

Aus der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie
der Freien Universität Berlin und dem
Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam

Eingereicht über die Klinik für Pferde
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Massenspektrometrische Proteinuntersuchung in Serum und CSF von
gesunden und neurologisch erkrankten Pferden**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Franziska Aumer
Tierärztin aus München

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3261

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.- Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. A. Grabner
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. F.J. Schweigert
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. R. Einspanier

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

equidae, horses, horse diseases, nervous system diseases, diagnostic techniques, proteins, cerebrospinal fluid, serum, mass spectrometry, spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionisation (MeSH)

Tag der Promotion: 11.05.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-645-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild © danielschoenen - Fotolia.com

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mensch und buch** verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Das Proteom	3
2.2	Das Proteom des Pferdes	4
2.3	Serumproteine.....	5
2.4	Liquor cerebrospinalis.....	6
2.4.1	Funktion der CSF	7
2.4.2	Liquorräume	8
2.4.3	Produktion und Abfluss des Liquor	9
2.5	Blut-Liquor-Schranke	10
2.5.1	Blut-Hirn-Schranke.....	11
2.5.2	Liquor-Hirn-Schranke.....	13
2.5.3	Pathomorphologische Veränderungen der Blut-Liquor-Schranke, der Blut-Hirn-Schranke und der Liquor-Hirn-Schranke	13
2.5.4	Liquorpunktion.....	14
2.6	Liquorproteine	15
2.6.1	Proteinkonzentration in der CSF.....	16
2.6.2	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes und Albuminquotienten in der CSF	17
2.6.3	Herkunft der Liquorproteine	18
2.7	Proteinuntersuchung in der CSF.....	19
2.7.1	Albumin	19
2.7.2	Transthyretin	19
2.7.3	Retinol-Bindungs-Protein	21
2.7.4	Serumamyloid A.....	21
2.8	Untersuchung von Proteinen der CSF mittels massenspektrometrischer Verfahren	21
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Material	23
3.1.1	Vergleichende Untersuchung von Serumproteinen bei Pferden und Menschen.....	23
3.1.2	Vergleichende Untersuchung von Serumproteinen bei Equiden.....	23
3.1.3	Vergleichende Untersuchung von Serum- und Liquorproteinen bei Pferden	24
3.2	Probenentnahme und -aufbereitung	26
3.2.1	Serum.....	26
3.2.2	Liquor	26
3.2.3	Probenaufbewahrung.....	28
3.3	Durchführung der Proteinbestimmung.....	28
3.3.1	Serum- und Liquorproteinbestimmung	28
3.3.2	Hämoglobinbestimmung	28
3.3.3	Gelelektrophorese.....	29

3.3.4	Western Blot.....	29
3.3.5	SELDI-TOF-MS.....	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Gesamtprotein und Hämoglobin	32
4.2	Proteinanalyse	34
4.2.1	Serumamyloid A.....	34
4.2.2	Transthyretin	34
4.2.3	Retinol-Bindungs-Protein	35
4.2.4	Albumin	35
4.3	SELDI-TOF-MS.....	35
4.3.1	Vergleich des Proteinmusters im Serum von Pferd und Mensch	37
4.3.2	Vergleich des Proteinmusters im Serum von unterschiedlichen Equiden	46
4.3.3	Vergleich des Proteinmusters von Serum und Liquor des Pferdes	55
5	Diskussion.....	81
5.1	Probandenauswahl	81
5.2	Methodenbewertung	81
5.3	Qualitätskontrolle	83
5.4	Beurteilung der Messparameter der SELDI-TOF-MS.....	85
5.4.1	Quantitativer und qualitativer Vergleich des Peptid- und Proteinmuster von Mensch und Pferd	85
5.4.2	Serumamyloid A (SAA)	86
5.4.3	Transthyretin (TTR).....	87
5.4.4	Albumin	87
5.4.5	Retinol-Bindungs-Protein (RBP)	88
5.4.6	Vergleich des Peptid- und Proteinmuster im Serum der unterschiedlichen Equiden	88
5.4.7	Quantitativer und qualitativer Vergleich von Serum und Liquor des Pferdes	89
5.4.8	Hämoglobin	91
5.5	Erkrankungen.....	92
5.6	Schlussbetrachtung und Ausblick.....	93
6	Zusammenfassung.....	94
7	Summary.....	96
8	Literaturverzeichnis	98
9	Tabellenverzeichnis	104
10	Abbildungsverzeichnis.....	108
11	SELDI-TOF-MS Grafiken	110
12	Anhang	I

Verzeichnis der Abkürzungen und verwendeten Symbole

2DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
AOG	Atlanto-Occipital-Gelenk
APP	Akute-Phase-Protein
APR	Akute-Phase-Reaktion
AST	Aspartat-Amino-Transferase
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BU	Bakterielle Untersuchung
CK	Creatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Cerebrospinalfluid
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Ezyme-Linked-Immunabsorbend-Assay
EZF	Extrazelluläre Flüssigkeit
GP	Gesamtprotein
Hb	Hämoglobin
HDL	High-Density-Lipoprotein
HWZ	Halbwertzeit
kDa	Kilo-Dalton
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LSG	Lumbo-Sacral-Gelenk
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation – Time of Flight – Mass-Spectrometry
RBP	Retinol-Bindungs-Protein
RNA	Ribonucleinsäure
SAA	Serumamyloid A
SELDI-TOF-MS	Surface-Enhanced-Laser-Desorption/Ionisation - Time of Flight - Mass-Spectrometry

T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TBG	Thyroxin-Binding-Globulin
TTR	Transthyretin

1 Einleitung

Erkrankungen des ZNS beim Pferd stellen aufgrund ihres häufig progressiven und fatalen Verlaufes einen hohen Anspruch an die zeitliche und fachliche Effizienz der Diagnostik und ggf. auch der Therapie. Die Analyse der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) ist dabei ein essentieller Bestandteil der neurologischen Diagnostik.

Bisher übliche Liquoruntersuchungen (grob sinnliche Beurteilung, Druckmessung, Zellzahl, Zytologie, Pandy-Test, Proteinkonzentration, Enzymaktivitäten, Elektrolyte, Bakterielle Untersuchung (BU), Antikörper-Bestimmungen) erlauben meist nur eine Differenzierung zwischen viraler, bakterieller und parasitärer Entzündung. Degenerative oder metabolische Erkrankungen des ZNS können nach diesem Untersuchungsmuster nicht erkannt werden.

Aus diesem Grunde spielt in der Humanmedizin die Proteindiagnostik eine immer wichtigere Rolle. Dabei werden mit unterschiedlichen Methoden bestimmte Proteine in der CSF, wie Marker- bzw. Entzündungsproteine (z.B. das Amyloid β bei Morbus Alzheimer) oder auch umfassende Proteinspektren gemessen. Eine dieser Methoden ist die „surface enhanced laser desorption/ionisation – time of flight - mass spectrometry“ (SELDI-TOF-MS), die eine Analyse der Proteinmuster komplexer Flüssigkeiten zulässt.

Die Messung der Proteinmassen sowohl im Serum, als auch in der CSF mittels SELDI-TOF-MS wurde bislang noch nie bei Pferden durchgeführt.

Aus diesem Grunde liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit zunächst einmal in der Beschreibung und dem Vergleich des mittels SELDI-TOF-MS erstellten Peptid- und Proteinmusters im physiologischen Zustand, d.h. im Serum von gesunden Pferden. Dies ist wichtig, um die gewonnenen Erkenntnisse besser einzuschätzen und um Vergleichswerte für die Erkennung pathologischer Zustände zu erhalten. Dieses Peptid- und Proteinmuster wird mit dem Muster im Serum gesunder Menschen verglichen, um einen Eindruck von den Gemeinsamkeiten und Unterschieden der Proteine z.B. bezüglich deren Vorhandenseins oder Molekulargewichtes zu bekommen. Aus ethischen Gründen ist es jedoch nicht möglich, Liquor klinisch unauffälliger Pferde oder Menschen zu gewinnen, weshalb der parallele Vergleich physiologischen Liquors entfallen muss.

Das Peptid- und Proteinmuster der Pferde wird sodann im zweiten Teil der Arbeit mit dem Serum von Eseln und Maultieren (also unterschiedlichen Equiden) verglichen mit der Erwartung, verwandtschaftliche Verhältnisse im Proteinmuster nachvollziehen zu können.

Im dritten Teil der Arbeit werden Serum und CSF systemisch und neurologisch erkrankter Pferde anhand des Peptid- und Proteinmusters verglichen.

Schwerpunkte sind dabei die Erkennung charakteristischer Veränderungen bei der Gegenüberstellung klinisch definierter Krankheitsbilder.

Dies könnte ein erster Schritt sein auf der Suche nach krankheitsspezifischen Markerproteinen, sei es im Serum oder im Liquor.

Das Ziel der Arbeit ist die Gewinnung von Einblicken in das physiologische und pathologische Protein- und Peptidmuster in Serum und CSF von Pferden mittels SELDI-TOF-MS, die als Grundstock für weiterführende Arbeiten dienen kann.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Proteom

Der Begriff wurde 1995 von dem Australier Marc Wilkins geprägt, der damit das „gesamte Proteinäquivalent eines Genoms“ bezeichnete (LOTTENSPEICH und ZORBAS, 1998).

Das Proteom wird definiert als das gesamte Proteinexpressionsmuster einer Zelle, eines Organismus oder einer Körperflüssigkeit unter genau definierten Bedingungen.

Die dazu gehörige noch relativ junge Forschungsrichtung wird als „Proteomic“ bezeichnet. Ihre Vorgängerin, die Proteinanalytik befasst sich mit der Aufklärung von molekularen Eigenschaften wie Aminosäuresequenz, dreidimensionaler Struktur und biologischer Aktivität individueller Proteine. Demgegenüber untersucht die Proteomic die Gesamtheit aller Proteine in einer biologischen Probe im Moment der Untersuchung und bei den dafür gültigen Bedingungen. Am häufigsten werden Proteome homogener Zellpopulationen (aus Zelllinien) und biologischer Gewebe analysiert, um Antworten auf Fragen zur Regulation natürlicher Lebensvorgänge, insbesondere zur Entstehung, Therapie und Prophylaxe von Krankheiten zu bekommen (PROTEOMFORSCHUNG, 2006). Die Proteomanalyse ist aufgrund der vielen verschiedenen posttranslationalen Modifikationen komplexer als die Genomanalyse (SCHWEIGERT, 2005). Im Idealfall liefert die Proteomanalyse – im Gegensatz zur Analyse der DNA oder RNA – die aktuell vorhandene Menge und die posttranslationalen Modifikationen jedes Proteins. Ein Proteom reflektiert die Proteinexpression und ist daher ein ungeheuer dynamisches Objekt, das durch eine große Anzahl von Parametern beeinflusst wird. Das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau kann unter verschiedenen Stoffwechsel- oder Umweltbedingungen sehr unterschiedlich sein (LOTTENSPEICH und ZORBAS, 1998).

Die Human Proteome Organisation mit Samir Hansh von der Universität Michigan an der Spitze hat sich zum Ziel gesetzt, alle menschlichen Proteine zu analysieren und zu katalogisieren. U.a. ist Deutschland dafür zuständig, alle Proteine des Gehirns (man vermutete ca. 12000 verschiedene Proteine im Gehirn) zu inventarisieren, wohingegen z.B. die USA die Erfassung aller Serumproteine zur Aufgabe haben (SCHWÄGERL, 2003).

In der Proteomforschung werden viele verschiedene Techniken angewandt. Häufig werden die Proteine mittels Elektrophorese (zumeist 2-Dimensionale Elektrophorese) aufgetrennt. Die Quantifizierung geschieht bei zweidimensionalen Gelen mit einem Laserdensitometer oder mit einem Scanner. Zur Analyse kann eine Aminosäuren- bzw. eine Aminosäuresequenzanalyse durchgeführt werden. Aber auch verschiedene massenspektrometrische Techniken wie die SELDI-TOF-MS, MALDI-TOF-MS und die MS/MS-Technik werden

eingesetzt. Diese werden häufig mit enzymatischer Proteinspaltung oder Immuntechniken kombiniert. Je nach Art und Kombination der Techniken können verschiedene Aussagen erzielt werden. Einige Techniken eignen sich z.B. für bestimmte Molekularmassenbereiche besser als andere. Die Massenspektrometrie hat sich zur Methode der Wahl entwickelt, wenn es darum geht, funktionelle Proteinkomplexe zu analysieren (PATTERSON und AEBERSOLD, 2003).

Die Hauptzielsetzung der Proteomanalyse ist es, netzwerkartige und sonst nur schwer zugängliche, komplexe funktionelle Zusammenhänge sichtbar zu machen.

2.2 Das Proteom des Pferdes

Im Vergleich zur Humanforschung steckt die Proteomanalyse - mit Ausnahme der Ratte - bei Tieren noch in den Kinderschuhen (MILLER et al., 2004).

Das Genom ist zumeist nur inkomplett charakterisiert und nur einige Proteine sind in den Datenbanken verzeichnet. In der Literatur ist bislang wenig über die Proteomforschung beim Pferd zu finden: YOKOHAMA et al separierten 1987 Serumproteine von Pferden mittels 2D-Elektrophorese und JUNEJA und Mitarbeiter führten 1984 Elektrophoresen mit Agarose- und Polyacrylamid-Gelen bei verschiedenen pH-Werten durch (JUNEJA et al., 1984). Das Ziel war hierbei jedoch in erster Linie, Unterschiede in der Proteinmorphologie bei verschiedenen Pferderassen zu finden. Des Weiteren wurde bislang das Seminalplasma (BRANDON et al., 1999, MCDOWELL et al., 1996) und die Epididymal-Flüssigkeit (FOUCHECOURT et al., 2000) des Hengstes untersucht. IKADAI und Mitarbeiter untersuchten Proteine in Pferde-Erythrozyten im Hinblick auf Unterschiede nach Infektionen mit Babesien (IKADAI et al., 2000). Die bislang einzige publizierte Studie über Proteomforschung im Serum des Pferdes wurde 2004 von MILLER et al veröffentlicht. Darin wurde das Serum von Pferden mittels 2D-Elektrophorese, MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry) und Nano-electrospray MS/MS analysiert. Es konnten 29 verschiedene Proteine identifiziert werden. Die Quantifizierung der 2DE ergab folgende Proteinanteile:

37% Albumin, 12% α 1-Antitrypsin, 15% Immunglobulin G (light chain), 11% IgG (heavy chain), 9% Transferrin; 5% Apolipoprotein, 4% Haptoglobin (β -chain), 4% α 1 B-Glycoprotein (MILLER et al., 2004).

Diese aufgelisteten Proteine sind jedoch keinesfalls alle Proteine, die im Serum eines Pferdes vorkommen. Vielmehr konnten in jener Arbeit lediglich diese Proteine definitiv identifiziert werden. Der Schwerpunkt lag also in diesem Falle bei der Identifikation von Proteinen.

2.3 Serumproteine

Von allen im Blutplasma bzw. Serum gelösten Substanzen überwiegen die Proteine, die hauptsächlich in der Leber synthetisiert werden. Sie machen etwa 4% aller Körperproteine aus. Die Gesamtproteinkonzentration im Serum beträgt beim Pferd 55 – 72 g/l (Kraft und Dürr, 2005). Die 5 größten Proteinfractionen im Serum sind Albumine, sowie α_1 , α_2 , β und γ -Globuline (KOOLMANN und RÖHM, 1998).

Proteine nehmen im Blut unterschiedliche Aufgaben wahr.

- Unspezifische Trägerfunktion:

Durch unspezifische Bindung von Kationen (z.B. Kalzium) wird deren Gleichgewicht zwischen gebundenen und freien, demzufolge physiologisch wirksamen Ionen reguliert.

- Vehikelfunktion:

Kleinmolekulare hydrophobe Stoffe (z.B. Hormone, Arzneimittel und Bilirubin) werden beim Transport im Blut unspezifisch an Plasmaproteine gebunden.

- Pufferfunktion:

Die ionisierbaren Seitengruppen der Aminosäuren tragen zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes im Blut bei.

- Erzeugung des kolloidosmotischen Drucks:

Proteine (v.a. das Albumin) bewirken den kolloidosmotischen Druck, an den der gesamte Körperstoffwechsel gebunden ist.

- Blutgerinnung:

Viele der Blutgerinnungsfaktoren der Gerinnungskaskaden sind Proteine oder haben Proteinanteile, wie z.B. Thrombin oder Fibrinogen.

- Abwehrfunktionen:

Die so genannten Antikörper der spezifischen Immunreaktion sind die γ -Immunglobuline welche ausnahmslos Glykoproteine sind.

- Nährfunktionen:

Proteine sind auch wichtige Energielieferanten und dienen als Aminosäurereservoir zum Bau neuer Muskelfasern oder anderer Gewebestrukturen im Körper.

Entzündungsproteine

Als Entzündung bezeichnet man die vom Bindegewebe und den Blutgefäßen getragene Reaktion des Organismus auf einen innerlich oder äußerlich ausgelösten Entzündungsreiz,

mit dem Zweck, diesen zu beseitigen oder zu inaktivieren und die reizbedingte Gewebeschädigung zu reparieren (ADEREM und SMITH, 2004). Die in diesen Vorgang unmittelbar involvierten Proteine werden als Entzündungsproteine bezeichnet. Übersteigen Entzündungsreaktionen eine gewisse Intensität, so tritt eine systemische Veränderung auf, die so genannte Akute-Phase-Reaktion (APR)(PETERSEN et al., 2004). Das zentrale Organ der APR ist die Leber, wo als Reaktion auf verschiedene Zytokine die Proteine gebildet werden, die wesentlich zur Reaktion des Organismus beitragen. Dies sind die Akute-Phase-Proteine (APPs). Sie werden in den Hepatozyten gebildet und in der klinischen Labordiagnostik schon seit geraumer Zeit als Maß für Entzündungsvorgänge verwendet (KUSHNER und MACKIEWICZ, 1987).

Zu den Akute-Phase-Proteinen wird eine Vielzahl einzelner Proteine gezählt. Anhand ihrer Funktion lassen sie sich in sechs verschiedene Kategorien unterteilen:

- Komplementsystem (z.B. Komplement C3)
- Gerinnung und Fibrinolyse (z.B. Fibrinogen)
- Antiproteasen (z.B. α 1-Antitrypsin)
- Transportproteine (z.B. Haptoglobin, Transferrin)
- Inflammatorische Reaktion (z.B. Phospholipase A2)
- sonstige Proteine (z.B. CRP, Serum Amyloid A)

Man unterscheidet zwischen positiven und negativen APPs. Während der APR steigt die Plasmakonzentration der positiven APPs, wohingegen die Biosynthese der negativen APPs herunterreguliert wird. Die Bedeutung einzelner APPs in der gesamten Reaktion ist zwischen den verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich (KENT, 1992).

2.4 Liquor cerebrospinalis

Der Liquor cerebrospinalis (Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit) ist eine klare, farblose, wässrige und proteinarme Lösung von organischen und anorganischen Stoffen (SMOLLICH und GÜNTHER, 1992). Er besteht zu ca 99% aus Wasser und ist ein Ultrafiltrat des Plasmas, das durch aktiven Transport in seiner Zusammensetzung verändert wird (JOHNSON und CONSTANTINESCU, 2000). Im physiologischen Zustand sind im Liquor nur sehr vereinzelt Zellen anzutreffen. Zudem ist er normalerweise Fibrinogenfrei und koaguliert demzufolge nicht.

2.4.1 Funktion der CSF

Die Cerebrospinalflüssigkeit umgibt das Gehirn allseitig in Form eines dünnen Flüssigkeitsmantels. Sie besitzt mehrere Aufgaben, die für die Funktion des gesamten Zentralen Nervensystems von essentieller Bedeutung sind:

Mechanischer Schutz:

Das Gehirn ist gegenüber äußeren mechanischen Einflüssen sehr empfindlich, was durch die weiche Textur und einer fehlenden Gewebeschicht als Pufferzone zwischen dem Gehirn und der Schädelkalotte bedingt ist. Durch den hydrostatischen Druck wird das Gehirn in einer Art Schwebezustand gehalten, wodurch mechanische Einwirkungen auf das Gehirn deutlich gemildert werden. Beispielsweise wird ein Gehirn mit dem tatsächlichen Gewicht von 1500 g auf ein Effektivgewicht von 50 g gemindert, mit dem es dem Schädelknochen aufliegt (FISHMAN, 1992).

Transportmedium:

Der Liquor cerebrospinalis dient als intrazerebrales Transportmedium für Metabolite, Hormone und Neurotransmitter. Die nutritive Versorgung des Gehirns ist von untergeordneter Bedeutung, da diese Aufgabe in erster Linie von den Blutgefäßen übernommen wird.

Homöostase:

Die Homöostase des externen Hirnmilieus ist besonders wichtig, da der Liquor im ständigen Austausch mit der zerebralen extrazellulären Flüssigkeit (EZF) steht. Die extraneuronale Kaliumkonzentration wird über weite Schwankungsbereiche des Plasmakaliums konstant gehalten. Dies geschieht mittels einer Na/K-ATPase an der abluminalen Zellmembran. Ebenfalls werden die Konzentration von Ca^{++} , Mg^{++} , Bicarbonat und Glukose durch teilweise aktiven Transport unterhalb der Plasmakonzentrationen gehalten. Durch die Kontrolle der Bikarbonatsekretion wird der pH-Wert des Liquors konstant gehalten, auch wenn eine Veränderung des Plasma-pH vorliegt. Aufgrund der hohen CO_2 -Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wirken sich respiratorische Störungen schneller auf das Gehirn aus als metabolische (JOACHIMSKI, 1998).

Lymphatische Funktion:

Im Gehirn gibt es keine eigentlichen lymphatischen Organe zur Beseitigung von Abfallprodukten, Toxinen und Metaboliten. Sie werden im Subarachnoidalraum über die Arachnoidalzotten in den duralen Sinus und somit in das Venensystem abgegeben.

2.4.2 Liquorräume

Das Gehirn und das Rückenmark sind von den bindegewebigen Gehirn- und Rückenmarkshüllen umgeben. Sie gehen aus der gemeinsamen Mesenchymhülle (Meninx primitiva) hervor, die embryonal das Neuralrohr umschließt und außer den Gehirn- und Rückenmarkshüllen auch die knöcherne Umhüllung entstehen lässt (SMOLLICH und GÜNTHER, 1992).

Die Dura mater (Harte Hirnhaut) ist eine dem Periost anliegende straffe Bindegewebshaut. Sie besteht aus Bündeln kollagener Fasern und einem elastischen Fasernetz. An den Nervenwurzeln geht sie in das Perineurium über.

Die der Dura mater innen anliegende Leptomeninx (weiche Gehirn- und Rückenmarkshaut) besteht aus zwei Komponenten. Die äußere Arachnoidea (Spinnwebhaut) ist eine zarte kapillararme Bindegewebshaut, bestehend aus einem epithelbekleidetem Gitter kollagener Faserbündel.

Die Pia mater ist eine aus lockerem Bindegewebe bestehende, gefäß- und nervenreiche feine Hülle, die dem Gehirn bzw. Rückenmark aufliegt und sich in alle Furchen und Vertiefungen der Zentralorgane einsenkt (SMOLLICH und GÜNTHER, 1992).

Zwischen diesen beiden Häuten befindet sich der Subarachnoidalraum, der von Bindegewebsbündeln durchzogen ist, durch die die beiden Anteile der Pia mater in Kontakt stehen.

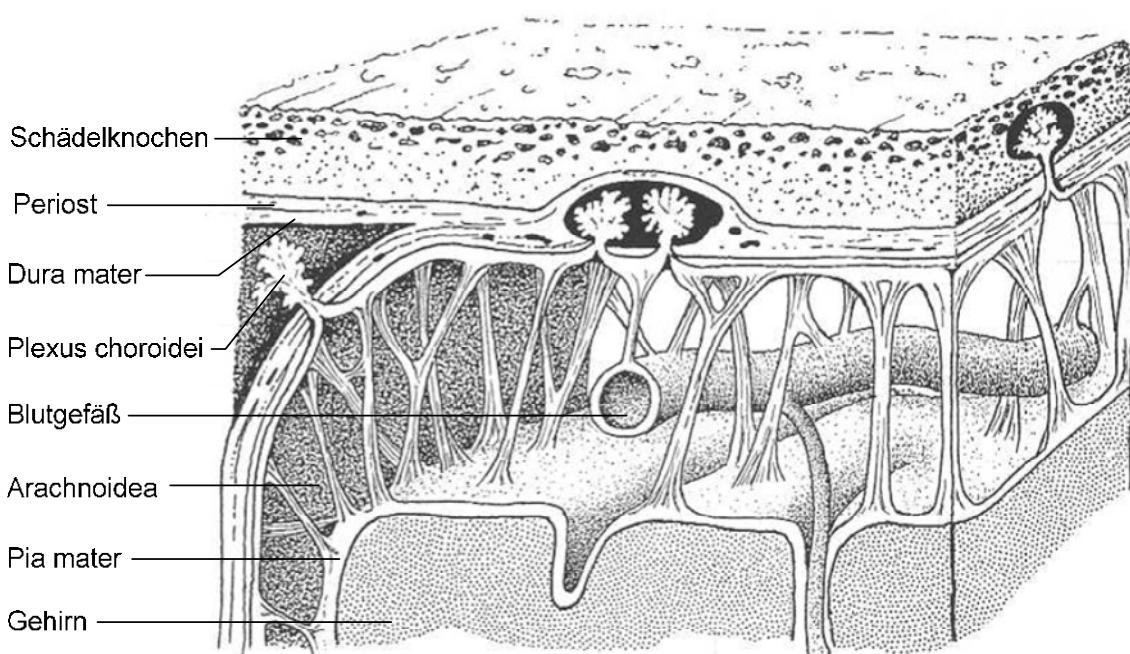


Abbildung 1: Darstellung der Meningeen des Gehirns nach Blottner 2004

Das Hirn-Ventrikelsystem (Ventriculi encephali) besteht aus vier liquorgefüllten Gehirnkammern, die sich während der Ontogenese aus dem Lumen des Neuralrohres entwickeln. Die rechte und linke Gehirnkammer (Ventriculi lateralia) liegen in der rechten bzw. linken Großhirnhemisphäre (Telencephalon). Über das Foramen interventriculare sind sie mit der unpaaren dritten Gehirnkammer verbunden, die ringförmig die zentral im Zwischenhirn gelegene Adhaesio interthalamica umgibt und im Diencaphalon liegt. Nach kaudal schließt sich die enge Wasserleitung (Aquaeductus mesencaphali) an, die in die vierte Gehirnkammer (im Rhombencephalon) übergeht, woraus wiederum nach kaudal der Zentralkanal des Rückenmarks (Canalis centralis) seinen Ursprung findet. Die inneren Liquorräume sind in der vierten Hirnkammer mit Cavum subarachnoideale, dem äußeren Liquorraum verbunden (BUDRAS und RÖCK, 1997).

2.4.3 Produktion und Abfluss des Liquor

Der Liquor cerebrospinalis stammt aus dem Blut und dringt unter Zurückhaltung der Blutzellen und größerer Moleküle durch die Blut-Liquor-Schranke hindurch in die Hirnventrikel. Er wird im Plexus choroideus, einem zottenreichen Adergeflecht im Inneren der Ventrikel, und in den Endothelzellen der cerebralen Kapillaren produziert. Der Plexus choroideus besteht aus einem gefäßreichen Stroma, das mit einem einschichtigen, kubischem Epithel verkleidet ist. Er ragt mit seiner blumenkohlähnlichen Struktur in die Ventrikel hinein.

Die Produktionsrate scheint relativ konstant und vom intracranialen Druck unabhängig zu sein, wohingegen die Absorptionsrate variabel ist und mit dem Druckgradient zwischen CSF und dem venösen System in Zusammenhang steht (TODD, 1984). Beim Menschen wird das Gesamtvolumen des Liquors auf etwa 110 – 160 ml geschätzt, wobei in 24 Stunden etwa die 3- bis 5-fache Menge der Gesamt-Liquormenge produziert wird (LORENZO et al., 1970).

Der Hauptanteil des CSF (70%) wird im Plexus choroideus gebildet. Der Rest entsteht im Ependym der Ventrikel, in der Arachnoidea und den Blutgefäßen der Meningen (GREEN et al., 1993).

Zur Erhaltung eines konstanten Liquordruckes, welcher sich im physiologischen Bereich von 150-500 mmHg befindet (HAYES, 1987), bedarf es einer geregelten Resorption des Liquors, die in den Arachnoidalzotten (Pacchionische Granulationen) stattfindet. Die Arachnoidalzotten befinden sich in den Sinus venosi und in den zerebralen Venen. Sie geben Liquor aus dem Subarachnoidalraum in die Venen ab und regeln so den Flüssigkeitsdruck im Subarachnoidalraum. Die Endothelzellen der Arachnoidalzotten sind aufgrund ihrer Fensterung für den Liquor und die darin enthaltenen Moleküle relativ frei passierbar. Bei steigendem Liquordruck wird der Liquor gegen die Arachnoidalzotten gedrückt und verstärkt

resorbiert, sobald der Liquordruck den venösen Druck übersteigt. Umgekehrt sind die Zotten für Flüssigkeiten oder Moleküle nicht passierbar, was somit einen einseitigen Liquorfluss gewährleistet. Weitere Resorptionsstellen sind Venen und Lymphbahnen in der Nähe der Spinalnerven.

Angetrieben durch die intrazerebrale Volumenzunahme in der Systole, die Zilienbewegung des Ependyms und die einseitige Liquorresorption findet ein Liquorfluss von den lateralen Hirnventrikeln zum dritten und von dort über den Aquaeductus in den vierten Ventrikel und weiter nach kaudal statt (BLOTTNER, 2004; STAIGER, 2005).

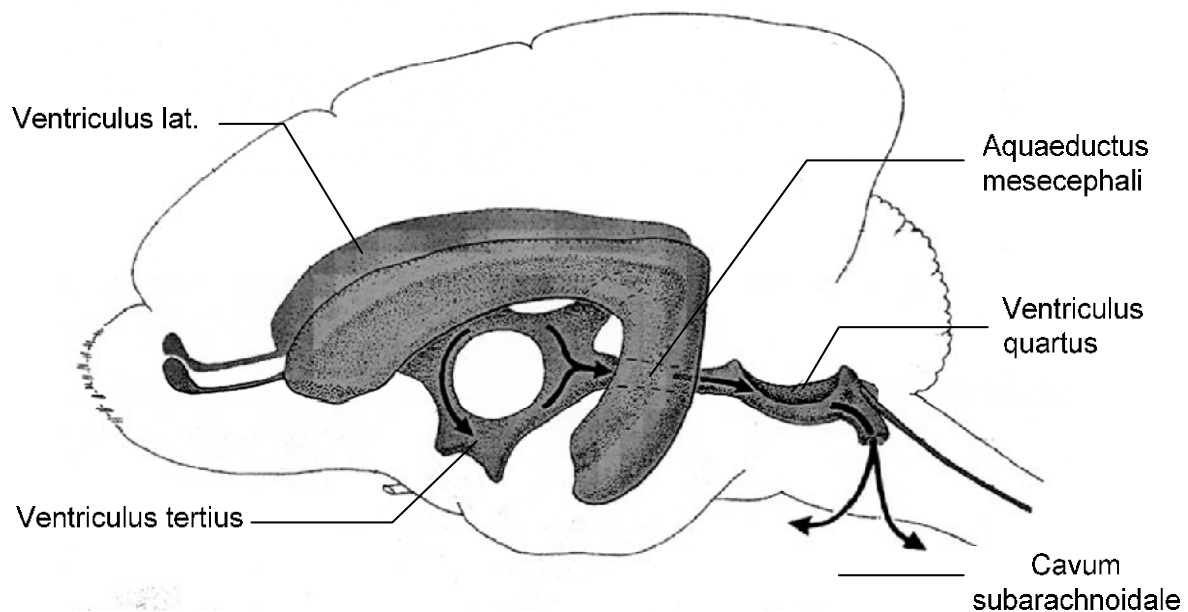


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ventrikelsystems im Gehirn nach Blottner 2004

2.5 Blut-Liquor-Schranke

Die Blut-Liquor-Schranke (BLS) besteht, wie schon oben erwähnt, aus einer einschichtigen Epithellage (Lamina epithelialis), der eine gefäßführende Bindegewebsschicht aus einschichtigem, kubischen Epithel (Ependym – ein Derivat der Pia mater) aufliegt.

An der Eintrittsstelle der Blutgefäße in das Zentralorgan stülpt sich die Leptomeninx ein und wird im weiteren Gefäßverlauf zu einer Hülle in Form eines feinen Spaltraumsystems (Spacia perivascularia, Virchow-Robinsche Räume), das mit dem Subarachnoidalraum in Verbindung steht. Durch ihre spezifische morphologische Ausbildung wirken die perivaskulären Spalträume physiologisch als eine Komponente der BLS. Sie sind für Stoffwechselforgänge im Gehirn von Bedeutung und sollen zudem auch der Auslöschung von Pulswellen der in

das Gehirn eindringenden Arterien und auch der Abwehr dienen (SMOLLICH und GÜNTHER, 1992).

Die BLS ist je nach Lokalität etwas unterschiedlich aufgebaut:

In den sogenannten „zirkumventrikulären“ Regionen des Gehirns (z.B. Neurallappen der Hypophyse oder Area postrema) ist das Kapillarendothel lückenhaft und somit stärker durchlässig. Dadurch können Stoffe, insbesondere Hormone, aus dem Hirngewebe in das Kapillarblut übertreten (BLOTTNER, 2004). In diesen Bereichen ist das Ependym (das Epithel der Liquorräume) mit dichten Zellverbindungen versehen, so dass hier nur ein geringer Flüssigkeitsaustausch stattfindet.

In den Plexus Choroidei, die den Grossteil des Liquors produzieren, ist das Ependym stärker durchlässig und das Kapillarendothel besitzt ebenfalls eine höhere Permeabilität. Hier können dadurch mehr Flüssigkeit und andere Moleküle, wie z.B. Nukleotide und Vitamine aus dem Blut in das Hirngewebe bzw. in den Liquor übertreten.

2.5.1 Blut-Hirn-Schranke

Der Begriff Blut-Hirn-Schranke (BHS) wird häufig als Oberbegriff für alle Epithelbarrieren zwischen Blut und Nervengewebe (Blut-ZNS-Schranke, Blut-Liquor-Schranke, Blut-Retina-Schranke, Blut-Nerven-Schranke) als auch zur Bezeichnung der Grenze zwischen Kapillargefäßen und zerebraler extrazellulärer Flüssigkeit verwendet.

Mit Abnahme des Arterienkalibers nimmt die Ausdehnung des Spaltraumsystems ab. Die Kapillaren weisen keine Virchow-Robinschen Räume mehr auf. Der Austausch der Stoffe findet lediglich durch die Kapillarwand und der Membrana limitans gliae perivascularis (aus der Pia mater entspringende gliöse Grenzhaute) statt. Die Venen hingegen werden wieder von perivaskulären Spalträumen umgeben.

Laut SMOLLICH und GÜNTHER sind die Astrozyten das wichtigste funktionell-morphologische Grundelement der Blut-Hirn-Schranke. Sie befinden sich in der Membrana limitans gliae perivascularis, in der sie mit fußartigen Fortsätzen die Kapillaren direkt umgeben und auf der anderen Seite durch diese mit den Nervenzellen in direktem Kontakt stehen (SMOLLICH und GÜNTHER, 1992). Diese strukturelle Bedeutung für die BHS wird jedoch von anderen Autoren angezweifelt, da zwischen den Astrozyten ihrer Meinung nach so große Lücken vorhanden sind, dass sie lediglich der Stabilisierung, nicht jedoch der Regulierung des Stoffaustausches dienen (THEWS et al., 1999)

Als das morphologische Substrat der BHS wird in erster Linie das Kapillarendothel angesehen, das im Gehirn mit besonders dichten „tight junctions“ ausgestattet ist.

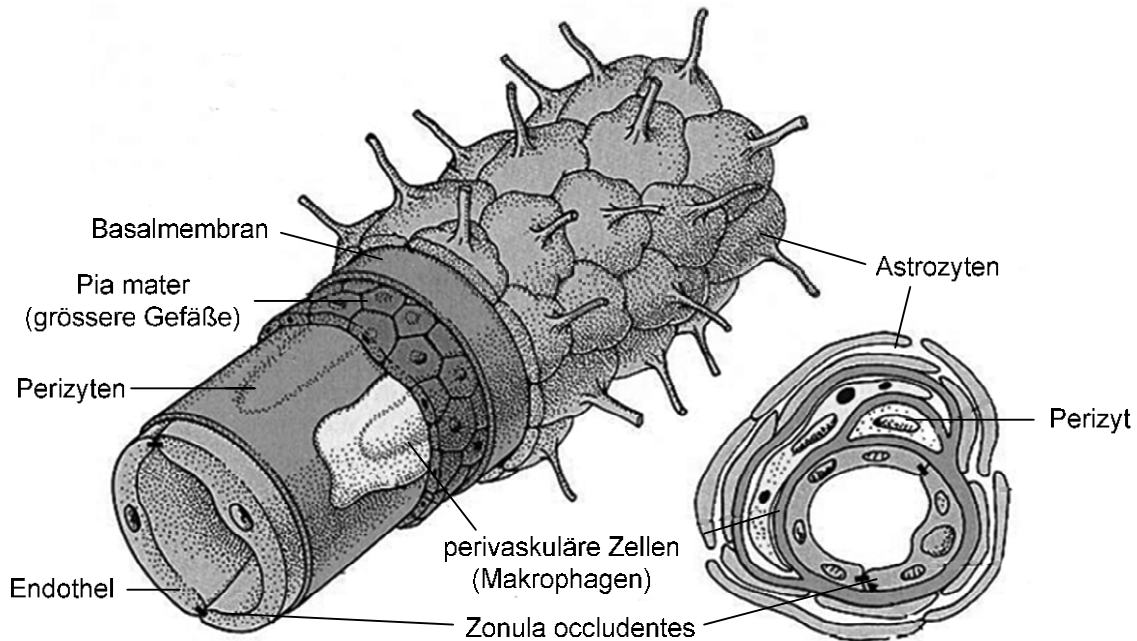


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke nach Blottner 2004

Die Aufgaben sowohl der BLS als auch der BHS sind es, den bidirektionalen Stoffaustausch zwischen Blut, Liquor und Gehirn zu kontrollieren und das Eindringen von Molekülen, die die Homöostase gefährden könnten, zu verhindern. Ebenso wird unter physiologischen Bedingungen das Gehirn vor Mikroorganismen und den meisten Toxinen geschützt. Die BHS und die BLS sind selektiv permeabel. Der Transport von Substanzen durch diese Schranken kann sowohl aktiv als auch passiv erfolgen. Ob ein Molekül diese Schranken passieren kann, hängt in erster Linie von seiner Molekülgröße, seiner Lipophilie und der elektrischen Ladung ab. Je geringer die Ladung und die Molekülgröße und umso größer die Lipophilie, desto leichter kann ein Molekül diese Schranken auf passive Weise überwinden (FISHMAN, 1992).

Dies gilt nur für Moleküle, die in freier Form im Blut vorliegen. Viele Stoffe, die an Plasmaproteine gebunden sind, können die Endothelbarriere nicht durchdringen. Im Falle der stark Plasmaprotein-gebundenen lipophilen Steroidhormone, interagiert das Kapillarendothel der Hirngefäße mit dem Trägerprotein und führt zu einer Freisetzung und damit raschen Permeation über die BHS (JOACHIMSKI, 1998).

Nichtpolare Substanzen können aufgrund ihrer Lipidlöslichkeit transzellulär die BHS überwinden. Zahlreiche Peptidrezeptoren führen zur Endo- und Transzytose. Insulin und Eisen/Transferrin-Komplexe werden z.B. über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen.

Einige Stoffe, wie z.B. Glukose, Aminosäuren und Peptide werden über selektive, Carrier-vermittelte Transportmechanismen aus dem Blut in das Gehirngewebe aufgenommen.

