werden. Da jede mögliche Modifikation einzeln analysiert werden muss (Phosphorylierung, Glykosylierung, Sumoylierung, Ubiquitinierung etc.) sind die Experimente dementsprechend umfangreich.

Antikörper gegen Laktotransferrin konnten im Blut von Patienten mit im Zusammenhang mit autoimmuner rheumatoider Arthritis auftretender Vaskulitis nachgewiesen werden (Lonnerdal and Iyer, 1995). Eine differenzielle Expressierung von Laktotransferrin in Zellen oder im Zusammenhang mit autoimmun-mediierter Uveitis wurde bisher nicht beschrieben (PubMed Recherche Stand 16.10.2009).

**Triosephosphat Isomerase (TPI)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 290, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 7) und **Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 263, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 8) sind Enzyme der Glykolyse, einem Vorgang, der in Zellen über den Abbau von Glukose der Energiegewinnung in Form von ATP dient (Nelson and Cox, 2009; Kolln et al., 2006). Dabei wird Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) über die TPI zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und dieses weiter über GAPDH in 1,3-Bisphosphoglycerat umgewandelt (Nelson and Cox, 2009). TPI ist im 2D-DIGE-Experiment 1 in den Lymphozyten erkrankter Pferde höher exprimiert im Vergleich zu gesunden, GAPDH hingegen weist eine niedrigere Expression auf. Bisher wurden TPI und GAPDH als potenzielle Autoantigene in der Zerebrospinalflüssigkeit bei Multipler Sklerose (MS) nachgewiesen; hier war jedoch die Expression beider Enzyme im Liquor von MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden stark erhöht (Kolln et al., 2006). Da beide Enzyme am gleichen biochemischen Prozess beteiligt sind, ist diese gemeinsame Expressionsänderung

nachvollziehbar. Daher ist es eher verwunderlich, dass das Expressionsverhalten von TPI und GAPDH in dieser Studie voneinander abweicht.

TPI wurde zudem bereits erhöht exprimiert im Zusammenhang mit etlichen neoplastischen Erkrankungen wie Lungenadenokarzinomen (Chen et al., 2002) oder als Biomarker im Serum von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen in der Lunge beschrieben (Zhang et al., 2009b). GAPDH konnte als Autoantigen bei der dilatativen Kardiomyopathie bei Hunden identifiziert werden (Buse et al., 2008) und steht außerdem im Zusammenhang mit der experimentellen Autoimmunencephalomyelitis bei Mäusen, einem Modell für die Untersuchung von humaner multipler Sklerose, bei dem es in Rückenmarkszellen durch die S-Nitrosylierung von GAPDH zu einer reduzierten Aktivität dieses Enzyms kommt (Bizzozero and Zheng, 2009). Möglicherweise ist die reduzierte Expression von GAPDH in dieser Studie ein Hinweis auf eine geringere GAPDH Aktivität in Leukozyten von an ERU erkrankten Pferden und damit einhergehend ein Defizit in der ATP-Gewinnung durch Glykolyse. Die in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden hingegen niedriger exprimierte **Protein Disulfid Isomerase A3 (PDIA3)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 163, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 1) gehört zur Familie der Protein Disulfid Isomerasen, welche die Reorganisation von Disulfidbrückenbindungen in Proteinen katalysieren (Fae et al., 2008). Zusammen mit weiteren Proteinen des endoplasmatischen Retikulums sind sie am MHC Klasse 1 (major histocompatibility complex class 1)-abhängigen Peptid-Präsentationspfad beteiligt, welcher für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen und die immunologische Individualität wichtig ist (Fae et al., 2008). PDIA3 wurde bereits als Zielantigen der im Verlaufe des streptokokkeninduzierten rheumatischen Fiebers in das Herz infiltrierenden T-Zellen beschrieben (Fae et al., 2008). Zudem konnte PDIA3 bei der altersbedingten Makuladegeneration mittels 2D-DIGE höher abundant in Endothelzellen der Retina im Vergleich zu Endothelzellen der Choroidea detektiert werden (Zamora et al., 2007). Im Zusammenhang mit Autoimmunuveitis wurde die Protein Disulfid Isomerase A3 jedoch noch nicht untersucht (PubMed Recherche Stand 16.10.2009) und soll daher bei der ERU in weiteren Experimenten charakterisiert werden.

Ebenso unbeschrieben im Zusammenhang mit autoimmun-mediiertes Uveitis ist das in den Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Tieren geringer exprimierte Protein **Tyrosin-Protein Phosphatase non-Rezeptor**

**Typ 6 (PTPN6)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 123, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 5), ein ubiquitär, jedoch in hohem Maße in Zellkern und Zytoplasma von blutbildenden Zellen vorkommendes Protein, welches in der Signaltransduktionskaskade von Immunzellen wirkt (Pao et al., 2007a; Neel et al., 2003). Dieses Enzym verbindet durch Protein-Tyrosin-Phosphorylierung Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit anderen Signalproteinen und spielt eine tragende Rolle in der Hämatopoese (<http://www.uniprot.org/uniprot/P29350>). In T-Zellen wird PTPN6 mit einer negativen Regulierung des TCR- und Zytokin-Signalpfades in Verbindung gebracht, was zu einer inhibierten Proliferation und Zytokinproduktion führt. In Mäusen mit PTPN6-defizienten B-Zellen kommt es zu ausgedehnten Entzündungsreaktionen und Autoimmunität, einhergehend mit dem sogenannten „motheaten“ Phänotyp (Pao et al., 2007b). Welche Zellen genau bei der ERU das Protein PTPN6 niedriger exprimieren und wie dies mit der auftretenden Autoimmunität in Verbindung stehen könnte, soll mit weitergehenden Charakterisierungen untersucht werden.

Ein weiteres, in dieser Studie differenziell exprimiertes Protein ist das **Voltage-dependent anion-selective channel Protein 2 (VDAC2)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 253, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 6). Es ist in den Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden niedriger exprimiert als in den augengesunden Kontrolltieren. VDACS befinden sich in der äußeren Mitochondrienmembran von eukaryotischen Zellen und bilden dort Poren zur Diffusion kleiner hydrophiler Moleküle (Sampson et al., 1997). Sie spielen somit eine wichtige Rolle in der Energiegewinnung, indem sie den Transport von Metaboliten über die Mitochondrienmembran kontrollieren (Jiang et al., 2007). Zudem sind sie als Schlüsselemente an der mitochondrien-medierten Apoptose von Zellen beteiligt (Jiang et al., 2007). Daher könnte die niedrigere Expression dieses Proteins in den Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden mit einer geringeren Apoptoserate der Zellen zusammenhängen, jedoch würde dem widersprechen, dass ein Defizit an VDAC2 mit reduziertem Metabolitentransport über die Mitochondrienmembran und damit verbundener Verringerung der ATP-Produktion einhergeht, was zu einer negativen Energiebilanz und damit zur Zellapoptose führen würde. Der Zusammenhang der erniedrigten VDAC2 Expression in Lymphozyten mit dem Krankheitsverlauf der ERU sollte daher in weiteren Untersuchungen genauer betrachtet werden. Mit autoimmun-medierten Uveitiden wurden VDAC2 bisher nicht

beschrieben (PubMed Recherche Stand 16.10.2009), jedoch spielt dieses Protein eine wichtige Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, wo es bei Patienten in der Großhirnrinde des Temporallappens höher exprimiert ist (Yoo et al., 2001) und wurde ebenfalls im Zusammenhang mit Epilepsie beschrieben, wo es im Hippokampus Phenytoin-resistenter Patienten höher und im gleichen Hirnareal von Patienten, die auf Phenytoin Gabe reagieren, niedriger exprimiert war (Jiang et al., 2007).

**Programmed cell death 6-interagierendes Protein (PDCD6IP)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 44, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 3), auch Alix oder ALG-2 genannt, ist ebenfalls eines der niedriger exprimierten Proteine in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden und eine wichtige Komponente des ESCRT Pfades, eines nach innen gerichteten budding Systems, welches durch Endozytose die Dichte von Membranproteinen auf der Zelloberfläche reguliert (Zhai et al., 2008; Alam and Sundquist, 2007). Dabei werden die abzubauenen, membranständigen Proteine intrazellulär mit Ubiquitin markiert, diese ubiquitinilierten Proteine dann durch Endozytose in Vesikel eingeschlossen und mit Lysosomen fusioniert (Alam and Sundquist, 2007). Dieser Mechanismus wird häufig von eingehüllten RNA-Viren, wie dem HI-Virus, ausgenutzt, um von der Zelloberfläche ins Innere der Zelle zu gelangen (Morita and Sundquist, 2004). Zudem ist PDCD6IP über Endozytose von Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1 (TNF-R1) an der Apoptose von Zellen beteiligt (Schneider-Brachert et al., 2004). Warum die PDCD6IP Expression in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden niedriger exprimiert ist im Vergleich zu gesunden bedarf weiterer Untersuchungen. Möglicherweise bewirkt ein geringerer PDCD6IP Gehalt in der Zelle, dass weniger Endozytose von Zelloberflächenproteinen stattfindet, womit auch die TNF-bedingte Induktion von Apoptosevorgängen verringert wird. Ebenfalls muss in Betracht gezogen werden, dass PDCD6IP möglicherweise mit den Proteinen der Zellmembran assoziiert ist und so mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nur mangelhaft dargestellt werden kann. Die von Nagaraj und Mitarbeitern etablierte gelfreie Methode zur Analyse von Membranproteinen wäre in diesem Fall eine Option zur weiteren Charakterisierung dieses Proteins (Nagaraj et al., 2008).

Das zur Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Familie gehörende Protein **Ezrin** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 79, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 2), wurde in dieser Studie mittels 2D-DIGE in peripheren Blut-Lymphozyten von an ERU

erkrankten Pferden im Vergleich zu Gesunden als niedriger exprimiert detektiert. Ezrin verbindet die zelluläre Plasmamembran mit dem Zytoskelett (Bretscher et al., 2002) und ist vor allem an den Mikrovilli von Epithelzellen, wie der Bürstensaummembran des Dünndarmepithels oder den apikalen Mikrovilli von Müller-Glia-Zellen sowie dem retinalen Pigmentepithel lokalisiert (Bonilha, 2007; Bonilha et al., 2006). Zudem ist Ezrin in etliche zelluläre Prozesse involviert, wie der Zelladhäsion, -motilität und -morphogenese und spielt eine Rolle in Pfaden der Signaltransduktion (Bretscher et al., 2002). T-Zellen exprimieren zwei der ERM-Proteine, Ezrin und Moesin (Shaffer et al., 2009). Ezrin wird dabei in aktiver, phosphorylierter Form im Zusammenhang mit bestimmten Schritten in der Aktivierung der T-Zellen beschrieben (Fievet et al., 2004) und soll bei Defizienz zu einer gestörten Signaltransduktion führen (Shaffer et al., 2009). Möglicherweise hängt die verringerte Expression von Ezrin in den Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden mit zunehmender Ezrin-Phosphorylierung in den aktivierten T-Zellen bei der ERU zusammen. Da Ezrin in T-Zellen und ebenfalls stark in einigen Innenstrukturen des Auges exprimiert wird, sollte die in dieser Studie detektierte verminderte Expression dieses Proteins in weiteren Experimenten charakterisiert werden. Vor allem die Phosphorylierung von Ezrin zur funktionellen Aktivierung ist ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen. Bisher konnte Ezrin als Schlüsselkomponente in der Metastasierung bei Tumorerkrankungen, wie Osteosarkomen (Khanna et al., 2004) und Rhabdomyosarkomen (Yu et al., 2004), beschrieben werden, bei denen es Metastasen-assoziierte Zelloberflächensignale koordinieren und verstärken soll (Hunter, 2004). Zudem ist es in peripheren mononukleären Zellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis im Vergleich zu gesunden niedriger exprimiert (Schulz et al., 2007). Zu Ezrin und autoimmunmediierter Uveitis liegen bisher keine Studien vor (PubMed Recherche Stand 16.10.2009), was die weitere Charakterisierung dieses erstmals in Verbindung mit Autoimmunuveitis identifizierten Proteins unumgänglich macht.

Als letztes der neun differenziell exprimierten Proteine des ersten Experiments wurde **Septin 7** identifiziert (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 144, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 9), das in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden ebenfalls niedriger exprimiert wird. Septine gehören zur Familie der GTP-bindenden Proteine, die ursprünglich in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt wurden (Byers and Goetsch, 1976; Hartwell, 1971). Dort bilden Septine während der

---

Zytokinese eine ringförmige Struktur, ein Septum, welches die Mutter- von der Tochterzelle trennt (Byers and Goetsch, 1976; Hartwell, 1971) und eine Diffusionsbarriere für zytoplasmatische Proteine darstellt (Barral et al., 2000). Im Säugetier spielen Septine ebenfalls eine wichtige Rolle in der Zellteilung, sowie zudem in etlichen anderen zellulären Prozessen, wie beim Transport von Vesikeln im Zytoplasma und membranassoziierter Zellbewegung (Cao et al., 2009; Hall et al., 2005). Zudem interagieren Septine mit dem Zytoskelett und stehen somit im Zusammenhang mit Aktin und der Stabilität der Mikrotubuli (Kremer et al., 2005). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Septine Veränderungen in der Zytoskelett- und Membranorganisation von Zellen koordinieren (Weirich et al., 2008). Der Einfluss von Septin 7 auf die Teilung von Pferdezellen konnte in dieser Studie eindrucksvoll in einem *in vitro* Proliferationsassay gezeigt werden. Dabei kam es nach Zugabe von einem anti-Septin 7-Antikörper zu kultivierten Pferdeleukozyten zu einer fast vollständigen Hemmung der mittels verschiedener Mitogene polyklonal stimulierten Zellproliferation (Abschnitt 4.2.7, Abb. 4.9).