Des Weiteren existieren auch noch aktive Transportsysteme, die über die Na^+/K^+ - ATPase an der gewebeseitigen Membran der Endothelzellen angetrieben werden. K^+ wird aus dem Interstitium des Gehirngewebes in das Zellinnere und Na^+ im Gegenzug aus der Endothelzelle befördert. Aufgrund der dadurch bedingten geringen Na^+ Konzentration in den Endothelzellen, strömt Na^+ passiv aus dem Interstitium in die Zellen ein und nimmt dabei im Kotransport sowohl andere Substanzen wie z.B. Vorstufen von Neurotransmitter (z.B. Tryptophan, Cholin), als auch auf osmotischem Wege Wasser mit. Dieses Wasser geht zunächst in das Interstitium, um dann in die Liquorräume abzufließen. Etwa 20% des Liquors entstehen auf diese Weise.

Durch endotheliale Enzyme, wie z.B. γ -Glutamyl-Transpeptidase, alkalische Phosphatase, Adenylatcyclase oder L-Aminosäure-Decarboxylase werden aufgenommene Substanzen modifiziert und abgebaut.

2.5.2 Liquor-Hirn-Schranke

Die Grenze zwischen Liquor und Gehirngewebe besteht lediglich aus einer einschichtigen Ependymzellschicht. Ependymzellen gehören zur Familie der Gliazellen und weisen zwar gap junctions und Zonula occludens, aber keine tight junctions auf. Die Diffusion kleiner, gelöster Stoffe ist somit unbehindert möglich.

2.5.3 Pathomorphologische Veränderungen der Blut-Liquor-Schranke, der Blut-Hirn-Schranke und der Liquor-Hirn-Schranke

Die Zerstörung der BHS ist eine ätiologische Komponente vieler neurologischer Erkrankungen. Bakterientoxine schädigen z.B. die Endothelzellen, was gravierende Veränderungen der Blutgefäßpermeabilität nach sich zieht. Serumkomponenten und ganze Blutbestandteile gelangen in das Gehirnparenchym und in den Liquorraum. Ein Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke führt aufgrund der Steigerung des osmotischen Drucks durch eindringende Blutproteine schnell zu einem vasogenen (perivaskulären) Hirnödem. Tumore, Traumata, Ischämien, Meningoenzephalitis, Stoffwechselstörungen u.a. können die BHS beeinträchtigen und so zu einer Verschlimmerung der Symptomatik beitragen (STAIGER, 2005). Die Messung der BHS-Funktion ist bedeutend für die Analyse des Krankheitsverlaufes und der Auswahl von Therapeutika. Eine intakte BHS verhindert wiederum auch die Passage bestimmter therapeutischer Substanzen (MARCHI et al., 2003)

Sämtliche Störfaktoren, welche die Durchlässigkeit der BHS bzw. BLS und damit das Spektrum für deren Permeabilität verändern, haben nachteilige Wirkung auf den Stoffwechsel des ZNS. Die Nervenzellen sind besonders anfällig für Sauerstoff- und Glukosemangel. Hypoglykämien, Anämien und Zirkulationsstörungen (z.B. aufgrund kardialer Dekompensati-

on) ziehen die Nervenzellen schon frühzeitig in Mitleidenschaft. Aber auch Erkrankungen der Leber, Milz und Nieren führen zur Anhäufung von Para- und Heteroproteinen, welche die Nervenzellen nicht verarbeiten können.

Das Auftreten von Plasmaproteinen im Liquor ist ein Hinweis auf eine Störung der Barrierefunktion. Nur wenige Proteine werden ausschließlich im ZNS synthetisiert bzw. treten dort in höheren Konzentrationen auf als im Blut. Das Erscheinen dieser gehirnspezifischen Proteine im Blut ist ein Hinweis auf eine Durchlässigkeit der BHS. Die Messung solcher Proteine im Blut ist wesentlich schonender als eine Liquorpunktion und vor allem bei wiederholten Verlaufskontrollen von Bedeutung (CHODOBSKI und SZMYDYNGER-CHODOBSKA, 2001).

Sowohl das ZNS, als auch das periphere Nervensystem (PNS) können bei fast allen entzündlichen Erkrankungen des Organismus mehr oder weniger in Mitleidenschaft gezogen werden. Die BHS schützt die Nervenzellen nur so lange vor den schädlichen Auswirkungen von Krankheitserregern und den toxisch wirkenden Stoffwechselprodukten, solange sie intakt ist. Die entzündlichen Vorgänge spielen sich vorwiegend im vaskulären System ab, wobei es zu perivaskulären Infiltrationen kommt, die im ZNS von reaktiven Gliawucherungen begleitet werden. Diese entzündlichen Erscheinungen sind von ihrer Ursache her unspezifisch und begleiten alle Schädigungen des nervösen Gewebes (VANVELDE et al., 2001).

Vorraussetzung für das Zustandekommen einer entzündlichen Erkrankung im Bereiche des ZNS ist das Durchbrechen der BHS bzw. BLS durch Krankheitserreger oder Toxine. Bei den so genannten aufsteigenden Infektionen breiten sich die Krankheitserreger entlang der peripheren Nerven aus. Bei der Bornaschen Krankheit wird dies z.B. über den N. Trigemini angenommen (BILZER et al., 1996). Auch kann das Nervensystem durch entzündliche Prozesse in der Nachbarschaft befallen werden.

Entzündungen der Dura mater (Pachymeningitis) werden vergleichsweise selten gefunden, wohingegen die Entzündung der weichen Hirnhäute (Leptomeningitis) weit häufiger vorkommt. Sie entsteht nahezu ausschließlich erregungsbedingt und ist häufig vergesellschaftet mit einer Entzündung des Rückenmarks (DAHME und SCHMAHL, 1999).

2.5.4 Liquorpunktion

Die Liquoruntersuchung ist indiziert, wenn aufgrund der klinischen Untersuchung deutliche Hinweise auf Läsionen im Bereich des Gehirns oder des Rückenmarks vermutet werden. Die Liquorpunktion ist eine relativ einfache und ungefährliche Untersuchungsmethode wenn sie unter streng sterilen Kautelen erfolgt und die ausführende Person ausreichende Kenntnis und Übung besitzt (HAYES, 1987; JOHNSON und CONSTANTINESCU, 2000).

Die Punktion im Bereich des Atlanto-Occipital-Gelenkes (AOG) bedingt allerdings eine Allgemeinanästhesie, wohingegen die Punktion im Lumbo-Sakral-Gelenk (LSG) auch nur mit einer Sedation und lokalen Infiltration der Punktionsstelle erfolgen kann.

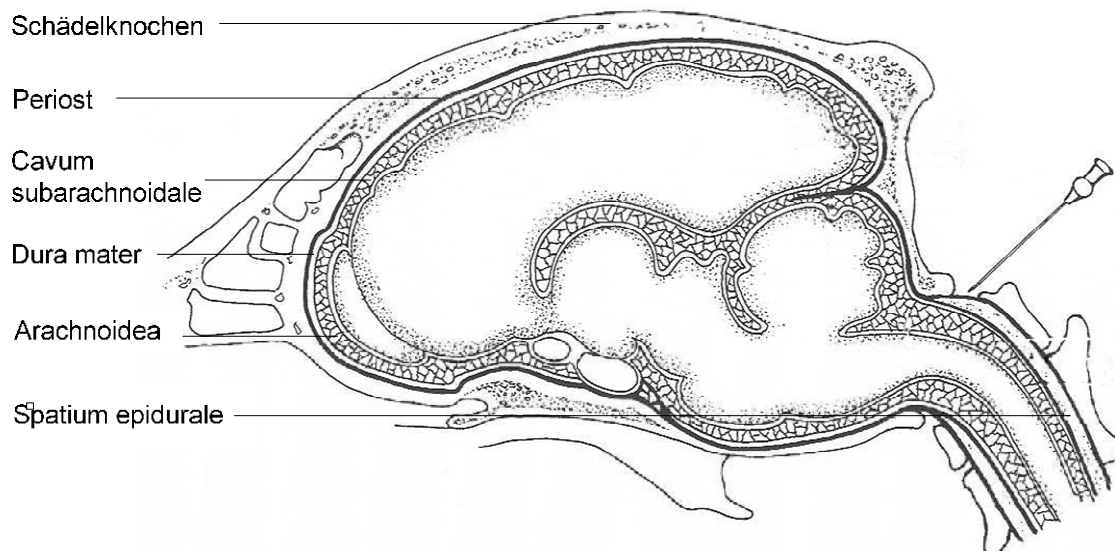


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Liquorpunktion im Atlanto-Occipital-Gelenk nach Blottner 2004

Die Punktion im Bereich des AOG wird bevorzugt, wenn eine Erkrankung des Gehirns vorliegt, oder die Läsion mehr im cranialen Bereich des Rückenmarks liegt, bzw. vermutet wird (JOHNSON und CONSTANTINESCU, 2000). Aufgrund der Tendenz der Cerebrospinal-Flüssigkeit nach caudal zu fließen, kann im Falle einer vermuteten Läsion im kaudalen Bereich des Rückenmarks eine Punktion im LSG die Methode der Wahl sein. Es ist jedoch zu beachten, dass die Punktion an dieser Stelle im Allgemeinen etwas schwieriger ist. Besonders weil eine wesentlich dickere Gewebeschicht passiert werden muss, ist die Gefahr der iatrogenen Blutungen größer.

Bei Pferden mit einem akuten Schädeltrauma ist die Punktion eindeutig kontraindiziert, ebenso bei Pferden mit einem erhöhten intrakranialen Druck, da die Gefahr einer Herniation des Cerebellum in Richtung des Foramen magnum besteht (MACWILLIAMS, 2002).

2.6 Liquorproteine

Prinzipiell ist die Proteinzusammensetzung des Liquors dem Proteinmuster des Blutes sehr ähnlich. Lediglich die Proteingesamtkonzentration ist sehr unterschiedlich. Die Proteine des

ZNS sind normalerweise sehr unsymmetrisch verteilt mit wesentlich geringeren Konzentrationen als im Serum (MARCHI et al., 2003).

Ab 2.5.3. werden hier nur exemplarisch einige Proteine besprochen, die in dieser Arbeit eine besondere Rolle spielen.

2.6.1 Proteinkonzentration in der CSF

Liquor hat verglichen mit Plasma einen wesentlich geringeren Proteingehalt. Das Verhältnis Plasmaprotein- zu Liquorproteinkonzentration beträgt in etwa 250:1. Die relative Konzentration an niedermolekularen Proteinen ist im Vergleich zum Serum größer (STARK et al., 2001).

Die geringen Proteinkonzentrationen erschweren die Messung erheblich, da z.B. das in vielen Kliniken verwendete Refraktometer solch geringe Mengen nicht messen kann. Zur Messung stehen verschiedene semiquantitative und quantitative Methoden zur Verfügung, wie die Turbidometrie (Nephelometrie), Ultraviolett Spektrophotometrie, eine modifizierte Biuretmethode oder immunologische Methoden (MACWILLIAMS, 2002; GREEN et al., 1993).

Jede Methode hat ihren eigenen Referenzbereich, was erklärt, dass die Angaben über die Gesamte Proteinkonzentration im Liquor gesunder Pferde in der Literatur sehr stark differieren. Es werden Bereiche von 20-80 mg/dl (MACWILLIAMS, 2002) oder sogar 10-120 mg/dl (JOHNSON und CONSTANTINESCU, 2000) angegeben. Fohlen zeigen im Vergleich zu adulten Pferden einen höheren Liquorproteingehalt, der mit zunehmendem Lebensalter sinkt. In einer Studie von Furr zeigten 2 Tage alte Fohlen eine durchschnittliche Proteinkonzentration von $109,0 \pm 9,7$ mg/dl. Diese sank bis etwa zum 30. Lebensstag auf den Normwert adulter Pferde ab (FURR und BENDER, 1994). Werte von 50 – 100 mg/dl sind der in der Literatur am häufigsten angegebene Bereich physiologischer Proteinkonzentrationen im Liquor von gesunden Pferden.

Schon geringe Blutbeimengungen, z.B. durch iatrogene Blutungen während der Liquorpunktion verändern die Proteinkonzentration erheblich und verfälschen so das Messergebnis. Eine Blutkontamination von 0,1 ml zu 1 ml CSF kann z.B. eine Proteinkonzentration von 400 mg/dl erzeugen (GREEN et al., 1993). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, iatrogene Blutkontaminationen zu identifizieren. Zum einen gibt die Auszählung der Erythrozyten und deren Morphologie Aufschluss und zum anderen ist es möglich über die Verrechnungsformel des Albumin-Quotienten oder des Immunglobulin-Index den Serumproteingehalt mit der Liquorproteinkonzentration zu vergleichen. Ein nicht iatrogen bedingter Anstieg der

Proteinkonzentration in der CSF ist immer ein Hinweis auf eine neurologische Erkrankung bzw. eine pathomorphologische Veränderung der Liquorschranken.

Physiologischerweise differiert der Proteingehalt einer im Atlanto-Occipital-Bereich entnommenen Liquorprobe kaum zu dem einer Lumbalpunktion (MAYHEW et al., 1977). Eine Differenz diesbezüglich weist auf eine pathologischen Veränderung hin und kann einen Hinweis auf die Lokalisation der Noxe geben. In diesem Fall fällt das Ergebnis höher aus (MACWILLIAMS, 2002).

Eine erhöhte Proteinkonzentration im Liquor kann durch einen erhöhten Plasmaproteingehalt, eine Schrankenstörung oder eine lokale Immunglobulinsynthese zu Stande kommen. Die Ursache können viral oder bakteriell bedingte Entzündungen, eine Infektion mit Protozoen oder Pilzen, oder Neoplasien sein. Ebenso kann ein erhöhter Proteingehalt Folge einer traumatischen, vaskulären oder degenerativen Läsion sein. Diese kann auch bei metabolischen, endokrinen oder toxischen Erkrankungen der Fall sein (FISHMAN, 1992).

2.6.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes und Albuminquotienten in der CSF

Nephelometrie

In der Humanmedizin haben sich nephelometrische und photometrische Analysemethoden zur Gesamtproteinbestimmung etabliert. Auch in der Veterinärmedizin wird in einigen Arbeiten, die Nephelometrie als besonders geeignet dargestellt (HAMMERBACHER-SMITH, 2001; GOEHRING et al., 2006).

Die Nephelometrie ist ein quantitatives analytisches Verfahren, das besonders zur Messung der Proteinkonzentration im Liquor geeignet ist. Dabei wird die (durch die Proteine verursachte) Trübung der Flüssigkeit (in diesem Falle der Liquor) mittels eines Nephelometers gemessen. Die Teilchen in der Flüssigkeit verursachen eine Streuung des Primärstrahles, welche dann gemessen wird (REIBER, 1980).

Pandy-Test

Der Pandy-Test ist ein semiquantitativer Nachweis von Eiweiß in der CSF. Das Verfahren beruht auf der Ausfällung von Eiweiß durch gesättigte wässrige Phenollösung. Der Grad der Trübung wird geschätzt.

Reiber Schema

Die Blut/Liquor-Schrankenfunktionsstörung führt auch zum Konzentrationsanstieg der Immunglobuline im Liquor. Im Rahmen entzündlicher Geschehen kann es nach Einwanderung von B-Zellen, ab etwa der 2. Krankheitswoche zu einer intrathekalen Immunglobulinsynthese kommen. Die Differenzierung zwischen Diffusion in den Liquorraum und

intrathekaler Synthese gelingt mit dem Göttinger Diagramm (Reiber-Schema). Nach Bestimmung der Immunglobulinkonzentration im Liquor und Serum wird der Liquor/Serum-Quotient berechnet und dann in einem Diagramm auf der y-Achse gegen den zugehörigen Albuminquotienten (x-Achse) aufgetragen. Die Granzlinie markiert eine mathematische Funktion (spezifisch für IgA, IgG und IgM), die eine Diffusion des Ig (unterhalb der Linie) von einer intrathekalen Produktion (oberhalb der Linie) differenziert (Reiber, 1980). ECKHOFF et al. haben dieses Schema erfolgreich in der Diagnostik bei der Bornaschen Krankheit angewandt (ECKHOFF et al., 2006).

Mikroproteinmethode

Bei der Mikroproteinmethode (auch Pyrogallolrot-Methode genannt) werden Pyrogallolrot-Molybdatkomplexe an die Proteine gebunden. Die gebildete Farbe ist proportional zur Proteinkonzentration und wird per Extinktion gemessen. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit zur Messung des Gesamtproteingehaltes in der CSF angewandt.

Albuminquotient

Zur Beurteilung der BLS wird der sog. „Albuminquotient“ verwendet, der das Verhältnis des Albumins im ZNS zum Serumalbumin beschreibt (ANDREWS et al., 1995):

Albuminquotient: $(\text{Albumin-Liquor} : \text{Albumin-Serum}) \times 100$

Der Normalwert liegt hierbei bei $1,4 \pm 0,04$ (GREEN et al., 1993; ANDREWS et al., 1995) bzw. $1,2 \pm 0,69$ (HAMMERBACHER-SMITH, 2001). Ein Albuminquotient über 2,4 gilt als relativ sicherer Indikator für eine Störung der BLS (ANDREWS et al., 1995).

2.6.3 Herkunft der Liquorproteine

Der Hauptteil der Liquorproteine stammt aus dem Blut. Sie gelangen über Carriersysteme, bzw. Pinozytose über die kapillären Endothelzellen durch die BHS oder BLS in den Liquor. Die Rate dieser Proteinaufnahme hängt dabei unter anderem vom isoelektrischen Punkt ab.

Ein geringer Anteil wird jedoch auch intrathekal im Plexus choroideus (PC) produziert. Dazu gehören z.B. das Myelin-Basis-Protein, die Prostaglandin-D-Synthetase und das Tau Protein (FISHMAN, 1992).

Ein Teil der Proteine, wie z.B. das Transthyretin werden sowohl in der Leber als auch im PC produziert.

Einige extrazelluläre Proteine des ZNS werden nicht nur im PC, sondern auch in den Gliazellen produziert (ALDRED et al., 1995).

Die meisten Plasmaproteine sind auch im Liquor vorhanden, wobei deren Konzentration von der Molekülgröße bzw. dem Molekulgewicht und dem Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Liquor abhängig ist (GREEN et al., 1993).

Der Plexus choroideus ist nicht nur Synthese- sondern auch Zielorgan von Polypeptiden. Verschiedene Polypeptide regulieren die Zusammensetzung des Liquors über die Regulierung des Blutflusses im PC (CHODOBSKI und SZMYDYNGER-CHODOBSKA, 2001).

Die Liquorproteine verlassen die CSF über die Arachnoidalen Villi in das venöse Blut (FISHMAN, 1992).

Aufgrund des schon oben erwähnten Konzentrationsverhältnisses Plasmaprotein zu Liquorprotein von 250:1 ist ein Fließgleichgewicht zwischen Blut und Liquor und somit eine Homöostase nur möglich, wenn der Proteinabfluss die Proteineintrittsrate um diesen Faktor übersteigt.

2.7 Proteinuntersuchung in der CSF

Im Folgenden werden einige Proteine beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht wurden.

2.7.1 Albumin

Albumin ist sowohl im Serum als auch im Liquor das mengenmäßig wichtigste Protein und essentiell zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Blut. Es ist wasserlöslich und (im Gegensatz zu den meisten anderen Serumproteinen) frei von Kohlenhydraten. Albumin besitzt Bindungsstellen für lipophile Substanzen, wodurch es als Carrierprotein für langkettige Fettsäuren, Bilirubin, Pharmaka, Steroidhormone und Vitamine fungiert. Das Molekulargewicht beträgt ca 66 kDa. Albumin besitzt einen starken Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren, zeigt ein ampholytisches Verhalten und hat einen isoelektrischen Punkt von 4,6 (KOOLMANN und RÖHM, 1998).

Das Albumin der CSF gelangt in erster Linie per Diffusion durch die BLS in den Liquorraum und steht in gleichmäßiger Relation zur Konzentration des Serumalbumins. Der Normwert wird mit $35,7 \pm 9,7$ mg/dl (GREEN et al., 1993) bzw. $35,8 \pm 7,9$ mg/dl (ANDREWS et al., 1995) angegeben. Ist die BLS gestört, erhöht sich die Albuminkonzentration im Liquor.

2.7.2 Transthyretin

Transthyretin (TTR) gehört zusammen mit Albumin und dem Thyroxin-Bindenden-Globulin (TBG) zu der Gruppe der Thyroxin-bindenden Hormone, die durch die Bindung der

hydrophoben Schilddrüsenhormone T3 und T4 vor allem im Blut, aber auch im Liquor deren Konzentration stabilisieren und ihre Halbwertszeit verlängern. TTR wurde erstmals 1950 durch Gelelektrophorese als Bande entdeckt, die etwas schneller als Albumin lief und das Protein wurde kurzerhand als „Präalbumin“ bezeichnet, ein Name, der teilweise auch noch heute verwendet wird (ROBBINS, 2002). TTR gehört zu den sog. negativen Akute-Phase-Proteinen (APP), d.h. seine Expression wird in der Akute-Phase-Reaktion (APR) gedrosselt.

TTR-Morphologie:

Transthyretin ist ein beim Menschen ca 55 kDa schweres Protein, das aus 4 identischen Untereinheiten mit jeweils 127 Aminosäuren besteht, die in einer Tetraederform angeordnet sind. Die komplette dreidimensionale Struktur dieses Proteins wurde beim Menschen durch hochauflösende Röntgen-Kristallographie ermittelt (BLAKE et al., 1978).

TTR-Synthese und Abbau:

TTR wird sowohl in der Leber, als auch im Plexus choroideus synthetisiert und in geringen Mengen auch in anderen Geweben wie z.B. im Herz, im Skelettmuskel und in der Milz (SOPRANO et al., 1985). Etwa 40% des Plasma-TTR zirkuliert als Komplex mit dem Retinol-Bindungs-Protein (MARCHI et al., 2003).

Im zentralen Nervensystem hingegen sind die Verhältnisse anders als im Serum. Hier ist das Transthyretin das Haupttransportprotein der Schilddrüsenhormone, die dort einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung und den Stoffwechsel des Gehirns haben. Das Verhältnis der TTR-Konzentration im Liquor im Vergleich zum Serum ist von allen Plasmaproteinen mit Ausnahme von Cystatin C und β 2-Mikroglobulin am höchsten (DICKSON et al., 1987). Im humanen Liquor stellt TTR ca. 25% der gesamten Proteinfraction (ALDRED et al., 1995). TTR liegt im Plasma als einzelner Tetraeder vor, wohingegen es im ZNS in erster Linie als Monomer auftritt (PUCHADES et al., 1999)

Bei vielen neuropathologischen Vorgängen spielt TTR eine wichtige Rolle: MARCHI und Mitarbeiter registrierten nach einer iatrogen erzeugten Öffnung der Blut-Hirn-Schranke binnen Minuten einen deutlichen Anstieg der Konzentration von TTR-Monomeren im Blut (MARCHI et al., 2003). TTR ist zudem eine der wichtigsten Proteinkomponenten der pathologischen Amyloid-Ablagerungen im Gehirn z.B. Amyloid β bei Morbus Alzheimer (Jacobson, 2003). SULLIVAN und Mitarbeiter fanden bei Menschen mit Depressionen eine signifikant erniedrigte TTR Konzentration (SULLIVAN et al., 1999). Auch SOUSA und Mitarbeiter wiesen anhand von TTR freien Mäusen einen wichtigen Einfluss von TTR auf das Verhalten von Lebewesen nach (SOUSA et al., 2004).

2.7.3 Retinol-Bindungs-Protein

Das Retinol-Bindungs-Protein (RBP) gehört mit ca. 21 kDa zu den niedermolekularen Proteinen. Es dient als Transportprotein für Retinol (Vitamin A) von der Leber zu den Epithelialen Geweben. Somit ist es ein wichtiger Regulator des Vitamin A Metabolismus. RBP zirkuliert zu 95% als HoloRBP, d.h. mit gebundenem Retinol (BURRI et al., 1993). Der Hauptanteil dieses Plasma-RBP bildet einen hochmolekularen Komplex mit TTR, wodurch eine ungewollte Filtration in der Niere verhindert wird (MONACO et al., 1995).

Auch im Liquor wird RBP synthetisiert. Es zirkuliert nach BERNARD dort als freies Molekül, was angesichts der relativ hohen TTR-Konzentration erstaunlich ist. Das Verhältnis RBP zu TTR ist im Liquor etwa 10-fach geringer als im Serum (BERNARD et al., 1982). Die unterschiedlich starke Expression von RNA im Plexus choroideus von Ratten, Mäusen, Schafen und Rindern legt die Vermutung nahe, dass die Bedeutung von RBP als Transportprotein im Liquor speziesabhängig zu sein scheint (DURAN und SCHREIBER, 1992).

2.7.4 Serumamyloid A

Das Serumamyloid A ist ein Apo-Lipoprotein und beim Pferd eines der wichtigsten Akute-Phase-Proteine (KENT, 1992). In den Datenbanken wird beim Pferd eine Masse von 123 kDa angegeben. Es wird in der Leber synthetisiert und metabolisiert. Im Serum ist es die Vorstufe des Amyloid A, der Hauptkomponente der Amyloidfibrillen der pathologischen Amyloidablagerungen im Gewebe (HUSEBEKK et al., 1985). Im Blut kommt es in erster Linie als Komplex mit der Fraktion 3 der high density lipoproteins (HDL) vor. Während einer Akute-Phase-Reaktion sind etwa 30-50% der HDL3 Moleküle an SAA-Moleküle gebunden. SAA ist ein sehr heterogenes Protein. Beim Pferd sind drei verschiedene Isoformen bekannt, die sich unter anderem in ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden (HULTEN et al., 1997). Es wird in der klinischen Diagnostik als Entzündungsparameter verwendet.

Im Rahmen der Inflammationsreaktion steigert SAA die Phagozytose, ist leukozytenaktivierend und wirkt chemotaktisch auf verschiedene Leukozytenpopulationen sowie T-Lymphozyten.

2.8 Untersuchung von Proteinen der CSF mittels massenspektrometrischer Verfahren

Während konventionelle Verfahren wie die Fotometrie oder Immunoassays aufgrund der Art der Detektion medizinisch relevante Stoffe oft ungenau erfassen, erlauben massenspektrometrische Verfahren eine höchst spezifische Stoffidentifikation auf der Ebene der jeweiligen molekularen Struktur (VOGESER et al., 2007).

Die Massenspektrometrie ist eine physikalische Messtechnik, deren Grundlagen bereits Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelt wurden.

Bei der Time-of-flight-Massenspektrometrie (TOF-MS) analysiert man Ionen anhand ihrer massenabhängigen unterschiedlichen Beschleunigung im elektrischen Feld. Sie ist besonders für große Moleküle wie etwa Proteine geeignet.

HUTCHES und YIP stellten 1993 erstmals die Surface-enhanced-laser-desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) vor (HUTCHENS und YIP, 1993).

Ihr Haupteinsatzbereich ist die schnelle Analyse einer großen Anzahl von komplexen biologischen Proben wie z.B. Körperflüssigkeiten. Diese Technologie nutzt verschiedene chromatographische Oberflächen um bestimmte Proteingruppen zu selektieren, basierend auf spezifischen Eigenschaften der Proteine wie z.B. Affinität und Ladung (GUERREIRO et al., 2007).

Die massenspektrometrische Untersuchung von CSF hat in der Humanmedizin bislang vor allem in der Diagnostik der Alzheimer Erkrankung Anwendung gefunden (CARETTE, 2003; MADDALENA et al., 2004; SEIBERT, 2004). CARETTE et al. fanden unter anderem mittels SELDI-TOF-MS im Liquor von Patienten mit Morbus Alzheimer fünf erkrankungsspezifische Polypeptide. In Kombination konnte daraus für die Diagnostik des Morbus Alzheimer eine Spezifität von 100% und Sensitivität von 66% erreicht werden (CARETTE, 2003).

KHWAJA et al. untersuchten 2006 32 humane Liquorproben zentralnervös erkrankter Patienten mit SELDI-TOF-MS. Die Krankheitsbilder teilten sich auf in maligne, entzündliche bzw. reaktive und ZNS-Erkrankungen unbekannter Ursache auf. Für alle drei Gruppen konnten jeweils drei spezifische Peaks zugeordnet werden. Darunter konnte in der Gruppe der neoplastischen Erkrankungen die Carbonic Anhydrase und hauptsächlich in der Gruppe der entzündlichen Erkrankungen Cystatin C identifiziert werden (KHWAJA et al., 2006).

Über die Untersuchung der CSF von Tieren mittels SELDI-TOF-MS gibt es bisher nur wenige Berichte. SZUYAMA et al. fanden mittels SELDI-TOF-MS und 2D-Gelelektrophorese im Liquor von Ratten mit akuter cerebraler Ischämie einen signifikanten Anstieg des Transthyretin-Monomers (SUZUYAMA, 2004).

Bislang existieren noch keine Veröffentlichungen über massenspektrometrische Untersuchung equinen Liquors durch SELDI-TOF-MS.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Vergleichende Untersuchung von Serumproteinen bei Pferden und Menschen

Zum Vergleich des Serums gesunder Pferde mit dem Serum gesunder Menschen, wurden Serumproben von 8 klinisch unauffälligen Pferden und 8 gesunden Menschen verwendet.

Equine Serumproben

Tabelle 1: Soziografische Daten der klinisch unauffälligen Pferde (n=8)

Identität	Alter	Rasse	Geschlecht
I	4	WB	Stute
II	12	Traber	Stute
III	3	WB	Wallach
IV	18	Traber	Hengst
V	5	Traber	Stute
VI	12	Pony	Wallach
VII	2	WB	Wallach
VIII	5	Traber	Stute

Serum-Proben von 8 klinisch unauffälligen Pferden dienten als Standardgruppe für die massenspektrometrische Untersuchung des Serums. Die Pferde wurden unmittelbar vor der Blutentnahme einer gründlichen klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen, die bei keinem Pferd pathologische Abweichungen ergab. Ebenso wurde zeitgleich Blut in ein EDTA-Röhrchen entnommen und ein Blutbild mit Messung des Hämatokrits, des Hämoglobins, der Erythrozytenzahl, der Leukozytenzahl und des MCV mit Hilfe des Coulter Counters (Fa. Beckmann) angefertigt.

Humane Serumproben

Es wurden 8 humane Serumproben verwendet, die aus der Kontrollgruppe einer anderen Studie stammten.

3.1.2 Vergleichende Untersuchung von Serumproteinen bei Equiden

Pferde

Tabelle 2: Soziografische Daten der Gruppe der Pferde

Identität	Alter	Rasse	Geschlecht
I	4	WB	Stute
II	12	Traber	Stute
III	3	WB	Wallach
IV	18	Traber	Hengst
V	5	Traber	Stute
VI	12	Pony	Wallach

Diese 6 Pferde gehören zur schon oben genannten Gruppe der klinisch unauffälligen Pferde. Es wurden lediglich 2 Pferde herausgenommen, um die Anzahl von 6 Tieren pro Gruppe in dieser Untersuchung beizubehalten.

Maultiere

Tabelle 3: Soziografische Daten der Maultiere

Identität	Alter	Rasse	Geschlecht
M 1	6	Maultier	Stute
M 2	5	Maultier	Stute
M 3	5	Maultier	Wallach
M 4	6	Maultier	Wallach
M 5	6	Maultier	Stute
M 6	5	Maultier	Stute

Die Maultiere kamen alle aus einem Bestand in Brandenburg und zeigten bei der klinischen Allgemeinuntersuchung keine pathologischen Auffälligkeiten.

Esel

Tabelle 4: Soziografische Daten der Esel

Identität	Alter	Rasse	Geschlecht
E 1	14	Esel	Hengst
E 2	12	Esel	Stute
E 3	13	Esel	Wallach
E 4	1	Esel	Hengst
E 5	6	Esel	Wallach
E 6	8	Esel	Wallach

Die Esel waren bis auf die beiden Hengste Patienten der Klinik, die bei Nachkontrollen als klinisch gesund befunden wurden.

3.1.3 Vergleichende Untersuchung von Serum- und Liquorproteinen bei Pferden

Gruppe der klinisch unauffälligen Pferde

Die Daten der 8 klinisch unauffälligen Pferde aus dem Vergleich Pferd – Mensch, dienten ebenfalls als Kontrollgruppe für die Gegenüberstellung mit den Seren der allgemein erkrankten (neurologisch unauffälligen) und zentralnervös erkrankten Pferde. Eine Liquorentnahme war bei den klinisch unauffälligen Pferden aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht möglich.

Gruppe der neurologisch unauffälligen Pferde

Tabelle 5: Soziografische Daten der neurologisch unauffälligen Pferde (n=19)

Identität	Alter	Rasse	Geschlecht	Proben	Erkrankung
S 1	14	WB	Stute	S. u. L.	Cushing-Syndrom, Hufrehe
S 2	5	Pony	Stute	S. u. L.	Blasenlähmung, Cystitis
S 3	12	WB	Stute	nur S.	Fraktur
S 4	20	WB	Wallach	S. u. L.	Kolik
S 5	1	WB	Wallach	S. u. L.	Kolik
S 6	14	Pony	Stute	S. u. L.	Blasenlähmung, Cystitis
S 7	7	Pony	Wallach	S. u. L.	Oesophagusruptur, Pneumonie, Sepsis
S 8	1	WB	Stute	S. u. L.	Darmperforation, Peritonitis
S 9	11	WB	Wallach	S. u. L.	Kolik
S 10	20	WB	Wallach	S. u. L.	Kolik
S 11	7	Pony	Stute	S. u. L.	Partellaluxation
S 12			Stute	S. u. L.	
S 13	20	Pony	Wallach	S. u. L.	Milztumor, Kachexie
S 14	27	WB	Wallach	S. u. L.	Arthrose
S 15	19	Pony	Wallach	S. u. L.	Sepsis nach OP eines Penisapilloms
S 16	12	WB	Wallach	S. u. L.	Karies
S 17	22	WB	Wallach	S. u. L.	Arthrose
S 18	21	WB	Stute	S. u. L.	Arthrose
S 19	1	WB	Stute	S. u. L.	Tetanus

Die Gruppe der neurologisch unauffälligen Pferde diente als Kontroll- bzw. Vergleichsgruppe für die Liquoruntersuchungen. Sie setzt sich aus 19 Pferden zusammen, die im Zeitraum August 04 bis Mai 05 in der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie der Freien Universität Berlin aus den verschiedensten, jedoch nicht neurologischen Gründen euthanasiert werden mussten. Keines dieser Pferde zeigte bei der klinischen Untersuchung neurologische Auffälligkeiten. Von diesen Pferden wurde unmittelbar vor der Euthanasie Serum entnommen und unmittelbar danach durch eine Punktion im Atlanto-Occipital-Spalt, Liquor entnommen.

Gruppe der zentralnervös erkrankten Pferde

Tabelle 6: Soziografische Daten der zentralnervös erkrankten Pferde (n=14)

Identität	Alter	Rasse	Geschlecht	Proben	Erkrankung
A	20	WB	Stute	nur L.	EHV
C	5	Pony	Stute	S. u. L.	BVD
D	3	WB	Wallach	nur L.	Enzephalitis unbekannter Genese
E	6	Pony	Stute	nur L.	Enzephalitis unbekannter Genese
F	6	Pony	Stute	S. u. L.	bakterielle Meningitis
G	7	Araber	Stute	nur L.	Cyanid-Intoxikation
H	7	Pony	Wallach	S. u. L.	vertebrales Hämangiosarkom
I	6	WB	Wallach	S. u. L.	EHV
J	3	WB	Stute	S. u. L.	Abriß des M. longus capitis
K	18	Pony	Stute	S. u. L.	Hydrocephalus
L	22	WB	Wallach	S. u. L.	HWS Arthrose
M	11	WB	Wallach	S. u. L.	BVD
N	14	WB	Wallach	S. u. L.	Enzephalitis purulenta
O	10	WB	Wallach	S. u. L.	BVD

Die Gruppe der zentralnervös erkrankten Pferde setzt sich aus 14 Pferden mit den unterschiedlichsten neurologischen Erkrankungen zusammen. Die Pferde H bis O waren im Zeitraum Dezember 04 bis September 05 stationär in Behandlung. Liquor- und Serumentnahme erfolgten im Rahmen der üblichen Diagnostik. Weiterhin wurden eingefrorene Liquorproben (zum Teil auch Serum) der Pferde A bis G aus dem Zeitraum Juni 01 bis März 04 in die Untersuchungen miteinbezogen. Die Daten dieser Pferde wurden retrospektiv erfasst.

3.2 Probenentnahme und -aufbereitung

3.2.1 Serum

Die Blutentnahme zur Serumanalyse erfolgte bei den klinisch unauffälligen Pferden im Rahmen von Routineuntersuchungen, bei den neurologisch unauffälligen Pferden unmittelbar vor der Euthanasie und bei den zentralnervös erkrankten Pferden direkt vor der Narkoseeinleitung. Das Blut wurde aus der V. jugularis mit einer Kanüle bzw. direkt aus dem frisch gelegten Venen-Verweilkatheter entnommen.

3.2.2 Liquor

Alle Liquorproben wurden durch eine Punktion im Spatium atlanto-occipitale gewonnen. Dazu wurde eine Allgemeinanästhesie in Form einer Kurznarkose durchgeführt und die Pferde in Seitenlage gebracht. Die Tiere der Kontrollgruppe (neurologisch unauffällige Pferde) wurden unmittelbar nach der Punktion euthanasiert.



Abbildung 5: Durchführung der Liquorpunktion in Allgemeinanästhesie beim Pferd - Foto: Grabner 2004

Es wurden sterile Spinalkanülen mit Mandrin (Spinaject in der Größe 1,1 mm x 90 mm) verwendet.

Im Bereich des AOG wurde ein ca. 15 x 15 cm großes Feld geschoren und desinfiziert. Der Kopf wurde in eine rechtwinklige Ventroflexion gebracht. Die exakte Punktionsstelle wurde durch Palpation folgenden Schnittpunktes ermittelt: Die Verbindungslinie (Medianlinie) der Kranialseiten der Atlasflügel kreuzt die Verbindungslinie zwischen Protuberantia occipitalis und Processus spinosus des 2. Halswirbels (Axis).

Die Kanüle wurde langsam entlang der Medianen des Kopfes in Richtung Ventralrand der Nüstern vorgeschoben. Die Druckkontrolle erfolgte durch Abstützen der Kanülen-führenden Hand auf der Zweiten, welche wiederum direkten Kontakt zur Occipitalregion hatte. Das in der Literatur vielfach beschriebene Krepitationsgeräusch beim Durchdringen der Dura mater und das darauf folgende leichte „Puff“- Geräusch bei Erreichen des Cavum subarachnoidale (Johnson und Constantinescu, 2000) ist häufig nicht vorhanden. Bei sehr langsamen Vordringen der Kanüle und mehrfachen Probeziehen des Mandrins ist dies aber auch nicht essentiell. Der Liquor, der bei allen Pferden spontan abtropfte, wurde in sterilen Probengefäßen aufgefangen. Danach wurde die Kanüle mit Mandrin gezogen und die Punktionsstelle steril abgedeckt.

3.2.3 Probenaufbewahrung

Die Serum- und Liquorproben wurden aliquotiert, bei -20°C eingefroren und bis zur Untersuchung aufbewahrt.

3.3 Durchführung der Proteinbestimmung

Von den Serum- und Liquorproben wurden jeweils der Gesamtprotein- und Hämoglobingehalt bestimmt, sowie ein Western Blot und eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung angefertigt. Anschließend wurde die massenspektrometrische Untersuchung mittels SELDI-TOF-MS durchgeführt.

3.3.1 Serum- und Liquorproteinbestimmung

Serumprotein

Der Gesamtproteingehalt im Serum wurde im Labor der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin mit dem Konelab-Analysegerät der Firma Thermo Electron Oy gemessen. Es wurde das Totalprotein-Reagenz der Firma Konelab verwendet. Die Proteine bilden hierbei einen farbigen Komplex mit Kupfer-Ionen in alkalischen Lösungen. Die Bildung des Komplexes wird bei 540 nm gemessen.

Liquorprotein

Der Gesamtproteingehalt im Liquor wurde ebenfalls im Labor der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin mit dem Konelab-Analysegerät der Firma Thermo Electron Oy gemessen. Das zur Messung verwendeten U/CSF Protein-Reagenz von Konelab beruht auf der Pyrogallolrot-Methode, bei der Pyrogallolrot-Molybdatkomplexe an die Proteine gebunden werden. Die gebildete Farbe ist proportional zur Proteinkonzentration und wird per Extinktion gemessen.

3.3.2 Hämoglobinbestimmung

Der Hämoglobingehalt der Serum- und Liquorproben wurde semiquantitativ mit dem Combur-3-Test E der Firma Roche Diagnostics untersucht. Hämoglobin katalysiert die Oxidation eines Indikators durch das im Testpapier enthaltene Hydroperoxid. Der Ablesebereich beträgt 5 bis ca. 250 Erythrozyten/ μ l bzw. dem dieser Erythrozytenzahl entsprechenden Hämoglobinmenge. Die Richtigkeit beträgt laut Herstellerangaben im Vergleich zur Kammerzählung 90%.

3.3.3 Gelelektrophorese

Zur visuellen Veranschaulichung und zu einem Vergleich der Analysemethoden wurden von einigen Serum- und Liquorproben Gelelektrophoresen mit anschließender Silberfärbung angefertigt.

Natriumdedecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sowohl für den immunologischen Nachweis von Proteinen mittels Western Blot als auch für eine Silberfärbung ist die Auftrennung der Serum- bzw. Liquorproteine mittels Gelelektrophorese notwendig. Die vertikale Elektrophorese wurde in Mini-Protean® III (Fa. BioRad, München) mit 83 x 73 x 5 mm großen SDS-Gelen durchgeführt. Die Präparierung der Gele erfolgte nach dem Prinzip von LAEMMLI (1970). Das Trennungsgel war ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (PAG), bestehend aus 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 in 0,1% w/v SDS, 121 g/l Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,76 ml/l TEMED und 0,5 g/l Ammoniumpersulfat. Das 3%ige Sammelgel bestand aus 50 mM Tris-HCl, pH 6,8 in 0,1% w/v SDS, 39,9 g/l Acrylamid/Bisacrylamid, 1 ml/l TEMED und 0,5 g/l Ammoniumpersulfat. Die Serumproben wurden im Verhältnis 1:200 und die Liquorproben im Verhältnis 1:1 mit einem Probenpuffer (125 mM Tris, 20% Glycerol, 2% SDS, 2% 2-Mercaptoethanol; pH 6,8) gemischt und zur vollständigen Denaturierung 5 min im Wasserbad bei 95 °C erhitzt. Pro Gelslot wurden 7 µl der behandelten Proben aufgegeben. Je Gel kam zusätzlich ein kommerzieller Molekulargewichtsstandard (Silver Stain Standard Low Range; BioRad) in einem oder zwei Slots hinzu. Die Elektrophorese wurde für ca. 1 Stunde bei konstanter Stromstärke von 40 mA fortgeführt. Der Elektrodenpuffer setzte sich aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% w/v SDS, pH 8,3 zusammen.

Die Proteinbanden wurden anschließend durch eine Silbernitratfärbung nach (Heukeshoven und Dernick, 1988) angefärbt.

3.3.4 Western Blot

Der immunologische Nachweis von SAA, TTR und RBP wurde im Anschluss an die Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE mittels Western-Blot-Technik durchgeführt. Durch das Transblot-Verfahren (Mini Trans-Blot™; BioRad) wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF, Immobilon; Fa. Millipore Corp., Bedford, USA) bei konstanter Spannung von 100 V und max. 400 mA unter Kühlung überführt. Der Transferpuffer bestand aus 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,038% SDS und 20% Methanol. Nach dem Blotting von einer Stunde wurde die Membran kurz in einem TBS-Tween-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20; pH 7,5) gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurde die Membran eine Stunde in dem TBS-Tween-Puffer mit

5% Magermilchpulver (Roth) behandelt. Für den Nachweis von RBP wurde anschließend die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten vom Kaninchen stammendes Antiserum gegen humanes Serum-RBP (Code Nr. A0040, Dako Diagnostika, Hamburg) über 60 min inkubiert. Das Antiserum wurde 1:100 in einem TBS-Tween Puffer mit 0,5% Magermilchpulver (0,05% Tween20) verdünnt. Humanes Blutserum wurde als Positivkontrolle auf jedem Blot mitgeführt. Nach einer kurzen Waschung mit 0,1%igen TBST-Puffer erfolgte die Inkubation mit einem HRP konjugierten ENVISION-Immunglobulin (Dako Diagnostika, Hamburg), welches mit dem gleichen Puffer 1:20 verdünnt wurde. Vor der abschließenden Detektion wurde die Membran dreimal für 10 min mit einem TBST-Puffer (0,3% Tween20) gereinigt. Die Detektion der RBP-Banden erfolgte durch Chemilumineszenz mit dem Luminol-Reagenz (Chemiluminescence Detektion Kit, Boehringer Mannheim, Mannheim) in dem Flour-STM Multimager (BioRad). Auf eine Computergestützte Auswertung wurde verzichtet, da es hier lediglich um den Nachweis des Vorhandenseins der Proteine ging.

Zum Nachweis von TTR wurde mit derselben Methode zuerst ein ebenfalls vom Kaninchen stammendes Antiserum gegen humanes Serum-TTR (Code Nr. A0002, Dako Diagnostika, Hamburg) mit einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Bei dem zweiten Antikörper handelte es sich um ein Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin (Code Nr. P0217, Dako Diagnostika, Hamburg), der 1:500 verdünnt wurde.

3.3.5 SELDI-TOF-MS

Das Peptid- und Proteinmuster der Serum- und Liquorproben wurde mittels SELDI -TOF- MS (surface enhanced laser desorption/ionisation -time of flight - mass spectrometry) der Firma Ciphergen Biosystems untersucht.

Die SELDI-TOF Massenspektrometrie ist eine Kombination von Chromatographie und Massenspektrometrie. Bestimmte Proteine der Proben werden auf einer spezifisch ausgewählten Oberfläche eines Metallchips gebunden, wohingegen nicht gebundene Proteine durch verschiedene Waschschriffe entfernt werden. Die verbleibenden Proteine werden dann durch einen Laser ionisiert und von der Oberfläche des Chips abgelöst. Je nach Stärke der Ionisation sowie der Masse des Moleküls unterscheidet sich die Flugzeit bis zu einem Detektor, der diese Daten verwertet und als Ergebnis ein Chromatogramm mit den dazugehörigen Molmassen ausgibt.

Umso kleiner die Proteine sind, desto geringer ist die benötigte Flugdauer. Das errechnete Ergebnis wird in einem Graphen dargestellt, der auf der x-Achse die Molmassen der Proteine und auf der y-Achse die Signalintensität angibt. Diese erhöht sich mit zunehmender Proteinkonzentration. Die sichtbaren Signale werden als „Peaks“ bezeichnet.

Für die Analyse der Serum- und Liquorprofile wurde ein SAX Chip (Fa. CIPHERGEN Biosystem, Fremont, CA, USA) verwendet. Der SAX ist ein starker Anionenaustauscher, dessen aktive Spots kationische quaternäre Aminosäuregruppen, enthalten, die mit den negativen Oberflächenladungen der Proteine mit niedrigem isoelektrischem Punkt interagieren. Zunächst wurden die Chips mit einem Bindungspuffer (Tris HCl 0,1M; pH 8,5; 0,02% Triton X-100) vorbehandelt, was die selektive Bindungsfähigkeit erhöht. Anschließend wurde auf jedem Spot im On-Spot-Verfahren 7µl jeder Probe aufpipettiert. Das Serum wurde vorher 1:10 mit einem Tris-HCl-Puffer verdünnt, wohingegen der Liquor aufgrund der niedrigeren Viskosität und des geringeren Gesamtproteins unverdünnt analysiert werden konnte. Die Proben wurden dann 1h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Spots mittels Pipette mit Tris-HCl-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen.

Nach einer 5-10 minütigen Trocknungsphase wurde abschließend als Matrix 1µl einer gesättigten EAM-Lösung (engl. energy-absorbing molecule; Sinapinsäure in 50% Acetonitril und 0,5% Trifluoressigsäure) auf jeden Spot pipettiert und getrocknet. Die getrocknete Matrix bildet ein Kristallgitter, in dem die Proteine eingeschlossen sind. Die Kristalle absorbieren die Laserenergie und geben die ionisierten Proteine ab.

Schließlich wurden die Proben im ProteinChip System (PBS II Serie; CIPHERGEN) analysiert. Dazu wurden die Spots mit einem Nitrogenlaser in einer Stärke von 3000 V und 680 ns, sowie einer Wiederholungsrate von 10 HZ unter Vakuum beschossen. Die Proteine werden dadurch von der Oberfläche abgelöst und gleichzeitig ionisiert. Durch einen Teilchenbeschleuniger werden sie dann gebündelt und in Richtung eines Detektors beschleunigt. Die geladenen Proteine werden von dem Detektor mit Hilfe der TOF-Analyse bestimmt und ihren Molmassen zugeteilt. Für die Beurteilung der Proteine zwischen 4 und 20 kDa wurden die Spots mit einer Laserintensität von 250 und für die Beurteilung des Spektrums zwischen 20 und 80 kDa mit einer Intensität von 280 beschossen. Die Spektren werden im positiven Ionenmodus gesammelt und mit der CIPHERGEN Peak Software (Version 3.2) ausgewertet.

Zur Kalibrierung der Molmassen wurde ein Standard bestehend aus Cytochrome C (equine cardiac 12360,1 Da), Myoglobin (equine cardiac 16951,5 Da) und Albumin (Rinderserum 66433 Da) verwendet. Dieser wurde auf den jeweils ersten Spot der Chips aufgetragen. Die Peaks dieses Standards wurden anhand der angegebenen Massen und die restlichen Proben des Chips so dann wiederum anhand dieses Standards kalibriert

In die Auswertung wurden Peaks einbezogen, deren Amplitude 3-fach höher als das mittlere Hintergrundrauschen und deren höchster Punkt (Top) eindeutig zu ermitteln war.

4 Ergebnisse

4.1 Gesamtprotein und Hämoglobin

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Messung des Gesamtproteins in Serum und Liquor der neurologisch unauffälligen Pferde, sowie der semiquantitativen Hämoglobinbestimmung im Liquor dieser Pferde ersichtlich. Die Identität der Pferde ist mit 1 – 19 in der linken Spalte angegeben.

Die Gesamtproteinkonzentration ist in Serum und Liquor in g/l angegeben. Die Referenzwerte betragen im equinen Serum 55 – 73 g/l und im Liquor < 0.5 g/l.

Tabelle 7: Gesamtprotein(GP) und Hämoglobin(HB) der neurologisch unauffälligen Pferde

Identität	GP Serum g/l	GP Liquor g/l	Hb Liquor
1	59.8	0.33	neg
2	62.7	0.41	neg
3		0.81	neg
4	70.6	0.39	neg
5	89.6	1.42	>200
6	58.2	0.89	>200
7	75.9	0.36	ca 10
8	53.9	0.23	neg
9	37.5	1.15	ca 25
10	44.7	0.87	neg
11	70.4	1.7	neg
12	55.2	0.47	ca 10
13	53.3	0.49	neg
14	66.1	0.6	neg
15	57.7	0.92	neg
16	71.1	2.03	neg
17	60.8	1.08	neg
18	65.4	0.78	neg
19	60.2	0.23	ca 25

Hämoglobinbestimmung:

Angegeben sind ist die Anzahl der Erythrozyten, die der Hämoglobin-Menge entsprechen:
 Weiß: negativ; gelb: Hb-Gehalt von ca 10 Erys/ μ l; hellgrün: Hb-Gehalt von ca 25 Erys/ μ l;
 mittelgrün: Hb-Gehalt von ca 50 Erys/ μ l; Dunkelgrün: Hb-Gehalt von > 200 Erys/ μ l

Tabelle 8: Gesamtprotein(GP) und Hämoglobin(Hb) der zentralnervös erkrankten Pferde

Identität	GP Serum g/l	GP Liquor g/l	Hb Liquor
A		1.29	neg
C		0.87	neg
D		0.13	>200
E		0.24	ca 10
F	79.0	0.37	ca 10
G		0.37	neg
H	69.1	0.34	neg
I	62.3	0.99	neg
J	63.5	0.48	neg
K	49.5	2.54	>200
L	69.3	0.33	ca 10
M	78.9	1.44	neg
N	75.3	1.59	ca 10
O	68.0	0.22	neg

4.2 Proteinanalyse

Bei einigen prominenten Peaks wurden, aufgrund der zugeordneten Molmasse und Erfahrungen aus anderen Studien bei unterschiedlichen Spezies, bestimmte entsprechende Proteine vermutet. Diese Proteine wurden daraufhin mittels unterschiedlicher Nachweismethoden identifiziert.

4.2.1 Serumamyloid A

Die Vermutung, dass es sich bei diesem Peak um das Serumamyloid A handelt, konnte mittels eines Antikörper-Chips bestätigt werden. Dazu wurden Serum- und Liquor-Proben mit besonders hohen Intensitäten des Proteins 18 ausgesucht. Die Peaks des AK-Chips waren nahezu identisch mit den mittels SAX-Chip erworbenen Peaks.

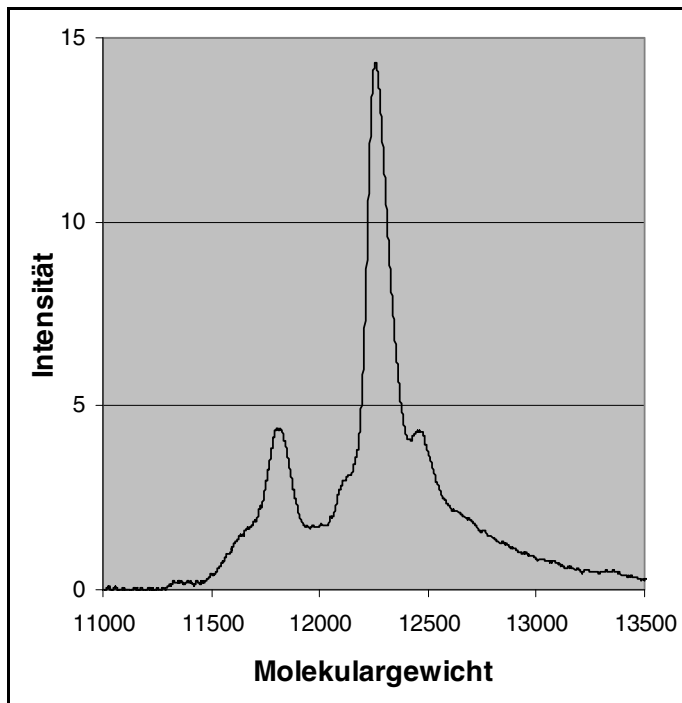


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung des Serumamyloid A aus equinem Serum mittels Massenspektrometrie nach selektiver Anreicherung auf einem Antikörper-Chip

4.2.2 Transthyretin

Das Vorhandensein von TTR konnte durch einen Western Blot nachgewiesen werden. Es zeigt sich eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem im Serum und Liquor vorhandenen TTR.

Linkes Gel: Liquorbanden stellen sich aufgrund der wesentlich geringeren Konzentration nur sehr schwach dar. Am linken Rand ist der TTR-Standard zu erkennen.

Rechtes Gel: Schwächere Serum- und deutlichere Liquorbanden abwechselnd. Rechts im Bild der TTR-Standard.

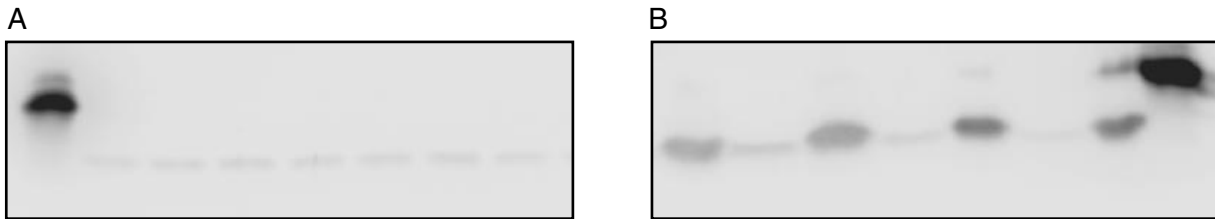


Abbildung 7: Mittels Western Blot erzeugte TTR-Banden im Serum(A) und Liquor(B)

Im SELDI-TOF-MS Spektrum sind zudem deutliche Peaks zu erkennen (siehe 4.3.3 Peak 20 und 5.4 TTR), die bezüglich der Molmasse annähernd den Daten von Proteindatenbanken entsprechen (SwissProt, 2006) und zudem die in der Literatur beschriebene typische Morphologie aufweisen (Gericke et al., 2005).

4.2.3 Retinol-Bindungs-Protein

Mittels Western Blot (siehe Kapitel 3.3.4) konnte RBP sowohl im Serum (linkes Bild) als auch im Liquor (rechtes Bild) nachgewiesen werden.

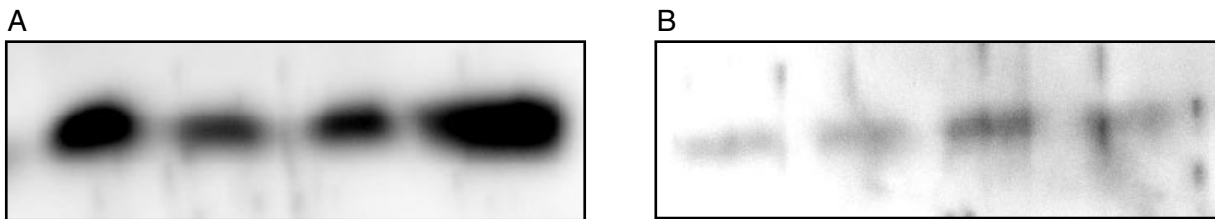


Abbildung 8: Mittels Western Blot erzeugte RBP-Banden im Serum(A) und Liquor(B)

Im Proteinspektrum des SELDI-TOF-MS finden sich bei den Menschen und Pferden Peak 22 (siehe 4.3.1) der in diesem Molekularbereich fällt. Die Massendifferenzen zu den Angaben der SwissProt-Datenbank beruhen auf technischen Ursachen wie Messungenauigkeit und Kalibrierung (siehe 5.3: Kalibrierung)

4.2.4 Albumin

Albumin als Hauptfraktion der Serumproteine ist bei Säugetieren in der Massenspektrometrie aufgrund der hohen Konzentration als besonders prominenter Peak mit charakteristischer Form im Bereich von 66 kDa zu erkennen. Somit kann auch ohne weitere Proteinidentifizierung davon ausgegangen werden, dass Peak 28 dem Albumin zuzuordnen ist.

4.3 SELDI-TOF-MS

Bei der massenspektrometrischen Analyse von Serum und CSF mit Hilfe von SAX-Chips wurden in allen Gruppen im Bereich von 4 und 80 kDa Proteinpeaks analysiert. Die genaue

Anzahl der Proteine lässt sich nicht bestimmen, da es u.a. bei einigen Peaks schwer zu differenzieren ist, ob es sich um einen Peak mit mehreren Gipfeln, also ein einziges Protein handelt. Oder es sind mehrere dicht beieinander liegende Proteine, also Proteine mit sehr ähnlichen Massen.

Doppelladung:

In den Kommentaren zu den einzelnen Tabellen steht bei einigen Peaks das Wort „Doppelladung“. Es bedeutet, dass dieser Peak kein eigenständiges Protein darstellt, sondern aufgrund einer Technischen Ursache lediglich das halbe Molekulargewicht des Originalpeaks bzw. -proteins darstellt. Dieses Phänomen ist in der Diskussion im Abschnitt 5.4 eingehender erläutert.

Im Folgenden werden die Proteinpeaks mit aufsteigendem Molekulargewicht beschrieben und zum Teil auch schon kommentiert, um die Übersichtlichkeit in der Diskussion zu verbessern. Die Tabellen ermöglichen einen Überblick über die grundlegenden Daten der Peaks:

Anzahl bzw. Prozent:

Die Anzahl bzw. der prozentuale Anteil der Pferde einer Gruppe, bei denen der Peak mittels der CIPHERGEN Software auswertbar ist. Bei den restlichen Pferden ist der Peak oftmals zwar zu erkennen, aber aufgrund eines zu geringen Signal/Rausch (S/N) -Verhältnisses nicht auswertbar.

MW Masse:

Hier ist der Mittelwert der Molekulargewichte der einzelnen Proben einer Gruppe verzeichnet.

STABW M.:

Die Standardabweichung der Molekulargewichte dient in dieser Arbeit lediglich dazu, eine Vorstellung über den Schwankungsbereich der Molekulargewichte innerhalb einer Gruppe zu vermitteln. Die zum Teil sehr hohen Standardabweichungen kommen zum einen dadurch zustande, dass die Peaks oftmals keinen eindeutig höchsten Punkt (Gipfel) haben, d.h. der Gipfel stellt sich als kleines Plateau dar oder ist gezackt. Zum anderen zeigen die Peaks aber auch häufig echte Massenabweichungen, d.h. sie sind innerhalb der Gruppen leicht verschoben. Die Morphologie der einzelnen Peaks ist jeweils in den Texten beschrieben, die den Tabellen angegliedert sind.

MW Int.:

Der Mittelwert der Intensitäten der jeweiligen Peaks einer Gruppe soll ebenfalls nur einen ungefähren Eindruck über die Stärke der Signale eines Proteins ermöglichen. Er wird teilweise durch einzelne extrem hohe Werte stark beeinflusst. Die Intensität eines Peaks ist keinesfalls genau proportional zur Menge des jeweiligen Proteins in einer Probe. Deutliche Intensitätsunterschiede lassen hingegen zumindest richtungweisende Interpretationen zu.

Während des Lesens der Kapitel 4.3.1 bis 4.3.3 können die jeweils entsprechenden SELDI-TOF-MS Grafiken auf S. 111 bis S. 120 ausgeklappt werden. So ist ein direkter Vergleich des Textes und der Tabellen mit dem dazugehörigen Peakmuster möglich.

4.3.1 Vergleich des Proteinmusters im Serum von Pferd und Mensch

Um einen Überblick über das physiologische Peakmuster klinisch gesunder Pferde zu bekommen wurde zunächst das Serum der 8 klinisch unauffälligen Pferde mit dem von 8 gesunden Menschen verglichen. Dabei stellten sich zum Teil erhebliche Unterschiede heraus, sowohl was die Massen, als auch die Anordnung und Morphologie der Proteinpeaks betrifft.

Es wurden insgesamt 37 Peaks analysiert, wobei 10 davon nur beim Pferd und 8 Peaks nur beim Menschen auftraten. Die auswertbaren Peaks bzw. die ihnen entsprechenden Proteine sind anhand der Gruppe der klinisch unauffälligen Pferde durchnummeriert. Die Peaks, die nur beim Menschen auftraten und denen kein entsprechender Peak beim Pferde zuzuordnen war, wurden mit dem Kürzel „Me“(Mensch) und gesonderter Durchnummerierung versehen.

Die gemeinsame Auflistung zweier Proteine in den Tabellen bedeutet also nicht, dass es sich automatisch um das entsprechend gleiche Protein der anderen Spezies handelt. Gerade die Massenunterschiede sind zum Teil so erheblich, dass dies oft sehr fraglich scheint. Bei großen Massenunterschieden befinden sich neben den Tabellen zumeist Erklärungen, warum die entsprechenden Proteine gemeinsam aufgelistet sind. Neben ähnlichen Masseverhältnissen waren vor allem auch die Anordnung oder Nähe zu anderen Peaks und die Morphologie entscheidend, ob ein Zusammenhang vermutet und somit zwei Peaks gemeinsam in einer Tabelle aufgelistet wurden.

Peak 1

Tabelle 9: Daten Peak 1 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	5	2
MW Masse.	4169 Da	4177 Da
STABW M.	12,5	2,1
MW Intens.	4,5	5,2

Dies ist der kleinste auswertbare Peak bei Pferd und Mensch im Spektrum 4 – 80 kDa.

Peak 2

Tabelle 10: Daten Peak 2 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	6	4
MW Masse.	4549 Da	4493 Da
STABW M.	15,9	2,7
MW Intens.	5,4	4,9

Dieser Peak ist zwar bei allen Menschen zu erkennen, aber nur bei 50% auswertbar.

Peak 3

Tabelle 11: Daten Peak 3 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	0
MW Masse.	4726 Da	
STABW M.	11,7	
MW Intens.	32,5	

In diesem Bereich ist bei den Menschen kein Peak zu erkennen. In der Gruppe der Pferde erscheint er sehr prominent und hat eine tiefe und eng anliegende rechte Schulter.

Peak 4

Tabelle 12: Daten Peak 4 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	6 / 6	0
MW Masse.	4884/4930 Da	
STABW M.	7,5 / 4,5	
MW Intens.	5,9 / 6,8	

Dieser Peak hat bei den Pferden zwei dicht aufeinander folgende, etwa gleich hohe Gipfel.

Peak 5

Tabelle 13: Daten Peak 5 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	7	8
MW Masse.	5094 Da	5070 Da
STABW M.	50,5	12,9
MW Intens.	5,9	6,2

Dieser Peak ist extrem inhomogen in seiner Form und in der Masse, da durch eine unregelmäßige Oberlinie der Gipfel nicht immer genau zu definieren ist:

Peak 6

Tabelle 14: Daten Peak 6 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	8
MW Masse.	5552 Da	5763
STABW M.	14,8	4,6
MW Intens.	40,0	44,0

Ähnlichkeit ihrer Morphologie und Lage ist zu vermuten, dass es sich prinzipiell um das gleiche Protein handelt.

Zwar sind bei diesem Peak zwischen Pferd und Mensch sehr starke Massenunterschiede deutlich, jedoch werden sie hier in einer Tabelle miteinander verglichen. Aufgrund der

Peak 7

Tabelle 15: Daten Peak 7 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	8
MW Masse.	5762 Da	5901 Da
STABW M.	12,3	14,8
MW Intens.	7,9	13,9

breiter und dadurch die Isolation von Peak 6 nicht so stark wie beim Pferd. Beide Peaks zeigen wiederum dicht dahinter einen weiteren sehr kleinen und flachen Peak, der beim Pferd wiederum isoliert und beim Mensch eher als flache Schulter erscheint.

Sowohl bei den Pferden als auch im Spektrum der Menschen ist dicht hinter Protein 6 dieser Peak zu erkennen. In der Gruppe der Menschen ist Peak 7 etwas

Peak Me 1

Tabelle 16: Daten Peak Me 1 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	0	8
MW Masse.		6465 Da
STABW M.		5,1
MW Intens.		44,0

In diesem Massebereich ist bei den Pferden allenfalls ein sehr kleiner Peak zu erahnen.

Peak Me 2

Tabelle 17: Daten Peak Me 2 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	0	8
MW Masse.		6665 Da
STABW M.		4,5
MW Intens.		60,4

siehe Me 1

Peak Me 3

Tabelle 18: Daten Peak Me3 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	0	8
MW Masse.		6871 Da
STABW M.		5,9
MW Intens.		17,2

siehe Me 1

Peak Me 1, 2 und 3 folgen sehr dicht hintereinander.

Peak 8

Tabelle 19: Daten Peak 8 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	7	0
MW Masse.	7012 Da	
STABW M.	21,8	
MW Intens.	5,8	

Peak 8 ist der erste aus einer Gruppe von drei Peaks, die eine gemeinsame Basis haben. Keiner dieser Peaks ist bei den Menschen zu erkennen.

Peak 9

Tabelle 20: Daten Peak 9 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	6	0
MW Masse.	7132 Da	
STABW M.	9,3	
MW Intens.	7,0	

Peak 10

Tabelle 21: Daten Peak 10 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	0
MW Masse.	7338 Da	
STABW M.	13,7	
MW Intens.	8,0	

Dieser Peak ist der prominenteste in der Peakgruppe.

Peak 11

Tabelle 22: Daten Peak 11 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	7	0
MW Masse.	7665 Da	
STABW M.	8,1	
MW Intens.	3,2	

Peak Me 4

Tabelle 23: Daten Peak Me 4 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	0	8
MW Masse.		7792 Da
STABW M.		5,1
MW Intens.		10,2

Peak Me 5

Tabelle 24: Daten Peak Me 5 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	0	4
MW Masse.		7998 Da
STABW M.		2,9
MW Intens.		5,0

Dieser Peak ist dicht hinter Me 4. Danach folgt noch ein kleiner und undeutlicher Peak.

Peak 12

Tabelle 25: Daten Peak 12 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	0
MW Masse.	8096 Da	
STABW M.	14,2	
MW Intens.	3,6	

Peak 13

Tabelle 26: Daten Peak 13 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	6/ 8	0
MW Masse.	8262/8345 Da	
STABW M.	16,1 / 20,0	
MW Intens.	4,0 / 2,7	

Peak 13 ist ein Doppelpeak bzw. ein Peak mit 2 Gipfeln.

Peak 14

Tabelle 27: Daten Peak 14 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	0
MW Masse.	8517 Da	
STABW M.	13,8	
MW Intens.	4,4	

Protein 14, 15 und 16 folgen dicht hintereinander. Durch die hohen STABW ist die Zuordnung der Peaks nicht immer ganz eindeutig.

Peak 15

Tabelle 28: Daten Peak 15 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	8
MW Masse.	8788 Da	8951 Da
STABW M.	12,1	5,8
MW Intens.	10,1	10,9

Hier ist wiederum ein sehr großer Massenunterschied, doch spricht die Ausprägung des Peaks, sowie die Anordnung der unmittelbar folgenden Peaks dafür, dass es sich um das

gleiche Protein handeln könnte.

Peak 16

Tabelle 29: Daten Peak 16 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	4 / 6	8
MW Masse.	8996/9081 Da	9158 Da
STABW M.	5,7 / 31,1	6,9
MW Intens.	2,4 / 3,3	4,0

Bei den Pferden sind zwei Gipfel zu sehen, wobei bei einigen Pferden der rechte und bei einigen Pferden der linke dominant ist.

Peak 17

Tabelle 30: Daten Peak 17 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	8
MW Masse.	9427 Da	9445 Da
STABW M.	18,3	13,5
MW Intens.	1,5	4,1

Peak Me 6

Tabelle 31: Daten Peak Me 6 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	0	2
MW Masse.		10084 Da
STABW M.		4,2
MW Intens.		2,3

Peak Me 7

Tabelle 32: Daten Peak Me 7 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	0	4
MW Masse.		10282 Da
STABW M.		3,6
MW Intens.		1,2

Peak Me 8

Tabelle 33: Daten Peak Me 8 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	0	4
MW Masse.		11742 Da
STABW M.		7,4
MW Intens.		0,3

Im Vergleich mit Molmassen aus Proteindatenbanken handelt es sich bei diesem Peak vermutlich um das Serumamyloid A (siehe 5.4). Dazu passt die geringe Intensität dieses

Entzündungsproteins bei den gesunden Individuen.

Peak 18

Tabelle 34: Daten Peak 18 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	3
MW Masse.	12616 Da	12326 Da
STABW M.	16,0	21,0
MW Intens.	0,7	1,4

An dieser Stelle sind extreme Unterschiede zu finden. Bei den Menschen erstreckt sich ein sehr breiter (von 12070 bis 13550 Da) und unregelmäßiger Peak, dessen Gipfel teils an der linken Seite und teils weiter rechts liegt. Die Pferde hingegen zeigen in diesem Bereich einen sehr spitz zulaufenden, vergleichsweise homogenen und kleinen Peak. Aufgrund der extrem unterschiedlichen Morphologie der Peaks zwischen den beiden Spezies ist zu vermuten, dass es sich nicht um das gleiche Protein handelt.

Peak 19

Tabelle 35: Daten Peak 19 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	5	0
MW Masse.	13113 Da	
STABW M.	46,4	
MW Intens.	0,9	

Dieser Peak ist bei den Pferden deutlich abgesetzt von dem nächst folgenden großen Peak.

Peak 20

Tabelle 36: Daten Peak 20 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	8
MW Masse.	13905 Da	14103 Da
STABW M.	9,6	22,3
MW Intens.	2,9	2,4

Bei den Pferden hat Peak 20 zu beiden Seiten eine steile und eng anliegende Schulter. Auch bei den Menschen ist auf beiden Seiten eine Schulter vorhanden, wobei die linke eng anliegend, die rechte Schulter jedoch breiter und stärker abgesetzt ist (MW 14690 Da, Int. 0,9). Die Molmasse sowie die typische Morphologie deuten darauf hin, dass es sich hierbei um das Transthyretin handelt, dessen Vorhandensein mittels Western Blot bestätigt werden konnte (siehe 5.4.).

Peak 21

Tabelle 37: Daten Peak 21 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	8
MW Masse.	17241 Da	17341 Da
STABW M.	16,7	59,6
MW Intens.	0,6	1,0

sein.

In beiden Gruppen ist der Gipfel des Peaks nicht spitz zulaufend, wodurch die hohen STABW auftreten. Dieser Peak scheint lediglich die Doppelladung von Peak 26b zu

Peak 22

Tabelle 38: Daten Peak 22 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	7	8
MW Masse.	21858 Da	22176 Da
STABW M.	20,1	19,3
MW Intens.	1,3	1,3

Die Molmasse lässt vermuten, dass es sich hier um RBP handelt, welches mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte.

Peak 23

Tabelle 39: Daten Peak 23 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	7	8
MW Masse.	26147 Da	25405 Da
STABW M.	43,1	118,4
MW Intens.	0,6	1,3

Ob diese beiden Peaks dem gleichen Protein entsprechen bleibt unklar. Die Morphologie und Lage der Peaks zu der nächsten prominenten Peakgruppe ist sehr ähnlich.

Peak 24

Tabelle 40: Daten Peak 24 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	8
MW Masse.	27593 Da	28038 Da
STABW M.	23,7	19,0
MW Intens.	3,1	5,4

In beiden Gruppen hat der Peak eine tief angesetzte rechte Schulter.

Peak 25

Tabelle 41: Daten Peak 25 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	4	8
MW Masse.	31105 Da	30211 Da
STABW M.	21,7	134,1
MW Intens.	3,4	2,3

Bei diesem Peak handelt es sich um die Doppelladung von Peak 27. Bei den Menschen ist die Masse wesentlich kleiner und der Peak somit deutlicher abgesetzt von den nächsten beiden Peaks. Die hohe STABW kommt durch zwei „Ausreißer“, die einmal eine deutlich höhere und einmal eine deutlich niedrigere Masse aufweisen. Bei den Pferden ist dieser Peak schon in den linken Basisbereich des folgenden Peaks integriert.

Peak 26a

Tabelle 42: Daten Peak 26a Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	8
MW Masse.	32739 Da	33239 Da
STABW M.	39,7	22,5
MW Intens.	8,1	7,9

Bei diesem Peak ist zwar wieder ein deutlicher Massenunterschied, doch sticht er in beiden Gruppen durch seine vergleichsweise hohe Intensität und spitze Form deutlich hervor. Dieser Peak stellt die Doppelladung des Peak 28 (Albumin) dar.

Peak 26b

Tabelle 43: Daten Peak 26b Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	7	8
MW Masse.	34049 Da	34188 Da
STABW M.	229,9	15,3
MW Intens.	7,8	3,0

Bei beiden Spezies folgt dieser Peak sehr dicht hinter 26a, doch ist die Morphologie jeweils sehr unterschiedlich. Bei den Menschen ist er als spitze, gut abgesetzte rechte Schulter von Peak 26a mit eigenem Gipfel ausgeprägt. Bei den Pferden hingegen ist die Intensität wesentlich höher und der Peak breiter und unregelmäßiger in der Form, was auch die sehr hohe STABW erklärt. Teilweise ist hier Peak 26b sogar dominierender als 26a.

Peak 27

Tabelle 44: Daten Peak 27 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	7	8
MW Masse.	62645 Da	60997 Da
STABW M.	94,6	209,0
MW Intens.	6,3	2,4

Bei den Menschen ist dieser Peak eigenständig und immer deutlich abgesetzt vom nächsten Peak (Albumin). In der Gruppe der Pferde ist die Masse wesentlich größer und der Peak somit dichter am Albuminpeak. Hier ist der Peak teilweise noch selbstständig, aber bei einigen Pferden auch als abgesetzte linke Schulter des Albumins ausgeprägt. Bei dem nicht aufgeführten Pferd ist die Masse mit 59819 Da wesentlich niedriger als bei den anderen Pferden und somit eher der Masse des humanen Albumins entsprechend.

Peak 28

Tabelle 45: Daten Peak 28 Pferd/Mensch

	Pferde	Menschen
Anzahl	8	8
MW Masse.	65354 Da	66389 Da
STABW M.	76,7	39,4
MW Intens.	18,3	32,6

Der ausgeprägte Peak bei ca. 65000 Da ist bei fast allen Säugetieren charakteristisch für das Albumin. Die Pferde besitzen eine abfallende bis auslaufende rechte Schulter des Albumins, wohingegen diese bei den Menschen allenfalls nur noch zu erahnen ist.

4.3.2 Vergleich des Proteinmusters im Serum von unterschiedlichen Equiden

In das Patientengut der zentralnervös erkrankten Pferde war zunächst auch ein Esel inkludiert. Als beim Vergleich des Proteinmusters mit dem der Pferde jedoch auffiel, dass das Spektrum des Esels sich teilweise erheblich von dem der Pferde unterscheidet, wurde der Esel aus der Liquorstudie heraus genommen. Es wurde der Entschluss gefasst, das Proteinmuster im Serum unterschiedlicher Equiden, (Pferden, Maultieren und Eseln) genauer zu untersuchen bzw. zu vergleichen.

Silberfärbung

In der Silberfärbung sind zwischen den Equiden keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Links sind die Banden von drei Eseln, in der Mitte die Banden dreier Maultiere und rechts die Banden dreier Pferde zu sehen. Lediglich in einem Bereich von ca. 21500 Da ist bei den Pferden eine Bande deutlich zu erkennen, die bei den anderen Spezies nur sehr undeutlich vorhanden ist.

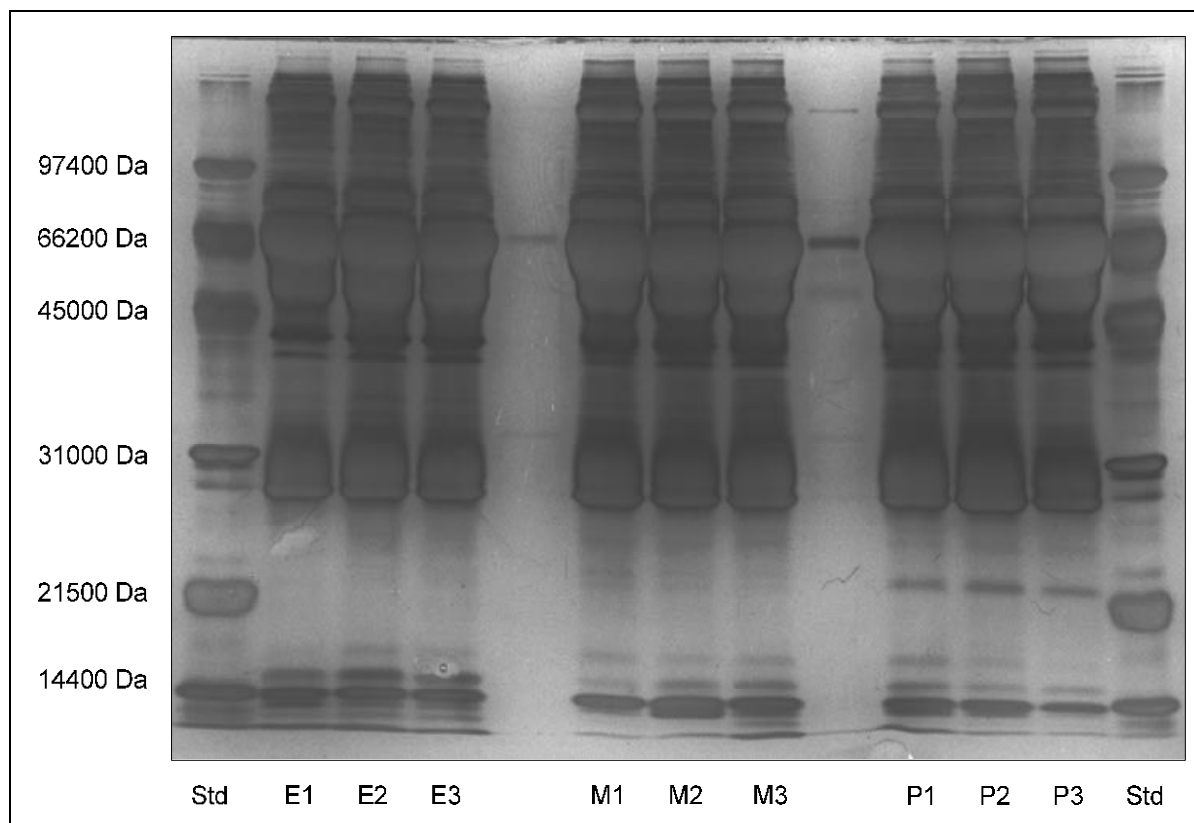


Abbildung 9: Vergleichende Gegenüberstellung des Proteinmusters im Serum von Esel(E), Maultier(M) und Pferd(P) nach SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung

SELDI-TOF-MS

Im Bereich 4 – 80 kDa konnten insgesamt 35 Peaks mit einem S/N > 3 ausgewertet werden, wobei hiervon 18 Peaks bei allen drei Equiden vorkommen. Bei den Pferden waren es insgesamt 29 Peaks, wobei davon 8 Peaks ausschließlich bei den Pferden und drei Peaks nur bei Pferden und Maultieren vorliegen. Es wurden keine Peaks gefunden, die bei den Pferden und den Eseln, nicht aber den Maultieren vorkommen.