Septine sind ubiquitär in Pilzen und Tieren an der Plasmamembran, sowie bei Tieren zudem im Zytoplasma von Zellen lokalisiert und konnten bisher nicht in Pflanzenzellen nachgewiesen werden (Cao et al., 2009). Bis heute wurden 14 humane Septin-Gene identifiziert, welche in vier Gruppen eingeteilt werden können: Die Septin 2 Gruppe, in die Septin 1, 2, 4 und 5 eingegliedert sind, die Septin 3 Gruppe, mit Septin 3, 9 und 12, die Septin 6 Gruppe, welche Septin 6, 8, 10, 11 und 14 enthält, und schließlich die Septin 7 Gruppe, bestehend aus Septin 7 und Septin 13 (Weirich et al., 2008). Septine bilden untereinander stabile heteromere Komplexe, welche sich *in vivo* als bis zu 25-32 nm lange und 7-9 nm breite Filamente aneinanderfügen und somit groß genug sind, um elektronenmikroskopisch untersucht werden zu können (Sirajuddin et al., 2007; Low and Macara, 2006).

Nachdem Septin 7 mittels 2D-DIGE als differenziell exprimiert identifiziert werden konnte (Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 9), wurde die verringerte Septin 7-Expression in Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Western Blot bestätigt und quantifiziert. Dabei konnte in den Lymphozyten der ERU-Proben eine Reduktion der Septin 7-Expression um 30% nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.4, Abb. 4.6). Zur Bestimmung der Septin 7-exprimierenden Lymphozytensubpopulationen, wurden anschließend Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden mittels Durchflusszytometrie (FACS) charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass nahezu

---

100% der equinen peripheren Blut-Lymphozyten Septin 7-positiv sind (Abschnitt 4.2.5, Abb. 4.7b). Dies ist, vor allem in den Kontrollproben, nicht verwunderlich, da Septine eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen, sowie unter anderem auch bei der Organisation von Zytoskelett und Zellmembran spielen und ubiquitär in Zellen exprimiert sind (Cao et al., 2009; Weirich et al., 2008). Warum weist die Septin 7-Expression jedoch zwischen Zellen gesunder und Zellen erkrankter Tiere im FACS keinen Unterschied auf, obwohl dieser doch eindeutig mittels 2D-DIGE und Western Blot identifiziert und bestätigt wurde? Bei der durchgeführten Durchflusszytometrie wurde in dieser Studie pro Zelle lediglich zwischen der Tatsache Septin-positiv oder Septin-negativ unterschieden. Es ist daher durchaus möglich, dass Septin 7 zwar auf jeder Zelle exprimiert ist, jedoch in unterschiedlicher Dichte, dass also auf einigen Zellen mehr Septin 7 Moleküle vorhanden sind und auf anderen weniger. Daher ist es sinnvoll, weitere FACS-Experimente durchzuführen, um Unterschiede in der Moleküldichte von Septin 7 zu überprüfen.

Zudem wurde Septin 7 auf der Lymphozytenlandkarte in zwei Spots identifiziert (Abb. und Tab. 4.1: Spots 143 und 144), jedoch war nur einer dieser Spots differenziell exprimiert (Spot 144). Möglicherweise liegen hier posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen oder Sumoylierungen vor (Cao et al., 2009; Hall and Russell, 2004; Kinoshita and Noda, 2001), die zu einem veränderten  $pI$  und somit einer horizontalen Spotreihe geführt haben. Welche Modifikationen zu einer niedrigeren Septin 7-Expression im Lymphozytenproteom von an ERU erkrankten Pferden geführt haben, bedarf weiterer Untersuchungen, denn diese potenziellen Modifikationen könnten interessante Aufschlüsse über veränderte Funktionen von Septin 7 im Zusammenhang mit der ERU geben.

Zuletzt wurde die Expression von Septin 7 in den T-Zellen der bei ERU gebildeten, subretinalen Lymphfollikel betrachtet (Abschnitt 4.2.6, Abb. 4.8D). Septin 7 war hier weitaus geringer exprimiert als in den Mandibularlymphknoten von gesunden Pferden, welche als Kontrollgewebe eingesetzt wurden (Abschnitt 4.2.6, Abb. 4.8B). Dies deutet darauf hin, dass im Auge vermehrt Lymphozyten mit erniedrigter Septin 7-Expression vorkommen, ein interessanter Befund, der in weiteren Experimenten genauer charakterisiert werden soll, um herauszufinden, welche Bedeutung die vermehrte Infiltration von Septin 7-defizienten Zellen in das uveitische Auge hat.

Differenzielle Expression und Regulation von Septinen wurde bereits in Verbindung mit mehreren anderen Erkrankungen beschrieben. So wiesen Santos und Mitarbeiter

---

im Rückenmark von Patienten mit akuter myeloider Leukämie eine signifikant verringerte Expression von Septin 6 (im Komplex mit Septin 2 und Septin 7) nach, was ihrer Studie zufolge in einer fehlerhaften Regulation des Zellzyklus, einem wichtigen Kennzeichen humaner Neoplasien, resultieren könnte (Santos et al., 2009). Des Weiteren konnten im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen wie Brustkrebs (Montagna et al., 2003), Ovarial- (Burrows et al., 2003) und Hirntumoren (Kim et al., 2004) in den Tumorzellen ebenfalls Störungen in der Septin-Expression konstatiert werden. Zudem spielen Septine im Gehirn von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Kinoshita et al., 1998) und Morbus Parkinson (Periquet et al., 2005; Ihara et al., 2003), sowie beim Down Syndrom (Engidawork et al., 2003) eine wichtige Rolle. Im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und Uveitis wurde Septin bisher noch nicht charakterisiert (PubMed Recherche Stand 16.10.2009).

In einer aktuellen Studie konnten Tooley und Mitarbeiter nachweisen, dass Septine eine überaus interessante Rolle in der Regulation von T-Zell-Form und -Motilität, sowie der Migration dieser Zellen durch kleine Poren spielen (Tooley et al., 2009). Dabei zeigten sie in einer murinen Septin 7-knock-down D10 T-Zelllinie, dass die in diesen Zellen vorliegende erniedrigte Expression von Septin 7 die T-Zell Migration über bis zu 3  $\mu\text{m}$  kleine Poren ermöglicht, einer Porengröße, die normalerweise zu eng für die Passage von Zellen ist. Septin 7-defiziente Zellen führen somit nachweislich zu einer veränderten Zellmorphologie mit erniedrigter Membranspannung und -festigkeit. Septinen kann demnach in T-Zellen eine membranstabilisierende Wirkung, ähnlich der eines Korsetts, zugesprochen werden (Tooley et al., 2009). Dies unterstützt die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse über die verringerte Expression von Septin 7 in T-Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu augengesunden Tieren. Denn die Tatsache, dass bei der ERU sensibilisierte T-Zellen die Blut-Retina-Schranke überwinden, eine Barriere, die normalerweise eine Zell-Migration ins Auge verhindert (Deeg et al., 2001; Romeike et al., 1998; Gery and Streilein, 1994), könnte mit der erniedrigten Septin 7-Expression und den damit verbundenen Änderungen im Zytoskelett und in der Membranfestigkeit dieser Zellen zusammenhängen. Die Migrationsfähigkeit von Septin 7-exprimierenden equinen Zellen über verschieden große Poren könnte in Zukunft mittels Transwell-Migrationsassays überprüft werden.

Da es in manchen Fällen bei der spontan auftretenden ERU zu vorwiegend granulozytärer Zellinfiltration der Augeninnenstrukturen kommt (Deeg et al., 2001) und dieses Phänomen zudem im Mausmodell der EAU beschrieben wurde (Caspi, 2008; Caspi et al., 2008), wurden in einem zweiten Experiment auch Granulozyten in die Untersuchung mit einbezogen. Mittels 2D-DIGE und der DeCyder 6.5 Software wurden die in diesem Ansatz gemischt granulo- und lymphozytären Proben (60% +/- 7% Lymphozyten) vergleichend proteomisch analysiert.

Es wurden 50 statistisch relevante Spots ermittelt (Student's *t*-Test  $p < 0,05$ ), die im Proteinexpressionsmuster der Zellpräparation von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu den gesunden Tieren Abundanzunterschiede aufwiesen. Davon konnten 20 massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden. Zehn dieser Proteine waren im Zellproteom der ERU-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben höher (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Albumin, Cu-Zn Superoxid Dismutase, Aldehyd Dehydrogenase, Glutaredoxin 3, Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K, Selenid Wasser-Dikinase 1, Serin Proteinase Inhibitor Stamm B10, Succinyl-CoA Ligase, Laktotransferrin, Scaffold attachment Faktor B), und ebenfalls zehn Proteine niedriger exprimiert (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Fruktose-Bisphosphat Aldolase C, Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein H3, Poly (rC) bindendes Protein 2 Isoform b, Glutathion S-transferase P, Transgelin 2, Protein Disulfid Isomerase, PWP1-interagierendes Protein, Serpin B10, NCK Adapter Protein 1, Talin 1).

Erneut wurde hier, wie auch im ersten Experiment, **Laktotransferrin** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 70, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 18) in ERU-Proben als höher abundant identifiziert. Die beiden Laktotransferrin Spots in den DIGE-Experimenten 1 und 2 liegen an verschiedenen Stellen im Gel, daher sollten hier mögliche posttranslationale Modifikationen genauer untersucht und die Funktion von Laktotransferrin im Immunsystem nachverfolgt werden.

Zudem wurde das Plasmaprotein **Albumin** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 71, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 17) in den mit den ERU-Proben beladenen Gelen vermehrt exprimiert. Albumin ist ein in der Leber synthetisiertes und sezerniertes Transportprotein, welches im Blut den kolloidosmotischen Druck aufrecht erhält (Ahlqvist, 2004; Kragh-Hansen, 1990). Da Albumin keine intrazellulären Funktionen hat, ist dies möglicherweise auf die Präparation der Zellen zurückzuführen, bei der es, trotz gewissenhafter und möglichst standardisierter Durchführung, noch zu in den Zellpellets verbliebenen Plasmaresten gekommen sein

könnte. Dagegen spricht jedoch, dass in den Gelen nicht das im Blutplasma typischerweise vorkommende Immunglobulin gamma (IgG) identifiziert wurde (Abb. und Tab. 4.1). Zudem liegt der identifizierte Spot nicht an Albumin-typischer Stelle und hat einen sehr niedrigen Identifikations-Score (Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 71, Abb. 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 17), was für eine mögliche Falschidentifikation spricht.

Das nächste, in den ERU-Proben höher exprimierte Protein ist die **Cu-Zn Superoxid Dismutase (SOD1)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 325, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 7). Diese ist eine in den Mitochondrien lokalisierte Oxidoreduktase (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001), welche die im Verlaufe des Zellmetabolismus produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), auch Sauerstoffradikale genannt, bindet und somit eine zellschädigende Radikalbildung verhindert (Fridovich, 1995). In aktivierten Zellen, sowie bei Entzündungen oder Tumorerkrankungen ist der Metabolismus erhöht und es kommt zu einer gesteigerten Produktion von ROS (Iuchi et al., 2007). Die Zelle reagiert auf diesen oxidativen Stress mit der Ausschüttung von Oxidoreduktasen und kontrolliert somit die intrazellulär auftretenden Redoxvorgänge zur Erhaltung der vitalen Zellfunktionen (Marikovsky et al., 2003). Neben SOD1 wirken **Glutaredoxin 3** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 149, Abb. 4.12 und 4.1.3 und Tab. 4.3: Spot Nr. 4) (Meyer et al., 2009) und **Aldehyd Dehydrogenase** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 161, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 19) (Zhang et al., 2009a) ebenfalls als Oxidoreduktasen und sind, wie auch SOD1, in den ERU-Proben des gemischt granulo- und lymphozytären Experiments im Vergleich zu den Kontrollen höher exprimiert. Da bei der ERU eine Aktivierung von Lymphozyten, und in einigen Fällen auch Granulozyten, vorliegt, ist die erhöhte Expression dieser drei Antioxidantien nachvollziehbar und weist auf eine intakte Unterdrückung von Radikalbildungen in den aktivierten Zellen hin. Noch unklar ist, ob die drei Oxidoreduktasen in den Lymphozyten oder den neutrophilen Granulozyten dieses Experiments erhöht exprimiert sind. Oxidativer Stress spielt in der Pathogenese und Pathophysiologie etlicher neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson (Zhang et al., 2009a) und auch bei Entzündungen wie der Pankreatitis eine wichtige Rolle (Milnerowicz et al., 2009) und tritt zudem in frühen Stadien der murinen EAU in der Retina auf, noch bevor Leukozyten in das Auge infiltrieren (Saraswathy and Rao, 2009).

**Succinyl-CoA Ligase** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 97, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 3) ist ein Enzym des Zitratzyklus, welches in den Mitochondrien der Eukaryoten Succinyl-CoA unter Abgabe von Energie in Succinat umwandelt (Phillips et al., 2009; Przybyla-Zawislak et al., 1998; Bailey et al., 1993) und ist in diesem zweiten DIGE-Experiment in den Zellen von an ERU erkrankten Pferden höher exprimiert als in den Zellen der gesunden Tiere. Da der Zitratzyklus eine wichtige Komponente der zellulären Atmungskette ist, könnte dies darauf schließen, dass in den Granulozyten und Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden aufgrund einer möglichen Aktivierung ein erhöhter Energieumsatz stattfindet und somit vermehrt Succinyl-CoA Ligase benötigt wird. Unterschiede in der Expression von Succinyl-CoA Ligase wurden bisher nicht in Zusammenhang mit Uveitis oder Autoimmunerkrankungen beschrieben (PubMed Recherche Stand 16.10.2009). Jedoch wird die Defizienz von Succinyl-CoA Ligase im Zitratzyklus und somit in der Atmungskette der Zelle mit mitochondrialer DNA-Depletion assoziiert, was sich in Ausfallerscheinungen wie Muskelschwäche, Leberfunktionsstörungen und Encephalopathien äußert (Elpeleg et al., 2005).

Ebenfalls höher exprimiert in den gemischt granulo- und lymphozytären ERU-Proben im Vergleich zu den Kontrollen ist **Selenid Wasser-Dikinase 1** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 152, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 6). Dieses Enzym gehört zur Familie der Selenophosphat Synthetasen, katalysiert den Transfer funktioneller Gruppen und ist eine essenzielle Komponente der Synthese von Selenoproteinen (Low et al., 1995). Selenoproteine, wie Selenocystein, erhöhen die Aktivität von Enzymen, wenn sie statt eines Cysteins eingebaut werden (Lobanov et al., 2008). Die Selenid Wasser-Dikinase 1 steht im Zusammenhang mit der Synthese von Selenocystein (Lobanov et al., 2008), ihre Bedeutung in den peripheren Blutzellen bei Autoimmunerkrankungen wie der ERU ist jedoch noch ungeklärt.

Das nächste, bei an ERU erkrankten Pferden in mononukleären Zellen höher exprimierte Protein ist **Serin Proteinase Inhibitor Stamm B10** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 153, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 16), synonym auch als Serpin B10 oder Bomapin bezeichnet. Serpine kommen ubiquitär in Eukaryoten vor und sind unterteilt in extrazelluläre „clade A“ Moleküle und intrazellulär lokalisierte „clade B“ Moleküle (Silverman et al., 2001). Sie sind in erster Linie Inhibitoren der Serinproteasen, wobei Serpin B10 speziell die Enzyme Thrombin und Trypsin inhibiert (Riewald and Schleef, 1995). Serpine des A-Stammes

konnten interessanterweise in aktivierten T-Zell-Kulturen, jedoch nicht in ruhenden T-Zellen identifiziert werden (Hampson et al., 1997), hingegen liegt eine solche Assoziation für die B-Serpine nicht vor. Aufgrund der höheren Expression in mononukleären Zellen von an ERU erkrankten Pferden sollte dies genauer untersucht werden. Neben dem höher abundanten Serpin B10-Spot wurde in diesem gemischt granulo- und lymphozytären Experiment zudem ein auf gleicher Höhe liegender, jedoch im isoelektrischen Punkt ins saure, also im Gel nach links verschobener, zweiter **Serpin B10** Spot detektiert (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 173, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 10), welcher in der ERU-Probe niedriger exprimiert ist als in der Kontrolle. Diese unterschiedliche Expression deutet auf einen funktionellen Unterschied zwischen beiden Proteinspots hin, der jetzt entsprechend analysiert werden soll. Eine Beteiligung von Serpin B10 an pathologischen Ereignissen oder Erkrankungen ist bisher nicht bekannt, ebenso wenig wurde Serpin B10 bislang im Zusammenhang mit Uveitis beschrieben (PubMed Recherche Stand 16.10.2009).

**Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine** (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNP) sind multifunktionelle, RNA- und einsträngige DNA-bindende Proteine (Dreyfuss et al., 1993). Sie kommen hauptsächlich im Zellkern vor, können jedoch zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln und so mRNA über die Kernmembran transportieren (Dreyfuss et al., 1993). HnRNPs sind über RNA-Splicing, -Transkription und -Translation hauptsächlich an der Verarbeitung von mRNA beteiligt, und haben zudem Funktionen in der Signaltransduktion (Bomsztyk et al., 2004; Klimek-Tomczak et al., 2004; Kim et al., 2000). Es sind schätzungsweise 20 hnRNP Subklassen identifiziert (Shnyreva et al., 2000; Dreyfuss et al., 1993), darunter die in diesem Experiment detektierten **hnRNP-K** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 56, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 2), **hnRNP-H3** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 242, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 12) und hnRNP-E2. Letzteres ist auch unter dem Namen **Poly (rC) bindendes Protein 2 Isoform b** (PCBP2) (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 178, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 11) bekannt (Kim et al., 2000) und wurde in diesem Experiment auch so identifiziert. Das im gemischt granulo- und lymphozytären Experiment bei an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu Gesunden höher exprimierte hnRNP-K ist aus diesen drei Proteinen am besten charakterisiert. Obwohl die Proteine der hnRNP-Familie überwiegend gleiche Funktionen haben,

---

unterscheiden sie sich hauptsächlich in der Ziel-RNA-Sequenz, an die sie binden und zudem in den verschiedenen Aufgaben, die sie im RNA-Metabolismus übernehmen (Kim et al., 2000). Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass hnRNP-H3 und PCBP2 in den Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Gegensatz zu hnRNP-K niedriger exprimiert sind. Interessanterweise interagiert hnRNP-K während der Umwandlung der Chromatinstruktur im Prozess der Genexpression mit dem im nächsten Abschnitt beschriebenen Protein SAFB (Bomsztyk et al., 2004), welches in den ERU-Proben dieses Experiments ebenfalls höher exprimiert ist.

Es wird vermutet, dass hnRNP-K die transkriptionale Aktivität einiger Onkogene in Krebszellen erhöht (Ostareck-Lederer et al., 2002). Eine Überexpression von hnRNP-K würde somit den Verlauf von Neoplasien beschleunigen, wie kürzlich in einer Studie der chronischen myeloischen Leukämie beschrieben (Du et al., 2009). Ob eine differenzielle Expression von heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen mit der Pathophysiologie autoimmun-mediierter Uveitis im Zusammenhang steht, ist bisher nicht untersucht (PubMed Recherche Stand 16.10.2009).

Das letzte in diesem Experiment in den ERU-Proben höher exprimierte Protein ist **Scaffold attachment Faktor B (SAFB)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 151, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 5), ein multifunktionelles, DNA- und RNA-bindendes, ubiquitär im Zellkern lokalisiertes Protein (Ivanova et al., 2005; Renz and Fackelmayer, 1996). Es ist wichtig bei der Entstehung und Erhaltung der Chromatinstruktur und funktioniert als Verankerung der Chromatinwindungen in der Zellkernmatrix (Renz and Fackelmayer, 1996). Zudem wird eine Beteiligung von SAFB bei der Regulation der Transkription *in vivo* (Oesterreich et al., 1997), sowie bei den letzten Stadien der Apoptose (Lee et al., 2007) und in der zellulären Stressantwort vermutet (Oesterreich, 2003). Des Weiteren wirken SAFB-Proteine als Ko-Repressoren des Transkriptionsfaktors Östrogen Rezeptor  $\alpha$  (Ivanova et al., 2005) und sind somit potenziell an der Unterdrückung von Brustkrebstumoren beteiligt (Hammerich-Hille et al., 2009). Im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und Uveitis wurde SAFB bisher noch nicht untersucht und eine krankheitsassoziierte Funktion von SAFB in Granulozyten und Lymphozyten ist nach wie vor unklar (PubMed Recherche Stand 16.10.2009).

Wie im DIGE-Experiment 1, konnte die **Protein Disulfid Isomerase** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 87, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 1) in diesem zweiten Experiment ebenfalls als differenziell abundant detektiert werden. Sie

ist auch hier in den Zellen von an ERU erkrankten Pferden niedriger exprimiert im Vergleich zu Gesunden. Interessant ist, dass der identifizierte Spot im gemischt granulo- und lymphozytären Experiment ein anderer ist als der Protein Disulfid Isomerase-Spot im lymphozytären Experiment, der weiter im basischen, also nach rechts verschoben im Gel liegt (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 163, Abb. 4.4 und 4.5 und Tab. 4.2: Spot Nr. 1). Da beide Spots auf gleicher Höhe liegen, könnten möglicherweise posttranslationale Modifikationen die Unterschiede im isoelektrischen Punkt hervorgerufen haben. Welche Modifikationen das sind, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

Ebenfalls in an ERU erkrankten Pferden niedriger exprimiert ist die **Glutathion S-Transferase P (GSTP)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 341, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 9). Sie spielt in Zellen eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport von hydrophoben Molekülen, sowie beim Metabolismus toxischer Verbindungen (Lee et al., 1994). In einer proteomischen Studie peripherer mononukleärer Blutzellen bei systemischem Lupus Erythematosus (SLE) konnte GSTP mittels 2-DE und Massenspektrometrie, wie auch in diesem Experiment, in den Lymphozyten erkrankter Patienten interessanterweise als niedriger exprimiert detektiert werden, was nach Dai und Mitarbeitern aus erhöhtem oxidativem Stress in den Zellen bei SLE resultieren könnte (Dai et al., 2008). Da SLE und ERU beides T-Zell-medierte Erkrankungen sind, könnte diese Übereinstimmung in der Expression von GSTP ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen dieses Proteins im Zusammenhang mit der ERU sein.

**Fruktose-Bisphosphat Aldolase C** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 188, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 13) ist ein Enzym der Glykolyse, ein Vorgang zur Energiegewinnung in Form von ATP. Dieses Enzym kommt hauptsächlich im Gehirn vor und war in diesem Experiment in den ERU-Proben im Vergleich zu den Kontrollen niedriger exprimiert. In Vertebraten können drei Isoformen des ubiquitär vorkommenden Enzyms Aldolase gefunden werden: Aldolase A im Skelettmuskelgewebe, Aldolase B in Leber und Niere und schließlich Aldolase C in den Zellen des Nervensystems (Beemer et al., 1982). Es erscheint merkwürdig, dass die gewebespezifische Aldolase C in equinen Leukozyten identifiziert werden konnte, jedoch beschrieben Riol und Mitarbeiter in ihrer Studie zu GFAP (glial fibrillary acidic protein) in humanen Lymphozyten ebenfalls eine Expression von gehirnspezifischen Markern, darunter Aldolase C, in peripheren

Blutzellen (Riol et al., 1997). Aldolase C zeigt in Tumorerkrankungen wie dem Retinablastom eine verringerte Expression (Beemer et al., 1982), und wurde zudem im Gehirn von Patienten mit Schizophrenie in veränderten Konzentrationen nachgewiesen (Martins-de-Souza et al., 2009). Im Zusammenhang mit Uveitis wurde dieses Protein jedoch noch nicht beschrieben.

Ein weiteres, in diesem Experiment in erkrankten Tieren niedriger exprimiertes Protein ist **Transgelin 2** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 346, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 8). *In vivo* vernetzt Transgelin Aktinfilamente untereinander und hat zudem *in vitro* die Fähigkeit, Aktin zu gelieren (Shapland et al., 1993). Dies deutet darauf hin, dass Transgelin 2 in der Zelle eine wichtige Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts spielt (Shapland et al., 1993) und somit physiologischerweise in der Zelldifferenzierung (Camoretti-Mercado et al., 1998) aber auch pathologisch in der Regulation des Zellphänotyps von glatten Muskelzellen während der Arteriosklerose eine wichtige Funktion hat (Feil et al., 2004). Zudem könnte eine erniedrigte Expression von Transgelin 2 in der frühen Tumorentstehung eine Rolle spielen (Li et al., 2008). Obwohl Transgelin 2 ein Protein der Zellen des glatten Muskelgewebes ist (Li et al., 1996), wurde es überraschenderweise auch in peritonealen B-Lymphozyten charakterisiert (Frances et al., 2006), jedoch sind bislang keine Studien zu Transgelin 2 in mononukleären Zellen des peripheren Bluts bekannt. Bei Autoimmunerkrankungen und Uveitis wurde Transgelin bisher ebenfalls nicht charakterisiert (PubMed Recherche Stand 16.10.2009).

Das nächste, in den ERU-Proben dieses Experiments geringer exprimierte Protein ist das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte, als Ko-Chaperon wirkende **PWP1-interagierende Protein** (periodic tryptophan protein 1 interacting Protein, Synonyme: DnaJ homolog subfamily B member 11, HEDJ) (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 177, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 14), welches Proteine und RNA unterstützt, sich korrekt zu falten (Yu et al., 2000). Es ist in nahezu alle Aspekte der Proteinsynthese und -sekretion involviert und kann in einigen Fällen nicht nur als Ko-Chaperon sondern auch als Chaperon an sich funktionieren. Yu und Mitarbeiter beschrieben in einer Studie die Gewinnung und Klonierung dieser Hsp40-Chaperone und charakterisierten sie in Vero-Zellen (Yu et al., 2000). Durch eine herabgesetzte Expression des PWP1-interagierenden Proteins in Zellen könnte es vermehrt zu fehlerhaft gefalteten Proteinen kommen. In Zellen des zentralen Nervensystems können solche Fehlfaltungen zur Pathogenese von Erkrankungen wie Morbus

---

Alzheimer beitragen (Kopito, 1997). Die Bedeutung der differentiellen Expression in den gemischt granulo- und lymphozytären Proben ist nicht geklärt und auch mit der autoimmun-medierten Uveitis konnte noch kein Zusammenhang gefunden werden (PubMed Recherche Stand 16.10.2009).