7 Peaks können den Maultieren und Eseln, nicht aber den Pferden zugeordnet werden. Weder die Maultiere, noch die Esel haben spezies-spezifische Peaks.

Verteilung der Peaks bezüglich ihres Auftretens im Vergleich des Proteinmusters der unterschiedlichen Equiden:

Nur bei den Pferden	8 Peaks (5, 8, 9, 10, 19, 23, 25, 26b)
Nur bei den Maultieren	kein Peak
Nur bei den Eseln	kein Peak
Nur bei Pferden und Maultieren	3 Peaks (3, 6, 7)
Nur bei Pferden und Eseln	kein Peak
Nur bei Eseln und Maultieren	7 Peaks (Mu/E 1-7)
Bei allen drei Spezies	18 Peaks (1, 2, 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 26a, 27, 28)

Die Nummerierung der Peaks beim Vergleich der Equiden richtet sich nach der Gruppe der klinisch unauffälligen Pferde. Proteine, die in diesem Vergleich nicht bei den Pferden, wohl aber bei den Maultieren und Eseln auftraten, sind mit „Mu/E“(Maultier/Esels) und eigenständiger Nummerierung gekennzeichnet.

Peak 1

Tabelle 46: Daten Peak 1 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	4	6	6
MW Masse.	4171 Da	4196 Da	4197 Da
STABW MW.	13,0	7,4	11,9
MW Intens.	4,8	3,7	4,6

Dieser Peak ist bei allen drei Spezies zu erkennen. Die Massenunterschiede sind jeweils gering.

Peak Mu1/E1

Tabelle 47: Daten Peak Mu1/E1 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	0	6	6
MW Masse.		4287 Da	4287 Da
STABW M.		6,8	5,6
MW Intens.		3,9	4,9

Bei den Pferden ist in diesem Bereich kein eindeutiger Peak zu sehen. Lediglich die Grundlinie erscheint unruhig.

Peak 2

Tabelle 48: Daten Peak 2 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	4	6	4 / 6
MW Masse.	4540 Da	4567 Da	4563/4600 Da
STABW M.	5,2	6,7	6,4 / 9,6
MW Intens.	5,7	2,7	2,9 / 2,5

Bei den Eseln ist hier ein Doppelpeak zu erkennen.

Peak 3

Tabelle 49: Daten Peak 3 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	5	0
MW Masse.	4723 Da	4749 Da	
STABW M.	5,3	8,0	
MW Intens.	36,2	4,9	

Peak 3 ist bei den Eseln gar nicht zu sehen. Bemerkenswert ist, die im Vergleich zu den Maultieren erheblich höhere Intensität bei den Pferden. Zudem ist bei den Pferden eine tief angesetzte rechte Schulter zu erkennen.

Peak 4

Tabelle 50: Daten Peak 4 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	5 / 5	6	6
MW Masse.	4883/4931 Da	4880 Da	4881 Da
STABW M.	9,2 / 5,1	7,8	6,6
MW Intens.	6,0 / 6,9	5,2	8,2

In der Pferde-Gruppe ist an dieser Stelle ein Doppelpeak vorhanden. Zwischen 5020 und 5200 Da ist außerdem nur bei den Pferden ein sehr breiter und uneinheitlicher Peak vorhanden.

Peak 5

Tabelle 51: Daten Peak 5 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	0	0
MW Masse.	5096 Da		
STABW M.	55,0		
MW Intens.	6,0		

Dieser Peak ist extrem inhomogen in seiner Form und seiner Masse, da die Oberlinie sehr unregelmäßig ist.

Nachfolgend ein Beispiel für zwei Peaks, welche das unterschiedliche Spektrum bei den jeweiligen Spezies besonders gut veranschaulichen: Bei den Eseln ist im selben Spektrumsbereich nur Peak Mu2/E2, bei den Pferden hingegen nur Peak 6 vorhanden. Das Maultier jedoch weist beide Peaks auf.

Peak Mu2/E2

Tabelle 52: Daten Peak Mu2/E2 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	0	6	6
MW Masse.		5451 Da	5454 Da
STABW M.		9,7	6,1
MW Intens.		5,3	15,2

Dieser Peak ist bei den Pferden nicht vorhanden.

Peak 6

Tabelle 53: Daten Peak 6 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	0
MW Masse.	5548 Da	5581 Da	
STABW M.	8,1	8,8	
MW Intens.	43,8	7,8	

Dieser Peak ist wiederum bei den Eseln nicht erkennbar.

Peak 7

Tabelle 54: Daten Peak 7 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	4	0
MW Masse.	5759 Da	5785 Da	
STABW M.	9,4	6,9	
MW Intens.	8,6	2,0	

Bei den Eseln ist dieser Peak nur bei einigen zu erahnen, aber nicht auswertbar. Bei den Maultieren ist dieser Peak

zwar bei allen zu sehen, aber nur bei 4 Tieren auszuwerten.

Peak 8

Tabelle 55: Daten Peak 8 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	0	0
MW Masse.	7016 Da		
STABW M.	9,5		
MW Intens.	6,0		

Bei den Pferden ist dieser Peak der erste einer prominenten Gruppe aus drei Peaks.

Peak 9

Tabelle 56: Daten Peak 9 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	5	0	0
MW Masse.	7133 Da		
STABW M.	9,5		
MW Intens.	7,2		

Peak 10

Tabelle 57: Daten Peak 10 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	0	0
MW Masse.	7336 Da		
STABW M.	5,6		
MW Intens.	6,7		

Peak 11

Tabelle 58: Daten Peak 11 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	4	4
MW Masse.	7666 Da	7593 Da	7639 Da
STABW M.	7,9	32,8	27,4
MW Intens.	3,2	3,6	3,5

Protein 11 ist bei Maultieren und Esel Bestandteil eines insgesamt hügeligen Bereiches. Die Morphologie ist sehr uneinheitlich, was die hohe STABW bei diesen beiden Gruppen erklärt.

Peak 12

Tabelle 59: Daten Peak 12 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6
MW Masse.	8065 Da	8093 Da	8125 Da
STABW M.	9,3	12,4	10,0
MW Intens.	3,9	2,9	4,5

Zu beachten ist die auffällige Massezunahme von den Pferden über die Maultiere hin zu den Eseln. Die ähnliche Morphologie des Peaks und seine Lage zu den folgenden Peaks lassen aber darauf schließen, dass es sich prinzipiell um das gleiche Protein handelt.

Peak 13

Tabelle 60: Daten Peak 13 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6 / 6	6 / 6	6 / 6
MW Masse.	8258/8340 Da	8299/8373 Da	8299/8372 Da
STABW M.	14,7 / 6,4	7,4 / 11,2	8,8 / 8,3
MW Intens.	3,0 / 3,5	4,8 / 8,4	4,7 / 8,6

Protein 13 ist ein Doppelpeak. Auch hier scheinen sich im Vergleich zu den Pferden die Peaks von den Maultieren und

Eseln mehr zu ähneln.

Peak 14

Tabelle 61: Daten Peak 14 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6
MW Masse.	8514 Da	8543 Da	8541 Da
STABW M.	8,0	10,8	8,6
MW Intens.	3,8	14,8	15,1

Wiederum sind sich Esel und Maultiere sowohl in der Masse als auch in der Intensität im Vergleich zu den Pferden

ähnlicher.

Peak 15

Tabelle 62: Daten Peak 15 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6 / 6
MW Masse.	8785 Da	8808 Da	8768/8843 Da
STABW M.	8,4	14,4	9,1 / 10,2
MW Intens.	11,7	5,3	4,4 / 6,6

Nur bei den Eseln erscheint Protein 15 als Doppelpeak, dessen erster Gipfel was die Masse betrifft, mehr dem Peak

15 der Pferde entspricht. Bei den Pferden ist dieser Peak spitzer und bei den Maultieren mehr hügelig ausgeprägt.

Peak 16

Tabelle 63: Daten Peak 16 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	2	6	6
MW Masse.	9054 Da	9090 Da	9084 Da
STABW MW.	1,7	7,5	11,6
MW Intens.	2,7	7,2	8,0

Bei den Pferden ist der Peak nur bei 2 Pferden eindeutig zu bestimmen. Bei den restlichen Pferden der Gruppe ist die

Intensität niedriger und der Peak erscheint dann als angedeuteter Doppelpeak. Auch hier sind sich Maultier und Esel bezüglich der Masse und Morphologie des Peaks ähnlicher. Möglich ist aber auch, dass der Peak des Pferdes gar nicht dem Protein 16 des Maultieres und des Esels entspricht.

Peak 17

Tabelle 64: Daten Peak 17 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6
MW Masse.	9419 Da	9452 Da	9462 Da
STABW M.	10,5	24,9	14,9
MW Intens.	1,6	1,7	2,5

Bei allen 3 Gruppen ist dieser Peak sehr flach angelegt.

Peak Mu3/ E3

Tabelle 65: Daten Peak Mu3/E3 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	0	6	6
MW Masse.		11483 Da	11495 Da
STABW M.		12,4	15,8
MW Intens.		0,5	1,1

Bei den Pferden ist Peak 18 teilweise zu erahnen, aber nicht auswertbar.

Peak 18

Tabelle 66: Daten Peak 18 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	5
MW Masse.	12621 Da	12548 Da	12589 Da
STABW M.	13,1	100,9	82,0
MW Intens.	0,7	0,6	0,6

In der Pferde-Gruppe ist der Peak klar erkennbar und relativ homogen. Bei den Maultieren und Eseln

hingegen ist dieser Peak sehr flach und breit angelegt und untereinander in der Lage versetzt, was die hohen STABW erklärt.

Der Esel 6 hat als einziger einen deutlichen Peak bei 12322 Da (Int. 5,7).

Peak 19

Tabelle 67: Daten Peak 19 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	5	0	0
MW Masse.	13112 Da		
STABW M.	46,5		
MW Intens.	0,9		

Dieser breite und flache Peak ist ausschließlich bei den Pferden zu sehen.

Peak 20

Tabelle 68: Daten Peak 20 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6
MW Masse.	13905 Da	13929 Da	13923 Da
STABW M.	9,5	17,3	26,2
MW Intens.	3,6	2,7	2,4

Dieser Peak entspricht dem Transthyretin. Bei den Pferden sind eine schmale rechte und eine linke Schulter erkennbar,

bei den Maultieren und Eseln hingegen nur eine rechte Schulter.

Peak Mu4/E4

Tabelle 69: Daten Peak Mu4/E4 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	0	6	6
MW Masse.		14868 Da	14870 Da
STABW M.		12,7	22,5
MW Intens.		0,4	0,7

Peak 21

Tabelle 70: Daten Peak 21 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6
MW Masse.	17238 Da	17258 Da	17261 Da
STABW M.	17,5	27,9	16,2
MW Intens.	0,6	0,8	0,7

Bei den Pferden ist dies ein sehr flacher und breiter Peak.

Peak 22

Tabelle 71: Daten Peak 22 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	5	6	6
MW Masse.	21860 Da	21906 Da	21874 Da
STABW M.	19,4	27,7	17,2
MW Intens.	1,4	1,2	1,6

Dieser Peak entspricht bezüglich der Molekularmasse dem Retinol-Bindungs-Protein.

Peak Mu5/E5

Tabelle 72: Daten Peak Mu5/E5 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	0	5	6
MW Masse.		22975 Da	22908 Da
STABW M.		19,5	16,7
MW Intens.		1,2	3,2

Dieses Protein ist bei keinem der Pferde sichtbar.

Peak Mu6/E6

Tabelle 73: Daten Peak Mu6/E6 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	0	6	6
MW Masse.		24926 Da	25112 Da
STABW M.		84,3	105,6
MW Intens.		2,2	1,7

Der zweite Peak in Folge, der bei den Pferden nicht zu sehen ist. Auffällig ist die hohe STABW bei beiden Gruppen.

Umso höher die Intensität bei diesem Peak ist, umso größer ist auch die Masse. D.h. der Gipfel verschiebt sich mit zunehmender Intensität nach rechts.

Peak 23

Tabelle 74: Daten Peak 23 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	0	0
MW Masse.	26142 Da		
STABW M.	40,7		
MW Intens.	0,7		

Weder bei den Eseln noch bei den Maultieren ist dieser Peak ansatzweise zu sehen.

Peak 24

Tabelle 75: Daten Peak 24 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6
MW Masse.	27590 Da	27699 Da	27685 Da
STABW MW.	27,2	27,7	20,3
MW Intens.	2,6	8,5	6,4

Bei allen drei Gruppen besitzt dieser Peak eine rechte, hohe und dicht anliegende Schulter.

Peak Mu7/E7

Tabelle 76: Daten Peak Mu7/E7 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	0	6	6
MW Masse.		29612 Da	29843 Da
STABW MW.		106,9	107,9
MW Intens.		1,9	1,4

Dieser Peak ist wieder nur bei den Maultieren und Eseln vorhanden.

Peak 25

Tabelle 77: Daten Peak 25 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	0	0
MW Masse.	31106 Da		
STABW MW.	23,6		
MW Intens.	3,7		

In diesem Bereich ist der Unterschied zwischen Maultier und Esel einerseits und den Pferden andererseits

besonders deutlich. Die Pferde haben in diesem Bereich eine Gruppe aus 3 Peaks (25, 26a und b), wobei die ersten beiden Peaks dem dritten Peak fast aufgesetzt erscheinen.

Peak 26a

Tabelle 78: Daten Peak 26a im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6
MW Masse.	32739 Da	32847 Da	32816 Da
STABW MW.	48,4	33,4	27,2
MW Intens.	8,7	5,4	4,4

Peak 26a ist der mittlere und höchste in der Dreiergruppe der Pferde. Maultiere und Esel hingegen besitzen nur diesen

Peak, der sich hier als eigenständiger Peak mit einer flach auslaufenden rechten Schulter.

Peak 26b

Tabelle 79: Daten Peak 26b im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	5	0	0
MW Masse.	34124 Da		
STABW M.	137,2		
MW Intens.	8,9		

Peak 27

Tabelle 80: Daten Peak 27 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6
MW Masse.	62628 Da	59902 Da	60238 Da
STABW MW.	91,1	138,2	170,7
MW Intens.	7,0	5,1	3,9

Maultiere und Esel haben einen eigenständigen hügelartigen Peak vor dem Albumin. Bei den Pferden

hingegen ist stattdessen ein Peak vorhanden, der so dicht am Albumin liegt, dass er fast wie eine weit ausgezogene Schulter erscheint. Bei den Maultieren und Eseln steht der Albuminpeak hingegen völlig isoliert.

Peak 28

Tabelle 81: Daten Peak 28 im Equidenvergleich

	Pferde	Maultiere	Esel
Anzahl	6	6	6
MW Masse.	65344 Da	65604 Da	65536 Da
STABW MW.	87,7	53,0	46,7
MW Intens.	20,3	16,0	11,6

Albumin

4.3.3 Vergleich des Proteinmusters von Serum und Liquor des Pferdes

In der Silberfärbung sind zwischen Serum(S) und Liquor(L) in erster Linie Unterschiede im Bezug auf die Konzentration der Proteine erkennbar. Serum erzeugt trotz stärkerer Verdünnung wesentliche dickere Banden als der Liquor. Hier sind Serum und jeweils rechts daneben Liquor von 4 verschiedenen Pferden dargestellt. Links im Bild ist der Standard aufgetragen.

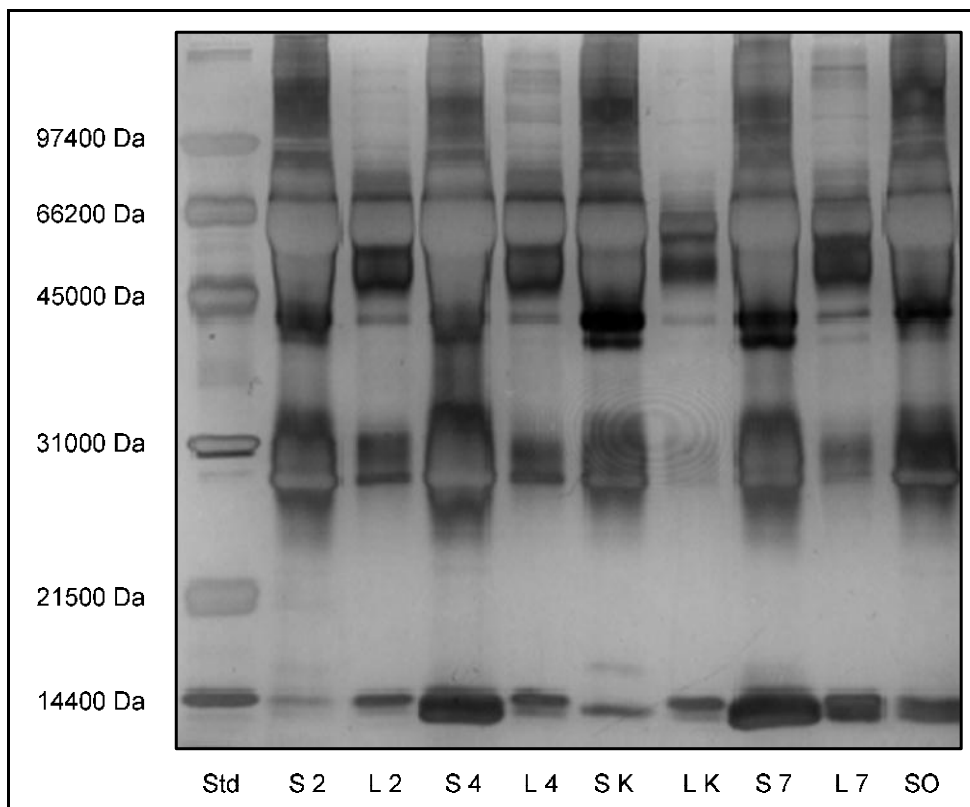


Abbildung 10: Vergleichende Gegenüberstellung des Proteinmuster im Serum von Serum(S) und Liquor(L) nach SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung und dem Vergleich des Serum und des Liquors wurden ebenfalls die Serumproben der klinisch unauffälligen Pferde als Standard genommen. Die in dieser Gruppe gefundenen 29 Peaks wurden wieder durchnummeriert. Zusätzlich wurden 9 Peaks nur bei den erkrankten Pferden gefunden. Diese sind gesondert durchnummeriert und mit einem davor stehenden „K“ (Krank) gekennzeichnet.

Peak 1

Tabelle 82: Daten Peak 1 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	63%	44%	90%	47%	21% / 21%
MW Mass.	4169 Da	4178 Da	4147 Da	4169 Da	4105 / 4169 Da
STAB M.	12,5	11,7	7,8	12,8	2,0 / 10,3
MW Inten.	4,5	6,3	3,0	9,1	3,5 / 4,9

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Protein 1 ist bei allen Proben zu erkennen, wenn auch zum großen Teil nur sehr schwach.

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier fällt bei S 9 (Kolik) ein deutlicher Doppelpeak (4180 und 4229 Da) auf, der sonst bei keinem Pferd dieser Gruppe zu sehen ist.

Zentralnervös erkrankte Pferde: S C (Borna) zeigt eine vergleichsweise hohe Intensität (12,6).

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier scheint Peak 1 der erste einer zusammengehörigen Gruppe von drei Peaks zu sein. Besonders deutlich ist dies bei L 7 zu sehen (Oesophagusruptur, Pneumonie und Sepsis): Peak 1a mit 4156Da, Peak 1b mit 4273 Da und Peak 1c mit 4382 Da. Nur bei einigen Pferden sind alle drei Peaks nachweisbar, bei den meisten nur ein oder zwei davon. Ausschließlich in dieser Gruppe lässt sich Peak 1b bei 21% der Pferde zu erkennen und zwar mit den Mittelwerten von 4283 Da; einer STABW von 15 und einer Intensität von 6,1.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Es erscheinen zwei Peaks dicht beieinander (siehe Tabelle – beide als 1a bezeichnet). Beide sind jeweils nur bei drei Pferden zu finden, wovon lediglich in der Probe L I (Herpes-Patient) beide Peaks gleichzeitig zu sehen sind. Im Gegensatz zu 1b lässt sich nur in dieser Gruppe der Peak 1c verifizieren: 42%; 4355 Da MW Masse; 3,5 STABW Masse; 5,3 MW Intensität.

Peak 2

Tabelle 83: Daten Peak 2 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	75%	32%	20%	0%	14%
MW Mass.	4549 Da	4591Da	4527Da		4599 Da
STAB M.	15,9	10,4	3,3		0,92
MW Inten.	5,4	6,5	4,7		3,1

Serum

Bei allen Gruppen, stellt sich dieser Peak, wenn vorhanden, in seiner Morphologie sehr unterschiedlich dar. Teilweise ist er gezackt, sodass eine exakte Massendefinition schwierig ist.

Liquor

Bis auf die Pferde F (bakterielle Meningitis) und G (Cyanid-Vergiftung) ist dieser Peak im Liquor nicht zu sehen.

Peak 3a

Tabelle 84: Daten Peak 3a im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	100%	100%	26%	42%
MW Mass.	4726Da	4724Da	4698Da	4728Da	4741 Da
STAB M.	11,7	14,4	8,1	7,0	9,5
MW Inten.	32,5	17,9	9,6	3,0	10,2

Serum

Im Serum fällt auf, dass bei den klinisch unauffälligen Pferden die höchsten Intensitäten zu verzeichnen sind.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist der Peak nur sehr schwach ausgeprägt und aufgrund der großen Anzahl von kleinen Peaks und dem hohen Grundrauschen in diesem Bereich nur schwer von anderen Peaks zu unterscheiden.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Im Gegensatz zum Serum ist im Liquor die Intensität und der prozentuale Anteil der Proben mit auswertbarem Peak in der Gruppe der neurologisch erkrankten Pferde deutlich größer. Die Pferde M (Borna) und N (Enzephalitis purulenta unbekannter Genese) ragen mit einer Intensität von 20 bzw. 19 auffallend hervor.

Peak 3b

Tabelle 85: Daten Peak 3b im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	63%	11%	0%	57%	86%
MW Mass.	4799 Da	4814Da		4819Da	4835 Da
STAB M.	5,5	1,2		13,1	4,9
MW Inten.	9,3	6,3		5,3	5,8

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Peak 3b ist ein kleiner Peak direkt hinter Peak 3a. Beide treten im Serum in erster Linie bei den klinisch unauffälligen Pferden auf und im Liquor va. bei den im ZNS erkrankten Pferden.

Neurologisch unauffällige Pferde: Bei den beiden Pferden S1 (Hufrehe und Cushing Syndrom) und S7 (Oesophagusruptur, Sepsis und Pneumonie) wo Peak 4 zu isolieren ist, erscheint er ebenfalls als kleiner Peak direkt hinter Peak 3.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Hier ist dieser Peak bei keinem der Pferde ansatzweise zu sehen.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: L 7 ragt mit einer Masse von 4798 Da in der Intensität (17) deutlich hervor. Es fällt auf, dass L 7 insgesamt in diesem Bereich bei allen Proteinen zwar hohen Intensitäten jedoch jeweils immer etwas geringere Massen als die anderen Pferde aufweist. Im Gegensatz zum Serum ist bei dieser Gruppe Peak 4 größer als Peak 3 und steht eigenständig.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe steht Peak 3b wiederum eigenständig, ist jedoch teils größer und teils kleiner als Peak 3a.

Peak 4

Tabelle 86: Daten Peak 4 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	75% / 75%	56% / 50%	30% / 30%	36%	0%
MW Mass.	4884/ 4930 Da	4889/ 4935 Da	4870/ 4919 Da	5022 Da	
STAB M.	7,5 / 4,5	12,6 / 16,5	5,1 / 11,2	17,0	
MW Inten.	5,9 / 6,8	4,1 / 4,1	2,2 / 2,6	3,1	

Serum

Im Serum ist bei allen drei Gruppen ein kleiner hügeliger Doppelpeak zu erkennen.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier ist nur bei 5022 Da ein einzelner Peak vorhanden, der zwar bei fast allen Pferden der Gruppe zu erkennen, aber dessen S/N meist für eine Auswertung zu gering ist. Sowohl die Masse, als auch die Morphologie dieses Peaks im Liquor weicht stark von den Doppelpeaks im Serum ab.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Hier ist bei keinem Pferd im Serum ein Peak mit entsprechendem Molekulargewicht zu erkennen.

Peak 5

Tabelle 87: Daten Peak 5 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	88%	0%	28%	36%	0%
MW Mass.	5094 Da		5091 Da	5022 Da	
STAB M.	50,5		17,6	17,0	
MW Inten.	5,9		3,7	3,1	

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Dieser Peak ist sehr flach und extrem inhomogen in seiner Form und Masse, da durch die unregelmäßige Oberlinie der Gipfel nicht immer genau zu definieren ist.

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier ist dieser Peak nur bei einigen wenigen Pferden zu erahnen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe ist der Peak nur bei einem Teil der Pferde auswertbar, aber bei einigen weiteren auch noch schwach zu erkennen.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier verhält es sich wie im Serum der zentralnervös erkrankten Pferde.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Der Peak ist noch nicht einmal ansatzweise zu erkennen.

Peak K1

Tabelle 88: Daten Peak K1 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	0%	28% / 33%	10%	0%	43%
MW Mass.		5315/ 5398 Da	5387 Da		5276 Da
STAB M.		11,0 / 15,8			37,1
MW Inten.		9,6 / 12,9	3,7		3,1

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe sind in diesem Bereich keinerlei Peaks vorhanden.

Neurologisch unauffällige Pferde: In der Gruppe der neurologisch unauffälligen Pferde ist eine Zweiteilung zu beobachten: Ein Teil der Gruppe hat einen Peak mit einem Mittelwert von 5315 Da und der andere Teil einen Peak mit einem Mittelwert von 5398 Da. Bei keinem Pferd sind beide Peaks gleichzeitig zu erkennen und sie ähneln sich morphologisch sehr.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe ist lediglich bei S H (vertebrales Hämangiosarkom) ein kleiner auswertbarer Peak direkt vor dem folgenden Peak zu erkennen. Bei drei weiteren Pferden ist dieser Peak ebenfalls wahrzunehmen (jedoch $S/N < 3$).

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist bei keinem Pferd ein solcher Peak erkennbar.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Die Peaks sind zum größten Teil sehr schwach und undeutlich. Lediglich bei L M (Borna) und L N (Enzephalitis purulenta unbekannter Genese) ist die Intensität größer und die Linie deutlicher.

Peak 6

Tabelle 89: Daten Peak 6 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	100%	100%	79%	93%
MW Mass.	5552 Da	5549 Da	5527 Da	5549 Da	5562 Da
STAB M.	14,8	14,2	8,9	19,0	11,5
MW Inten.	40,0	37,3	18,4	5,0	11,0

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Bei den übrigen Pferden ist dieser Peak auch erkennbar, jedoch mit einem zu geringen S/N Verhältnis. L 15 (Sepsis nach Operation eines Penispapilloms) fällt durch eine besonders hohe Intensität (13,4) auf.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Hier fallen wieder L M und L N durch hohe Intensitäten (31 b.z.w. 27) auf.

Peak 7

Tabelle 90: Daten Peak 7 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	83%	80%	58%	50%
MW Mass.	5762 Da	5764 Da	5746 Da	5741 Da	5771 Da
STAB M.	12,3	11,9	6,0	18,3	13,6
MW Inten.	8,0	9,0	3,3	9,8	3,3

Auffällig ist hier, dass sowohl im Serum als auch im Liquor bei den neurologisch unauffälligen Pferden die höchsten und bei den zentralnervös erkrankten Pferden die geringsten Intensitäten zu verzeichnen sind. Die Intensität im Serum der zentralnervös erkrankten Pferde ist sogar deutlich niedriger als die der klinisch unauffälligen Pferde.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Zwar ist Peak 8 hier bei allen Pferden zu sehen, aber nicht bei allen Pferden mit einem ausreichend hohem S/N Verhältnis. L 15 weist mit 65 eine extrem hohe Intensität auf. Außerdem ist nur bei diesem Pferd im Liquor ein Peak mit 5943 Da bei einer Intensität von 12,3 ersichtlich.

Peak K2

Tabelle 91: Daten Peak K2 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	0%	50%	1 Pferd	16%	21%
MW Mass.		6137 Da	6127 Da	6129 Da	6165 Da
STAB M.		14,7		29,2	8,1
MW Inten.		5,8	3,3	2,9	2,5

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Bei keinem der Pferde dieser Gruppe ist ein Peak in diesem Bereich zu sehen.

Neurologisch unauffällige Pferde: Die Intensität von S 7 fällt mit 22,5 besonders hoch aus.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Zwar ist ein kleiner Peak bei den Proben F, H, I, L, M zu erkennen, doch weist lediglich S L ein S/N Verhältnis über 3 auf.

Liquor

Im Liquor fällt zwischen den beiden Gruppen lediglich ein Unterschied im Mittelwert des Molekulargewichtes auf. Das Molekulargewicht der zentralnervös erkrankten Gruppe ist deutlich höher. In beiden Gruppen sind die Peaks insgesamt sehr schwach und nur bei einem Teil der Pferde sicht- bzw. auswertbar.

Peak K3

Tabelle 92: Daten Peak K3 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	1 Pferd	1 Pferd	1 Pferd	0%	29%
MW Mass.	6439 Da	6425 Da	6430 Da		6412 Da
STAB M.					22,8
MW Inten.	2,1	2,1	3,5		1,6

Serum

In allen drei Gruppen sind Peak 10 und 11 jeweils nur bei ein und demselben Pferd zu erkennen. Auch einzeln treten sie bei keinem weiteren Pferd auf.

Klinisch unauffällige Pferde: Pferd III

Neurologisch unauffällige Pferde: Pferd 16 (Karies)

Zentralnervös erkrankte Pferde: Pferd C (Borna)

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: In diesen Massebereichen sind keine isolierten Peaks zu erkennen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Bei einem kleinen Teil der Pferde dieser Gruppe ist ein sehr schwach ausgeprägter Peak zu erkennen.

Peak K4

Tabelle 93: Daten Peak K4 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	1 Pferd	1 Pferd	1 Pferd	0%	0%
MW Mass.	6629 Da	6621 Da	6631 Da		
STAB M.					
MW Inten.	4,5	3,1	5,5		

Serum

siehe Protein 10

Liquor

In beiden Gruppen ist in diesem Massebereich kein Peak zu erkennen.

Peak K5

Tabelle 94: Daten Peak K5 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	0%	0%	0%	37%	71%
MW Mass.				6692 Da	6737 Da
STAB M.				23,2	11,2
MW Inten.				4,0	3,0

Liquor

Dieser Peak taucht ausschließlich im Liquor auf und ist in beiden Gruppen fast bei allen Pferden erkennbar, aber nur bei einem Teil mit ausreichend hohem S/N Verhältnis. Er erscheint wie ein kleiner Vorpeak zu dem nächst folgendem größeren Peak. Es besteht zwar ein deutlicher Massenunterschied zwischen den beiden Gruppen, jedoch ist eine große Ähnlichkeit bezüglich der Lage und der Morphologie vorhanden.

Die nächsten drei Peaks gehören zusammen zu einer Proteingruppe, deren Basis miteinander verschmolzen ist.

Peak 8

Tabelle 95: Daten Peak 8 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	88%	72%	90%	100%%	64%
MW Mass.	7012 Da	6989 Da	6969 Da	6937 Da	6946 Da
STAB M.	21,8	27,4	27,6	41,5	21,8
MW Inten.	5,8	4,1	3,6	6,9	3,1

Serum

Dieser Peak ist im Serum der erste Peak der Gruppe im Bereich 6900 bis 7900 Da.

Liquor

Im Liquor ist bei beiden Gruppen statt einer Peak-Gruppe nur ein breiter Peak mit zwei bis drei Tops zu sehen, die unterschiedliche Höhe aufweisen. Keiner dieser Gipfel ist bei allen Pferden dominierend. Hier wurde jeweils der höchste Punkt des gesamten Peaks in die Wertung einbezogen, was die hohe Standardabweichung der Molekülmassen erklärt. Eine genauere Massendefinition ist hierbei nicht möglich.

Peak 9

Tabelle 96: Daten Peak 9 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	75%	44%	0%	0%	0%
MW Mass.	7132 Da	7130 Da			
STAB M.	9,3	21,1			
MW Inten.	7,0	2,2			

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Von allen drei Gruppen ist Peak 14 bei den klinisch unauffälligen Pferden am besten isoliert und als eigenständiger Peak erkennbar.

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier ist dieser Peak nur noch vereinzelt als eigenständiger Peak zu sehen und erscheint oft nur als rechte „Schulter“ des vorherigen Peak.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe ist Peak 14 nicht von den anderen Peaks zu isolieren.

Liquor

Im Liquor ist bei beiden Gruppen in diesem Bereich kein Peak vorhanden.

Peak 10

Tabelle 97: Daten Peak 10 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	100%	100%	0%	14%
MW Mass.	7338 Da	7327 Da	7312 Da		7347 Da
STAB M.	13,7	10,0	12,4		1,2
MW Inten.	8,0	6,2	2,9		2,4

Serum

Peak 15 ist der dritte Peak und bezüglich der Intensität in den beiden ersten Gruppen der dominanteste dieser Dreiergruppe.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: In diesem Bereich sind keinerlei Peaks zu erkennen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Im Liquor ist lediglich bei den bei L M und L N ein ganz ähnlicher Peak wie im Serum zu sehen.

Peak K6

Peak K6 tritt bei einigen Pferden zusammen mit Protein 11 auf, während andere nur das eine oder das andere zeigen.

Tabelle 98: Daten Peak K6 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	0%	50 %	0%	11%	1 Pferd (L K)
MW Mass.		7545 Da		7537 Da	7566 Da
STAB M.		19,5		4,0	
MW Inten.		4,0		2,2	10,5

Peak 11

Tabelle 99: Daten Peak 11 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	88%	83%	40%	0%	21%
MW Mass.	7665 Da	7655 Da	7624 Da		7676 Da
STAB M.	8,1	8,0	52,0		7,0
MW Inten.	3,2	3,2	1,9		3,2

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist ausschließlich Peak 17 zu finden.

Neurologisch unauffällige Pferde: Dies ist die einzige Gruppe (sowohl Serum als auch Liquor betreffend) in der mehrfach gleichzeitig beide Peaks zu erkennen sind.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Hier ist nur bei manchen Pferden der Gruppe sehr schwach ausgeprägt Peak 17 zu erkennen, Peak 16 hingegen gar nicht.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist lediglich bei L 5 (Kolik) und L 6 (Blasenlähmung) Peak 16 zu erkennen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Peak 16 ist in dieser Gruppe nur bei L K zu sehen, wohingegen Peak 17 bei drei Pferden zu erkennen ist (L K, M, N). L K zeigt als einziges Pferd im Liquor beide Peaks gleichzeitig.

Peak 12

Tabelle 100: Daten Peak 12 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	83%	90%	0%	21 – 57%
MW Mass.	8069 Da	8050 Da	8044 Da		8045 - 8531 Da
STAB M.	14,2	6,4	12,6		10 - 20
MW Inten.	3,6	3,4	5,1		2 – 5,8

Serum

Im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen weist die Gruppe der zentralnervös erkrankten Pferde bei Peak 12 im Serum die höchsten Intensitäten auf.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier ist dieser Peak bei keinem Pferd eindeutig isolierbar.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Im Gegensatz zu den relativ einheitlichen Peaks im Serum dieser Gruppe, stellt sich im Liquor in diesem Massebereich eine Gruppe von 5 Peaks dar. Teilweise stehen diese Peaks isoliert mit eigener Basis und teilweise stellen die im Folgenden aufgelisteten Peaks nur mehrere Gipfel eines Peaks dar (d.h. die Basis der Peaks ist visuell nicht trennbar. Diese Peaks treten jedoch nur bei den Pferden C, D, H, I, J, K, M, N auf, wobei meistens mehrere dieser Peaks gleichzeitig zu sehen sind:

Peak 12a: 57%; 8074 Da MW; 16,0 STABW; 2,7 Intensität.

Peak 12b: 36%; 8127 Da MW; 12,5 STABW; 5,6 Intensität.

Peak 12c: 50%; 8185 Da MW; 9,8 STABW; 6,1 Intensität.

Peak 12d: 21%; 8372 Da MW; 6,7 STABW; 1,9 Intensität.

Peak 12e: 36%; 8515 Da MW; 19,1 STABW; 3,3 Intensität.

Zwischen den neurologisch unauffälligen und zentralnervös erkrankten Pferden sind im Bezug auf Vorhandensein und Morphologie der Peaks in diesem Massenbereich im Liquor deutliche Unterschiede vorhanden. Das lässt vermuten, dass es sich hier um Proteine handelt, die im unmittelbaren Zusammenhang mit den neurologischen Veränderungen stehen.

Anzumerken ist noch, dass L K als einziges Pferd, einen sehr deutlichen Peak bei 8012 Da (Int. 10,1) aufweist, der von der Morphologie her als erster Peak dieser Proteingruppe betrachtet werden kann.

Peak 13

Tabelle 101: Daten Peak 13 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	75% / 100%	72%	30%	0%	evtl. 18d?
MW Mass.	8262 / 8345 Da	8333 Da	8319 Da		
STAB M.	16,1 / 20,0	18,2	8,9		
MW Inten.	4,0 / 2,7	4,1	4,2		

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: In der Gruppe der klinisch unauffälligen Pferde ist Peak 13 im Serum wesentlich als Doppelpeak ausgeprägt, dessen rechter Gipfel zumeist eine höhere Intensität aufweist.

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier dominiert der rechte Gipfel so stark, dass der linke nur noch als Schulter ausgeprägt ist.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Bei den zentralnervös erkrankten Pferden ist dieser Peak nur bei einem Teil der Pferde erkennbar und nur bei Patient C als Doppelpeak.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist kein Peak zu erkennen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Es ist fraglich, ob Peak 12d dem Peak 13 entspricht, da er im Liquor mitten in der oben beschriebenen Gruppe als Peak erscheint und Peak 14 im Serum relativ isoliert zu sein scheint.

Peak 14

Tabelle 102: Daten Peak 14 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	67%	60%	0%	36%
MW Mass.	8517 Da	8502 Da	8488 Da		8515 Da
STAB M.	13,8	16,7	6,9		19,1
MW Inten.	4,4	6,5	4,4		3,3

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Wie in der Tabelle angegeben, ist in dieser Gruppe kein entsprechender auswertbarer Peak zu finden. In diesem Bereich sind sehr viele kleine und undeutliche Peaks zu sehen, die aber nicht auswertbar sind. Lediglich bei L 7 sind in diesem Bereich zwei deutlichere Peaks vorhanden: 8414 Da (Int. 3,1) und 8577 Da (Int. 4,1)

Zentralnervös erkrankte Pferde: Auch hier ist es möglich, dass Peak 12e dem im Serum vorhandenen Peak 14 entspricht. Auffällig ist die hohe Intensität von L D (7,7) bei 8539 Da.