Das zur Familie der Adapter-Proteine gehörende, in den ERU-Proben niedriger exprimierte **NCK Adapter Protein 1 (NCK1)** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 172, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 15) besteht aus einer SH2- und drei SH3-Domänen und ist im Zytoplasma von Zellen lokalisiert (Lehmann et al., 1990). NCK 1 ist an der Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen an nachgeschaltete Signalempfänger wie RAS beteiligt (Buday et al., 2002), stellt ein Bindeglied zwischen Aktinfilamenten und Zelloberflächenrezeptoren dar und ist wichtig für die dynamische Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Buday et al., 2002; Qualmann and Kessels, 2002; Li et al., 2001). Zudem spielt NCK1 eine wichtige Rolle in der Aktivierung von T-Lymphozyten, indem es, nach der Bildung eines TCR-MHC-assoziierten Liganden-Komplexes, an die zytoplasmatische CD3 $\epsilon$ -Domäne des TCR-CD3-Komplexes bindet und somit an der Induktion der TCR-medierten, nach innen gerichteten Signalkaskade mitwirkt (Gil et al., 2002). Im Gegensatz zu der Studie von Gil und Mitarbeitern postulierten Takeuchi und Mitarbeiter sechs Jahre später eine hemmende Wirkung von NCK1 auf die T-Zell-Aktivierung, indem die NCK1-CD3-Interaktion die Tyrosin-Phosphorylierung von CD3 $\epsilon$  und damit den ITAM-basierenden Signaltransduktionsweg inhibieren soll (Takeuchi et al., 2008). ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) besteht aus einer Sequenz von vier Aminosäuren, die im zytoplasmatischen Teil von Zelloberflächenproteinen des Immunsystems, wie CD3, lokalisiert sind. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste dieser Aminosäuresequenzen ermöglicht das Andocken von weiteren, für die Signaltransduktion in Zellen wichtigen Proteinen (Underhill and Goodridge, 2007; Pitcher and van Oers, 2003).

In unseren Untersuchungen wurde NCK1 in gemischt granulo- und lymphozytären Proben von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu augengesunden Tieren als niedriger exprimiert detektiert. Dies könnte, basierend auf den Erkenntnissen von Takeuchi und Mitarbeitern, auf eine erhöhte Zahl aktivierter T-Zellen im peripheren Blut von an ERU erkrankten Pferden hindeuten. Andererseits würde dies nach Gil und Mitarbeitern bedeuten, dass bei der ERU weniger aktivierte T-Zellen im peripheren Blut zirkulieren. In letzterem Fall wäre es möglich, dass die aktivierten T-

Zellen zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits ins uveitische Auge migriert und somit nicht mehr im peripheren Blutkreislauf detektierbar sind.

Interessanterweise interagieren NCK1 und das im ersten, lymphozytären DIGE-Experiment niedriger exprimierte Septin 7 in der Zelle miteinander, indem Septine, durch die Translokation von NCK1 aus dem Zytoplasma in den Zellkern, an das Aktin-Zytoskelett binden (Kremer et al., 2005). Daher bleibt zu klären, warum die differenzielle Expression von NCK1 nicht im ersten, lymphozytenlastigeren DIGE-Experiment, sondern im gemischt granulo- und lymphozytären Ansatz als unterschiedlich abundant detektiert wurde. In dieser Studie scheiterte eine Validierung von NCK1 daran, dass kein für das Pferd passender Antikörper gefunden werden konnte und der verwendete anti-human NCK1-Antikörper im Western Blot nicht kreuzreagierte. Die weitere Charakterisierung dieses interessanten Proteins muss daher warten, bis geeignete Werkzeuge zur Verfügung stehen.

Schließlich wurde mittels 2D-DIGE in den Leukozyten von an ERU erkrankten Pferden **Talin 1** (Abschnitt 4, Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 34, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 20) als niedriger exprimiert detektiert. Talin 1 ist ein 270 kDa großes Protein, welches als Adapterprotein das Verbindungsglied zwischen Transmembranproteinen und dem Zytoskelett von Zellen darstellt (Critchley, 2009; Critchley and Gingras, 2008; Li et al., 2007). Es liegt aufgrund seines hohen Molekulargewichts im oberen Bereich der DIGE-Gele und bildet dort einen einzelnen Spot (Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 6), sowie zwei horizontale Spotreihen, eine davon aus sechs Spots und zudem eine aus zwei, etwas schräg nach unten versetzten Spots bestehend (Abb. und Tab. 4.1: Spots Nr. 31-38). Interessanterweise ist nur einer dieser Spots differenziell exprimiert (Abb. und Tab. 4.1: Spot Nr. 34, Abb. 4.12 und 4.13 und Tab. 4.3: Spot Nr. 20). Dies weist auf funktionelle Veränderungen am Protein in Form von posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierungen, hin. Um herauszufinden, welche dieser funktionellen Modifikationen genau bei der ERU erniedrigt ist, sollen diese in weiteren Untersuchungen näher betrachtet und charakterisiert werden. In einer unlängst veröffentlichten Studie wurde beschrieben, dass die Phosphorylierung von Talin durch Cdk5 (cyclin-dependant protein kinase 5) zur Stabilisierung von fokalen Adhäsionen und Lamellipodia während der Zellmigration führt (Huang et al., 2009). Dies könnte auch auf die zellulären Vorgänge bei der ERU zutreffen und zeigt, dass die Untersuchung von

---

posttranslationalen Modifikationen wichtige Erkenntnisse über die Funktionen von Proteinen zulässt.

Talin 1 besteht aus einer kugelförmigen head- und einer stabförmigen, flexiblen rod-Region und hat an beiden Regionen mehrere Bindungsstellen für die beta-Untereinheit von Integrinen ( $\beta$ -Integrin) und die filamentöse Form von Aktin (F-Aktin) (Critchley, 2009; Critchley and Gingras, 2008; Li et al., 2007). Die Bindung von Talin an die zytoplasmatische, ins Zellinnere zeigende beta-Untereinheit von Integrin, einem transmembranständigen Adhäsionsmolekül, führt zu einer Konformationsänderung in der extrazellulären  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrin-Domäne und damit zu ihrer Aktivierung. Aktivierte Integrine zeigen eine erhöhte Affinität zu Proteinen aus der extrazellulären Matrix (ECM) und spielen eine wichtige Rolle bei Zell-zu-Zell-Interaktionen, sind somit also ein wichtiger Faktor in der Kaskade der Signalübertragung (Critchley, 2009; Critchley and Gingras, 2008; Li et al., 2007) sowie der Leukozytenadhäsion an und der Migration durch Endothelien (Rose et al., 2007; Simonson et al., 2006; Smith et al., 2005). Zusätzlich zu Aktin und Integrin kann Talin 1 an seiner rod-Region das Protein Vinculin binden (Ziegler et al., 2006; Bakolitsa et al., 2004). Dieses dient vermutlich der Stabilisierung des Aktin-Talin-Integrin-Komplexes, indem es F-Aktin mit Talin 1 quervernetzt (Ziegler et al., 2006; Bakolitsa et al., 2004). Neben dem ubiquitär in Zellen vorkommenden Talin 1 gibt es bei Säugetieren zudem das bislang weniger erforschte Talin 2, welches nicht in Leukozyten exprimiert wird (Debrand et al., 2009).

In T-Zellen ist Talin 1 maßgeblich an der Regulation von Affinität, Clustering und Polarisation des Leukozytenintegrins LFA-1 (Lymphozyten-Funktions-assoziiertes Antigen 1) im Verlaufe der Zelladhäsion und -migration beteiligt (Simonson et al., 2006; Smith et al., 2005). Wie von Simonson und Mitarbeitern in Talin 1-depletierten Jurkat T-Zellen und Talin 1-depletierten humanen PBL beschrieben, führt ein Talin 1-Mangel in Leukozyten zur Beeinträchtigung dieser Abläufe mit verminderter Affinität der LFA-1 zum auf Endothelzellen exprimierten, interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) (Simonson et al., 2006).

Interessanterweise wurde in unserer Studie Talin 1 in equinen Leukozyten aus dem peripheren Blut von an ERU erkrankten Pferden mittels 2D-DIGE (Abb. 4.12 und 4.13, Tab. 4.3: Spot Nr. 20) als niedriger exprimiert detektiert. Dies konnte auch im Western Blot bestätigt werden, wobei hier die Talin 1-Expression im Erkrankten um 89% zurück ging im Vergleich zum Gesunden (Abb. 4.14). Die über die Blut-Retina-

Schranke in das uveitische Auge migrierten und in subretinalen Lymphfollikeln akkumulierten T-Zellen waren zu nahezu 100% Talin 1-positiv (Abb. 4.16D). Im Gegensatz zum Lymphfollikel waren im Kontrollgewebe Mandibularlymphknoten weniger als die Hälfte der Lymphozyten Talin positiv (Abb. 4.16B). Im Auge waren die Talin 1-exprimierenden Zellen zudem mit den Integrinen LFA-1 (CD11a-positive Zellen, Abb. 4.16.6) und CD49a (Abb. 4.16.7) assoziiert. Welche PBL-Zellpopulation genau Talin 1 niedriger exprimiert, muss durch weitere durchflusszytometrische Untersuchungen geklärt werden, wobei die Granulozyten- und Lymphozytenpopulationen in zwei Gruppen von Kontroll- und an ERU erkrankten Pferden analysiert werden müssen. Zur Expression von Talin 1 beim Pferd gibt es zudem keine publizierten Studien, so dass hier weitere, eingehende Charakterisierungen nötig sind.

Die in dieser Studie gezeigte Assoziation von Talin 1 mit Integrinen auf Pferdeleukozyten und die bei ERU deutlich erhöhte Expression von Talin 1 auf intraokulären Lymphozyten macht Talin 1 zu einem interessanten Kandidaten bei der Analyse der Voraussetzungen, die Zellen benötigen, um die Blut-Retina-Schranke überwinden zu können. In früheren Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die wenigen, bei ERU aus dem Glaskörper gewinnbaren Leukozyten in der Regel ausreichen, um durchflusszytometrisch analysiert oder in funktionellen Assays eingesetzt zu werden. Deshalb sollen zunächst die bei der als Therapie eingesetzten Vitrektomie anfallenden Glaskörperproben genutzt werden, um die Talin-1-Expressionsmuster von PBL und intravitrealen Zellen aus dem selben Tier zu vergleichen, und somit weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von Talin 1 bei der ERU zu erhalten.

Bislang wurde eine Veränderung der Talin 1-Expression weder bei der Pathogenese von ERU, noch bei anderen Autoimmunerkrankungen beschrieben (PubMed Recherche Stand 16.10.2009). Daher soll Talin 1 in Zukunft in weiteren Experimenten ausführlich charakterisiert werden.

Die, in dieser Studie als experimentelle Basis genutzte, Anwendung der 2D-DIGE Technik zur vergleichenden, differenziellen Expressionsanalyse von Zellproteinen hat viele Vorteile und trägt maßgeblich zur Identifikation neuer Kandidatenproteine bei. Sie umgeht die schlechte Reproduzierbarkeit der 2-DE (Timms and Cramer, 2008; Lilley and Friedman, 2004) und erlaubt somit akkuratere und sensitivere quantitative proteomische Studien, sowie die Detektion feinerer Expressionsunterschiede als

---

konventionelle 2-DE (Lilley and Friedman, 2004). Zudem ist ein Expressionsvergleich von Proteinen mittels 2D-DIGE weitaus weniger arbeitsintensiv als herkömmliche 2-DE (Timms and Cramer, 2008) und die von Natur aus starke dynamische Bandbreite von komplexen Proteingemischen wie Zellysaten kann mittels dieser Technologie besser repräsentiert werden (Kondo and Hirohashi, 2009; Lilley and Friedman, 2004).

Durch die Eingliederung eines internen Standards können kleine, jedoch relevante Änderungen in der Proteinexpression besser erfasst werden (Friedman et al., 2004). So detektierten Prabakaran und Mitarbeiter in zerebralem Gewebe von an Schizophrenie erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden äußerst subtile Proteinexpressionsunterschiede, die mit konventioneller 2-DE und ohne einen internen Standard als Ladungskontrolle nicht hätten nachgewiesen werden können (Prabakaran et al., 2004). 2D-DIGE wurde zudem bereits effektiv für die vergleichende Untersuchung weiterer biologischer Materialien, unter anderem humaner Brustkrebszellen (Gharbi et al., 2002), ösophagealer Krebszellen (Zhou et al., 2002), Kolonkrebs des Menschen (Friedman et al., 2004), sowie von Mäusegehirnen (Skynner et al., 2002) und Rattenherzen (Sakai et al., 2003) eingesetzt. Zudem wurde vor kurzem eine Studie zur differentiellen Mitochondrienproteomik bei oxidativem Stress in muriner experimenteller Autoimmunität veröffentlicht, in der mittels 2D-DIGE 13 differentiell exprimierte Mitochondrienproteine aus der Retina detektiert und identifiziert wurden, darunter die im zweiten DIGE-Experiment der hiesigen Studie bei an ERU erkrankten Pferden höher exprimierte Superoxid Dismutase (Saraswathy and Rao, 2009).

Ein wichtiger Vorteil proteomischer Verfahren, die auf zweidimensionaler Gelelektrophorese basieren, ist die Visualisierung von Änderungen in Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt eines Proteins (O'Farrell, 1975). Solche Änderungen spiegeln biologisch signifikante Prozesse wie posttranslationale Modifikationen (PTM) wieder, dazu gehören unter anderem Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Sulfatierungen und Acetylierung/Deacetylierung von Proteinen (Lilley and Friedman, 2004), die mit alternativen Techniken auf DNA- und RNA-Ebene nicht dargestellt werden können. Die Phosphorylierung von Proteinen ist wichtig für etliche regulatorische Pfade, Enzymaktivitäten und die Proteindegeneration, während die Proteinglykosylierung mit biochemischen Alterationen und pathogenetischen Änderungen in der Entwicklung, wie der

Tumorentstehung, in Verbindung gebracht wird (Gorg et al., 2004). Diese zwei posttranslationalen Modifikationen sind die wichtigsten unter den vielen bisher beschriebenen PTM und sind in einem zweidimensionalen Gel als horizontal oder vertikal ausgerichtete Spotreihen klar erkennbar (Gorg et al., 2004). Dieses Phänomen trat, wie bereits beschrieben, auch in zwei der Kandidaten dieser Studie, Talin 1 und Septin 7, auf und wäre mit anderen Methoden nicht so offensichtlich hervorgetreten.

Mit Hilfe der 2D-DIGE Technik war es uns möglich, das equine Leukozytenproteom großflächig und nicht-hypothesengetrieben zu untersuchen und einige, im Zusammenhang mit der ERU bisher unbeschriebene, differenziell exprimierte Leukozytenproteine erfolgreich zu beschreiben, die eine weitere, eingehende Charakterisierung verdienen.

Jedoch stößt diese Methode an technische Grenzen, wenn es um die Darstellung von Membranproteinen geht (Santoni et al., 2000). Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften sind Membranproteine in wässrigen Medien, wie sie bei der isoelektrischen Fokussierung im Rahmen der 2-DE eingesetzt werden, äußerst schlecht löslich (Santoni et al., 2000). Vor allem integrale Membranproteine sind mittels 2-DE schwierig darzustellen, da diese während der isoelektrischen Fokussierung zudem stark zur Ausfällung neigen (Lilley and Friedman, 2004). Da sie bei verschiedenen zellulären Prozessen wie der Signaltransduktion, Zelladhäsion, Endozytose und dem Ionentransport eine wichtige Rolle spielen (Wallin and von Heijne, 1998), sind Membranproteine jedoch ein äußerst interessanter und bedeutsamer Ansatz zur Detektion von potenziellen Biomarkern und Angriffspunkten für pharmakologische Substanzen (Santoni et al., 2000). Auch für die Analyse von Immunfunktionen der PBL ist die Untersuchung der Membranprotein-Expression auf diesen Zellen sicher sehr aufschlussreich, in diesem Experiment jedoch aufgrund der mangelnden Darstellungsmöglichkeit dieser Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nicht möglich gewesen. Dies ist ein gravierender Nachteil der auf 2-DE basierenden Proteomanalyse. Zudem müssen zur Lösung und Fraktionierung von Membranproteinen aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften Detergenzien eingesetzt werden (Nagaraj et al., 2008), welche die Identifizierung von Peptiden und Proteinen mittels Massenspektrometrie in erheblichem Maße stören (Nagaraj et al., 2008).

Bis dato gibt es in der Proteomik keinen Goldstandard zur Identifikation von Membranproteinen, jedoch beschrieben Nagaraj und Mitarbeiter eine gut durchführbare, auf Detergenzien basierende und gelfreie Methode, die es ermöglicht, mittels flüssigkeitschromatographischer Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) in einer Ionenfalle (Orbitrap) mehrere hundert Membranproteine aus einer Probe zu identifizieren (Nagaraj et al., 2008). Dabei wurden die zur Probenaufbereitung genutzten Detergenzien (SDS, Triton X-100 oder CHAPS) vor der massenspektrometrischen Analyse über eine mit Harnstoff äquilibrierte Entsalzungssäule aus der Probe entfernt (Nagaraj et al., 2008). Diese gelfreie Methode zur Analyse von Membranproteinen führt zu einer sehr ergiebigen Proteinidentifikationsrate und ist eine einfach anwendbare, effektive und robuste Technik zur Entfernung von Detergenzien aus Membranprotein-Präparationen (Nagaraj et al., 2008). Die Anwendung dieser Technik soll anschließend an die hiesige, auf 2D-DIGE basierende Leukozytenstudie, als ergänzende Untersuchung wertvolle Aufschlüsse über mögliche Expressionsänderungen der Leukozyten-Membranproteine von an ERU erkrankten Pferden geben und damit tiefere Einblicke die Pathogenese der ERU ermöglichen.

Zusammenfassend wurden in dieser proteomisch-vergleichenden Studie des Leukozytenproteoms von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu Gesunden mit Hilfe der 2D-DIGE Technik etliche differenzielle, im Zusammenhang mit der equinen rezidivierenden Uveitis bisher unbeschriebene Leukozytenproteine erfolgreich identifiziert. Vor allem Septin 7 und Talin 1 sollen in weiteren Experimenten näher analysiert werden, aber auch weitere der identifizierten Proteine, wie NCK1, SAFB und Ezrin, verdienen in Zukunft genauere Untersuchungen zur Charakterisierung ihrer Funktion in der spontan auftretenden equinen rezidivierenden Uveitis, einer der weltweit häufigsten Ursache der Erblindung von Pferden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine spontane, periodisch wiederkehrende Erkrankung und ist die häufigste Ursache von Erblindung bei adulten Pferden. Sie betrifft weltweit bis zu 10% der Pferdepopulation und ist das einzige spontane Modell für die autoimmun-medierte Uveitis des Menschen.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels vergleichender Proteomanalyse Unterschiede in der Proteinexpression zwischen Leukozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde zu detektieren und durch massenspektrometrische Identifizierung dieser differenziell exprimierten Proteine die Pathogenese der ERU weiter zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang wurden in dieser Studie Leukozyten aus dem peripheren Blut von insgesamt 37 augengesunden und 33 an ERU erkrankten Pferden untersucht.

Mittels zweidimensionaler Difference-gel-electrophoresis (2D-DIGE) wurden in einem ersten, lymphozytären Experiment 50 differenziell exprimierte Proteine detektiert. Von diesen Proteinen konnten insgesamt neun massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden, unter anderem Septin 7. Die Expressionsstärke von Septin 7 in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden ist im Vergleich zu gesunden Tieren um 30% verringert. Zudem ist die Septin 7-Expression in T-Zellen der bei ERU intraokulär gebildeten Lymphfollikel niedriger als in den Zellen des als Kontrollgewebe eingesetzten Mandibularlymphknotens. Nachdem Septin 7 eine Rolle bei der Funktion und Migration von T-Zellen zugesprochen wird, soll in weiteren Untersuchungen geklärt werden, wie die verringerte Septin 7-Expression mit der Pathologie der ERU zusammenhängen könnte.

Im zweiten Experiment wurden auch die Granulozyten in die Analyse mit einbezogen. Aus den hier ebenfalls 50 unterschiedlich abundanten Proteinen konnten 20 eindeutig identifiziert werden, darunter Talin 1, das in den ERU-Proben zu 89% niedriger exprimiert war als in den Kontrollen. Talin 1 wird auf equinen PBL zum Teil mit mehreren Integrinen (CD11a, CD11b, CD29 und CD49a) ko-exprimiert und war auf den intraokulären Zellen zu nahezu 100% exprimiert im Vergleich zum Kontroll-Lymphknoten (ca. 40%). Da Talin 1 ebenfalls eine Rolle bei der Zellmigration zugeschrieben wird, sollen weitere funktionelle Analysen klären, welche Bedeutung die veränderte Talin 1-Expression in den PBL und den intraokulären Leukozyten der an ERU erkrankten Pferde hat.

Weitere interessante Kandidaten aus beiden Experimenten, die unserer Meinung nach nähere Untersuchungen rechtfertigen, sind Scaffold attachment Faktor B, Superoxid Dismutase und Triosephosphat Isomerase (überexprimiert bei ERU) sowie Programmed cell death 6-interagierendes Protein, NCK Adapter Protein 1 und Ezrin (niedriger exprimiert bei ERU).

## 7 SUMMARY

Equine recurrent uveitis (ERU) is a spontaneous, periodic recurrent disease and the most common cause for blindness in adult horses. About ten percent of the worldwide equine population is affected by this disease. In addition, ERU is the only spontaneous model for autoimmune-mediated uveitis in humans.

In order to get a deeper understanding of the ERU pathogenesis, the aim of this study was to detect and subsequently identify differentially expressed proteins in the peripheral blood leucocyte (PBL) proteome of ERU-diseased horses in comparison to healthy controls through comparative proteome analysis. For this purpose, PBL of 37 healthy and 33 ERU diseased horses were examined in this study.

In a first experiment, comparing lymphocytes from PBL, we detected 50 differentially expressed proteins using the two-dimensional Difference-gel-electrophoresis (2D-DIGE) technique. Nine out of these 50 proteins could be unambiguously identified by mass spectrometry, among these was Septin 7. The Septin 7-expression level in lymphocytes of horses with equine recurrent uveitis is reduced by 30% in comparison to non-diseased controls. Additionally, T-cells in intraocular lymph follicles, which occur in eyes of ERU-diseased horses, express less Septin 7 than cells of the mandibular lymphnodes used for comparison. As Septin 7 might play a role in the function and migration of T-cells, further investigation will be performed to clarify whether a reduced Septin 7-expression associates with the ERU pathology.

In a second experiment, the analysis was expanded to total PBL, also containing granulocytes. Again, a total of 50 differentially expressed proteins were detected and 20 out of these 50 proteins could be clearly identified. Among these was Talin 1, which - in PBL of ERU-diseased horses - was reduced in its expression by 89% compared to control samples. Talin 1 was partially co-expressed with several integrins (CD11a, CD11b, CD29 and CD49a) on equine PBL and it was expressed by almost 100% of intraocular T-cells in contrast to control lymphnodes, where Talin 1 was expressed in about 40% of the cells. As Talin 1 might also play a role in cell-migration, further functional analysis should clarify why the Talin 1-expression in PBL and intraocular leukocytes in ERU-diseased horses is altered.

Other proteins of interest detected in the two DIGE-experiments which also deserve further characterisation are Scaffold attachment factor B, Superoxide dismutase and Triosephosphate isomerase (all with a higher expression in ERU-diseased horses) as

well as Programmed cell death 6-interacting protein, NCK adaptor protein 1 and Ezrin (expressed lower in ERU cases).

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahlqvist J. (2004) Equation for osmotic pressure of serum protein (fractions). *J Appl Physiol* **96**, 762-4.
- Alam S. L. and Sundquist W. I. (2007) Structural biology: ESCRT service. *Nature* **447**, 921-2.
- Albert L. J. and Inman R. D. (1999) Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* **341**, 2068-74.
- Amadi-Obi A., Yu C. R., Liu X., Mahdi R. M., Clarke G. L., Nussenblatt R. B., Gery I., Lee Y. S. and Egwuagu C. E. (2007) TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* **13**, 711-8.
- Bailey D. L., Wolodko W. T. and Bridger W. A. (1993) Cloning, characterization, and expression of the beta subunit of pig heart succinyl-CoA synthetase. *Protein Sci* **2**, 1255-62.
- Bakolitsa C., Cohen D. M., Bankston L. A., Bobkov A. A., Cadwell G. W., Jennings L., Critchley D. R., Craig S. W. and Liddington R. C. (2004) Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* **430**, 583-6.
- Barral Y., Mermall V., Mooseker M. S. and Snyder M. (2000) Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell* **5**, 841-51.
- Becker M. D., Adamus G., Davery M. P. and Rosenbaum J. T. (2000) The role of T cells in autoimmune uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation* **8**, 93-100.
- Beemer F. A., Vlug A. M., Rijksen G., Hamburg A. and Staal G. E. (1982) Characterization of some glycolytic enzymes from human retina and retinoblastoma. *Cancer Res* **42**, 4228-32.
- Bizzozero O. A. and Zheng J. (2009) Identification of major S-nitrosylated proteins in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* **87**, 2881-9.
- Bomsztyk K., Denisenko O. and Ostrowski J. (2004) hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays* **26**, 629-38.
- Bonilha V. L. (2007) Focus on molecules: ezrin. *Exp Eye Res* **84**, 613-4.
- Bonilha V. L., Rayborn M. E., Saotome I., McClatchey A. I. and Hollyfield J. G. (2006) Microvilli defects in retinas of ezrin knockout mice. *Exp Eye Res* **82**, 720-9.
- Borro M., Gentile G., Stigliano A., Misiti S., Toscano V. and Simmaco M. (2007) Proteomic analysis of peripheral T lymphocytes, suitable circulating biosensors of strictly related diseases. *Clin Exp Immunol* **150**, 494-501.
- 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.
- Bretscher A., Edwards K. and Fehon R. G. (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 586-99.
- Buday L., Wunderlich L. and Tamas P. (2002) The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* **14**, 723-31.
- Burrows J. F., Chanduloy S., McIlhatton M. A., Nagar H., Yeates K., Donaghy P., Price J., Godwin A. K., Johnston P. G. and Russell S. E. (2003) Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. *J Pathol* **201**, 581-8.