Peak 15

Tabelle 103: Daten Peak 15 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	100%	100%	53%	86%
MW Mass.	8788 Da	8769 Da	8761 Da	8785 Da	8795 Da
STAB M.	12,1	8,0	14,0	22,5	18,0
MW Inten.	10,1	11,5	12,2	1,4	3,1

Serum

In der Gruppe der neurologisch unauffälligen Pferde sticht das Pferd 13 mit einer besonders hohen Intensität von 44 deutlich hervor.

Liquor

Da die Intensität in der Gruppe der zentralnervös erkrankten Pferde doppelt so hoch ist, wie bei den neurologisch unauffälligen Pferden, könnte hier wieder ein Liquor spezifisches Entzündungsprotein vermutet werden.

Peak 16

Tabelle 104: Daten Peak 16 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	50% / 75%	56% / 56%	40% / 40%	16%	29% / 21%
MW Mass.	8996/ 9081 Da	8979/ 9048 Da	8972/ 9076 Da	8971 Da	8996/ 9066 Da
STAB M.	5,7 / 31,1	7,2 / 15,4	13,2 / 22,2	8,5	9,5 / 16,3
MW Inten.	2,4 / 3,3	4,6 / 4,7	3,5 / 4,8	1,5	1,7 / 1,6

Serum

Im Serum sind bei allen Gruppen zwei dicht hintereinander folgende Peaks zu erkennen. Bei größeren Intensitäten dominiert oftmals einer von beiden so stark, dass der andere in seinem Peak gleichsam „verschwindet“.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Hier stellen sich zwei Peaks dar, die bei den Pferden H, I und J beide zu sehen sind, wohingegen bei Pferd C nur der erste und bei Pferd F nur der zweite Peak zu sehen ist.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist in diesem Bereich nur bei drei Pferden (12, 13, 14) der erste Peak zu erkennen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Bei drei Pferden (I, M, N) stellt sich ein unscharf gezeichneter Peak mit zwei ähnlich hohen Gipfel dar. Pferd H hat einen Peak mit einem Gipfel, entsprechend dem linken Gipfel der Peaks der anderen drei Pferde.

Es stellt sich die Frage, ob es sich hier um ein Protein mit zwei Gipfeln oder um zwei separate Proteine handelt. Auf jeden Fall ist die Morphologie der Peaks in den verschiedenen Gruppen sehr ähnlich.

Peak 17

Tabelle 105: Daten Peak 17 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	56%	90%	11%	0%
MW Mass.	9427 Da	9412 Da	9402 Da	9455 Da	
STAB M.	18,3	11,5	21,3	3,9	
MW Inten.	1,5	1,8	1,6	3,2	

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Lediglich bei zwei Pferden (13 und 14) ist hier ein Peak zu erkennen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Bei den Pferden M und N ist ansatzweise ein sehr schwacher und nicht auswertbarer Peak bei 9435 bzw. 9432 Da vorhanden.

Peak K7

Tabelle 106: Daten Peak K7 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	0%	33%	50%	32%	100%
MW Mass.		11435 Da	11447 Da	11432 Da	11424 Da
STAB M.		82,2	43,0	32,2	32,8
MW Inten.		0,9	0,8	0,6	1,3

Serum

Diese Peaks sind in allen drei Gruppen sehr schwach und ungenau ausgeprägt. Dies erklärt die zum Teil extrem hohen Standardabweichungen. Im Serum der klinisch unauffälligen Pferde ist der Peak zwar auch bei einigen Pferden zu erkennen, die S/N Ratio reicht jedoch für eine Auswertung nicht aus.

Liquor

Im Liquor fällt auf, dass in der Gruppe der zentralnervös erkrankten Pferde, im Vergleich zu den anderen Gruppen sowohl der Prozentsatz als auch die Intensitäten deutlich höher ausfallen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieses Protein bei neurologischen Erkrankungen vor allem im Liquor eine Rolle spielt.

Peak 18

Tabelle 107: Daten Peak 18 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	83%	60%	37%	50%
MW Mass.	12616 Da	12262 Da	12253 Da	12273 Da	12317 Da
STAB M.	16,0	22,5	15,2	28,8	47,3
MW Inten.	0,7	7,2	2,6	3,7	2,9

Bei diesem Peak handelt es sich um das Entzündungsprotein Serumamyloid A, was durch einen AK-Chip nachgewiesen konnte (siehe 4.2.1).

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Im Serum der klinisch unauffälligen Pferde stellt sich ein isolierter Peak dar, der weder im Serum, noch im Liquor der anderen Gruppen in dieser Weise anzutreffen ist. Es stellt sich die Frage, ob dieser Peak ebenfalls Serumamyloid A ist, da ausschließlich diese Gruppe im Bereich um 12260 Da keinen entsprechenden Peak aufweist, aber dafür eben diesen Peak bei 12616 Da.

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier sind der Prozentsatz und die Intensitäten im Vergleich zu der darauf folgenden Gruppe deutlich erhöht. Dies erscheint nur logisch im Anbetracht der Tatsache, dass die meisten der Pferde dieser Gruppe systemische Entzündungen hatten. Der Peak besitzt links eine deutliche, abgesetzte Schulter im Bereich 11900 – 12000 Da und eine steil abfallende, wenig abgesetzte rechte Schulter. Bis auf das Pferd 9 (Kolik-Patient) ist bei allen Pferden, die im Serum hohe SAA-Intensitäten aufweisen (6 und mehr) im Liquor ebenfalls ein SAA-Peak erkennbar.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Obwohl die Pferde dieser Gruppe ausschließlich neurologische Grunderkrankungen hatten, sind hier ebenfalls bei einem Großteil der Pferde hohe Intensitäten zu erkennen.

Bei der Beurteilung ist allerdings zu beachten, dass nicht von allen Pferden Serum-Proben vorhanden waren. In dieser Gruppe ist nur eine kleine, wenig abgesetzte, abfallende Schulter vorhanden.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Obwohl diese Pferde primär keine neurologischen Erkrankungen hatten und auch keinerlei Symptome einer zentralnervösen Störung zeigten, sind bei 7 Pferden im Liquor SAA-Peaks zu sehen. 5 dieser Pferde (1, 6, 7, 8, 15) hatten klinisch nachweisbar schwerwiegende systemische Entzündungen. Bei den anderen beiden Pferden (11 und 18) wurde die Entzündungssituation nach klinischen Parametern als nicht ganz so gravierend eingeschätzt. Bei diesen beiden Pferden ist die Intensität des SAA-Peaks im Gegensatz zu den anderen 5 Pferden aber auch deutlich unter 1. Alle Pferde dieser Gruppe, die SAA-Peaks im Liquor zeigten, hatten im Serum ebenfalls einen deutlichen SAA-Peak.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe zeigen 7 Pferde einen deutlichen SAA-Peak, wobei sich wieder kein Zusammenhang erkennen lässt, warum diese Pferde einen Peak zeigen und andere Patienten der Gruppe nicht.

Peak 19

Tabelle 108: Daten Peak 19 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	63%	22% / 56%	90%	21%	86%
MW Mass.	13113 Da	13054/13474	13041 Da	12930 Da	12781 Da
STAB M.	46,4	39,8 / 91,4	43,8	26,2	28,2
MW Inten.	0,9	1,5 / 1,5	1,9	3,5	1,7

Die Peaks unterscheiden sich zwischen den Gruppen sowohl in ihrer Molmasse als auch bezüglich ihrer Morphologie erheblich. Sie werden hier dennoch in einer Tabelle zum Vergleich zusammengefasst, da es sich hierbei jeweils um den Peak direkt vor dem prominenten TTR-Peak handelt.

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist Peak 27 stets ein eigenständiger, hügel förmiger Peak mit etwas Abstand zum TTR-Peak.

Neurologisch unauffällige Pferde: Grob unterteilt, gibt es hier zwei Erscheinungsformen: Vier Pferde weisen ebenfalls einen hügel förmigen, isolierten Peak mit einem MW von 13054 Da auf. Weitere 10 Pferde zeigen stattdessen eine linke Schulter des TTR, die umso dichter und steiler ist, je höher die Molmasse ausfällt.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Im Gegensatz zur vorherigen Gruppe stellt sich Peak 27 hier wiederum nur als eigenständiger, hügel förmiger Peak dar, dessen MW demgemäß niedriger ausfällt.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist der Peak prinzipiell eigenständig und wesentlich steiler als in den Serum-Gruppen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In niedrigeren Massebereichen, ist dieser Peak noch selbstständig, in höheren Bereichen als linke Schulter des TTR ausgeprägt.

Peak 20

Tabelle 109: Daten Peak 20 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	89%	100%	100%	100%
MW Mass.	13905 Da	13871 Da	13875 Da	13916 Da	13897 Da
STAB M.	9,6	21,8	15,0	28,2	105,0
MW Inten.	2,9	4,8	6,5	13,9	4,0

Bei diesem Peak handelt es sich um das Protein Transthyretin (siehe 2.7.2 und 4.2.2).

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Der Peak erscheint spitz mit einer steil abfallenden rechten Schulter, die keinen eigenen Gipfel hat. Die im Vergleich zu den anderen Gruppen niedrige Intensität erscheint plausibel, wenn man bedenkt, dass es sich hier um ein Entzündungsprotein und klinisch unauffällige Pferde handelt.

Neurologisch unauffällige Pferde: Die rechte Schulter ist hier nur zu erahnen, dafür ist bei einigen Pferden eine mehr oder weniger stark abgesetzte linke Schulter mit eigenem Gipfel zu erkennen (siehe Peak 19). Erstaunlich erscheint in dieser Gruppe, dass Pferd 5 (chronische Blasenlähmung und –entzündung) und Pferd 7 (Oesophagusruptur, Pneumonie und Sepsis) überhaupt keinen TTR-Peak aufweisen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Die rechte Schulter ist in dieser Gruppe wieder nur zu erahnen, die linke Schulter jedoch immer gut ausgeprägt und abgesetzt. Die im Vergleich zur Gruppe der neurologisch unauffälligen (aber systemisch erkrankten) Pferde höheren Intensitäten erstaunen zunächst. Diese könnten aber in der Tatsache begründet sein, dass TTR das wichtigste Entzündungsprotein im ZNS ist. (Über den Ursprung dieses im Serum gemessenen TTR kann an dieser Stelle keine Aussage gemacht werden.)

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Im Liquor dieser Gruppe ist die rechte Schulter des TTR-Peak überhaupt nicht zu sehen, und die linke Schulter – so überhaupt vorhanden – wenig abgesetzt. Der Peak ist allgemein nicht so spitz zulaufend und bei einigen Pferden mit einem drei gezacktem Gipfel ausgestattet. Das Pferd 7 hat mit 45 eine besonders hohe Intensität.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Wider Erwarten fällt in dieser Gruppe die Intensität im Liquor wesentlich geringer aus als in der vorherigen Gruppe. Die extrem hohen STABW kommt zum größten Teil durch den breiten undeutlichen Gipfel des Peaks, der eine genaue Massedefinition der Peaks unmöglich macht. Besonders hohe Intensitäten zeigen hier die Pferde A (Herpes) und E (Enzephalitis – Genese unbekannt).

Peak K8

Peak K8 und K9 sind bei einem Pferd immer entweder beide zu sehen, oder gar nicht. Dies lässt auf einen strukturellen Zusammenhang der beiden Peaks schließen.

Tabelle 110: Daten Peak K8 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	0%	50%	40%	16%	1 Pferd (L K)
MW Mass.		15079 Da	15054 Da	15079 Da	15110 Da
STAB M.		19,7	19,5	3,9	
MW Inten.		4,4	0,9	9,8	12,0

Peak K9

Tabelle 111: Daten Peak K9 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	0%	50%%	40%	16%	1 Pferd (L K)
MW Mass.		16002 Da	15961 Da	15979 Da	16008 Da
STAB M.		41,5	39,2	2,7	
MW Inten.		3,0	0,5	7,4	12,7

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Da beide Proteine bei keinem Pferd dieser Gruppe zu sehen sind, spricht dies für einen Zusammenhang dieser Proteine mit pathologischen Zuständen des Körpers.

Neurologisch unauffällige Pferde: Das Auftreten beider Peaks bei 50% dieser Gruppe bestätigt die oben genannte Vermutung. Es könnte sich hierbei um ein Entzündungsprotein handeln. Besonders hohe Intensitäten beider Proteine zeigen die Pferde 5 (Kolik) und 7 (Oesophagusruptur, Pneumonie und Sepsis).

Zentralnervös erkrankte Pferde: Auch in diesem Falle handelt es sich bei beiden Proteinen um dieselben 4 Pferde. Das Pferd K, das als einziges zentralnervös erkranktes Pferd diese Proteine auch im Liquor aufweist, ist hier ebenfalls dabei.

Liquor

Die Peaks haben im Liquor in beiden Gruppen eine jeweils ausgeprägte rechte Schulter.

Neurologisch unauffällige Pferde: Bei den Pferden 5, 6, und 7 sind die Peaks auch im Liquor zu erkennen, wobei Pferd 5 die deutlich höchsten Intensitäten hat.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Pferd K weist als einziges der Gruppe beide Proteine auch im Liquor mit hoher Intensität auf.

Peak 21

Tabelle 112: Daten Peak 21 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	89%	100%	37%	57%
MW Mass.	17241 Da	17200 Da	17179 Da	17217 Da	17243 Da
STAB M.	16,7	29,2	16,4	32,2	25,1
MW Inten.	0,6	0,6	0,4	0,8	0,5

Dies ist in allen Gruppen ein sehr flacher Peak, wodurch die hohen STABW zustande kommen.

Peak 22

Tabelle 113: Daten Peak 22 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	88%	94%	100%	32% / 32%	29%
MW Mass.	21858 Da	21839 Da	21848 Da	21125/21913	21994 Da
STAB M.	20,1	34,6	20,4	12,9 / 47,6	82,4
MW Inten.	1,3	1,4	1,1	1,0 / 0,9	0,9

Dieser Peak entspricht allem Anschein nach dem Retinol-Bindungs-Protein.

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Dieser Peak ist zwar sehr klein, aber dennoch in dieser Gruppe relativ deutlich zu erkennen.

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier sitzt der Peak auf einem sehr flachen aber lang gezogenen Hügel. Teilweise ist davor ein noch kleinerer Peak bei ca. 21110 Da vorhanden.

Bei Pferd 7 ist als Ausnahme ein Peak bei 24429 Da (Int. 10,3) mit einer linken Schulter bei 23662 Da zu sehen.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Bei den meisten Pferden dieser Gruppe sind hier drei Peaks zu erkennen, wovon der in der Tabelle aufgeführte der Mittlere und Prominenteste ist. Der Peak davor liegt bei ca. 21120 Da und der danach bei ca. 23000 Da.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist entweder ein Peak bei 21125 Da MW oder bei 21913 Da MW zu erkennen. Sie gehen bei fast allen Pferden der Gruppe in einen lang gezogenen, flachen Peak über, der sich bis ca. 25800 Da erstreckt.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Pferde, bei denen der Peak nicht mehr zu erkennen ist, ist dafür der folgende lang gezogene Peak wesentlich prominenter als in den anderen Gruppen. Dieser nachfolgende Peak hat eine extrem hügelartige Form. Der MW liegt bei 23376 Da mit einer extremen STABW von 485 bei einer Intensität von 0,9.

Peak 23

Tabelle 114: Daten Peak 23 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	88%	100%	90%	58%	93%
MW Mass.	26147 Da	26470 Da	25805 Da	27001 Da	26661 Da
STAB M.	43,1	354,1	132,8	177,0	253,2
MW Inten.	0,6	2,1	1,8	1,4	1,1

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe erscheint Peak 23 klein aber isoliert.

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier tritt Peak 23 teils mit geringerer Masse eigenständig auf, geht aber bei einigen Pferden mit zunehmender Masse in die linke Schulter des nächsten Peaks über. Da innerhalb der Gruppe diese Verschiebungen fließend möglich erscheinen, sind diese Peaks trotz der extrem hohen STABW in der Tabelle formal zusammen gefasst.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe ist Protein 23 bei allen Pferden als eigenständiger Peak zu sehen. Trotz der hohen STABW ist aufgrund der sehr ähnlichen Lage und Morphologie davon auszugehen, dass es sich um das gleiche Protein handelt.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Bei allen Pferden dieser Gruppe ist nur eine linke Schulter des folgenden Peaks zu sehen. Das erklärt auch die wesentlich höhere Masse im Vergleich zum Serum. Die Lage zwischen dem vorherigen, lang gezogenen und dem folgenden viel dominanteren Peak lässt jedoch vermuten, dass es sich prinzipiell um das gleiche Protein handelt wie im Serum.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe erscheint der Peak hingegen wieder als teilweise eigenständiger Peak (wenngleich auch dicht an dem folgenden) und als gut abgesetzte linke Schulter.

Dieser Peak ist ein gutes Beispiel, wie unterschiedlich der Peak eines Proteins zwischen und innerhalb der Gruppen in seiner Morphologie und Lage variieren kann.

Peak 24

Tabelle 115: Daten Peak 24 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	100%	100%	100%	100%
MW Mass.	27593 Da	27593 Da	27608 Da	27661 Da	27745 Da
STAB M.	23,7	24,8	17,4	71,9	57,4
MW Inten.	3,1	7,6	7,3	4,8	3,4

Der Peak weist sowohl im Serum als auch im Liquor bei jedem Pferd eine dicht und hoch anliegende rechte Schulter auf.

Die nächsten drei Peaks bilden zusammen eine Peak-Gruppe. Bei vielen Proben erscheinen die Peaks 25 und 26a nur auf einen großen Peak 26b aufgesetzt. Wie schon in 4.3.1 beschrieben, handelt es sich bei Peak 25 und 26a um Doppelladungen.

Peak 25

Tabelle 116: Daten Peak 25 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	50%	100%	90%	53%	79%
MW Mass.	31105 Da	31541 Da	30748 Da	32110 Da	31796 Da
STAB M.	21,7	423,0	162,1	140,8	304,7
MW Inten.	3,4	5,3	2,0	1,0	0,9

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Der Peak ist nur als linke Schulter (aber mit eigenem Gipfel) der folgenden Peaks ausgeprägt.

Neurologisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist der Peak in seiner Morphologie sehr unterschiedlich ausgeprägt. Von der reinen Schulter bis zum fast eigenständigen Peak kommen alle Varianten vor. Dadurch entstehen die großen Schwankungen in der Masse, was sich in der extremen STABW widerspiegelt. In der eigenständigeren Form ist die Masse kleiner als bei der Ausprägung als Schulter des nächsten Peaks.

Das Pferd 5 zeigt in diesem Bereich im Serum eine Besonderheit, da die Gruppe 25, 26a, 26b wie nach vorne versetzt erscheint. Peak 26b ist bei diesem Pferd gar nicht vorhanden, dafür jedoch noch vor Peak 25 ein weiterer Peak mit einem Molekulargewicht von 30120 Da, der auch nur bei diesem Pferd zu erkennen ist.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Hier ist der Peak bei fast allen Pferden beinahe noch eigenständig, erreicht aber auf der rechten Seite die Grundlinie nicht mehr, sondern ist sozusagen am Fuße des nächsten Peaks aufgesetzt.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Hier kommt der Peak nur bei einem Teil der Pferde und auch nur als Schulter des folgenden Peaks vor.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe ist der Peak ebenfalls nur als Schulter aber mit unterschiedlich deutlichem eigenem Gipfel ausgeprägt. Danach entsprechend variiert die Masse wieder sehr stark.

Peak 26

Tabelle 117: Daten Peak 26 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	94%	100%	89%	86%
MW Mass.	27390 Da	32770 Da	32763 Da	32886 Da	32997 Da
STAB M.	39,7	89,2	20,3	98,7	131,7
MW Inten.	8,1	9,2	2,5	3,1	2,6

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Dieser Peak ist wesentlich spitzer als der nächste Peak und erscheint zudem diesem aufgesetzt. In den Intensitäten dominieren sich beide wechselseitig. Es gibt auch Pferde bei denen einer von beiden kaum zu erkennen ist.

Neurologisch unauffällige Pferde: Wie aus den Tabellen ersichtlich, dominiert dieser Peak in dieser Gruppe bei den meisten Pferden deutlich.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe überwiegt Peak 26a bei allen Pferden.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Bei diesen Pferden fällt der Peak sehr unterschiedlich aus. Sowohl dominierend, als auch nur als Schulter von 26b.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Die Erscheinungsformen ähneln in dieser Gruppe sehr dem Liquor der neurologisch unauffälligen Pferde.

Peak 26b

Tabelle 118: Daten Peak 26b im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	88%	78%	100%	100%	79%
MW Mass.	34049 Da	33951 Da	33835 Da	34436 Da	34583 Da
STAB M.	230,0	150,5	97,6	240,8	286,5
MW Inten.	7,8	7,6	4,2	2,6	1,6

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: In dieser Gruppe ist Peak 26b bei fast allen Pferden deutlich ausgeprägt und fällt nach rechts lange flach ab.

Neurologisch unauffällige Pferde: Bei den Pferden, wo Peak 26 sehr dominant ist, ist Peak 26b fast nur als flach und lang abfallende rechte Schulter ausgeprägt. Der bei ähnlich vielen Pferden der Gruppe umgekehrte Fall, ist oben beschrieben.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Auch wenn Peak 26 bei vielen Pferden dieser Gruppe deutlich dominiert, ist Peak 26b fast immer mit einem deutlichen Top ausgestattet und noch als eigenständiger Peak zu bezeichnen.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Im Liquor ist Peak 26b bei allen Pferden deutlich länger nach rechts auslaufend. Bei etwa der Hälfte der Pferde dieser Gruppe ist er dominierend.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Wieder ist der Peak im Vergleich zum Serum deutlich länger nach rechts auslaufend. Bei 5 Pferden dominiert er.

Alle drei Peaks sind bei Pferd 7 sowohl im Serum als auch im Liquor erstaunlich klein im Vergleich zu den sonst eher sehr hohen Intensitäten dieses Pferdes.

Eine deutliche Variation ist im Serum von Pferd 5 zu sehen. Es sind zwar ebenfalls drei Peaks in ähnlichen Abständen zu sehen, jedoch erscheinen diese Peaks in ihrem Zusammenhang wie nach links versetzt. Peak 26b ist nicht zu erkennen, dafür ein zusätzlicher Peak bei 30120 Da. Im Liquor zeigen sich solche Abweichungen bei diesem Pferd nicht.

Peak 27

Tabelle 119: Daten Peak 27 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	86%	72%	90%	Nur Schulter	93%
MW Mass.	62645 Da	62754 Da	62290 Da	Ca 64300 Da	63794 Da
STAB M.	94,6	183,3	216,6		534,9
MW Inten.	6,3	12,7	8,1		3,1

Serum

Klinisch unauffällige Pferde: Dieser Peak ist bei den klinisch unauffälligen Pferden als deutlich getrennter Vorpeak des Albumins zu erkennen. Bei dem Pferd VII ist in diesem Massenbereich kein Peak zu sehen, aber statt dessen ein ähnlich geformter bei 59818 Da.

Neurologisch unauffällige Pferde: Bei 4 Pferden ist dieser Peak nur als direkt anliegende, linke Schulter (ohne eigenen Gipfel) des Albumins sichtbar. Bei den anderen Pferden der Gruppe ist Peak 27 als eigenständiger Peak vor dem Albumin mit einer etwas niedrigeren Masse ausgeprägt.

Zentralnervös erkrankte Pferde: Das Erscheinungsbild ähnelt stark dem der vorherigen Gruppe. Lediglich beim Pferd O (Borna-Patient) ist Peak 27 in diesem Bereich gar nicht vorhanden aber stattdessen ein Peak bei 56564 Da.

Liquor

Neurologisch unauffällige Pferde: Bei 7 Pferden ist überhaupt keine Schulter, geschweige denn ein Peak zu erkennen. Die restlichen Pferde zeigen lediglich eine eng anliegende Schulter (bei ca. 64300 Da) ohne eigenen Top.

Zentralnervös erkrankte Pferde: In dieser Gruppe ist Peak 27 zum Teil als linke Schulter des Albumins zu erkennen, welche allerdings im Vergleich zu der anderen Liquor-Gruppe deutlich besser abgesetzt ist und immer einen eigenen Top hat. Bei den anderen Pferden der Gruppe ist Peak 27 wieder als eigenständiger Vorpeak zu erkennen, allerdings mit insgesamt niedrigerer Masse als im Serum üblich. Überhaupt erkennt man beim Vergleich der Overlays des Serum-Albumins mit dem Liquor-Albumin, dass der Vorpeak bzw. die Schulter des Albumins im Liquor eine höhere Masse hat, also dichter am Albumin sitzt.

Peak 28

Tabelle 120: Daten Peak 28 im Vergleich Serum/Liquor

	Serum klin. unauffäll. Pferde (n = 8)	Serum ZNS unauffäll. Pferde (n = 18)	Serum ZNS erkrankte Pferde (n = 10)	CSF ZNS unauffäll. Pferde (n = 19)	CSF ZNS erkrankte Pferde (n = 14)
Prozent	100%	100%	100%	100%	100%
MW Mass.	65354 Da	65390 Da	65417 Da	65623 Da	65840 Da
STAB M.	76,7	61,2	53,8	157,1	174,6
MW Inten.	18,3	24,4	21,6	10,1	7,3

In allen 5 Gruppen kann auch hier davon ausgegangen werden, dass es sich bei Peak 28 um das Albumin handelt.

Serum

Die morphologischen Unterschiede zwischen den Gruppen entstehen in erster Linie durch den Vorpeak. Der eigentliche Albuminpeak fällt relativ homogen aus. In der Gruppe der neurologisch unauffälligen Pferde sind wie zu erwarten die höchsten Intensitäten zu finden.

Liquor

Beide Liquor-Gruppen zeigen wesentlich höhere STABW des Albumins als die Serum-Gruppen.

Zusammenfassung Vergleich Serum - Liquor

9 Peaks (K1 bis 9) waren bei den klinisch unauffälligen Pferden überhaupt nicht zuerkennen.

Ausschließlich im Serum kamen nur 3 Peaks vor (9, 13 und K4), wohingegen K5 nur im Liquor auftrat.

26 Peaks zeigten im Serum der neurologisch unauffälligen Pferde höhere Intensitäten als bei den zentralnervös erkrankten Pferden. 3 Peaks waren zudem ausschließlich im Serum der neurologisch unauffälligen Pferde vorhanden.

Bei 14 Peaks waren im Liquor die Intensitäten bei den neurologisch unauffälligen Pferden höher als bei den zentralnervös erkrankten Pferden. Bei 10 dieser Peaks war die Intensität im Serum ebenfalls höher als bei den neurologischen Patienten.

Hingegen waren bei den restlichen 15 Peaks die Intensitäten im Liquor der neurologischen Patienten höher, was bei 3 dieser Peaks auch für die Intensitäten im Serum zutraf.

Im Falle von 4 Peaks (5, 9, 20, 23) war bei den zentralnervös erkrankten Pferden die Intensität im Serum höher als bei den neurologisch unauffälligen Pferden, im Liquor hingegen vergleichsweise niedriger.

5 Diskussion

5.1 Probandenauswahl

In der vorliegenden Arbeit wurden Probanden ausgewählt, um Vergleiche in der Proteinzusammensetzung bei Mensch und Pferd (1), der Equiden (2) und zwischen Serum und Liquor (3) vornehmen zu können. Beim Vergleich Mensch – Pferd und bei den Equiden wurde nur das Serum verglichen, da aus ethischen bzw. tierschutzrechtlichen Gründen bei gesunden Individuen ein invasiver Eingriff wie eine Liquorpunktion nicht erlaubt ist. Folglich stand auch für den Vergleich des Liquors bei den neurologisch unauffälligen und zentralnervös erkrankten Pferden kein Liquor bei den klinisch unauffälligen Pferden als Referenzwert zur Verfügung. Demgemäß konnte hier lediglich der Liquor von zentralnervös erkrankten Pferden mit dem Liquor von neurologisch unauffälligen, jedoch systemisch erkrankten Pferden verglichen werden. Im Laufe der Auswertungen stellte sich heraus, dass der Liquor dieser an sich neurologisch unauffälligen Pferde häufig weit mehr pathologische Veränderungen aufweist als angenommen.

In allen drei Teilen sind die Gruppen klein bzw. für die geringe Anzahl der Individuen sehr inhomogen bezüglich der Parameter Alter, Geschlecht, Rasse oder Erkrankung. Statistische Aussagen sind somit nur begrenzt möglich. Es sollen vielmehr die unterschiedlichsten Individuen, Ausprägungen und Ausgangssituationen und das damit verbundene Proteinspektrum bzw. die daraus resultierenden Unterschiede dargestellt werden. Über die Reproduzierbarkeit lässt sich hieraus nur wenig aussagen. Diese Arbeit stellt einen ersten Versuch bzw. Schritt in der Untersuchung von Körperflüssigkeiten des Pferdes mittels SELDI-TOF-MS dar.

Die Gruppe der neurologisch erkrankten Pferde setzt sich aus Pferden mit den unterschiedlichsten Symptomen und Erkrankungen zusammen. Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere und dem vielfältigen Erkrankungsmuster konnte keine Einteilung in Gruppen nach Erkrankung bzw. Diagnose erfolgen. Somit ist es auch kaum möglich, durch Vergleiche ein erkrankungsspezifisches Proteinmuster zu finden. Dies würde einen großen Fortschritt in diagnostisch medizinischer Hinsicht bedeuten.

5.2 Methodenbewertung

In dieser Arbeit wurden alle Proben mittels eines SAX-Chips im SELDI-TOF-MS untersucht, der Gesamtprotein-Gehalt (GP) quantitativ und der Hämoglobin-Gehalt (Hb) semiquantitativ bestimmt. Der GP- und Hb-Gehalt wurde hierbei als Zusatzinformation benötigt, um bestimmte Phänomene der Peakmuster besser interpretieren zu können. Des Weiteren

wurde von einigen Proben eine Silberfärbung angefertigt und/oder weitere Untersuchungen zur direkten Proteinbestimmung (Western Blot, AK-Chip) vorgenommen. Hierzu wurden gezielt Proben ausgewählt, bei denen die Nachweisbarkeit des jeweiligen Proteins besonders wahrscheinlich oder dessen Konzentration besonders hoch erschien. Als Gegensatz dazu dienten einige, bezüglich des gesuchten Proteins unauffällige Proben zum Vergleich.

Die SELDI-TOF-Massenspektrometrie ist zur Auftrennung von Proteinen bezüglich ihrer Präzision anderen herkömmlichen Techniken, wie etwa der hier ebenfalls durchgeführten Silberfärbung, deutlich überlegen. Es ist sogar möglich, anhand der Peak-Morphologien minimale Veränderungen der Proteine, wie z.B. posttranslationale Modifikationen zu erkennen. Eine Proteinidentifizierung ist jedoch nur teilweise durch weitere Verfahren, wie z.B. Western Blot oder einem AK-Chip möglich.

Ein weit verbreitetes Problem dieser Technik ist bislang die oftmals schlechte Reproduzierbarkeit, was sowohl die Anzahl als auch die Masse der Peaks angeht (BONS et al., 2005). Deshalb wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit veröffentlicht, was bislang jedoch noch nicht zu einem allgemeingültigen Schema in der Vorgehensweise geführt hat (AIVADO, 2005; CORDINGLEY, 2003; KIEHNTOPF et al., 2007). Eine Prozessoptimierung ist erforderlich um zu differenzieren, ob Unterschiede im Peakmuster auf die Technik bzw. die Probenverarbeitung zurückzuführen sind oder aber auf biologischen Unterschieden der Proteinzusammensetzung basieren (CORDINGLEY, 2003).

Proteinanalytik

Es gibt verschiedene Methoden der Proteinidentifizierung. Die klassische Methode ist die Ausfällung mittels eines Antikörpers. Die setzt jedoch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit den spezifischen Proteinen voraus. Aus Kosten- und Herstellungsgründen ist es häufig nicht möglich, mit einem Antikörper derselben Spezies wie bei der zu untersuchenden Probe zu arbeiten. Häufig ist aber auch zwischen verschiedenen Spezies eine gute Kreuzreaktion vorhanden. Bei einigen können aber auch Probleme mit der Kompatibilität auftreten. Dann muss ein anderer Antikörper oder eine andere Nachweismethode angewendet werden. In einigen Fällen ist bei einer anderen Nachweismethode unter Verwendung desselben Antikörpers eine gute Kreuzreaktion vorhanden. Die Gründe hierfür sind noch vielfach ungeklärt.

Doppelladung

Ein wichtiges Phänomen der Massenspektrometrie, das bei der Analyse des Proteinspektrums beachtet werden muss, sind sog. „Doppelladungen“. Bei der Ionisierung der Proteinmoleküle durch die Laserenergie bindet normalerweise ein Proton an ein Protein

(M+H). Dabei wird zumeist die Aminogruppe einer Seitenkette des Proteins protoniert. Es kommt jedoch vor allem bei hohen Laserintensitäten vor, dass zwei Protonen an ein Proteinmolekül binden (M+2H). In diesem Fall hat das Protein im Vergleich zu den anderen Molekülen eine doppelte Ladung, wodurch sich aufgrund der höheren Anziehungskraft die Flugzeit deutlich verkürzt. Im Spektrum erscheint dann ein zweiter Peak mit der halben Masse des ursprünglichen Peaks. Dies ist wichtig zu wissen, da es sich hierbei nicht um den Peak eines weiteren Proteins handelt, sondern ausschließlich um einen technischen Artefakt. Ein weiteres Phänomen ist eine „halbe Ladung“: Dies ist der Fall, wenn zwei Proteinmoleküle sich quasi ein Proton „teilen“ (2M+H). Die in Relation „halbe Ladung“ bewirkt eine geringere Anziehungskraft und somit eine deutlich erhöhte Flugdauer. Es erscheint ein zusätzlicher Peak mit der doppelten Massenzuordnung (WUNDERLIN, 2000; RAWEL, 2006).

Die Ciphergen Software bietet die Möglichkeit, gezielt nach Halb- bzw. Doppelladungen zu suchen und diesen Peaks den ursprünglichen Peak (M+H) des Proteins zuzuordnen.

5.3 Qualitätskontrolle

Sämtliche Proben wurden im Zuge der Labordiagnostik dieser Arbeit weitgehend identisch behandelt, was die Aufbewahrung und Analysemethoden betrifft. Durch das sofortige Aliquotieren und Einfrieren, sowie dem Auftauen der Proben nur einmal unmittelbar vor der Analyse, konnten damit im Zusammenhang stehende Messfehler minimiert werden. BONS et al. stellten 2005 fest, dass mehrfaches Einfrieren und wieder Auftauen einer Probe zu signifikanten Unterschieden im Peakmuster führt (BONS et al., 2005). Lediglich im Mischungsverhältnis Probe : Puffer gab es Unterschiede zwischen Serum und Liquor (siehe Seite 26, 29 und 30). Diese Situation betraf auch die Lagerungszeit, vor allem bei den 7 Serum- und Liquorproben neurologischer Patienten (A–G), die schon vor Beginn dieser Arbeit gesammelt wurden. SZILAGYI et al. untersuchte 1993 TTR in humanem Serum und Liquor mittels Polyacrylamidgel Isoelektrischer Fokussierung (PAGIF) und fand unter anderem bei einer Lagerung von bis zu 30 Tagen bei -20°C keine Unterschiede je nach Lagerungsdauer. Es ist jedoch zu vermuten, dass die deutlich längeren Lagerungszeiten der Proben A bis G hingegen Auswirkungen auf die Proben hatten. Da das Probenmaterial jedoch so unterschiedlich ist, können diese Auswirkungen der Lagerungszeit nicht isoliert analysiert bzw. verglichen werden (SZILAGYI et al., 1993).

Die Probengewinnung entsprach den klinisch und hygienisch korrekten Erfordernissen.

Kalibrierung der SELDI-TOF-MS

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung wurde bei jedem Chip jeweils auf den ersten Spot ein Standard, bestehend aus equinem Cytochrom C, equinem Myoglobin und bovinem Albumin gegeben. Anhand dieses Standards wurde dann jeweils der entsprechende Chip „extern“ kalibriert. Die STABW der Standards betragen bei Cytochrom C (MW: 12356 Da) 8,6 bei einer Laserintensität von 250 und 6,8 bei einer Laserintensität von 280. Bei Myoglobin (MW: 16960 Da) lag die STABW bei 11,8 bzw. 8,7. Das bovine Albumin (MW: 66432 Da) zeigte mit 3,0 bzw. 2,2 die geringste STABW.

Aufgrund des weiten Massenspektrums, sind die Möglichkeiten einer exakten Kalibrierung begrenzt. Zur genaueren Untersuchung und Massedefinition eines bestimmten Proteins empfiehlt es sich, einen internen Standard zur Kalibrierung zu verwenden (BONS et al., 2005). Dabei wird ein bekanntes Protein mit exakter Massenangabe zur Probe hinzu gegeben, dessen Molekulargewicht sich in der Nähe des zu untersuchenden Proteins befindet. Anhand dieses Proteins wird dann kalibriert. Umso näher das Kalibrierungsprotein in der Masse dem zu untersuchenden Protein ist, desto exakter gelingt die Definition der Masse (CIPHERGEN, 2002).

Blutbeimengungen in Serum- oder Liquorproben, die durch iatrogene Blutungen oder intrakorporale Hämolyse entstanden, wurden nicht entfernt, um ihre Auswirkungen auf das Peakmuster erkennen zu können. Zur besseren Einschätzung und Interpretation wurden deshalb bei allen Liquorproben semiquantitative Hämoglobin-Messungen durchgeführt.

Ein nicht zu unterschätzender Faktor ist, dass fast alle Pferde der Gruppen „zentralnervös erkrankte“ und „neurologisch unauffällige Pferde“ sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme in medikamentöser Behandlung befanden. Es ist bekannt, dass nicht nur Erkrankungen sondern auch bestimmte Medikamente zur Modifikation von Proteinen führen können (SCHWEIGERT et al., 2005). Zum einen können Medikamente den Stoffwechsel und damit eingeschlossen auch den Proteinstoffwechsel erheblich beeinflussen. Das führt dazu, dass bestimmte Proteine in ihrer Konzentration oder Modifikation deutlich verändert werden, im Vergleich zu dem Proteinstatus, wie er allein durch die vorhandene Erkrankung eigentlich zu erwarten wäre. Zum anderen können aber auch (in weitaus selteneren Fällen) die pharmazeutisch wirksamen Substanzen oder galenisch bedeutsame Hilfssubstanzen im Peakmuster auftreten, wenn es sich hierbei um Proteine, wie z.B. Enzyme handelt. Allerdings weiß man bislang nur sehr wenig und auch nur bei einigen Proteinen bzw. Erkrankungen etwas über diese Auswirkungen. Es lässt sich also kaum einschätzen, inwieweit die verabreichten Medikamente das Proteinmuster der Individuen verändert haben.

5.4 Beurteilung der Messparameter der SELDI-TOF-MS

Die Beurteilung der vorhandenen Parameter und die Interpretation der Peakmuster sind nicht immer eindeutig oder beweisbar. An einigen Stellen können hier nur Interpretationsmöglichkeiten aufgezeigt werden. Exemplarisch werden hier nun einige Proteine bzw. ihre Peaks und bestimmte Auffälligkeiten diskutiert:

5.4.1 Quantitativer und qualitativer Vergleich des Peptid- und Proteinmuster von Mensch und Pferd

Zwischen den Menschen und den Pferden sind im Peakmuster wesentlich größere Unterschiede zu erkennen als zwischen den verschiedenen Equiden oder im Vergleich von Serum und Liquor. Dies ist nahe liegend, da Mensch und Pferd phylogenetisch weiter voneinander entfernt sind als die Equiden untereinander.

Protein 6 und 7 unterscheiden sich jeweils um 211 Da zwischen Mensch und Pferd bezüglich ihrer Molmasse erheblich. Bei beiden Spezies folgt jedoch dicht dahinter ein weiterer, etwas kleinerer Peak. Bei den Pferden beträgt der Abstand beider Peaks 210 und bei den Menschen 138 Da. Hier wäre eine Identifizierung der entsprechenden Proteine nötig, um feststellen zu können, ob es sich bei beiden Spezies prinzipiell um die gleichen Proteine handelt und ob Peak 7 eine Modifikation oder Variante von Protein 6 darstellt. Schon bei der Recherche in Proteindatenbanken (SWISSPROT, 2006) ist zu erkennen, dass die Molmasse von Proteinen zwischen verschiedenen Spezies deutlich variieren kann.

Um festzustellen, ob ein Peak bei den Pferden dem gleichen Protein entspricht wie ein ähnlicher Peak des Menschen, ist nur durch jeweils gezielte weiterführende Proteinanalysen (z.B. mittels Antikörperbindung oder Sequenzanalyse) möglich. Dies ist hier jedoch nicht Gegenstand der Arbeit und hätte das Ausmaß mehrfach überschritten.

Anhand von den Peaks Me 1, 2, und 3 soll die Fragestellung diskutiert werden, wieso diese bei den Menschen so dominanten Peaks, bei den Pferden wiederum nicht zu sehen sind. Aufgrund der Tatsache, dass alle drei Peaks sehr dicht nebeneinander liegen und nur beim Mensch zu erkennen sind, ist zu vermuten, dass diese drei Peaks funktionell zusammengehören oder evtl. verschiedene Varianten eines Proteins darstellen. Von Fall zu Fall unterschiedlich, sind jeweils folgende Erklärungen denkbar:

1. Es könnte sich um ein Protein handeln, das bei Pferden prinzipiell gar nicht vorhanden ist und dessen Funktion von ganz anderen Proteinen übernommen wird.
2. Das Protein hat beim Pferd eine ganz andere Größe bzw. liegt in anderen Komplexen im Serum vor oder teilt sich in andere Fragmente, die im SELDI dann ein ganz anderes Peakmuster ergeben.

3. Das Protein hat beim Pferd aufgrund von Veränderungen einzelner Aminosäuren eine abweichende Gesamtladung und ist somit im SELDI mittels eines SAX-Chips nicht richtig darstellbar. Dieselbe Probe auf einen weiteren Chip aufgetragen, würde dann vielleicht ebenfalls an dieser Stelle einen ähnlichen Peak ergeben.

Solche Phänomene tauchen bei allen untersuchten Gruppen immer wieder auf. Nur durch Proteinanalysen und weitere Untersuchungen mit verschiedenen Chip-Typen kann geklärt werden, ob bzw. welche dieser Optionen von Fall zu Fall die richtige Erklärung bietet.

5.4.2 Serumamyloid A (SAA)

In der Literatur bzw. in Proteindatenbanken wird für gesunde Individuen die Molekularmasse des humanen Serumamyloid A mit ca. 11680 Da und des equinen SAA mit ca. 12290 Da angegeben. In den hier untersuchten Proben zeigt sich in diesem Massebereich bei den klinisch unauffälligen Pferden kein Peak mit einer entsprechenden Masse. Dafür sind sowohl im Serum als auch im Liquor bei einem Großteil der im ZNS unauffälligen und der im ZNS erkrankten Pferde deutliche Peaks in einem vergleichbaren Massebereich zu finden. Bei der Untersuchung der Proben mittels SAA-Antikörper-Chips konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Im Serum klinisch unauffälliger Pferde ist im Gegensatz zu erkrankten Pferden kein spezifischer Peak erkennbar. Die hier gemachte Beobachtung weist darauf hin, dass das Akute-Phase-Protein SAA nur bei Pferden mit Entzündungsvorgängen als Peak zu isolieren ist (und zwar in Serum und Liquor). In diesen Gruppen korreliert die Intensität auch in etwa mit dem Schweregrad des klinischen Erscheinungsbildes der Entzündungsvorgänge im Körper der Patienten. Lediglich bei 7 der 14 neurologischen Patienten sind im Liquor besonders hohe Intensitäten zu verzeichnen. Es ist anhand der Art oder des Schweregrades der Erkrankungen allerdings nicht feststellbar, warum ausgerechnet diese 7 Patienten so hohe Intensitäten aufweisen. In 6 Serumproben von neurologischen Patienten fallen ebenfalls hohe Intensitäten des SAA-Peaks auf. Diese erhöhten SAA-Konzentrationen sind vermutlich mit den systemischen Reaktionen im gesamten Körper, die mit einer Entzündung des ZNS einhergehen zu erklären. Allerdings sind auch hier keine Korrelationen zwischen bestimmten Erkrankungen oder dem Schweregrad und den erhöhten SAA-Intensitäten zu erkennen.

Bei gesunden Individuen erscheint die Zuordnung des SAA zu einem bestimmten Peak schwierig. Durch gezielte Proteinanalyse muss die Identität des nur bei den klinisch unauffälligen Pferden auftretenden Peaks mit einem MW bei 12161 Da geklärt werden. Eventuell handelt es sich hierbei ebenfalls um SAA, das im physiologischen Zustand eine andere molekulare Erscheinungsform und somit eine höhere Masse hat. Bezüglich des humanen SAA kommt Peak „Me 8“ mit einem MW von 11742 Da dem in der Proteindaten-

bank beschriebenen Gewicht am nächsten. Da es sich um gesunde Individuen handelt, erscheint die geringe Intensität nicht ungewöhnlich.

5.4.3 Transthyretin (TTR)

Peak 20 weist sowohl bei den Menschen, als auch bei den Pferden eine für das Transthyretin typische Morphologie und Molekularmasse auf. Anhand dieses Proteins soll das Phänomen der „Peak-Schulter“ und die Frage von Zusammengehörigkeiten von dicht aufeinander folgenden Peaks erörtert werden. Untersuchungen mittels SELDI- und MALDI-TOF-MS zeigen, dass TTR im Serum des Menschen in verschiedenen Varianten erscheint. Gericke et al. isolierten 3 weitere Isoformen des TTR-Monomers, die dadurch entstehen, dass der Cystein-Rest an Position 10 Disulfidbrücken mit der Aminosäure Cystein oder den Peptiden Glutathione oder Cysteinyl-Glycin ausbildet (GERICKE et al., 2005). Die Isoform mit der höchsten Intensität erscheint in einem solchen Falle als „Hauptpeak“, die anderen Isoformen zeigen sich dann jeweils je nach Masseunterschied als linke oder rechte „Schultern“: Das native TTR mit der geringsten Masse der verschiedenen Isoformen, erscheint als linke Schulter des folgenden cysteinylierten TTR, dessen Intensität auch wesentlich höher ausfällt. An der rechten Seite dieses Peaks ist als kleine Stufe bzw. dicht anliegende Schulter ausgeprägt die cys-glyc-Form und anschließend als mehr oder weniger deutlich abgesetzte Schulter die glutathionylierte Form des TTR-Monomers ausgeprägt. Auch beim Pferd sind solche TTR-Varianten in Form von einem Hauptpeak, einer linken Schulter und zwei rechten Schultern erkennbar. Ob es sich hier allerdings um dieselben Modifikationen handelt, kann allein anhand der Peakmorphologie nicht geklärt werden. Auch ist noch ungeklärt, ob diese Mikroheterogenitäten genetisch bedingt sind, oder das Ergebnis posttranslationaler Modifikationen sind.

Bei den Peaks 25, 26a und 26b sind solche verschiedenen Ausprägungen zusammenhängender Peaks bzw. von Schultern ebenfalls deutlich nachvollziehbar.

5.4.4 Albumin

Der Albuminpeak (Peak 28) ist aufgrund seiner typischen Morphologie, seiner gewöhnlich hohen Intensität und isolierten Lage bei 65 bis 67 kDa (je nach Spezies) geradezu unverwechselbar. Jedoch bestehen bezüglich seiner Ausprägung und des Verhältnisses zu Peak 27 erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Im humanen Serum hat Peak 27 eine wesentlich geringere Masse als bei den klinisch unauffälligen Pferden und ist somit deutlich vom Albuminpeak getrennt. Innerhalb der Equiden ähneln sich Peak 27 und 28 bei Maultier und Esel deutlicher. Im Vergleich zu den Pferden weist bei diesen beiden Arten Peak 27 eine wesentlich geringere Masse als Peak 28 auf und stellt

somit einen eigenständigen Peak dar. Beim Vergleich von equinen Serum und Liquor fällt auf, dass im Liquor Peak 27 eine um ca. 1500 Da höhere Masse hat, als im entsprechenden Serum. Somit ist Peak 27 im Liquor nur noch als linke Schulter des Albumins ausgeprägt. Dies weist mit Sicherheit darauf hin, dass dieses Protein in Serum und Liquor bezüglich seiner Struktur nicht identisch ist. Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Krankheitsarten in Serum oder Liquor konnte nicht festgestellt werden.

5.4.5 Retinol-Bindungs-Protein (RBP)

In der SwissProt-Datenbank ist für das equine RBP eine Molekularmasse von 21195,7 Da und für das humane RBP von 21071,6 Da angegeben. RBP liegt im Körper hauptsächlich als Komplex mit TTR vor (siehe Kapitel 2.7.3), und zwar im Verhältnis RBP:TTR entsprechend 1:10. Mittels Western Blot konnte RBP sowohl im Serum als auch im Liquor nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.2.3).

Im Proteinspektrum des SELDI-TOF-MS finden sich bei den Menschen und Pferden Peak 22, der in diesen Molekularbereich fällt. Die Massendifferenzen zu den Angaben der SwissProt-Datenbank beruhen auf technischen Ursachen wie Messungengenauigkeit und Kalibrierung (siehe 5.3: Kalibrierung).

5.4.6 Vergleich des Peptid- und Proteinmuster im Serum der unterschiedlichen Equiden

Pferde, Esel und Maultiere gehören zur Gattung der Equiden, sind aber verschiedene Arten (Spezies). Diese sind dadurch definiert, dass die Nachkommen von Kreuzungen dieser Arten infertil sind. Die in dieser Arbeit untersuchten Maultiere sind infertile Nachkommen von Eselhengsten und Pferdestuten. Hier wurde versucht, dieses Verwandtschaftsverhältnis im Proteinmuster nachzuvollziehen bzw. seine Auswirkungen daraufhin zu beobachten.

Beim Vergleich des Peakmusters der Equiden fällt auf, dass zwischen Maultier und Esel mehr Übereinstimmungen vorhanden sind, als zwischen Pferd und Esel. Weder die Esel noch die Maultiere haben „eigene“ Peaks, die nur bei dieser Gattung vorkommen, wohingegen 8 Peaks ausschließlich bei den Pferden auftreten. Zudem kommen 7 Peaks bei Esel und Maultier, nicht aber bei den Pferden vor. Gemeinsame Peaks von Pferd und Maultier ohne Beteiligung der Esel sind lediglich in 3 Fällen zu erkennen.

Ein Beispiel hierzu sind Peak Mu2/E2 und Peak 6. Es fällt auf, dass die Pferde nur Peak 6, die Esel nur Peak E2, die Maultiere aber (die ja ein Kreuzungsprodukt beider Spezies sind), beide Peaks haben (Mu2 und Peak 6). Es sieht so aus, als ob sie von beiden Elternteilen jeweils das entsprechende Protein aufweisen. Unklar ist, ob es sich zumindest in der

Funktion bei Protein Mu2/E2 und Protein 6 um das gleiche Protein handelt und deshalb die Intensitäten beider Proteine bei den Maultieren jeweils deutlich niedriger sind. Dies könnte auf Synergieeffekte zurück zu führen sein, weshalb von den einzelnen Proteinen beim Maultier nicht so hohe Konzentrationen vorhanden sind.

Beim Betrachten des gesamten, hier vorhandenen Proteinspektrums erhält der Leser den Eindruck, dass hierbei die Ähnlichkeit zwischen Esel und Maultier größer ist, als zwischen Maultier und Pferd. Ob dies tatsächlich der Fall ist, kann wiederum nur mittels genauerer Proteinanalysen, eventuell in Kombination mit molekular-genetischen Techniken bewiesen werden. Es erscheint jedoch, dass die verwandtschaftlichen Zusammenhänge dieser Arten im Peakmuster des SELDI-TOF-MS durchaus nachvollziehbar sind.

5.4.7 Quantitativer und qualitativer Vergleich von Serum und Liquor des Pferdes

Von den insgesamt 39 definierten Peaks kommen 9 Peaks (K1 bis 9) nicht bei den klinisch unauffälligen Pferden vor. Dies bedeutet, dass ihr Auftreten vermutlich in engem Zusammenhang zu pathologischen Zuständen des Körpers steht. In Frage kommen z.B. Entzündungsproteine, die im Falle einer Erkrankung erst gebildet oder freigesetzt werden. Oder es handelt sich um schon vorhandene Proteine, die im Falle einer Reaktion des Körpers auf eine Noxe eine Modifikation erfahren, die sich im Spektrum des SELDI-TOF-MS als neuer Peak abzeichnet. Bekannt ist hier z.B., dass es bei polytraumatisierten Menschen zu einem vorübergehend deutlichen Anstieg der cys-glyc Variante des TTR kommt, die im physiologischen Zustand nur in äußerst geringen Konzentrationen auftritt (SCHWEIGERT et al., 2005).

Peak K5 scheint als einziger nur im Liquor aufzutreten. Es könnte sich hierbei um ein Liquor-spezifisches Protein handeln, welches dann höchst wahrscheinlich auch im Liquorraum gebildet wird. Gerade hier wäre nun zum Vergleich das Spektrum vom Liquor klinisch gesunder Pferde interessant, um Rückschlüsse ziehen zu können, ob es sich hier um ein physiologischerweise vorkommendes Protein handelt.

Die Peaks 9, 13 und K4 scheinen in dieser Form nur im Serum vorzukommen. Es ist zu nicht auszuschließen, dass sie im Liquor eine andere Ladung oder Größe besitzen, weshalb eine direkte Gegenüberstellung nicht gelingt (vergleiche „Mensch – Pferd“, 3. Absatz). Möglich ist jedoch ebenfalls, dass speziell diese Proteine die BHS nicht durchdringen können (z.B. aufgrund einer Bindung an größere Träger-Moleküle) und auch nicht im Liquorraum produziert werden, sodass sie dort in der Tat nicht vorkommen.

Bei 27 der 39 Peaks ist die Intensität im Serum der im ZNS unauffälligen Pferde höher als im Serum der im ZNS erkrankten Pferde. Dies erscheint plausibel, da die Gruppe der im ZNS

unauffälligen Pferde aus Pferden mit den unterschiedlichsten systemischen Erkrankungen (ausgenommen zentralnervöse Erkrankungen) besteht, was selbstverständlich starke Auswirkungen auf das Proteinmuster dieser Pferde hat. Die Peaks 3b, 9 und K6 kommen sogar im Serum ausschließlich bei dieser Gruppe vor. Erstaunlich ist jedoch, dass bei 14 Peaks auch im Liquor dieser Pferde höhere Intensitäten auftreten, als im Liquor der im ZNS erkrankten Pferde. Dies erscheint verwunderlich, da prinzipiell bei einem neurologischen Patienten eher höhere Proteinkonzentrationen (insbesondere der Entzündungsproteine) im Liquor zu erwarten sind. Auffallend ist, dass die Intensitäten bestimmter Peaks im Liquor dieser neurologisch unauffälligen Pferde umso höher sind, desto schwerwiegender das klinische Bild der systemischen Allgemeinerkrankung war. Ein Beispiel hierfür ist Patient 7, ein Pferd mit Oesophagusruptur, Pneumonie und damit einhergehender Sepsis. Hier sind die Intensitäten bei den meisten Peaks sowohl im Serum als auch im Liquor sehr hoch (besonders deutlich im Serum bei Peak 18 und K2 und im Liquor bei Peak 8 und 20). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bei schwerwiegenden systemischen Erkrankungen (z.B. Stoffwechselstörungen, bakteriellen Infektionen u.a.) die BHS und BLS oft deutliche Schädigungen aufweisen, auch wenn es sich um keine zentralnervöse Erkrankung handelt und keinerlei neurologische Symptome vorhanden sind.

Ein Beispiel hierfür ist, dass der TTR-Peak im Serum der neurologischen Patienten eine allgemein höhere Intensität aufweist als bei den neurologisch unauffälligen Pferden. Im Liquor ist es jedoch genau umgekehrt. Hier findet man bei den neurologisch unauffälligen Pferden die deutlich höheren Intensitäten. TTR ist bekanntermaßen eines der wichtigsten Entzündungsproteine im Liquor. Die hohen Intensitäten im Liquor der vermeintlich neurologisch unauffälligen Pferde verstärken die Vermutung, dass aufgrund der systemisch verursachten Schädigung der BHS und BLS, die Entzündungsvorgänge im Liquor dieser Pferde teilweise sogar gravierender zu sein scheinen, als bei den eigentlichen neurologischen Patienten.

Die Erkenntnis die daraus gezogen werden kann ist, dass als Vergleichswert für Untersuchungen der CSF ausschließlich Liquor von klinisch komplett unauffälligen, sprich gesunden Pferden herangezogen werden kann.

Bei einigen Peaks ist der Mittelwert der Intensitäten im Serum der klinisch unauffälligen Pferden deutlich am höchsten (z.B. Peak 3a und b). Hier ist also zu vermuten, dass es sich um physiologischerweise vorhandene Proteine handelt, deren Konzentration durch eine Erkrankung sinkt. Ein Beispiel sind hierfür die so genannten „negativen“ Akute-Phase-Proteine, deren Biosynthese während der APR herunterreguliert wird. Oder aber es handelt sich um Proteine, die im Zuge einer Erkrankung vermehrt „verbraucht“ werden und somit dann in geringerer Konzentration vorliegen.

K5 ist der einzige der ausgewerteten Peaks, der nur im Liquor zu erkennen ist. Er erscheint zu Peak 8 gehörig. Hierbei handelt es sich möglicherweise um eine Modifikation, d.h. eine Variante des Peak 8, die rein Liquor-spezifisch ist.

5.4.8 Hämoglobin

Die Peaks K8 und K9 (im Bereich 15-16k Da) sind im Serum der klinisch unauffälligen Pferde überhaupt nicht zu sehen, wohingegen sie in den anderen Gruppen bei einigen Pferden vorkommen und zwar immer nur gemeinsam auftreten. Alle 4 Pferde, bei denen Peak K8 und K9 im Liquor zu erkennen sind, weisen zudem, im Bereich von 7600 und 8000 Da Peaks auf, die jedoch lediglich die Doppelladung von K8 und K9 darstellen. Die Pferde, bei denen Peak K8 und K9 im Liquor zu erkennen sind, (Pferd 5, 6, 7 und K) weisen einen positiven Test auf Hb im Liquor auf. Die Pferde 5, 6 und K mit relativ hohen Intensitäten weisen gar einen Hb-Gehalt auf, der >200 Erythrozyten/ μ l entspricht. Allerdings sind bei den Pferden 9, 19 und D diese Peaks nicht zu sehen, obwohl auch diese 3 Pferde erhöhte Hb-Werte zeigten. Die Identifizierung von K8 und K9 als Hämoglobin wird dadurch bestätigt, dass reines Hb auf einen Alu- oder SAX-Chip aufgetragen, nahezu identische Peaks ergibt, wobei hier jedoch keine weiteren Peaks zu erkennen sind. Es ist jedoch nicht geklärt, um welche Hämoglobinfragmente es sich hier genau handelt.

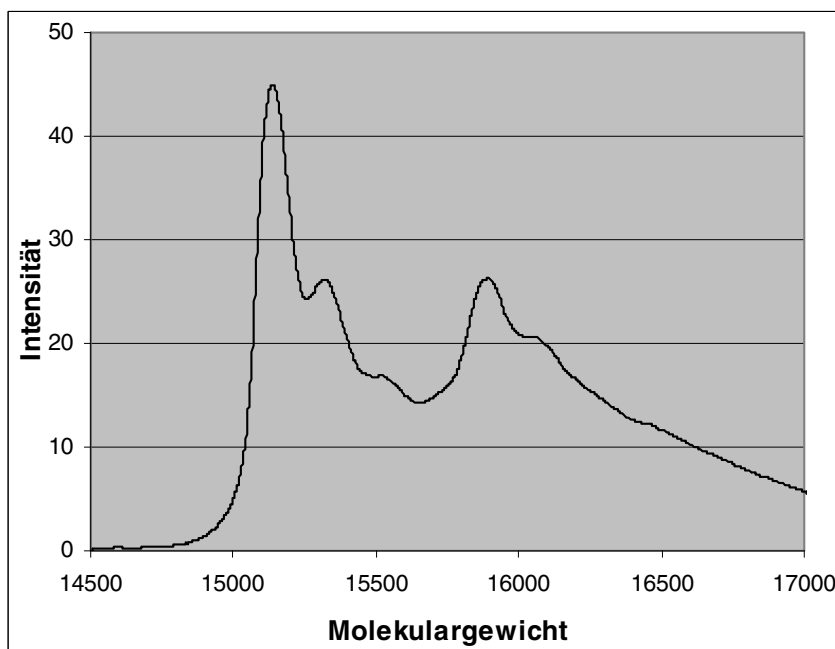


Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung des Hämoglobins aus equinem Serum mittels Massenspektrometrie nach selektiver Anreicherung auf einem Antikörper-Chip

Ein Massenbereich, bei dem im Liquor deutliche Unterschiede zwischen den neurologisch unauffälligen und zentralnervös erkrankten Pferden zu erkennen sind, ist der Bereich

zwischen 8000 und 8500 Da. Nur im Liquor zentralnervös erkrankter Pferde ist eine heterogene Anhäufung von dicht aufeinander folgenden Peaks zu erkennen, die bei einem großen Teil der erkrankten Pferde zu sehen sind. Die Pferde zeigen unterschiedlich teils nur einen, teils mehrere dieser Peaks. Es konnte keine Korrelation zu den spezifischen Erkrankungen, Hämoglobingehalten der Proben oder sonstigen Parametern gefunden werden, die erklären würden, weshalb diese Peaks bei einem Teil der Patienten so auffällig sind oder ob bei einzelnen Erkrankungen diese Peaks vermehrt bestimmten Massebereichen zuzuordnen sind. Dies ist jedoch sicherlich ein Bereich des Spektrums, der mit einer größeren Anzahl von Patienten noch einmal genauer auf dieses Phänomen hin untersucht werden sollte. Es handelt sich hierbei mit größter Wahrscheinlichkeit um Proteine, die im unmittelbaren Zusammenhang mit neurologischen Veränderungen stehen.

Einige Pferde, die sonst eher unauffällige Peakmuster aufweisen, zeigen im Serum oder im Liquor ganz vereinzelt bei bestimmten Peaks unerwartet hohe Intensitäten. Ein Beispiel ist hierbei Pferd 13, dessen Peak 16 im Serum mit 44 eine besonders hohe Intensität aufweist. Dieses Pferd wurde aufgrund zunehmender Kachexie, verursacht durch einen Milztumor, euthanasiert. Leider sind in dieser Studie keine weiteren Patienten mit einer solchen Erkrankung. Somit kann nicht nachvollzogen werden inwiefern diese hohe Intensität, die kein weiteres Pferd auch nur annähernd erreicht, mit dem Krankheitsbild zusammenhängt.

Ein weiteres Beispiel für solche ungewöhnlichen Einzelphänomene ist die Morphologie der Peakgruppe 25, 26a und b im Serum von Pferd 5 (Kolik-Patient), bei dem Peak 26b nicht vorhanden, statt dessen aber ein Peak mit 30120 Da vor der Gruppe zu sehen ist. Da die anderen Peaks unauffällig sind und dieses Phänomen reproduzierbar war, scheint es keinen technischen Grund dafür zu geben.

5.5 Erkrankungen

Beim Vergleich des Serums und der CSF von Pferden wurden Proben von Pferden mit neurologischen Symptomen und von Pferden mit den unterschiedlichsten Allgemeinerkrankungen untersucht. Beide Gruppen zeichnen sich durch ein sehr heterogenes Krankheitsmuster aus (Tabelle 5 und Tabelle 6), sodass aufgrund der geringen Gesamtzahl der Individuen eine aussagekräftige Einteilung in Gruppen nach Erkrankungen oder gar eine statistische Auswertung nicht möglich war. Dennoch wurden alle Peaks die in den Gruppen der erkrankten Pferde bei einigen Individuen mit erhöhter Intensität auftraten, daraufhin überprüft, ob irgendein Zusammenhang zu erkennen war, weshalb ausgerechnet bestimmte Pferde einer Gruppe besonders hohe Intensitäten aufwiesen. Es konnten jedoch weder im Serum noch im Liquor „erkrankungsspezifische Peaks“, gefunden werden.

5.6 Schlussbetrachtung und Ausblick

In der vorliegenden deskriptiven Analyse soll ein erster Eindruck über das mittels SELDI-TOF-MS ermittelte Proteinmuster des Pferdes gegeben werden. Nur bei einigen wenigen Proteinen wurde darüber hinaus auch eine Proteinanalytik durchgeführt. Dies bei allen als Peak sichtbaren Proteinen vorzunehmen, war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, ist aber sicherlich eine Aufgabe für nachfolgende Studien.

Es sei noch einmal daraufhin gewiesen, dass das hier besprochene Proteinspektrum lediglich ein kleiner Teil des Gesamtproteinmusters des Pferdes ist. Es fehlen die Untersuchung der Peptide < 4000 Da und der Proteine > 80000 Da.

Zudem können mittels des SAX-Chips lediglich Proteine mit negativer Gesamtladung als Peak in ausreichender Qualität dargestellt werden (siehe Seite 30). Um das Proteinmuster zu komplettieren fehlen also weitere Untersuchungen im SELDI-TOF-MS mit anderen Chip-Typen.

Die Untersuchung weiterer Körperflüssigkeiten (Harn, Semialplasma, Speichel etc) mittels dieser Methode wäre ebenfalls eine Aufgabe für die nähere Zukunft, um das Proteinmuster beim Pferd zu vervollständigen.

Das weitere und hauptsächliche Ziel dieser Art der Untersuchungen ist sicherlich, wie in der Humanmedizin die Suche nach erkrankungsspezifischen Markern, die sich zur Frühdiagnostik eignen. Dazu sind ähnliche Untersuchungen mit einer erheblich größeren Patientenzahl erforderlich, die auch eine statistische Auswertung von Krankheitsgruppen ermöglicht.

6 Zusammenfassung

Massenspektrometrische Proteinuntersuchung in Serum und CSF von gesunden und neurologisch erkrankten Pferden:

Die Proteomik ist eine noch relativ junge Forschungsrichtung, die sich mit dem gesamten Proteinexpressionsmuster des Organismus, d.h. vor allem auch mit den Aufgaben und Wechselwirkungen der unterschiedlichsten Proteine befasst. Eine der dabei verwendeten Methoden ist die SELDI-TOF-MS (surface-enhanced-laser-deionisation/ionisation-time of flight-mass-spectrometry).

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit ist es, im Hinblick auf eine zukünftige medizinisch-diagnostische Nutzung der SELDI-TOF-MS-Technik beim Pferd einen Einstieg in die Serum- und Liquoranalyse zu bekommen. Dazu wurde zunächst das Serum gesunder Pferde mit dem anderer Equiden und Humanserum gesunder Probanden verglichen, um einen umfassenden Eindruck vom physiologischen Peakmuster des Pferdes zu erlangen. Des Weiteren wurde Serum und Liquor systemisch und/oder neurologisch erkrankter Pferde miteinander verglichen, um erste Eindrücke der Auswirkung dieser pathologischen Zustände auf das massenspektrometrische Peakmuster des Pferdes zu bekommen.

Der praktische Teil der hier vorliegenden Arbeit teilt sich in drei Teile:

Im ersten Teil wurde das Peakmuster im Serum von 8 gesunden Menschen und 8 gesunden Pferden miteinander verglichen.

Im zweiten Teil wurden die Spektren von jeweils 6 Pferden, Eseln und Maultieren analysiert, um eventuelle Rückschlüsse auf das verwandtschaftliche Verhältnis zu finden.

Der dritte Teil bestand aus der Gegenüberstellung des Serum und Liquor von 14 neurologisch und 19 systemisch erkrankten Pferden und dem Vergleich zum Serum klinisch unauffälliger Pferde.

Alle Proben wurden auf einen SAX-Chip aufgetragen und mittels SELDI-TOF-MS in einem Bereich von 4000-80000 Da untersucht. Die Peakmuster wurden miteinander verglichen und auf Zusammenhänge mit Erkrankungsbildern und anderen Parametern wie Alter, Rasse, Geschlecht hin untersucht. Zusätzlich wurden das Gesamtprotein und der Hämoglobingehalt bestimmt und von einigen Proben exemplarisch Silberfärbungen angefertigt.

Serumamyloid A, Retinol-Bindungs-Protein, Transthyretin und Hämoglobin konnten zudem durch weitere Methoden der Proteinanalytik wie Western Blot oder Antikörper-Chips identifiziert werden.

Im Serum der klinisch unauffälligen Pferde wurden im genannten Massenbereich 29 Peaks charakterisiert.

Die Anzahl, Morphologie und Intensität der Peaks betreffend, ist beim Vergleich der Equiden, im Peakmuster der Maultiere eine deutlich größere Übereinstimmung mit den Eseln als mit den Pferden vorhanden.

In der Gegenüberstellung von Serum und Liquor der zentralnervös erkrankten und neurologisch unauffälligen Pferde, weist der Liquor systemisch erkrankter Pferde weit mehr pathologische Veränderungen auf, als aufgrund der fehlenden neurologischen Symptome zu vermuten wäre. Für keinen Peak konnte bezüglich des Auftretens, der Morphologie oder der Intensität eine Korrelation zu den Parametern Geschlecht, Rasse, Alter und Erkrankung bzw. Erkrankungsdauer gefunden werden.

Im Bereich 8000 bis 8500 Da tritt im Liquor zentralnervös erkrankter Pferde eine Anhäufung dicht aufeinander folgender Peaks auf, die weder im Liquor, noch im Serum anderer Gruppen beobachtet werden kann. Dies ist ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen im Hinblick auf Biomarker zur Diagnostik neurologischer Erkrankungen.

Die Proteindiagnostik mittels SELDI-TOF-MS scheint auch in der Veterinärmedizin eine viel versprechende Diagnostikmethode zu werden. Zum ersten Mal wurden Serum und Liquor von Pferden mit dieser Methode untersucht.

7 Summary

Mass-spectrometric proteinexamination in serum and CSF from healthy and neurologically ill horses:

The relatively young field of research of „Proteomic“ concerns itself with the complete Protein- Expression- Patterns of the organism; here mainly with the tasks and exchanging effects of the different proteins. One of the hereby used methods is the SELDI-TOF-MS (surface-enhanced-laser-deionization/ ionization-time of-flight-mass-spectrometry).

The idea of this descriptive work has been to get an introduction into the serum- and CSF-analysis for the future diagnostic use of the SELDI-TOF-MS-Technique for horses. First the serum of healthy horses has been compared to the human and to those of the equids to gain a thorough impression of the physiological peak-patterns. Further the serum and CSF of systemically and neurologically ill horses were compared to each other in order to gain first impressions of the effects of those pathological circumstances of the mass-spectrometric peak- patterns of the horse.

The practical part of his work is organized in three parts:

In the first part the peak- patterns in the serum of the eight healthy humans and eight healthy horses were compared to each other.

In the second part the specters of six horses, six donkeys and six mules have been analyzed to draw possible conclusions concerning their relational situation.

The third part consists of the confrontation of the serum and CSF of 14 neurologically ill and 19 systemically ill horses and of the comparison to the serum of clinically non-remarkable horses.

All the samples have been extracted to a SAX- Chip and via the SELDI-TOF-MS examined in an area of 4000-80000 DA. The peak- patterns have been compared and examined concerning their relation of the diseases and other parameters like age, race and sex. In addition the overall protein and the hemoglobin-level were taken and some samples were colored in silver for examples.

The serumamyloid A, retinol-connective-protein, transthyretin and hemoglobin could also be identified through further methods of protein- analysis like the Western Blot or Antibody-Chips.

In the serum of the clinically non-remarkable horses 29 peaks in the named mass-area have been characterized.

Concerning number, morphology and intensity of the peaks during the comparison among equids, the peak- patterns of the mules have shown a greater sum of common aspects with the donkeys than with the horses.

In the confrontation of the serum and CSF of the horses with CNS illnesses and CNS-healthy horses, the CSF of the systemic-ill horses has shown many more pathological changes than expected due to the lack of neurological signs. A correlation to the parameters of age, race or sex concerning the appearance, morphology or intensity could not be found for any of the peaks.

In the range of 8000 to 8500 Da the CSF of neurologically ill horses has shown a compiling of closely following peaks that has not been recognized in the serum and CSF of other groups. This is an interesting start for further research in the direction of bio-markers for the diagnosis of neurological diseases.

The protein- diagnosis via SELDI-TOF-MS seems to become a diagnostic method for veterinary medicine as well as for humans. CSF and serum of horses have been examined by this method for the first time.

8 Literaturverzeichnis

ADEREM, A.; Smith, K. D. (2004): A systems approach to dissection immunity and inflammation. *Semin Immunol.* 16(1). 55-67.

AIVADO, M. (2005): Optimization and evaluation of surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) with reversed-phase protein arrays for protein profiling. *Clin Chem Lab Med* 43(2). 133-140.

ALDRED, A. R.; Brack, C. M.; Schreiber, G. (1995): The cerebral expression of plasma protein genes in different species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 111(1). 1-15.

ANDREWS, F. M.; Maddux, J., M. ; Faulk, D. (1995): Total protein, albumin quotient, IgG and IgG index determinations for horse cerebrospinal fluid. *Prog Vet Neurol.* 1(2). 197-204.

BERNARD, A. M.; Moreau, D.; Lauwerys, R. R. (1982): Latex immunoassay of retinol-binding protein. *Clin Chim.* 28(5). 1167-1171.

BILZER, T.; Grabner, A.; Stitz, L. (1996): Immunpathologie der Borna-Krankheit beim Pferd: klinische, virologische und neuropathologische Befunde. *Tierärztl Prax* 25. 567-576.

BLAKE, C. C.; Geisow, M. J.; Oatley, S. J.; Rerat, B.; Rerat, C. (1978): Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol.* 121(3). 339-56.

BLOTTNER, D. (2004). Die Hirnhäute. Skript der Neuroanatomie-Vorlesung. FU Berlin.

BONS, J. A.; Wodzig, W. K.; van Dieijen-Visser, M. P. (2005): Protein profiling as a diagnostic tool in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* 43(12). 1281-1290.

BRANDON, C. I.; Heusner, G. L.; Caudle, A. B.; Fayrer-Hosken, R. A. (1999): Two dimensional polyacrylamid gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52. 863-873.

BUDRAS, K. D.; Röck, S. (1997): Atlas der Anatomie des Pferdes. Hannover. Schlütersche Verlag.

BURRI, B. J.; Neidlinger, T. R.; Zwick, H. (1993): Comparison of the properties and concentrations of the isoforms of retinol binding protein in animals an human beings. *Am J Vet Res.* 54(8). 1213-1220.

CARETTE, O. e. a. (2003): A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer´s disease. *Proteomics* 3. 1486-1494.

CHODOBSKI, A.; Szmydynger-Chodobska, J. (2001): Choroid Plexus: Target for polypeptides an site of their synthesis. *Microscop Res Tech.* 52. 65-82.

- CIPHERGEN (2002): ProteinChip Software 3.1 Operation Manual.
- CORDINGLEY, H. C. e. a. (2003): Multifactorial Screening Design and Analysis of SELDI-TOF Protein Chip Array Optimization Experiments. *BioTechniques* 34. 364-373.
- DAHME, E.; Schmahl, W. (1999): *Nervensystem*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- DICKSON, P. W.; Aldred, A. R.; Menting, J. G.; Marley, P. D.; Sawyer, W. H.; Schreiber, G. (1987): Thyroxine transport in choroid plexus. *J Biol Chem*. 262(10). 13907-13915.
- DURAN, W.; Schreiber, G. (1992): Expression of Retinol-Binding-Protein mRNA in mammalian choroid plexus. *Comp Biochem Physiol*. 101(B). 399-406.
- ECKHOFF, A.; Rieber, H.; Kirbach, H.; Uhlig, A.; Schusser, G. F. (2006): Liquoranalyse bei der Borna Erkrankung des Pferdes: Ein neuer diagnostischer Ansatz zur Messung der intrathekalen Immunantwort. *Vet Med Austria* 93. 235-243.
- FISHMAN, R. A. (1992): *Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system*. Philadelphia.
- FOUCHECOURT, S.; Metayer, S.; Locatelli, A.; Dacheux, F.; Dacheux, J. L. (2000): Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterisation, secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod*. 62. 1790-1803.
- FURR, M. O.; Bender, H. (1994): Cerebrospinal fluid variables in clinically normal foals from birth to 42 days of age. *Am J Vet Res*. 55(6). 781-4.
- GERICKE, B.; Raila, J.; Sehouli, J.; Haebel, S.; Kongsen, D.; Mustea, A.; Schweigert, F. J. (2005): Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid of ovarian cancer patients. *BMC Cancer*. 5(133). 1-9.
- GOEHRING, L. S.; Kessels, B. G.; van Maanen, C.; Voorbij, H. A.; Oldruitenborgh-Oosterbaan, S. v. (2006): Evaluation of nephelometry for albumin measurement in serum and cerebrospinal fluid: experiences with an indwelling subarachnoidal catheter system for repetitive cerebrospinal fluid collection in horses. *J Vet Diagn Invest* 18. 251-256.
- GREEN, E. M.; Constantinescu, G. M.; Kroll, R. A. (1993): Equine Cerebrospinal Fluid: Analysis. *Equine Vet J*. 15(2). 288-301.
- GUERREIRO, N.; Gomez-Mancilla, B.; Chramont, S. (2007): Optimization and evaluation of surface-enhanced-laser-desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry for protein profiling of cerebrospinal fluid. *Proteome Science* 4(7). 34-46.
- HAMMERBACHER-SMITH, K. I. (2001): Nephrometrische und elektrophoretische Liquorbestimmungen bei neurologisch unauffälligen und kranken Pferden - ein Methodenvergleich. *Medizinische Tierklinik, Lehrstuhl für Innere Krankheiten des Pferdes und der kleinen Haustiere, Ludwig-Maximilian-Universität München*.

- HAYES, T. E. (1987): Examination of cerebrospinal fluid in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 3(2). 283-91.
- HEUKESHOVEN, J.; Dernick, R. (1988): Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit: Staining of dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9. 28-32.
- HULTEN, C.; Sletten, K.; Foyen Bruun, C.; Marhaug, G. (1997): The acute phase serum amyloid A protein (SAA) in the horse: isolation and characterisation of three isoforms. *Vet Immunol Immunopathol.* 57(3-4). 215-227.
- HUSEBEKK, A.; Skogen, B.; Husby, G.; Marhaug, G. (1985): Transformation of amyloid precursor SAA to protein AA and incorporation in amyloid fibrils in vivo. *Scand J Immunol.* 21. 283-287.
- HUTCHENS, T. W.; Yip, T. T. (1993): New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Com Mass Spectr.* 7(7). 576-580.
- IKADAI, H.; Habamoto, S.; Xuan, X.; Igarashi, I.; Nagasawa, H.; Fujisaki, K.; Suzuki, N.; Mikami, T. (2000): Protein analysis of *Babesia caballi* merozoites by two-dimensional polyacrylamid gel electrophoresis and western blotting. *Vet Med Sci.* 62. 323-327.
- JACOBSON, D. R. (2003). Amyloidosis, Transthyretin-related. *eMedicine*. University school of medicine, New York.
- JOACHIMSKI, F. (1998). Neuroanatomieseminar. Online Version. Universität München.
- JOHNSON, P. J.; Constantinescu, G. M. (2000): Analysis of cerebrospinal fluid in horses. *Equine Vet Educ.* 12(1). 13-17.
- JOHNSON, P. J.; Constantinescu, G. M. (2000): Collection of cerebrospinal fluid in horses. *Equine Vet Educ.* 12(1). 7-12.
- JUNEJA, R. K.; Andersson, L.; Sandberg, K.; Gahne, B.; Adalsteinsson, S.; Gunnarsson, E. (1984): Two dimensional electrophoresis of horse serum proteins: genetic polymorphism of ceruloplasmin and two other serum proteins. *Anim Blood Groups Biochem Genet.* 15(4). 237-250.
- KENT, J. (1992): Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. *Br Vet J.* 148(4). 279-282.
- KHWAJA, F. W.; Nolen, J. D.; Mendrinou, S. E.; Lewis, M. M.; Pohl, J.; Van Meir, E. G.; Ritchie, J. C.; Brat, D. J. (2006): Proteomic analysis of cerebrospinal fluid discriminates malignant and nonmalignant disease of the central nervous system and identifies specific protein markers. *Proteomics* 6(23). 6277-6287.