- Buse C., Altmann F., Amann B., Hauck S. M., Poulsen Nautrup C., Ueffing M., Stangassinger M. and Deeg C. A. (2008) Discovering novel targets for autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis* **29**, 1325-32.
- Byers B. and Goetsch L. (1976) A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol* **69**, 717-21.
- Camoretti-Mercado B., Forsythe S. M., LeBeau M. M., Espinosa R., 3rd, Vieira J. E., Halayko A. J., Willadsen S., Kurtz B., Ober C., Evans G. A., Thweatt R., Shapiro S., Niu Q., Qin Y., Padrid P. A. and Solway J. (1998) Expression and cytogenetic localization of the human SM22 gene (TAGLN). *Genomics* **49**, 452-7.
- Cao L., Yu W., Wu Y. and Yu L. (2009) The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cell Mol Life Sci*.
- Caspi R. (2008) Autoimmunity in the immune privileged eye: pathogenic and regulatory T cells. *Immunol Res* **42**, 41-50.
- Caspi R. R. (2003) Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 15**, Unit 15 6.
- Caspi R. R. (2006) Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev* **213**, 23-35.
- Caspi R. R., Roberge F. G., Chan C. C., Wiggert B., Chader G. J., Rozenszajn L. A., Lando Z. and Nussenblatt R. B. (1988) A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* **140**, 1490-5.
- Caspi R. R., Silver P. B., Chan C. C., Sun B., Agarwal R. K., Wells J., Oddo S., Fujino Y., Najafian F. and Wilder R. L. (1996) Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the rat is associated with an elevated Th1 response. *J Immunol* **157**, 2668-75.
- Caspi R. R., Silver P. B., Luger D., Tang J., Cortes L. M., Pennesi G., Mattapallil M. J. and Chan C. C. (2008) Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* **40**, 169-74.
- Chen G., Gharib T. G., Huang C. C., Thomas D. G., Shedden K. A., Taylor J. M., Kardina S. L., Misek D. E., Giordano T. J., Iannettoni M. D., Orringer M. B., Hanash S. M. and Beer D. G. (2002) Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res* **8**, 2298-305.
- Critchley D. R. (2009) Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annu Rev Biophys* **38**, 235-54.
- Critchley D. R. and Gingras A. R. (2008) Talin at a glance. *J Cell Sci* **121**, 1345-7.
- Crouch S. P., Slater K. J. and Fletcher J. (1992) Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* **80**, 235-40.
- Dai Y., Hu C., Huang Y., Huang H., Liu J. and Lv T. (2008) A proteomic study of peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **17**, 799-804.
- de Smet M. D., Bitar G., Roberge F. G., Gery I. and Nussenblatt R. B. (1993) Human S-antigen: presence of multiple immunogenic and immunopathogenic sites in the Lewis rat. *J Autoimmun* **6**, 587-99.
- Debrand E., El Jai Y., Spence L., Bate N., Praekelt U., Pritchard C. A., Monkley S. J. and Critchley D. R. (2009) Talin 2 is a large and complex gene encoding multiple transcripts and protein isoforms. *FEBS J* **276**, 1610-28.
- Deeg C. A. (2008) Ocular immunology in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* **11 Suppl 1**, 61-5.

- Deeg C. A., Altmann F., Hauck S. M., Schoeffmann S., Amann B., Stangassinger M. and Ueffing M. (2007a) Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* **7**, 1540-8.
- Deeg C. A., Amann B., Raith A. J. and Kaspers B. (2006a) Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 652-6.
- Deeg C. A., Ehrenhofer M., Thurau S. R., Reese S., Wildner G. and Kaspers B. (2002a) Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* **75**, 127-33.
- Deeg C. A., Hauck S. M., Amann B., Kremmer E., Stangassinger M. and Ueffing M. (2007b) Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Mol Immunol* **44**, 3291-6.
- Deeg C. A., Hauck S. M., Amann B., Pompetzki D., Altmann F., Raith A., Schmalzl T., Stangassinger M. and Ueffing M. (2008) Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res* **40**, 151-3.
- Deeg C. A., Kaspers B., Gerhards H., Thurau S. R., Wollanke B. and Wildner G. (2001) Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 393-8.
- Deeg C. A., Pompetzki D., Raith A. J., Hauck S. M., Amann B., Suppmann S., Goebel T. W., Olazabal U., Gerhards H., Reese S., Stangassinger M., Kaspers B. and Ueffing M. (2006b) Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1462-70.
- Deeg C. A., Raith A. J., Amann B., Crabb J. W., Thurau S. R., Hauck S. M., Ueffing M., Wildner G. and Stangassinger M. (2007c) CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol* **2007**, 39245.
- Deeg C. A., Reese S., Gerhards H., Wildner G. and Kaspers B. (2004) The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 2286-92.
- Deeg C. A., Thurau S. R., Gerhards H., Ehrenhofer M., Wildner G. and Kaspers B. (2002b) Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* **32**, 2598-606.
- Dotzlaw H., Schulz M., Eggert M. and Neeck G. (2004) A pattern of protein expression in peripheral blood mononuclear cells distinguishes rheumatoid arthritis patients from healthy individuals. *Biochim Biophys Acta* **1696**, 121-9.
- Dreyfuss G., Matunis M. J., Pinol-Roma S. and Burd C. G. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* **62**, 289-321.
- Du Q., Wang L., Zhu H., Zhang S., Xu L., Zheng W. and Liu X. (2009) The role of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in the progression of chronic myeloid leukemia. *Med Oncol*.
- Dubielzig R. R., Render J. A. and Morreale R. J. (1997) Distinctive morphologic features of the ciliary body in equine recurrent Uveitis. *Vet. Comp. Ophthalmol.*
- Eichler W., Yafai Y., Keller T., Wiedemann P. and Reichenbach A. (2004) PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res* **299**, 68-78.
- Elkon K. and Casali P. (2008) Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* **4**, 491-8.
- Elpeleg O., Miller C., Hershkovitz E., Bitner-Glindzicz M., Bondi-Rubinstein G., Rahman S., Pagnamenta A., Eshhar S. and Saada A. (2005) Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with

- encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* **76**, 1081-6.
- Engidawork E., Gulesserian T., Fountoulakis M. and Lubec G. (2003) Aberrant protein expression in cerebral cortex of fetus with Down syndrome. *Neuroscience* **122**, 145-54.
- Fae K. C., Diefenbach da Silva D., Bilate A. M., Tanaka A. C., Pomerantzeff P. M., Kiss M. H., Silva C. A., Cunha-Neto E., Kalil J. and Guilherme L. (2008) PDIA3, HSPA5 and vimentin, proteins identified by 2-DE in the valvular tissue, are the target antigens of peripheral and heart infiltrating T cells from chronic rheumatic heart disease patients. *J Autoimmun* **31**, 136-41.
- Faure J. P. (1980) Autoimmunity and the retina. *Curr Top Eye Res* **2**, 215-302.
- Faustman D. L. and Davis M. (2009) The primacy of CD8 T lymphocytes in type 1 diabetes and implications for therapies. *J Mol Med*.
- Feil S., Hofmann F. and Feil R. (2004) SM22alpha modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis. *Circ Res* **94**, 863-5.
- Fievet B. T., Gautreau A., Roy C., Del Maestro L., Mangeat P., Louvard D. and Arpin M. (2004) Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* **164**, 653-9.
- Frances R., Tumang J. R., Kaku H., Gurdak S. M. and Rothstein T. L. (2006) B-1 cells express transgelin 2: unexpected lymphocyte expression of a smooth muscle protein identified by proteomic analysis of peritoneal B-1 cells. *Mol Immunol* **43**, 2124-9.
- Fridovich I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**, 97-112.
- Friedman D. B., Hill S., Keller J. W., Merchant N. B., Levy S. E., Coffey R. J. and Caprioli R. M. (2004) Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 793-811.
- Fruhauf B., Ohnesorge B., Deegen E. and Boeve M. (1998) Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy. *Vet Ophthalmol* **1**, 137-151.
- Fujinami R. S., von Herrath M. G., Christen U. and Whitton J. L. (2006) Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev* **19**, 80-94.
- Gerling I. C., Singh S., Lenchik N. I., Marshall D. R. and Wu J. (2006) New data analysis and mining approaches identify unique proteome and transcriptome markers of susceptibility to autoimmune diabetes. *Mol Cell Proteomics* **5**, 293-305.
- Gery I. and Streilein J. W. (1994) Autoimmunity in the eye and its regulation. *Current Opinion in Immunology*, 938-945.
- Gharbi S., Gaffney P., Yang A., Zvelebil M. J., Cramer R., Waterfield M. D. and Timms J. F. (2002) Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol Cell Proteomics* **1**, 91-8.
- Gil D., Schamel W. W., Montoya M., Sanchez-Madrid F. and Alarcon B. (2002) Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* **109**, 901-12.
- Gilger B. C., Malok E., Cutter K. V., Stewart T., Horohov D. W. and Allen J. B. (1999) Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* **71**, 17-28.

- Gilger B. C., Malok E., Stewart T., Ashton P., Smith T., Jaffe G. J. and 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. and Michau T. M. (2004) Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract* **20**, 417-27, vii.
- Gilger B. C., Salmon J. H., Wilkie D. A., Cruysberg L. P., Kim J., Hayat M., Kim H., Kim S., Yuan P., Lee S. S., Harrington S. M., Murray P. R., Edelhauser H. F., Csaky K. G. and Robinson M. R. (2006) A novel bioerodible deep scleral lamellar cyclosporine implant for uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 2596-605.
- Gorg A., Weiss W. and Dunn M. J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-85.
- Grant M. M., Scheel-Toellner D. and Griffiths H. R. (2007) Contributions to our understanding of T cell physiology through unveiling the T cell proteome. *Clin Exp Immunol* **149**, 9-15.
- Hall P. A., Jung K., Hillan K. J. and Russell S. E. (2005) Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol* **206**, 269-78.
- Hall P. A. and Russell S. E. (2004) The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol* **204**, 489-505.
- Hammerich-Hille S., Bardout V. J., Hilsenbeck S. G., Osborne C. K. and Oesterreich S. (2009) Low SAFB levels are associated with worse outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*.
- Hampson I. N., Hampson L., Pinkoski M., Cross M., Heyworth C. M., Bleackley R. C., Atkinson E. and Dexter T. M. (1997) Identification of a serpin specifically expressed in multipotent and bipotent hematopoietic progenitor cells and in activated T cells. *Blood* **89**, 108-18.
- Harkioliaki M., Holmes S. L., Svendsen P., Gregersen J. W., Jensen L. T., McMahon R., Friese M. A., van Boxel G., Etzensperger R., Tzartos J. S., Kranc K., Sainsbury S., Harlos K., Mellins E. D., Palace J., Esiri M. M., van der Merwe P. A., Jones E. Y. and Fugger L. (2009) T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* **30**, 348-57.
- Harrington L. E., Mangan P. R. and Weaver C. T. (2006) Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* **18**, 349-56.
- Hartwell L. H. (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* **69**, 265-76.
- Hashizume S., Kuroda K. and Murakami H. (1983) Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochim Biophys Acta* **763**, 377-82.
- Hauck S. M., Schoeffmann S., Amann B., Stangassinger M., Gerhards H., Ueffing M. and Deeg C. A. (2007) Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* **6**, 2121-31.
- Hirose S., Kuwabara T., Nussenblatt R. B., Wiggert B., Redmond T. M. and Gery I. (1986) Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Arch Ophthalmol* **104**, 1698-702.
- Hohlfeld R., Meinl E. and Dornmair K. (2008) B- and T-cell responses in multiple sclerosis: novel approaches offer new insights. *J Neurol Sci* **274**, 5-8.
- Horwitz M. S., Bradley L. M., Harbertson J., Krahl T., Lee J. and Sarvetnick N. (1998) Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* **4**, 781-5.

- Huang C., Rajfur Z., Yousefi N., Chen Z., Jacobson K. and Ginsberg M. H. (2009) Talin phosphorylation by Cdk5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitylation and cell migration. *Nat Cell Biol* **11**, 624-30.
- Hunter K. W. (2004) Ezrin, a key component in tumor metastasis. *Trends Mol Med* **10**, 201-4.
- Ihara M., Tomimoto H., Kitayama H., Morioka Y., Akiguchi I., Shibasaki H., Noda M. and Kinoshita M. (2003) Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *J Biol Chem* **278**, 24095-102.
- Iuchi Y., Okada F., Onuma K., Onoda T., Asao H., Kobayashi M. and Fujii J. (2007) Elevated oxidative stress in erythrocytes due to a SOD1 deficiency causes anaemia and triggers autoantibody production. *Biochem J* **402**, 219-27.
- Ivanova M., Dobrzycka K. M., Jiang S., Michaelis K., Meyer R., Kang K., Adkins B., Barski O. A., Zubairy S., Divisova J., Lee A. V. and Oesterreich S. (2005) Scaffold attachment factor B1 functions in development, growth, and reproduction. *Mol Cell Biol* **25**, 2995-3006.
- Jiang W., Du B., Chi Z., Ma L., Wang S., Zhang X., Wu W., Wang X., Xu G. and Guo C. (2007) Preliminary explorations of the role of mitochondrial proteins in refractory epilepsy: some findings from comparative proteomics. *J Neurosci Res* **85**, 3160-70.
- Jin M., Li S., Nusinowitz S., Lloyd M., Hu J., Radu R. A., Bok D. and Travis G. H. (2009) The role of interphotoreceptor retinoid-binding protein on the translocation of visual retinoids and function of cone photoreceptors. *J Neurosci* **29**, 1486-95.
- Kalsow C. M. and Dwyer A. E. (1998) Retinal immunopathology in horses with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* **6**, 239-51.
- Kang D., Gho Y. S., Suh M. and Kang C. (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**.
- Khanna C., Wan X., Bose S., Cassaday R., Olomu O., Mendoza A., Yeung C., Gorlick R., Hewitt S. M. and Helman L. J. (2004) The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med* **10**, 182-6.
- Kim D. S., Hubbard S. L., Peraud A., Salhia B., Sakai K. and Rutka J. T. (2004) Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumors. *Neoplasia* **6**, 168-78.
- Kim J. H., Hahm B., Kim Y. K., Choi M. and Jang S. K. (2000) Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J Mol Biol* **298**, 395-405.
- Kinoshita A., Kinoshita M., Akiyama H., Tomimoto H., Akiguchi I., Kumar S., Noda M. and Kimura J. (1998) Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **153**, 1551-60.
- Kinoshita M. and Noda M. (2001) Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. *Cell Struct Funct* **26**, 667-70.
- Klimek-Tomczak K., Wyrwicz L. S., Jain S., Bomszyk K. and Ostrowski J. (2004) Characterization of hnRNP K protein-RNA interactions. *J Mol Biol* **342**, 1131-41.
- Knowles M. R., Cervino S., Skynner H. A., Hunt S. P., de Felipe C., Salim K., Meneses-Lorente G., McAllister G. and Guest P. C. (2003) Multiplex proteomic analysis by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Proteomics* **3**, 1162-71.