- KIEHNTOPF, M.; Siegmund, R.; Deufel, T. (2007): Anwendung der SELDI-TOF-Massenspektrometrie zur Identifizierung neuer Biomarker: Möglichkeiten und Grenzen. *Laboratoriumsmedizin* 31(3). 93-108.
- KOOLMANN, J.; Röhm, K. H. (1998): Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart: Thieme Verlag.
- KRAFT, W.; Dürr, U. M. (2005): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer GmbH.
- KUSHNER, I.; Mackiewicz, A. (1987): Akute phase proteins as disease markers. *Dis Markers*. 5. 1-11.
- LORENZO, A. V.; Page, L. K.; Watters, G. V. (1970): Relationship between cerebrospinal fluid formation, absorption and pressure in human hydrocephalus. *Brain*. 93(4). 679-692.
- LOTTENSPEICH, F.; Zorbas, H. (1998): Bioanalytik. München: Spektrum-Verlag, Elsevier.
- MACWILLIAMS, P. S. (2002): Cerebrospinal fluid. Mosby Verlag.
- MADDALENA, A. S.; Papassotiropoulos, A.; Gonzalez-Agosti, C. (2004): Cerebrospinal fluid profile of amyloid beta peptides in patients with Alzheimer's disease determined by protein biochip technology. *Neurodegener. Dis.* 1(4). 231-235.
- MARCHI, N.; Fazio, V.; Cucullo, L.; Kight, K.; Masaryk, T.; Barnett, G.; Volgelbaum, M.; Kinter, M.; Rasmussen, P.; Mayberg, M. R.; Janigro, D. (2003): Serum Transthyretin monomer as a possible marker of Blood-to-CSF Barrier disruption. *J Neurosci*. 23(5). 1949-1955.
- MAYHEW, I. G.; Whitlock, R. H.; Tasker, J. B. (1977): Equine cerebrospinal fluid: reference values of normal horses. *Am J Vet Res*. 38(8). 1271-4.
- MCDOWELL, K. J.; Little, T. V.; Timoney, P. J.; Adams, M. H. (1996): Characterisations of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and supplement with testosterone. *Res Vet Sci*. 61. 33-37.
- MILLER, I.; Friedlein, A.; Tsangaris, G.; Maris, A.; Fountoulakis, M.; Gemeiner, M. (2004): The serum proteome of *Equus caballus*. *Proteomics*. 4. 3227-3234.
- MONACO, H. L.; Rizzi, M.; Coda, A. (1995): Structure of a complex of two plasma proteins: Transthyretin and Retinol-Binding Protein. *Science*. 268(5). 1039-1041.
- PATTERSON, S. D.; Aebersold, R. H. (2003): Proteomics: the first decade and beyond. *nature gen suppl* 33(3). 311-323.
- PETERSEN, H. H.; Nielsen, J. P.; Heegaard, P. M. H. (2004): Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*. 35. 163-187.
- PROTEOMFORSCHUNG, D. G. f. (2006): Allgemeines über Proteomik.

- PUCHADES, M.; Westman, A.; Davidsson, P. (1999): Analysis of intact proteins from cerebrospinal fluid by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry after two-dimensional liquid-phase electrophoresis. *Rapid Com Mass Spectr.* 13. 2450-2455.
- RAWEL, H. M. (2006). Phänomen der Doppelladung. Potsdam: persönliche Mitteilung.
- REIBER, H. (1980): The discrimination between different blood CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by recent evaluation graph for the protein profile of cerebrospinal fluid. *J Neurol* 224. 89-99.
- ROBBINS, J. (2002): Transthyretin from discovery to now. *Clin Chem Lab Med.* 40(12). S. 1183-1190.
- SCHWÄGERL, C. (2003). Die Partitur des Gen-Eiweiß-Konzerts. *Frankfurter Allgemeine Zeitung.* Frankfurt: 42.
- SCHWEIGERT, F. J. (2005): Characterisation of protein microheterogeneity and protein complexes using on-chip immunoaffinity purification-mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 4(1). 7-15.
- SCHWEIGERT, F. J.; Rawel, H. M.; Raila, J. (2005): Biomarker als Indikatoren für den gesundheitsfördernden Effekt von Pflanzenmetaboliten. *Laborwelt.* 4. 29-32.
- SEIBERT, V. e. a. (2004): Surface-enhanced laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and ProteinChip technology in proteomics research. *Path. Res. Pract.* 200. 83-94.
- SMOLLICH, A.; Günther, M. (1992): *Mikroskopische Anatomie der Haustiere.* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- SOPRANO, D. R.; Herbert, J.; Soprano, K. J.; Schon, E. A.; Goodman, D. S. (1985): Demonstration of Transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *J Biol Chem.* 260. 11793-11798.
- SOUSA, J. C.; Grandela, C.; Fernández-Ruiz, J.; Miguel, R.; Sousa, L.; Magalhães, A. I.; Saraiva, M. J.; Sousa, N.; Palha, J. A. (2004): Tranthyretin is involved in depression-like behaviour and exploratory activity. *J Neurochem.* 88. 1052-1058.
- STAIGER, J. F. (2005). *Blut-Hirn-Schranke.* Neuroanatomieseminar. Universität Düsseldorf.
- STARK, M.; Danielsson, O. Griffith, W. J.; Jornvall, H.; Johansson, J. (2001): Peptide repertoire of human cerebrospinal fluid: novel proteolytic fragments of neuroendocrine proteins. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 754(2). 357-367.

SULLIVAN, G. M.; Hatterer, J. A.; Herbert, J.; Chen, X.; Roose, S. P.; Attia, E.; Mann, J. J.; Marangell, L. B.; Goetz, R. R.; Gorman, J. M. (1999): Low levels of Transthyretin in the CSF of depressed patients. *Am J Psychiatry*. 156. 710-715.

SUZUYAMA, K. e. a. (2004): Combined proteomic approach with SELDI-TOF-MS and peptide mass fingerprinting identified the rapid increase of monomeric transthyretin in rat cerebrospinal fluid after transient focal cerebral ischemia. *Mol. Brain. Res.* 129. 44-53.

SWISSPROT (2006): ExPASy proteomics.

THEWS, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P. (1999): *Blut-Hirn-Schranke und Liquorbildung*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

TODD, J. C. S., A.H; Davidson, I., Ed. (1984): *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Philadelphia: WB Saunders. -.

VANVELDE, H.; Zurbruggen, A.; Bailey, C. S.; Dunlop, R. H. (2001): Pathophysiology of the central nervous system. In: *Veterinary pathophysiology*. / R. H. Dunlop, and C. H. Malbert (Hrsg.). Iowa: Blackwell Publishing. 278-279.

VOGESER, M.; Kobold, U.; Seidel, D. (2007): Massenspektrometrie in der Medizin - Stellenwert der molekularen Analytik. *Deutsches Ärzteblatt* 104(31-32). 1875-1881.

WUNDERLIN, M. (2000). Einführung in die MALDI-Massenspektrometrie. Projekt Z4-Massenspektrometrie. Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung Ulm.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Soziografische Daten der klinisch unauffälligen Pferde (n=8)	23
Tabelle 2:	Soziografische Daten der Gruppe der Pferde	23
Tabelle 3:	Soziografische Daten der Maultiere	24
Tabelle 4:	Soziografische Daten der Esel	24
Tabelle 5:	Soziografische Daten der neurologisch unauffälligen Pferde (n=19)	25
Tabelle 6:	Soziografische Daten der zentralnervös erkrankten Pferde (n=14)	26
Tabelle 7:	Gesamtprotein und Hämoglobin der neurologisch unauffälligen Pferde	32
Tabelle 8:	Gesamtprotein und Hämoglobin der zentralnervös erkrankten Pferde	33
Tabelle 9:	Daten Peak 1 Pferd/Mensch	38
Tabelle 10:	Daten Peak 2 Pferd/Mensch	38
Tabelle 11:	Daten Peak 3 Pferd/Mensch	38
Tabelle 12:	Daten Peak 4 Pferd/Mensch	38
Tabelle 13:	Daten Peak 5 Pferd/Mensch	38
Tabelle 14:	Daten Peak 6 Pferd/Mensch	39
Tabelle 15:	Daten Peak 7 Pferd/Mensch	39
Tabelle 16:	Daten Peak Me 1 Pferd/Mensch	39
Tabelle 17:	Daten Peak Me 2 Pferd/Mensch	39
Tabelle 18:	Daten Peak Me3 Pferd/Mensch	39
Tabelle 19:	Daten Peak 8 Pferd/Mensch	40
Tabelle 20:	Daten Peak 9 Pferd/Mensch	40
Tabelle 21:	Daten Peak 10 Pferd/Mensch	40
Tabelle 22:	Daten Peak 11 Pferd/Mensch	40
Tabelle 23:	Daten Peak Me 4 Pferd/Mensch	40
Tabelle 24:	Daten Peak Me 5 Pferd/Mensch	41
Tabelle 25:	Daten Peak 12 Pferd/Mensch	41
Tabelle 26:	Daten Peak 13 Pferd/Mensch	41
Tabelle 27:	Daten Peak 14 Pferd/Mensch	41
Tabelle 28:	Daten Peak 15 Pferd/Mensch	41
Tabelle 29:	Daten Peak 16 Pferd/Mensch	42
Tabelle 30:	Daten Peak 17 Pferd/Mensch	42
Tabelle 31:	Daten Peak Me 6 Pferd/Mensch	42
Tabelle 32:	Daten Peak Me 7 Pferd/Mensch	42
Tabelle 33:	Daten Peak Me 8 Pferd/Mensch	42
Tabelle 34:	Daten Peak 18 Pferd/Mensch	43
Tabelle 35:	Daten Peak 19 Pferd/Mensch	43

Tabelle 36:	Daten Peak 20 Pferd/Mensch	43
Tabelle 37:	Daten Peak 21 Pferd/Mensch	43
Tabelle 38:	Daten Peak 22 Pferd/Mensch	44
Tabelle 39:	Daten Peak 23 Pferd/Mensch	44
Tabelle 40:	Daten Peak 24 Pferd/Mensch	44
Tabelle 41:	Daten Peak 25 Pferd/Mensch	44
Tabelle 42:	Daten Peak 26a Pferd/Mensch	44
Tabelle 43:	Daten Peak 26b Pferd/Mensch	45
Tabelle 44:	Daten Peak 27 Pferd/Mensch	45
Tabelle 45:	Daten Peak 28 Pferd/Mensch	45
Tabelle 46:	Daten Peak 1 im Equidenvergleich	47
Tabelle 47:	Daten Peak μ_1/E_1 im Equidenvergleich	48
Tabelle 48:	Daten Peak 2 im Equidenvergleich	48
Tabelle 49:	Daten Peak 3 im Equidenvergleich	48
Tabelle 50:	Daten Peak 4 im Equidenvergleich	48
Tabelle 51:	Daten Peak 5 im Equidenvergleich	48
Tabelle 52:	Daten Peak μ_2/E_2 im Equidenvergleich	49
Tabelle 53:	Daten Peak 6 im Equidenvergleich	49
Tabelle 54:	Daten Peak 7 im Equidenvergleich	49
Tabelle 55:	Daten Peak 8 im Equidenvergleich	49
Tabelle 56:	Daten Peak 9 im Equidenvergleich	49
Tabelle 57:	Daten Peak 10 im Equidenvergleich	50
Tabelle 58:	Daten Peak 11 im Equidenvergleich	50
Tabelle 59:	Daten Peak 12 im Equidenvergleich	50
Tabelle 60:	Daten Peak 13 im Equidenvergleich	50
Tabelle 61:	Daten Peak 14 im Equidenvergleich	50
Tabelle 62:	Daten Peak 15 im Equidenvergleich	51
Tabelle 63:	Daten Peak 16 im Equidenvergleich	51
Tabelle 64:	Daten Peak 17 im Equidenvergleich	51
Tabelle 65:	Daten Peak μ_3/E_3 im Equidenvergleich	51
Tabelle 66:	Daten Peak 18 im Equidenvergleich	51
Tabelle 67:	Daten Peak 19 im Equidenvergleich	52
Tabelle 68:	Daten Peak 20 im Equidenvergleich	52
Tabelle 69:	Daten Peak μ_4/E_4 im Equidenvergleich	52
Tabelle 70:	Daten Peak 21 im Equidenvergleich	52
Tabelle 71:	Daten Peak 22 im Equidenvergleich	52
Tabelle 72:	Daten Peak μ_5/E_5 im Equidenvergleich	53

Tabelle 73:	Daten Peak Mu6/E6 im Equidenvergleich.....	53
Tabelle 74:	Daten Peak 23 im Equidenvergleich.....	53
Tabelle 75:	Daten Peak 24 im Equidenvergleich.....	53
Tabelle 76:	Daten Peak Mu7/E7 im Equidenvergleich.....	53
Tabelle 77:	Daten Peak 25 im Equidenvergleich.....	54
Tabelle 78:	Daten Peak 26a im Equidenvergleich.....	54
Tabelle 79:	Daten Peak 26b im Equidenvergleich.....	54
Tabelle 80:	Daten Peak 27 im Equidenvergleich.....	54
Tabelle 81:	Daten Peak 28 im Equidenvergleich.....	54
Tabelle 82:	Daten Peak 1 im Vergleich Serum/Liquor.....	56
Tabelle 83:	Daten Peak 2 im Vergleich Serum/Liquor.....	56
Tabelle 84:	Daten Peak 3a im Vergleich Serum/Liquor.....	57
Tabelle 85:	Daten Peak 3b im Vergleich Serum/Liquor.....	57
Tabelle 86:	Daten Peak 4 im Vergleich Serum/Liquor.....	58
Tabelle 87:	Daten Peak 5 im Vergleich Serum/Liquor.....	59
Tabelle 88:	Daten Peak K1 im Vergleich Serum/Liquor.....	59
Tabelle 89:	Daten Peak 6 im Vergleich Serum/Liquor.....	60
Tabelle 90:	Daten Peak 7 im Vergleich Serum/Liquor.....	60
Tabelle 91:	Daten Peak K2 im Vergleich Serum/Liquor.....	61
Tabelle 92:	Daten Peak K3 im Vergleich Serum/Liquor.....	61
Tabelle 93:	Daten Peak K4 im Vergleich Serum/Liquor.....	62
Tabelle 94:	Daten Peak K5 im Vergleich Serum/Liquor.....	62
Tabelle 95:	Daten Peak 8 im Vergleich Serum/Liquor.....	63
Tabelle 96:	Daten Peak 9 im Vergleich Serum/Liquor.....	63
Tabelle 97:	Daten Peak 10 im Vergleich Serum/Liquor.....	64
Tabelle 98:	Daten Peak K6 im Vergleich Serum/Liquor.....	64
Tabelle 99:	Daten Peak 11 im Vergleich Serum/Liquor.....	64
Tabelle 100:	Daten Peak 12 im Vergleich Serum/Liquor.....	65
Tabelle 101:	Daten Peak 13 im Vergleich Serum/Liquor.....	66
Tabelle 102:	Daten Peak 14 im Vergleich Serum/Liquor.....	67
Tabelle 103:	Daten Peak 15 im Vergleich Serum/Liquor.....	67
Tabelle 104:	Daten Peak 16 im Vergleich Serum/Liquor.....	68
Tabelle 105:	Daten Peak 17 im Vergleich Serum/Liquor.....	68
Tabelle 106:	Daten Peak K7 im Vergleich Serum/Liquor.....	69
Tabelle 107:	Daten Peak 18 im Vergleich Serum/Liquor.....	69
Tabelle 108:	Daten Peak 19 im Vergleich Serum/Liquor.....	70
Tabelle 109:	Daten Peak 20 im Vergleich Serum/Liquor.....	71

Tabelle 110:	Daten Peak K8 im Vergleich Serum/Liquor	72
Tabelle 111:	Daten Peak K9 im Vergleich Serum/Liquor	73
Tabelle 112:	Daten Peak 21 im Vergleich Serum/Liquor	73
Tabelle 113:	Daten Peak 22 im Vergleich Serum/Liquor	74
Tabelle 114:	Daten Peak 23 im Vergleich Serum/Liquor	74
Tabelle 115:	Daten Peak 24 im Vergleich Serum/Liquor	75
Tabelle 116:	Daten Peak 25 im Vergleich Serum/Liquor	76
Tabelle 117:	Daten Peak 26 im Vergleich Serum/Liquor	77
Tabelle 118:	Daten Peak 26b im Vergleich Serum/Liquor	77
Tabelle 119:	Daten Peak 27 im Vergleich Serum/Liquor	78
Tabelle 120:	Daten Peak 28 im Vergleich Serum/Liquor	79

Legende zu den Tabellen

L.	Liquor
S.	Serum
GP	Gesamtprotein
Hb	Hämoglobin
MW Masse	Mittelwert des Molekulargewichtes
STABW M.	Standardabweichung - Molekulargewicht
MW Intens.	Mittelwert der Intensitäten
WB	Warmblut

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung der Meningen des Gehirns nach Blottner 2004	8
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Ventrikelsystems im Gehirn nach Blottner 2004	10
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke nach Blottner 2004.....	12
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Liquorpunktion im Atlanto-Occipital-Gelenk nach Blottner 2004	15
Abbildung 5:	Durchführung der Liquorpunktion in Allgemeinanästhesie beim Pferd - Foto: Grabner 2004	27
Abbildung 6:	Beispielhafte Darstellung des Serumamyloid A aus equinem Serum mittels Massenspektrometrie nach selektiver Anreicherung auf einem Antikörper-Chip.....	34
Abbildung 7:	Mittels Western Blot erzeugte TTR-Banden im Serum(A) und Liquor(B).....	35
Abbildung 8:	Mittels Western Blot erzeugte RBP-Banden im Serum(A) und Liquor(B)	35
Abbildung 9:	Vergleichende Gegenüberstellung des Proteinmuster im Serum von Esel(E), Maultier(M) und Pferd(P) nach SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung	46
Abbildung 10:	Vergleichende Gegenüberstellung des Proteinmuster im Serum von Serum(S) und Liquor(L) nach SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung ...	55
Abbildung 11:	Beispielhafte Darstellung des Hämoglobins aus equinem Serum mittels Massenspektrometrie nach selektiver Anreicherung auf einem Antikörper-Chip.....	91
Abbildung 12:	Vergleich des Proteinmusters im Serum von Mensch und Pferd im Bereich 4 - 10 kDa.....	SELDI-TOF-MS Graphiken 111
Abbildung 13:	Vergleich des Proteinmusters im Serum von Mensch und Pferd im Bereich 10 - 20 kDa.....	SELDI-TOF-MS Graphiken 111
Abbildung 14:	Vergleich des Proteinmusters im Serum von Mensch und Pferd im Bereich 20 – 50 Da.....	SELDI-TOF-MS Graphiken 112
Abbildung 15:	Vergleich des Proteinmusters im Serum von Mensch und Pferd im Bereich 50 – 80 kDa.....	SELDI-TOF-MS Graphiken 112
Abbildung 16:	Vergleich des Proteinmusters im Serum von Equiden im Bereich 4 – 10 kDa	SELDI-TOF-MS Graphiken 113
Abbildung 17:	Vergleich des Proteinmusters im Serum von Equiden im Bereich 10 – 20 kDa	SELDI-TOF-MS Graphiken 114
Abbildung 18:	Vergleich des Proteinmusters im Serum von Equiden im Bereich 20 – 50kDa.....	SELDI-TOF-MS Graphiken 115

- Abbildung 19: Vergleich des Proteinmusters im Serum von Equiden im Bereich 50 – 80kDa.....SELDI-TOF-MS Graphiken 116
- Abbildung 20: Vergleich des Proteinmusters zwischen Serum und Liquor neurologisch unauffälliger Pferde im Bereich 4 – 10 kDa.....SELDI-TOF-MS Graphiken 117
- Abbildung 21: Vergleich des Proteinmusters zwischen Serum und Liquor zentralnervös erkrankter Pferde im Bereich 4 – 10 kDaSELDI-TOF-MS Graphiken 117
- Abbildung 22: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor neurologisch unauffälliger Pferde im Bereich 10 – 20 kDa...SELDI-TOF-MS Graphiken 118
- Abbildung 23: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor zentralnervös erkrankter Pferde im Bereich 10 – 20 kDaSELDI-TOF-MS Graphiken 118
- Abbildung 24: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor neurologisch unauffälliger Pferde im Bereich 20 – 50 kDa...SELDI-TOF-MS Graphiken 119
- Abbildung 25: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor zentralnervös erkrankter Pferde im Bereich 20 – 50 kDaSELDI-TOF-MS Graphiken 119
- Abbildung 26: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor neurologisch unauffälliger Pferde im Bereich 50 – 80 kDa...SELDI-TOF-MS Graphiken 120
- Abbildung 27: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor zentralnervös erkrankter Pferde im Bereich 50 – 80 kDaSELDI-TOF-MS Graphiken 120

11 SELDI-TOF-MS Grafiken

Die folgenden ausklappbaren Seiten enthalten die grafischen Darstellungen des mittels SELDI-TOF-MS erstellten Peptid- und Proteinmusters.

Beim Lesen des Ergebnisteils kann die entsprechende Seite mit den jeweils dazugehörigen grafischen Darstellungen ausgeklappt werden, um die im Text und den Tabellen beschriebenen Fakten besser nachzuvollziehen.

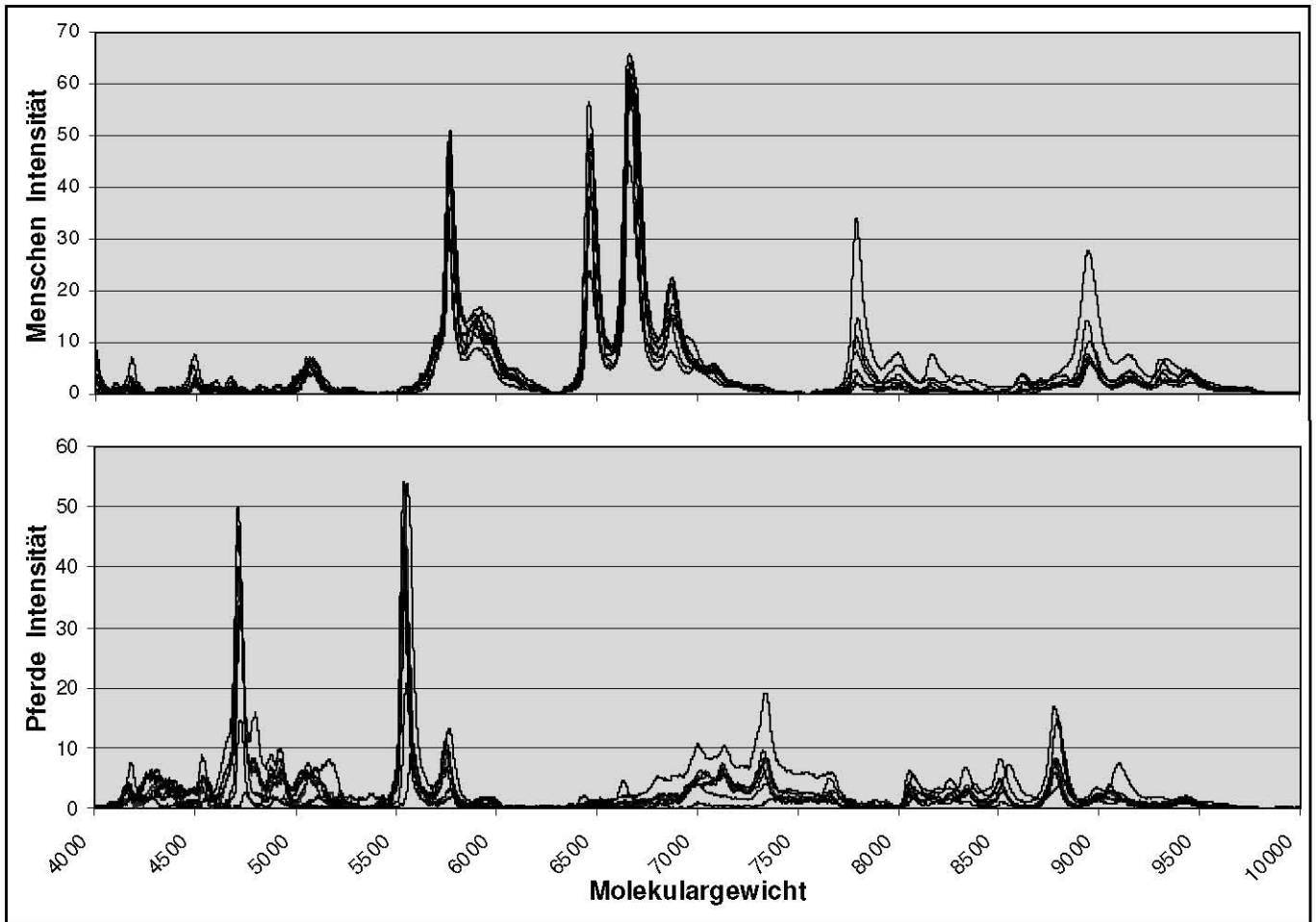


Abbildung 1: Vergleich des Proteinmusters im Serum von Mensch und Pferd im Bereich 4 - 10 kDa

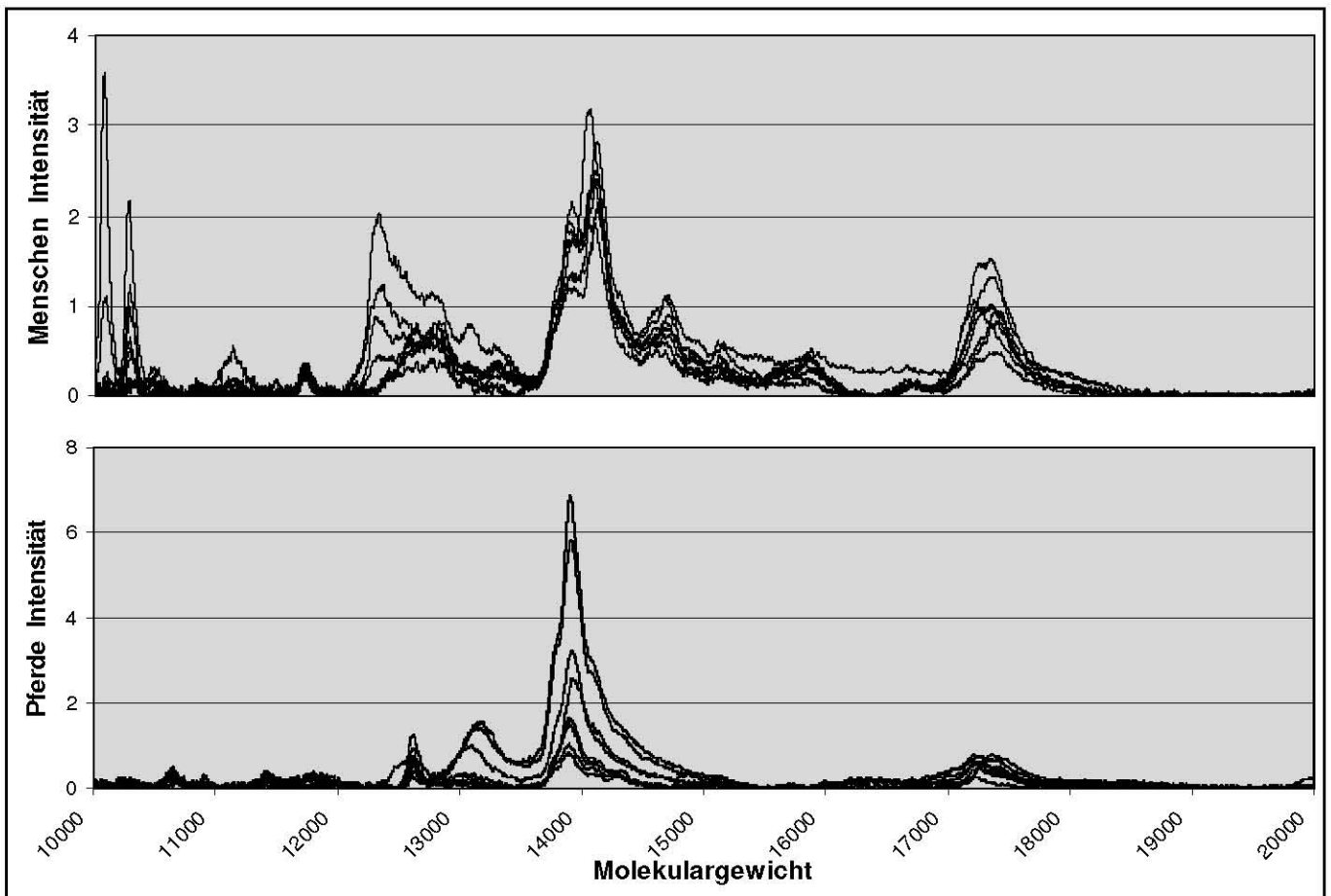


Abbildung 2: Vergleich des Proteinmusters im Serum von Mensch und Pferd im Bereich 10 - 20 kDa

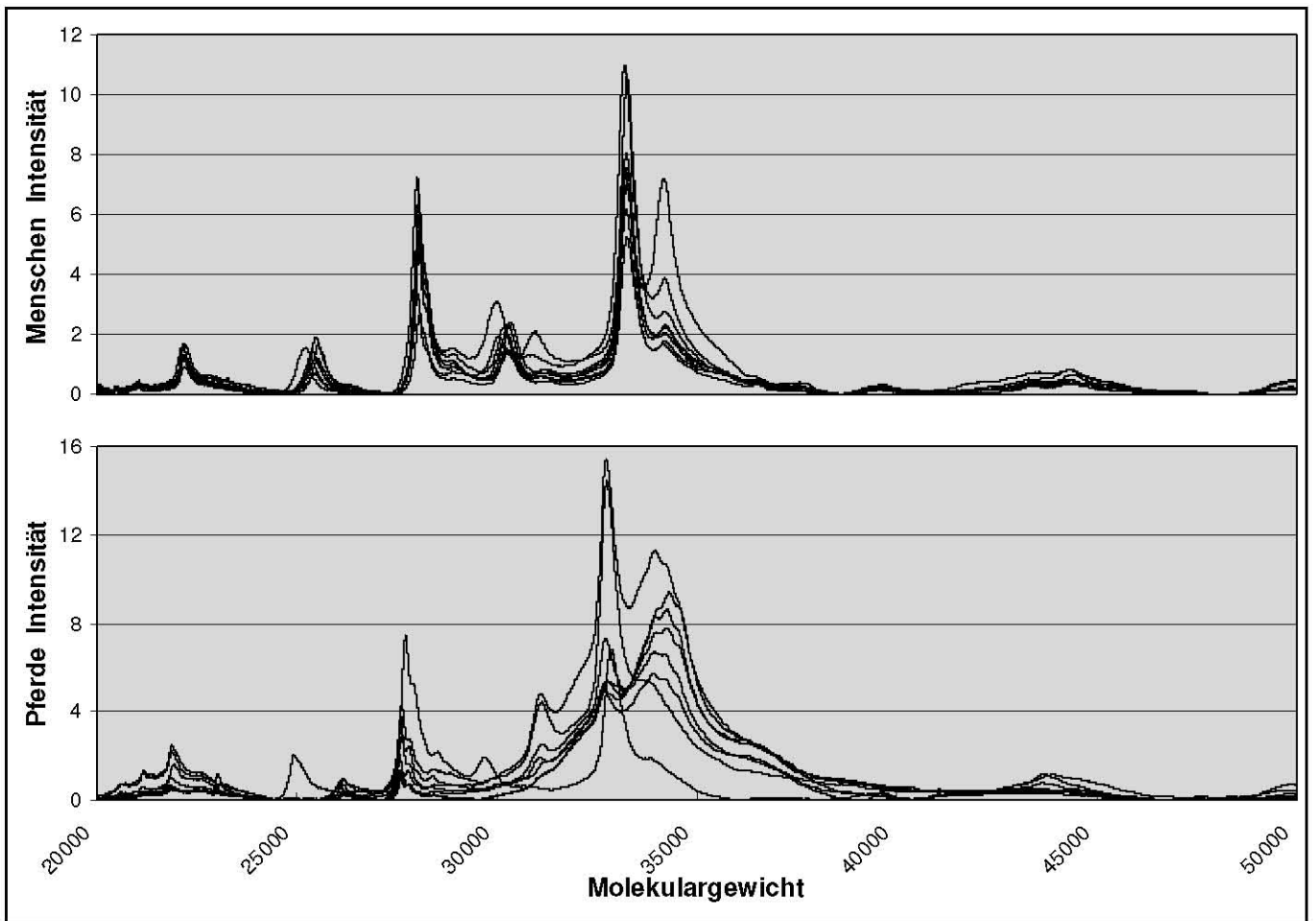


Abbildung 3: Vergleich des Proteinmusters im Serum von Mensch und Pferd im Bereich 20 – 50 Da

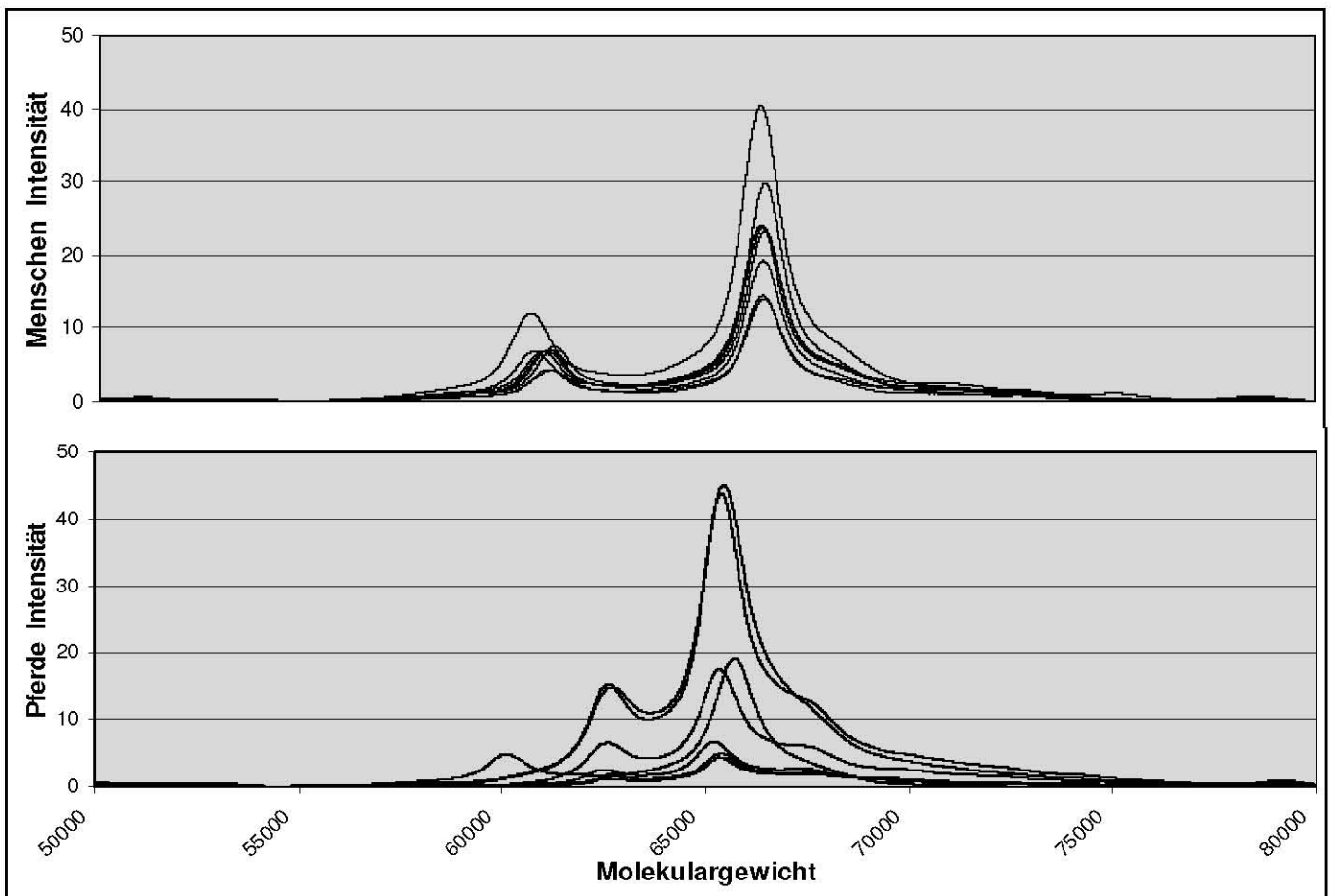


Abbildung 4: Vergleich des Proteinmusters im Serum von Mensch und Pferd im Bereich 50 – 80 kDa

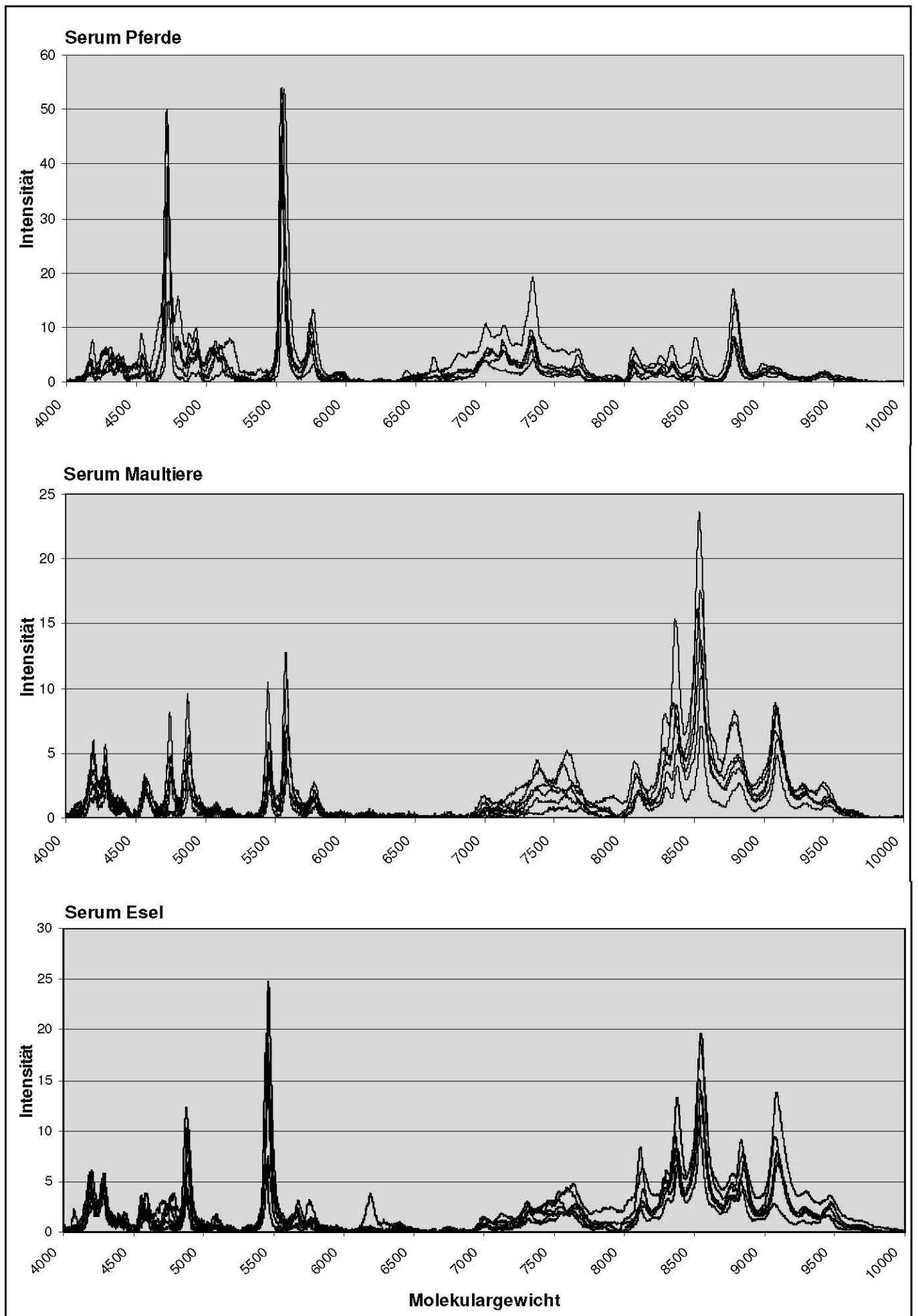


Abbildung 5: Vergleich des Proteinmusters im Serum von Equiden im Bereich 4 – 10 kDa