- Kolln J., Ren H. M., Da R. R., Zhang Y., Spillner E., Olek M., Hermanowicz N., Hilgenberg L. G., Smith M. A., van den Noort S. and Qin Y. (2006) Triosephosphate isomerase- and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-reactive autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Immunol* **177**, 5652-8.
- Kondo T. and Hirohashi S. (2009) Application of 2D-DIGE in Cancer Proteomics Toward Personalized Medicine. *Methods Mol Biol* **577**, 135-54.
- Kopito R. R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**, 427-30.
- Kragh-Hansen U. (1990) Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull* **37**, 57-84.
- Kremer B. E., Haystead T. and Macara I. G. (2005) Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol Biol Cell* **16**, 4648-59.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lai Y. L., Wiggert B., Liu Y. P. and Chader G. J. (1982) Interphotoreceptor retinol-binding proteins: possible transport vehicles between compartments of the retina. *Nature* **298**, 848-9.
- Larbi N. B. and Jefferies C. (2009) 2D-DIGE: comparative proteomics of cellular signalling pathways. *Methods Mol Biol* **517**, 105-32.
- Lee S. J., Friedman S. L., Whalen R. and Boyer T. D. (1994) Cellular sources of glutathione S-transferase P in primary cultured rat hepatocytes: localization by in situ hybridization. *Biochem J* **299** ( Pt 1), 79-83.
- Lee Y. B., Colley S., Norman M., Biamonti G. and Uney J. B. (2007) SAFB redistribution marks steps of the apoptotic process. *Exp Cell Res* **313**, 3914-23.
- Lehmann J. M., Riethmuller G. and Johnson J. P. (1990) Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3. *Nucleic Acids Res* **18**, 1048.
- LeHoang P., Sterkers M., Thillaye B., de Kozak Y., Coscas G. and Faure J. P. (2008) Primate model of uveoretinitis and vasculitis/experimental autoimmune uveoretinitis induced in cynomolgus monkeys by retinal s antigen. *Ophthalmic Res* **40**, 181-8.
- Lenchik N. I., Desiderio D. M. and Gerling I. C. (2005) Two-dimensional gel electrophoresis characterization of the mouse leukocyte proteome, using a tri-reagent for protein extraction. *Proteomics* **5**, 2202-9.
- Li L., Miano J. M., Cserjesi P. and Olson E. N. (1996) SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res* **78**, 188-95.
- Li M., Li S., Lou Z., Liao X., Zhao X., Meng Z., Bartlam M. and Rao Z. (2008) Crystal structure of human transgelin. *J Struct Biol* **162**, 229-36.
- Li W., Fan J. and Woodley D. T. (2001) Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene* **20**, 6403-17.
- Li Y. F., Tang R. H., Puan K. J., Law S. K. and Tan S. M. (2007) The cytosolic protein talin induces an intermediate affinity integrin alphaLbeta2. *J Biol Chem* **282**, 24310-9.
- Lilley K. S. and Friedman D. B. (2004) All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics* **1**, 401-9.
- Lobanov A. V., Hatfield D. L. and Gladyshev V. N. (2008) Selenoproteinless animals: selenophosphate synthetase SPS1 functions in a pathway unrelated to selenocysteine biosynthesis. *Protein Sci* **17**, 176-82.

- Lonnerdal B. and Iyer S. (1995) Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* **15**, 93-110.
- Low C. and Macara I. G. (2006) Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. *J Biol Chem* **281**, 30697-706.
- Low S. C., Harney J. W. and Berry M. J. (1995) Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J Biol Chem* **270**, 21659-64.
- Luger D. and Caspi R. R. (2008) New perspectives on effector mechanisms in uveitis. *Semin Immunopathol* **30**, 135-43.
- Luger D., Silver P. B., Tang J., Cua D., Chen Z., Iwakura Y., Bowman E. P., Sgambellone N. M., Chan C. C. and Caspi R. R. (2008) Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* **205**, 799-810.
- Luo Y., Li Y., Lin C., Ma H., Zhang J., Wu S., Wang X., Gao Y., Liu Y. and Zheng D. (2009) Comparative Proteome Analysis of Splenic Lymphocytes in Senescence-Accelerated Mice. *Gerontology*.
- Marikovsky M., Ziv V., Nevo N., Harris-Cerruti C. and Mahler O. (2003) Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *J Immunol* **170**, 2993-3001.
- Martins-de-Souza D., Gattaz W. F., Schmitt A., Novello J. C., Marangoni S., Turck C. W. and Dias-Neto E. (2009) Proteome analysis of schizophrenia patients Wernicke's area reveals an energy metabolism dysregulation. *BMC Psychiatry* **9**, 17.
- Mazurier J., Legrand D., Hu W. L., Montreuil J. and Spik G. (1989) Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Isolation of the receptors by antiligand-affinity chromatography. *Eur J Biochem* **179**, 481-7.
- McAllister C. G., Wiggert B., Chader G. J., Kuwabara T. and Gery I. (1987) Uveitogenic potential of lymphocytes sensitized to interphotoreceptor retinoid-binding protein. *J Immunol* **138**, 1416-20.
- Meyer Y., Buchanan B. B., Vignols F. and Reichheld J. P. (2009) Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. *Annu Rev Genet*.
- Milnerowicz H., Jablonowska M. and Bizon A. (2009) Change of zinc, copper, and metallothionein concentrations and the copper-zinc superoxide dismutase activity in patients with pancreatitis. *Pancreas* **38**, 681-8.
- Mochizuki M., Kuwabara T., McAllister C., Nussenblatt R. B. and Gery I. (1985) Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **26**, 1-9.
- Montagna C., Lyu M. S., Hunter K., Lukes L., Lowther W., Reppert T., Hissong B., Weaver Z. and Ried T. (2003) The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Res* **63**, 2179-87.
- Morita E. and Sundquist W. I. (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 395-425.
- Nagaraj N., Lu A., Mann M. and Wisniewski J. R. (2008) Detergent-based but gel-free method allows identification of several hundred membrane proteins in single LC-MS runs. *J Proteome Res* **7**, 5028-32.
- Neel B. G., Gu H. and Pao L. (2003) The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* **28**, 284-93.
- Nelson D. L. and Cox M. M. (2009) *Lehninger Principles of Biochemistry*.

- Notkins A. L. and Lernmark A. (2001) Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* **108**, 1247-52.
- Nyman T. A., Rosengren A., Syyrakki S., Pellinen T. P., Rautajoki K. and Lahesmaa R. (2001) A proteome database of human primary T helper cells. *Electrophoresis* **22**, 4375-82.
- O'Farrell P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-21.
- Oesterreich S. (2003) Scaffold attachment factors SAFB1 and SAFB2: Innocent bystanders or critical players in breast tumorigenesis? *J Cell Biochem* **90**, 653-61.
- Oesterreich S., Lee A. V., Sullivan T. M., Samuel S. K., Davie J. R. and Fuqua S. A. (1997) Novel nuclear matrix protein HET binds to and influences activity of the HSP27 promoter in human breast cancer cells. *J Cell Biochem* **67**, 275-86.
- Okado-Matsumoto A. and Fridovich I. (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* **276**, 38388-93.
- Oldstone M. B. (1987) Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* **50**, 819-20.
- Oldstone M. B. (1998) Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* **12**, 1255-65.
- Ostareck-Lederer A., Ostareck D. H., Cans C., Neubauer G., Bomsztyk K., Superti-Furga G. and Hentze M. W. (2002) c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol* **22**, 4535-43.
- Palestine A. G., Mc Allister C., Carter C., Keenan A. M., Vistica B., Gery I., Davey R. and Nussenblatt R. (1986) Lymphocyte migration in the adoptive transfer of EAU. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**, 611-5.
- Pao L. I., Badour K., Siminovitch K. A. and Neel B. G. (2007a) Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* **25**, 473-523.
- Pao L. I., Lam K. P., Henderson J. M., Kutok J. L., Alimzhanov M., Nitschke L., Thomas M. L., Neel B. G. and Rajewsky K. (2007b) B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. *Immunity* **27**, 35-48.
- Periquet M., Corti O., Jacquier S. and Brice A. (2005) Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *J Neurochem* **95**, 1259-76.
- Pfister C., Chabre M., Plouet J., Tuyen V. V., De Kozak Y., Faure J. P. and Kuhn H. (1985) Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* **228**, 891-3.
- Phillips D., Aponte A. M., French S. A., Chess D. J. and Balaban R. S. (2009) Succinyl-CoA synthetase is a phosphate target for the activation of mitochondrial metabolism. *Biochemistry* **48**, 7140-9.
- Pitcher L. A. and van Oers N. S. (2003) T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol* **24**, 554-60.
- Powell A. M. and Black M. M. (2001) Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol* **26**, 427-33.
- Prabakaran S., Swatton J. E., Ryan M. M., Huffaker S. J., Huang J. T., Griffin J. L., Wayland M., Freeman T., Dudbridge F., Lilley K. S., Karp N. A., Hester S., Tkachev D., Mimmack M. L., Yolken R. H., Webster M. J., Torrey E. F. and Bahn S. (2004) Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for

- compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry* **9**, 684-97, 643.
- Przybyla-Zawislak B., Dennis R. A., Zakharkin S. O. and McCammon M. T. (1998) Genes of succinyl-CoA ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **258**, 736-43.
- Qualmann B. and Kessels M. M. (2002) Endocytosis and the cytoskeleton. *Int Rev Cytol* **220**, 93-144.
- Ramirez-Boo M., Garrido J. J., Ogueta S., Calvete J. J., Gomez-Diaz C. and Moreno A. (2006) Analysis of porcine peripheral blood mononuclear cells proteome by 2-DE and MS: analytical and biological variability in the protein expression level and protein identification. *Proteomics* **6 Suppl 1**, S215-25.
- Rebhun W. C. (1979) Diagnosis and treatment of equine uveitis. *J Am Vet Med Assoc* **175**, 803-8.
- Renz A. and Fackelmayer F. O. (1996) Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic Acids Res* **24**, 843-9.
- Riewald M. and Schleef R. R. (1995) Molecular cloning of bomapin (protease inhibitor 10), a novel human serpin that is expressed specifically in the bone marrow. *J Biol Chem* **270**, 26754-7.
- Riol H., Tardy M., Rolland B., Levesque G. and Murthy M. R. (1997) Detection of the peripheral nervous system (PNS)-type glial fibrillary acidic protein (GFAP) and its mRNA in human lymphocytes. *J Neurosci Res* **48**, 53-62.
- Robinson W. H., Garren H., Utz P. J. and Steinman L. (2002) Millennium Award. Proteomics for the development of DNA tolerizing vaccines to treat autoimmune disease. *Clin Immunol* **103**, 7-12.
- Romeike A., Brugmann M. and Drommer W. (1998) Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol* **35**, 515-26.
- Rose D. M., Alon R. and Ginsberg M. H. (2007) Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev* **218**, 126-34.
- Saari J. C. and Crabb J. W. (2005) Focus on molecules: cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP). *Exp Eye Res* **81**, 245-6.
- Sakai J., Ishikawa H., Kojima S., Satoh H., Yamamoto S. and Kanaoka M. (2003) Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* **3**, 1318-24.
- Salinovich O. and Montelaro R. C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **156**, 341-7.
- Sampson M. J., Lovell R. S. and Craigen W. J. (1997) The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. *J Biol Chem* **272**, 18966-73.
- Samy T. S., Knoferl M. W., Zheng R., Schwacha M. G., Bland K. I. and Chaudry I. H. (2001) Divergent immune responses in male and female mice after trauma-hemorrhage: dimorphic alterations in T lymphocyte steroidogenic enzyme activities. *Endocrinology* **142**, 3519-29.
- Santoni V., Molloy M. and Rabilloud T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21**, 1054-70.
- Santos J., Cerveira N., Bizarro S., Ribeiro F. R., Correia C., Torres L., Lisboa S., Vieira J., Mariz J. M., Norton L., Snijder S., Mellink C. H., Buijs A., Shih L. Y., Strehl S., Micci F., Heim S. and Teixeira M. R. (2009) Expression pattern of

- the septin gene family in acute myeloid leukemias with and without MLL-SEPT fusion genes. *Leuk Res*.
- Saraswathy S. and Rao N. A. (2009) Mitochondrial proteomics in experimental autoimmune uveitis oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Schneider-Brachert W., Tchikov V., Neumeyer J., Jakob M., Winoto-Morbach S., Held-Feindt J., Heinrich M., Merkel O., Ehrenschwender M., Adam D., Mentlein R., Kabelitz D. and Schutze S. (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* **21**, 415-28.
- Schulz M., Dotzlaw H., Mikkat S., Eggert M. and Neeck G. (2007) Proteomic analysis of peripheral blood mononuclear cells: selective protein processing observed in patients with rheumatoid arthritis. *J Proteome Res* **6**, 3752-9.
- Schwink K. L. (1992) Equine uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* **8**, 557-74.
- Shaffer M. H., Dupree R. S., Zhu P., Saotome I., Schmidt R. F., McClatchey A. I., Freedman B. D. and Burkhardt J. K. (2009) Ezrin and moesin function together to promote T cell activation. *J Immunol* **182**, 1021-32.
- Shao H., Shi H., Kaplan H. J. and Sun D. (2005) Chronic recurrent autoimmune uveitis with progressive photoreceptor damage induced in rats by transfer of IRBP-specific T cells. *J Neuroimmunol* **163**, 102-9.
- Shapland C., Hsuan J. J., Totty N. F. and Lawson D. (1993) Purification and properties of transgulin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein. *J Cell Biol* **121**, 1065-73.
- Shnyreva M., Schullery D. S., Suzuki H., Higaki Y. and Bomsztyk K. (2000) Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. *J Biol Chem* **275**, 15498-503.
- Silverman G. A., Bird P. I., Carrell R. W., Church F. C., Coughlin P. B., Gettins P. G., Irving J. A., Lomas D. A., Luke C. J., Moyer R. W., Pemberton P. A., Remold-O'Donnell E., Salvesen G. S., Travis J. and Whisstock J. C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* **276**, 33293-6.
- Simonson W. T., Franco S. J. and Huttenlocher A. (2006) Talin1 regulates TCR-mediated LFA-1 function. *J Immunol* **177**, 7707-14.
- Simpson E. (2006) A historical perspective on immunological privilege. *Immunol Rev* **213**, 12-22.
- Singh V. K., Kalra H. K., Yamaki K., Abe T., Donoso L. A. and Shinohara T. (1990) Molecular mimicry between a uveitopathogenic site of S-antigen and viral peptides. Induction of experimental autoimmune uveitis in Lewis rats. *J Immunol* **144**, 1282-7.
- Sirajuddin M., Farkasovsky M., Hauer F., Kuhlmann D., Macara I. G., Weyand M., Stark H. and Wittinghofer A. (2007) Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* **449**, 311-5.
- Skyner H. A., Rosahl T. W., Knowles M. R., Salim K., Reid L., Cothliff R., McAllister G. and Guest P. C. (2002) Alterations of stress related proteins in genetically altered mice revealed by two-dimensional differential in-gel electrophoresis analysis. *Proteomics* **2**, 1018-25.
- Smith A., Carrasco Y. R., Stanley P., Kieffer N., Batista F. D. and Hogg N. (2005) A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol* **170**, 141-51.
- Spieß B. M. (1997) [Equine recurrent uveitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **139**, 126-33.

- Steele F. R., Chader G. J., Johnson L. V. and Tombran-Tink J. (1993) Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1526-30.
- Streilein J. W. (2003) Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *J Leukoc Biol* **74**, 179-85.
- Streilein J. W., Okamoto S., Hara Y., Kosiewicz M. and Ksander B. (1997a) Blood-borne signals that induce anterior chamber-associated immune deviation after intracameral injection of antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**, 2245-54.
- Streilein J. W., Takeuchi M. and Taylor A. W. (1997b) Immune privilege, T-cell tolerance, and tissue-restricted autoimmunity. *Hum Immunol* **52**, 138-43.
- Switzer R. C., 3rd, Merrill C. R. and Shifrin S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **98**, 231-7.
- Takeuchi K., Yang H., Ng E., Park S. Y., Sun Z. Y., Reinherz E. L. and Wagner G. (2008) Structural and functional evidence that Nck interaction with CD3epsilon regulates T-cell receptor activity. *J Mol Biol* **380**, 704-16.
- Tang J., Zhu W., Silver P. B., Su S. B., Chan C. C. and Caspi R. R. (2007) Autoimmune uveitis elicited with antigen-pulsed dendritic cells has a distinct clinical signature and is driven by unique effector mechanisms: initial encounter with autoantigen defines disease phenotype. *J Immunol* **178**, 5578-87.
- Tannu N. S. and Hemby S. E. (2006) Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc* **1**, 1732-42.
- Thurau S. R., Chan C. C., Nussenblatt R. B. and Caspi R. R. (1997) Oral tolerance in a murine model of relapsing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU): induction of protective tolerance in primed animals. *Clin Exp Immunol* **109**, 370-6.
- Timms J. F. and Cramer R. (2008) Difference gel electrophoresis. *Proteomics* **8**, 4886-97.
- Tooley A. J., Gilden J., Jacobelli J., Beemiller P., Trimble W. S., Kinoshita M. and Krummel M. F. (2009) Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat Cell Biol* **11**, 17-26.
- Tuohy V. K., Yu M., Yin L., Kawczak J. A., Johnson J. M., Mathisen P. M., Weinstock-Guttman B. and Kinkel R. P. (1998) The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* **164**, 93-100.
- Underhill D. M. and Goodridge H. S. (2007) The many faces of ITAMs. *Trends Immunol* **28**, 66-73.
- Unlu M., Morgan M. E. and Minden J. S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-7.
- Vanderlugt C. J. and Miller S. D. (1996) Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* **8**, 831-6.
- Vanderlugt C. L. and Miller S. D. (2002) Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2**, 85-95.
- Vergara D., Chiriaco F., Acierno R. and Maffia M. (2008) Proteomic map of peripheral blood mononuclear cells. *Proteomics* **8**, 2045-51.
- Viswanathan S., Unlu M. and Minden J. S. (2006) Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc* **1**, 1351-8.

- von Herrath M. G., Holz A., Homann D. and Oldstone M. B. (1998) Role of viruses in type I diabetes. *Semin Immunol* **10**, 87-100.
- Wacker W. B., Donoso L. A., Kalsow C. M., Yankeelov J. A., Jr. and Organisciak D. T. (1977) Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* **119**, 1949-58.
- Wallin E. and von Heijne G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* **7**, 1029-38.
- Wang X., Zhao H. and Andersson R. (2004) Proteomics and leukocytes: an approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses. *J Proteome Res* **3**, 921-9.
- Weirich C. S., Erzberger J. P. and Barral Y. (2008) The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 478-89.
- Wildner G. and Diedrichs-Mohring M. (2003) Autoimmune uveitis induced by molecular mimicry of peptides from rotavirus, bovine casein and retinal S-antigen. *Eur J Immunol* **33**, 2577-87.
- Wildner G., Diedrichs-Mohring M. and Thureau S. R. (2008) Rat models of autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* **40**, 141-4.
- Willard-Gallo K. E., Houck D. W. and Loken M. R. (1988) Analysis of human lymphocyte protein expression. I. Identification of subpopulation markers by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Immunol* **18**, 1453-61.
- Xu H., Forrester J. V., Liversidge J. and Crane I. J. (2003) Leukocyte trafficking in experimental autoimmune uveitis: breakdown of blood-retinal barrier and upregulation of cellular adhesion molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 226-34.
- Yanni G., Whelan A., Feighery C. and Bresnihan B. (1992) Analysis of cell populations in rheumatoid arthritis synovial tissues. *Semin Arthritis Rheum* **21**, 393-9.
- Yoo B. C., Fountoulakis M., Cairns N. and Lubec G. (2001) Changes of voltage-dependent anion-selective channel proteins VDAC1 and VDAC2 brain levels in patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Electrophoresis* **22**, 172-9.
- Yu M., Haslam R. H. and Haslam D. B. (2000) HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells. *J Biol Chem* **275**, 24984-92.
- Yu M., Johnson J. M. and Tuohy V. K. (1996) A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* **183**, 1777-88.
- Yu Y., Khan J., Khanna C., Helman L., Meltzer P. S. and Merlino G. (2004) Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat Med* **10**, 175-81.
- Zamora D. O., Riviere M., Choi D., Pan Y., Planck S. R., Rosenbaum J. T., David L. L. and Smith J. R. (2007) Proteomic profiling of human retinal and choroidal endothelial cells reveals molecular heterogeneity related to tissue of origin. *Mol Vis* **13**, 2058-65.

- 
- Zhai Q., Fisher R. D., Chung H. Y., Myszka D. G., Sundquist W. I. and Hill C. P. (2008) Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX(n)L late domains of HIV-1 and EIAV. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 43-9.
- Zhang M., Shoeb M., Goswamy J., Liu P., Xiao T. L., Hogan D., Campbell G. A. and Ansari N. H. (2009a) Overexpression of aldehyde dehydrogenase 1A1 reduces oxidation-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res*.
- Zhang S. X., Wang J. J., Gao G., Shao C., Mott R. and Ma J. X. (2006) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB J* **20**, 323-5.
- Zhang X. Z., Xiao Z. F., Li C., Xiao Z. Q., Yang F., Li D. J., Li M. Y., Li F. and Chen Z. C. (2009b) Triosephosphate isomerase and peroxiredoxin 6, two novel serum markers for human lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*.
- Zhao Z. S., Granucci F., Yeh L., Schaffer P. A. and Cantor H. (1998) Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* **279**, 1344-7.
- Zhou H., Ranish J. A., Watts J. D. and Aebersold R. (2002) Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **20**, 512-5.
- Ziegler W. H., Liddington R. C. and Critchley D. R. (2006) The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* **16**, 453-60.
- Zipplies J. K., Hauck S. M., Schoeffmann S., Amann B., Stangassinger M., Ueffing M. and Deeg C. A. (2009a) Serum PEDF levels are decreased in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. *J Proteome Res* **8**, 992-8.
- Zipplies J. K., Hauck S. M., Schoffmann S., Amann B., van der Meijden C. H., Stangassinger M., Ueffing M. and Deeg C. (2009b) Kininogen is decreased in peripheral blood stream but increased in target tissue of autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

## **DANKSAGUNG**

Für den am Institut für Tierphysiologie der LMU München zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Cornelia Deeg für die Überlassung des Themas und die großartige und kompetente fachliche Betreuung meiner Arbeit. Zielstrebig führte sie mich an das strukturelle, wissenschaftliche Arbeiten heran und stand mir bei Fragen jederzeit zur Verfügung, auch wenn ihr Terminkalender in manchen Wochen vor Vorlesungen, Vorträgen und Tagungen nur so platzte. Ohne ihre Hilfe hätte ich diese Arbeit so nicht verfassen können.

Allen fehlgeschlagenen Mobbing-Versuchen zum Trotz war Barbara Amann mir eine unersetzliche Hilfe bei sämtlichen Verdünnungs-, Antikörper-, Excel-, Powerpoint-, Word-, Statistik- und Quantifizierungsfragen. Ohne Bärbls Unterstützung wäre mir das Fertigstellen dieser Arbeit sehr viel schwerer gefallen und ohne ihre wilden und abenteuerlichen Zugeschichten wäre der morgendliche Start in den Arbeitstag immer nur halb so schön gewesen.

Frau Dr. Stefanie Hauck danke ich ganz herzlich für die ständige, große Hilfe bei proteomischen und massenspektrometrischen Fragestellungen, für das Spannen des roten Fadens im Gewirr der Datenbankanalysen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Kollegen gilt ein großes Dankeschön für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung während der Verfassung dieser Arbeit. Dabei danke ich Florian Hofmaier und Christina Eberhardt ganz herzlich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die kurzen, lustigen Kaffeepausen während des Schreibens. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Hanna Zipplies, an die ich mich stets mit sämtlichen Fragen wenden konnte und die immer ein paar aufmunternde Worte parat hatte, wenn ich am Ende eines unproduktiven Tages dachte, ich werde diese Arbeit NIE zu Ende bringen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Barbara Braus, die mir von good old England aus mit der Übersetzung ins Englische geholfen hat.

Stephanie Schöffmann und Caroline Bobe danke ich für die Vorbereitung meiner vielen, vielen Proben für die Massenspektrometrie und deren Auswertung. Zudem möchte ich mich bei Karsten Boldt für die Hilfe bei den Fragestellungen zur Flüssigkeitschromatographie und das Korrekturlesen bedanken.

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

Ebenfalls möchte ich mich bei Ramona Schmitt und Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel bedanken, ohne deren Hilfe ich mich niemals durch die unergründliche Komplexität der Durchflusszytometrie hätte kämpfen können.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Gerhards danke ich für die Überlassung der in dieser Studie verwendeten Blutproben.

Bei meiner lieben Familie bedanke ich mich dafür, dass sie mich trotz großer räumlicher Entfernung immer unterstützt hat; dabei gilt mein ganz besonderer Dank meiner Mutter, die mir ein sorgenfreies Studium und die anschließende Promotion überhaupt erst ermöglicht hat.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei Quentin Degroote bedanken, der mich während der Entstehung dieser Arbeit in jeder Hinsicht entlastet, motiviert und mir den Rücken gestärkt hat.