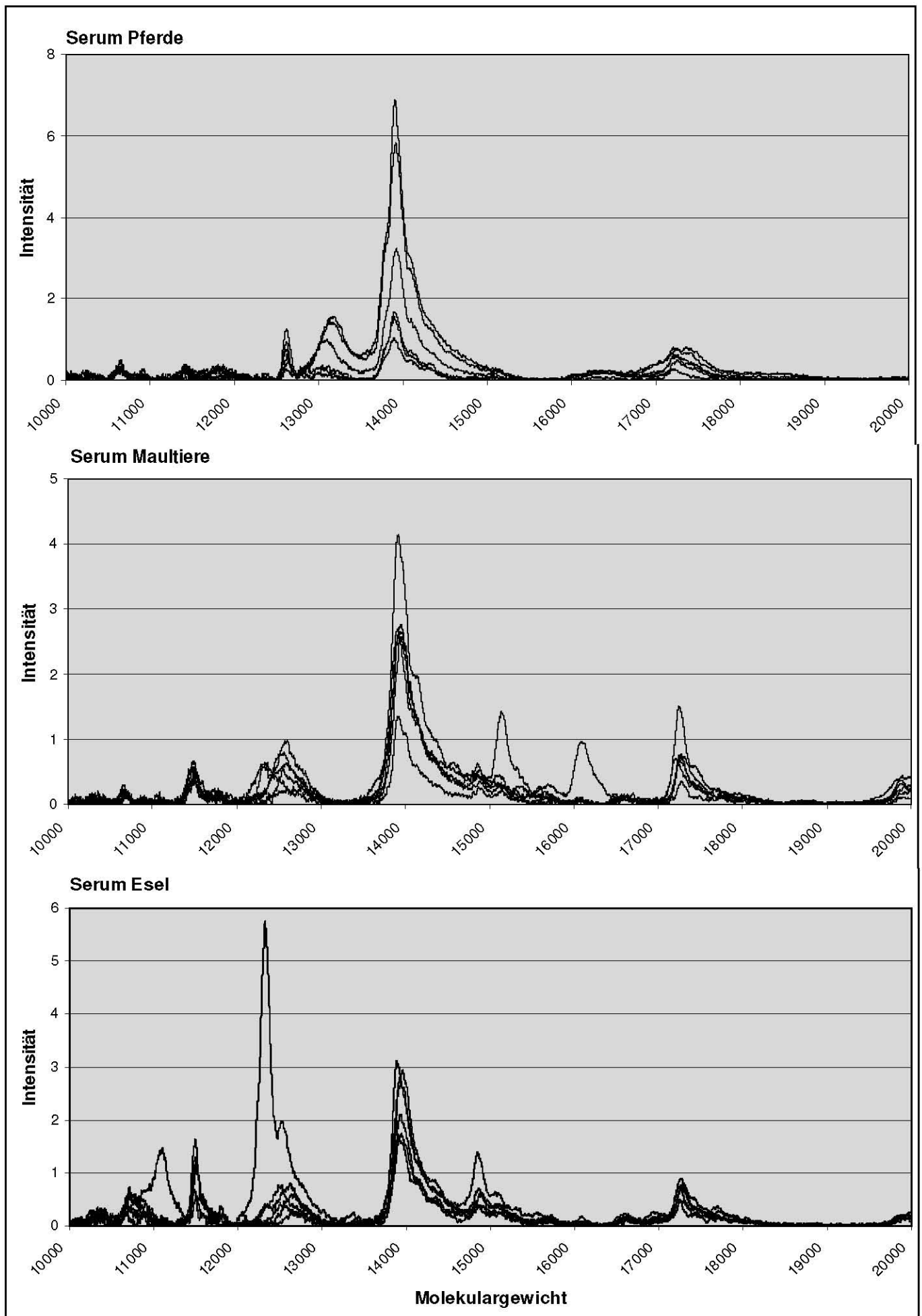


Abbildung 6: Vergleich des Proteinmusters im Serum von Equiden im Bereich 10 – 20 kDa

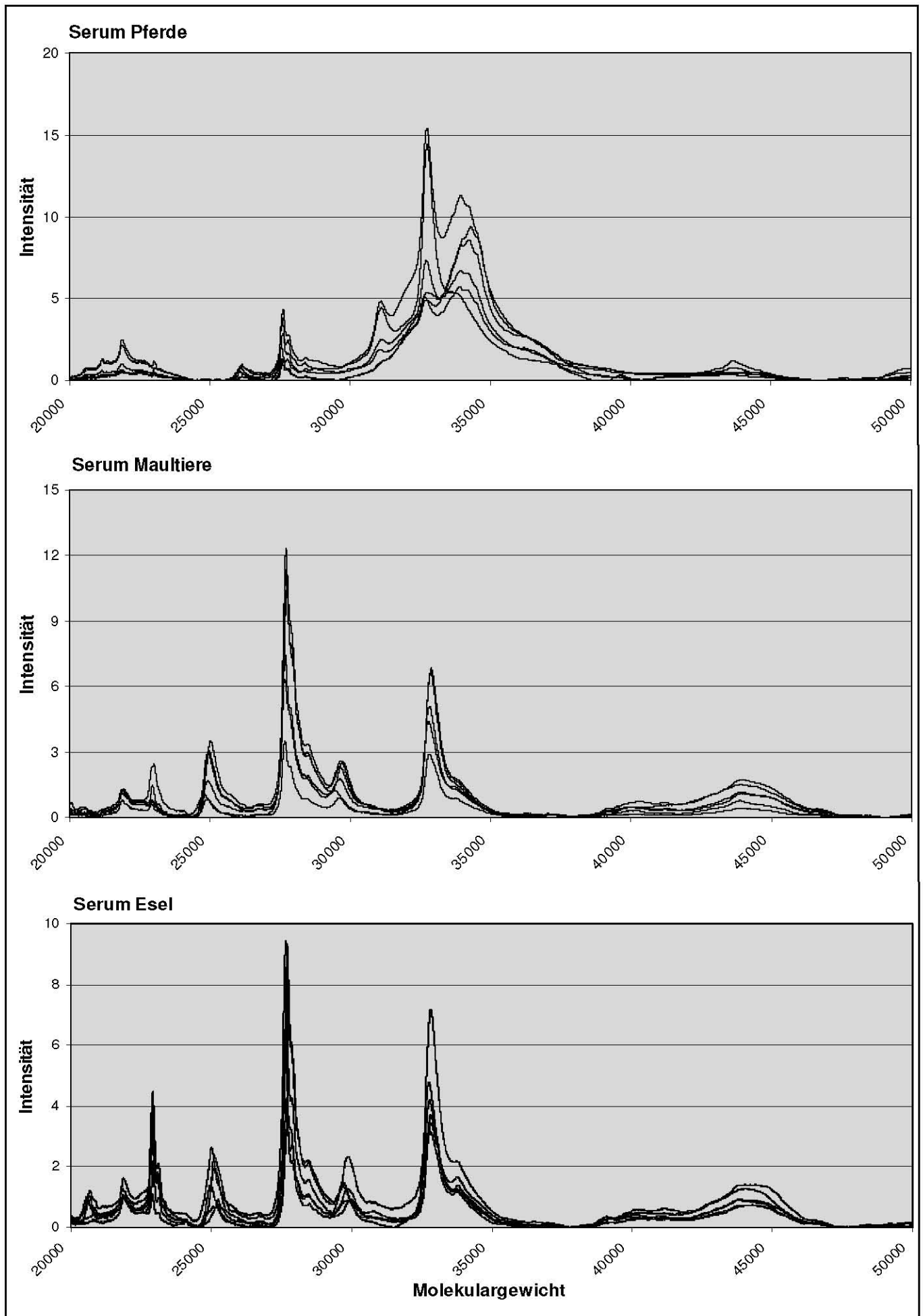


Abbildung 7: Vergleich des Proteinmusters im Serum von Equiden im Bereich 20 – 50kDa

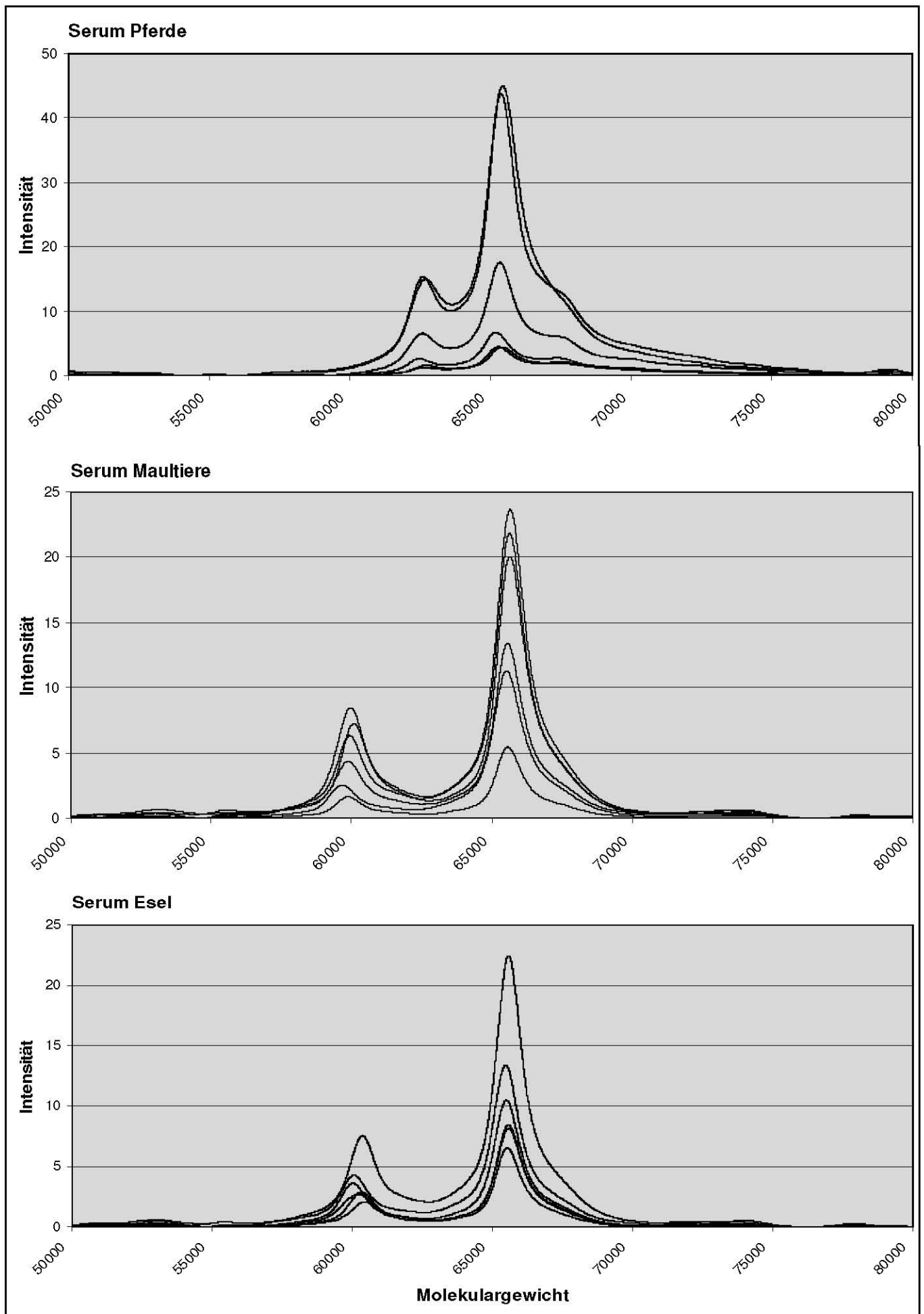


Abbildung 8: Vergleich des Proteinmusters im Serum von Equiden im Bereich 50 – 80kDa

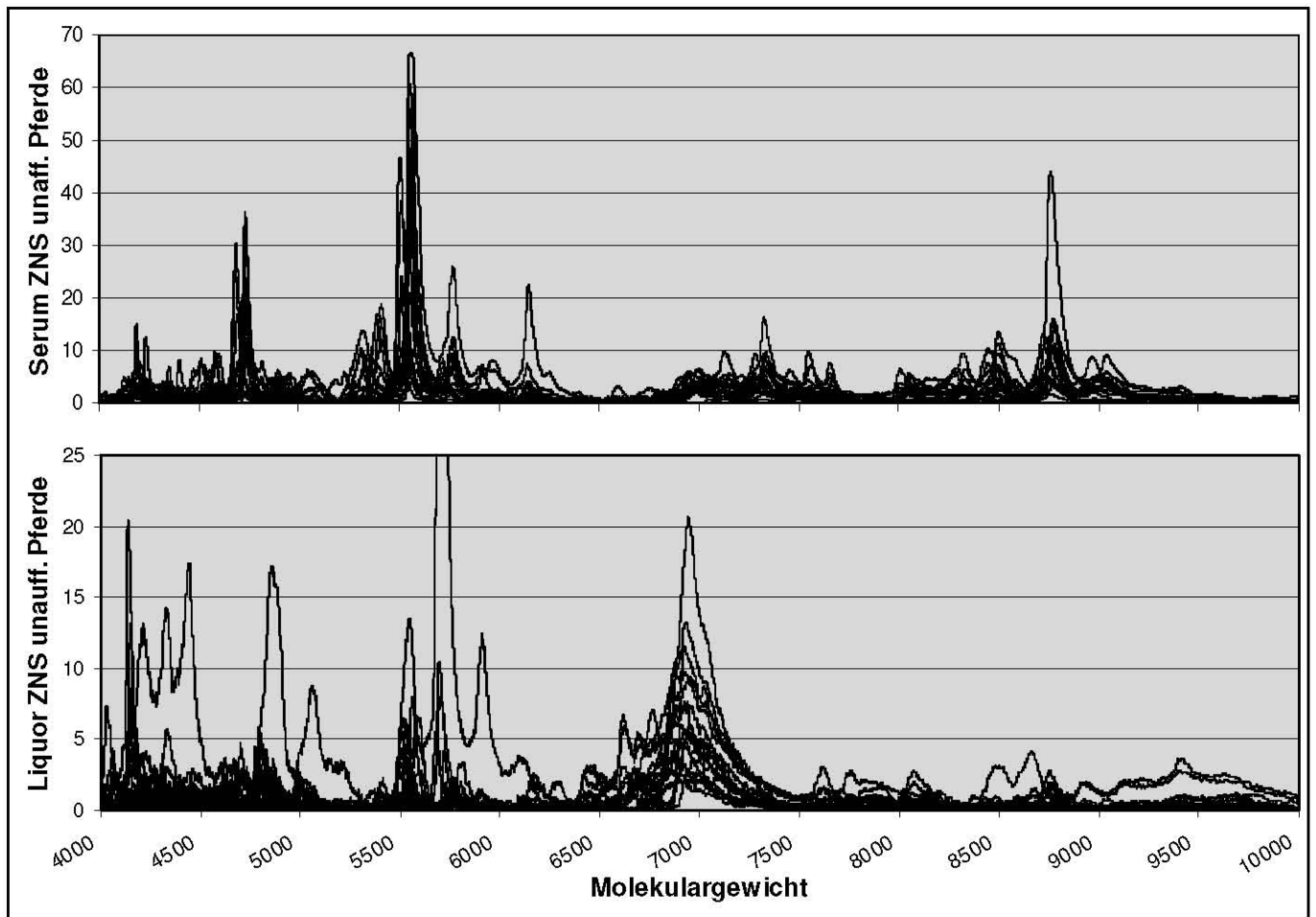


Abbildung 9: Vergleich des Proteinmusters zwischen Serum und Liquor neurologisch unauffälliger Pferde im Bereich 4 – 10 kDa

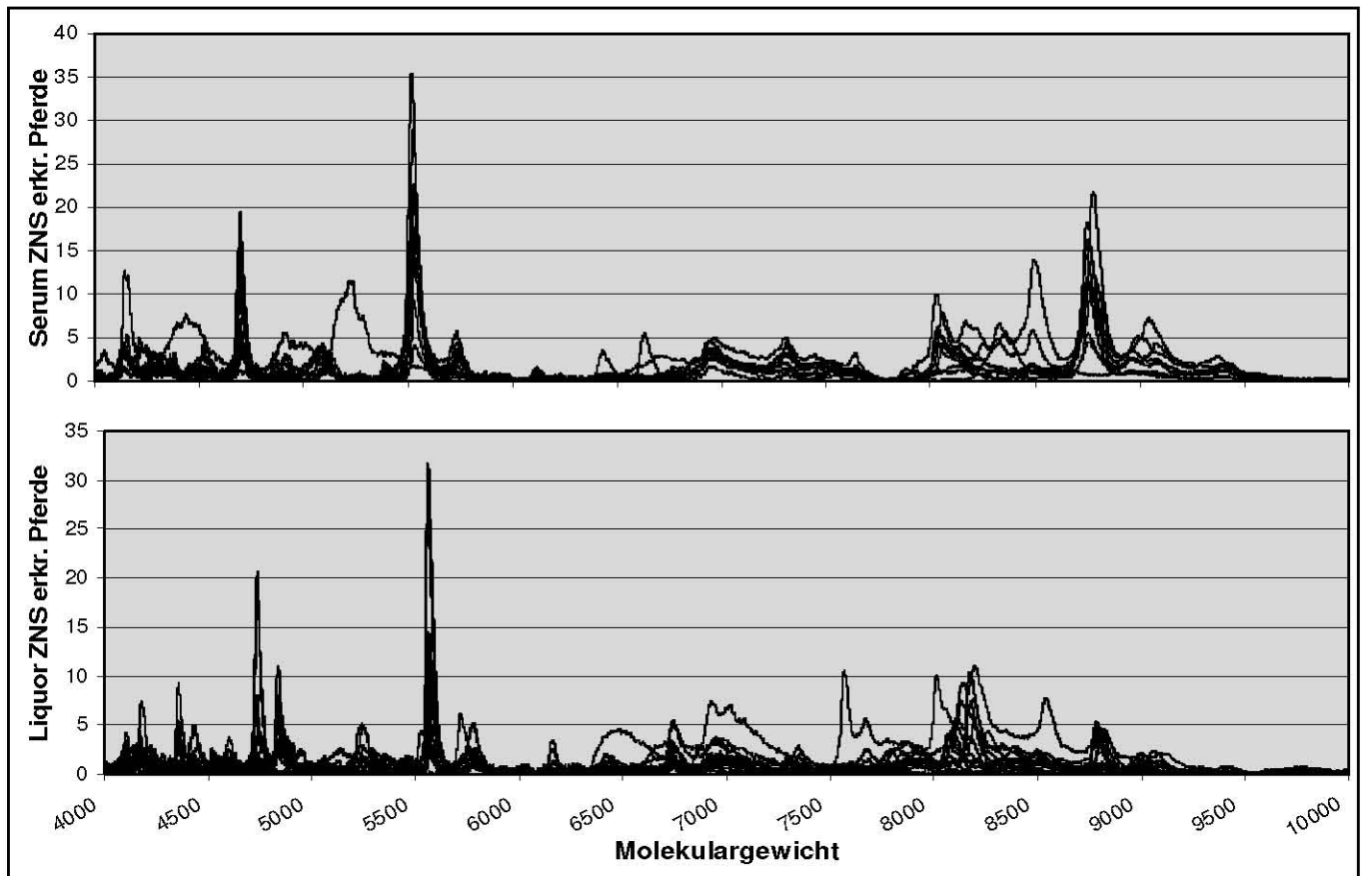


Abbildung 10: Vergleich des Proteinmusters zwischen Serum und Liquor zentralnervös erkrankter Pferde im Bereich 4 – 10 kDa

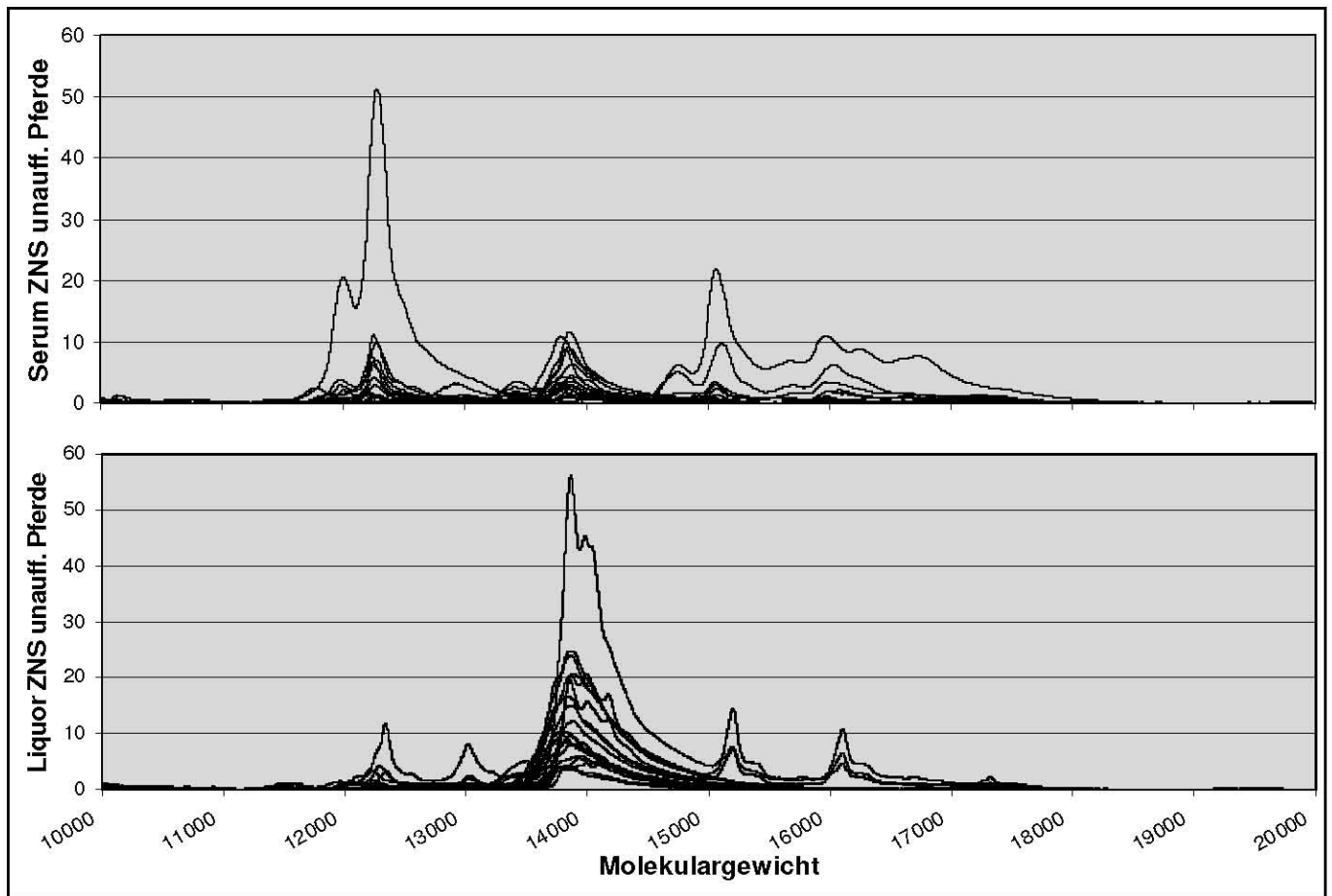


Abbildung 11: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor neurologisch unauffälliger Pferde im Bereich 10 – 20 kDa

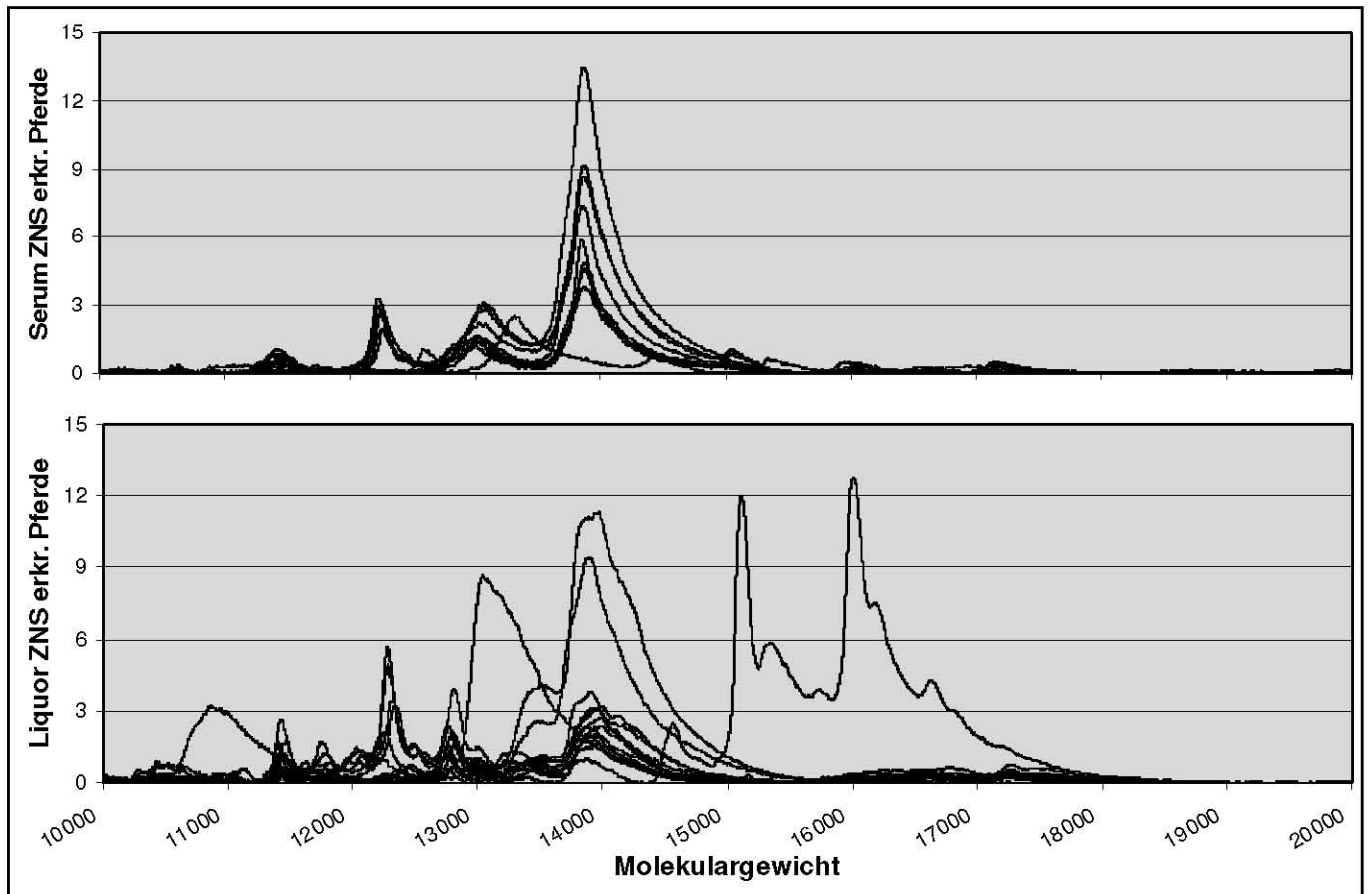


Abbildung 12: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor zentralnervös erkrankter Pferde im Bereich 10 – 20 kDa

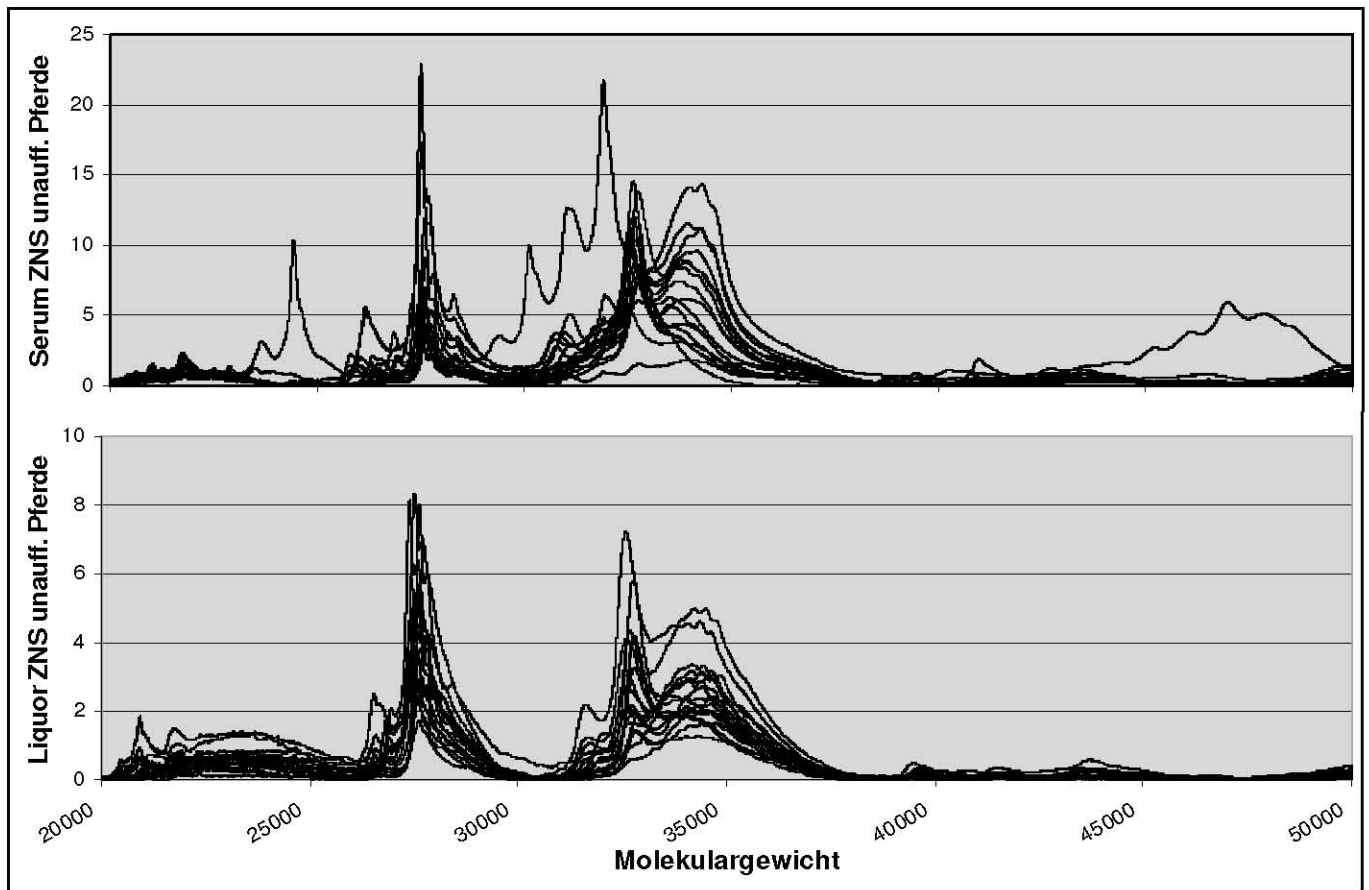


Abbildung 13: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor neurologisch unauffälliger Pferde im Bereich 20 – 50 kDa

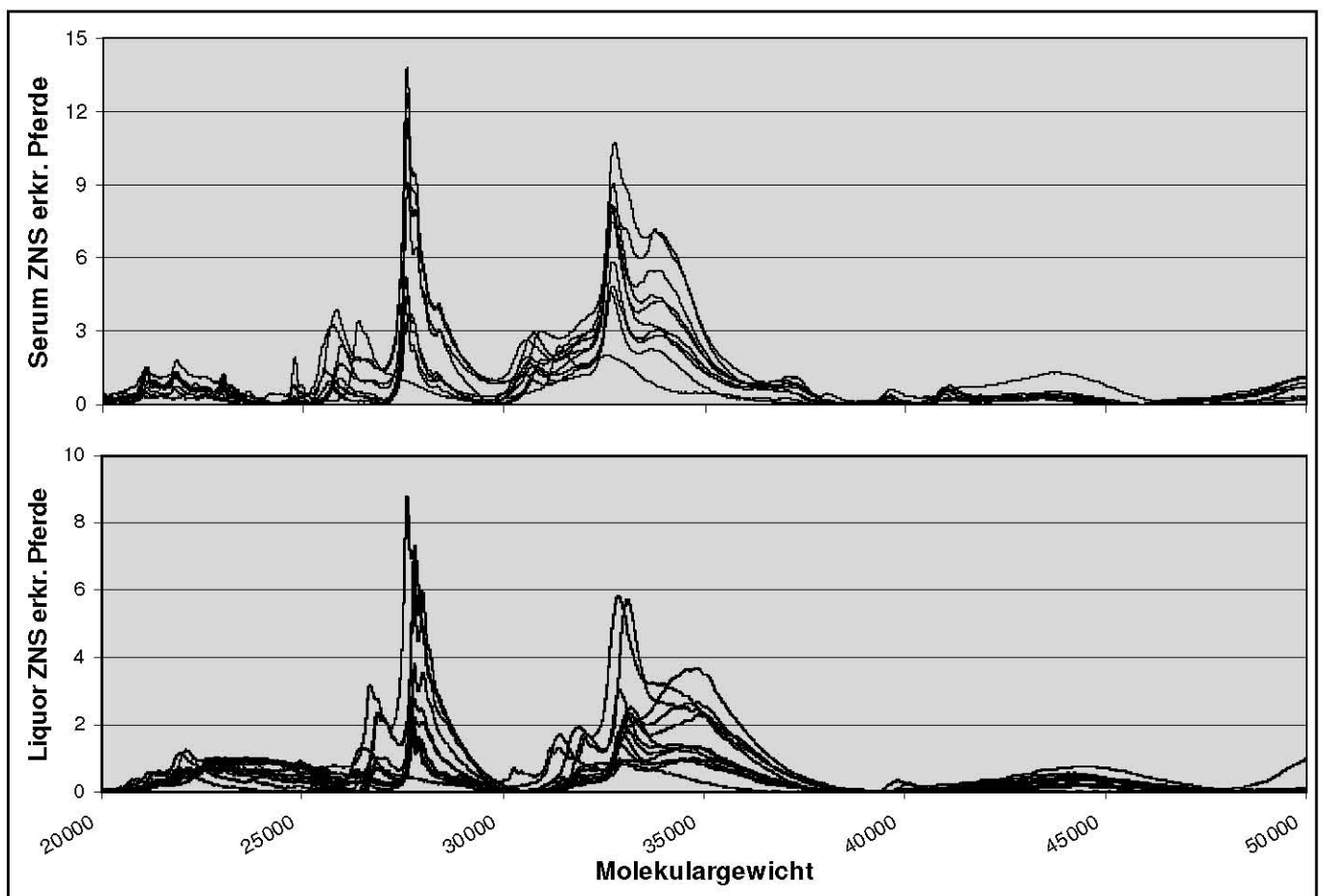


Abbildung 14: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor zentralnervös erkrankter Pferde im Bereich 20 – 50 kDa

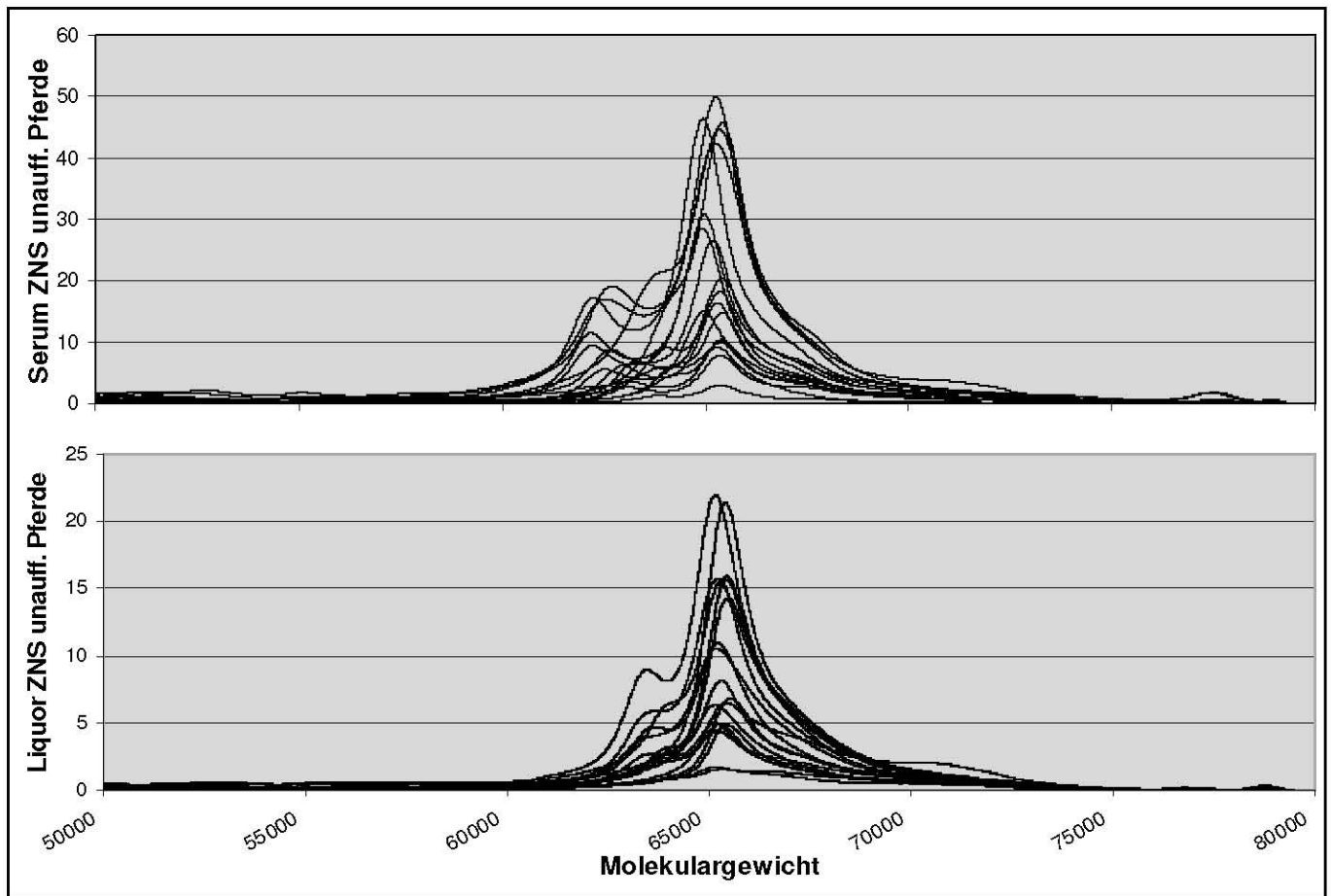


Abbildung 15: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor neurologisch unauffälliger Pferde im Bereich 50 – 80 kDa

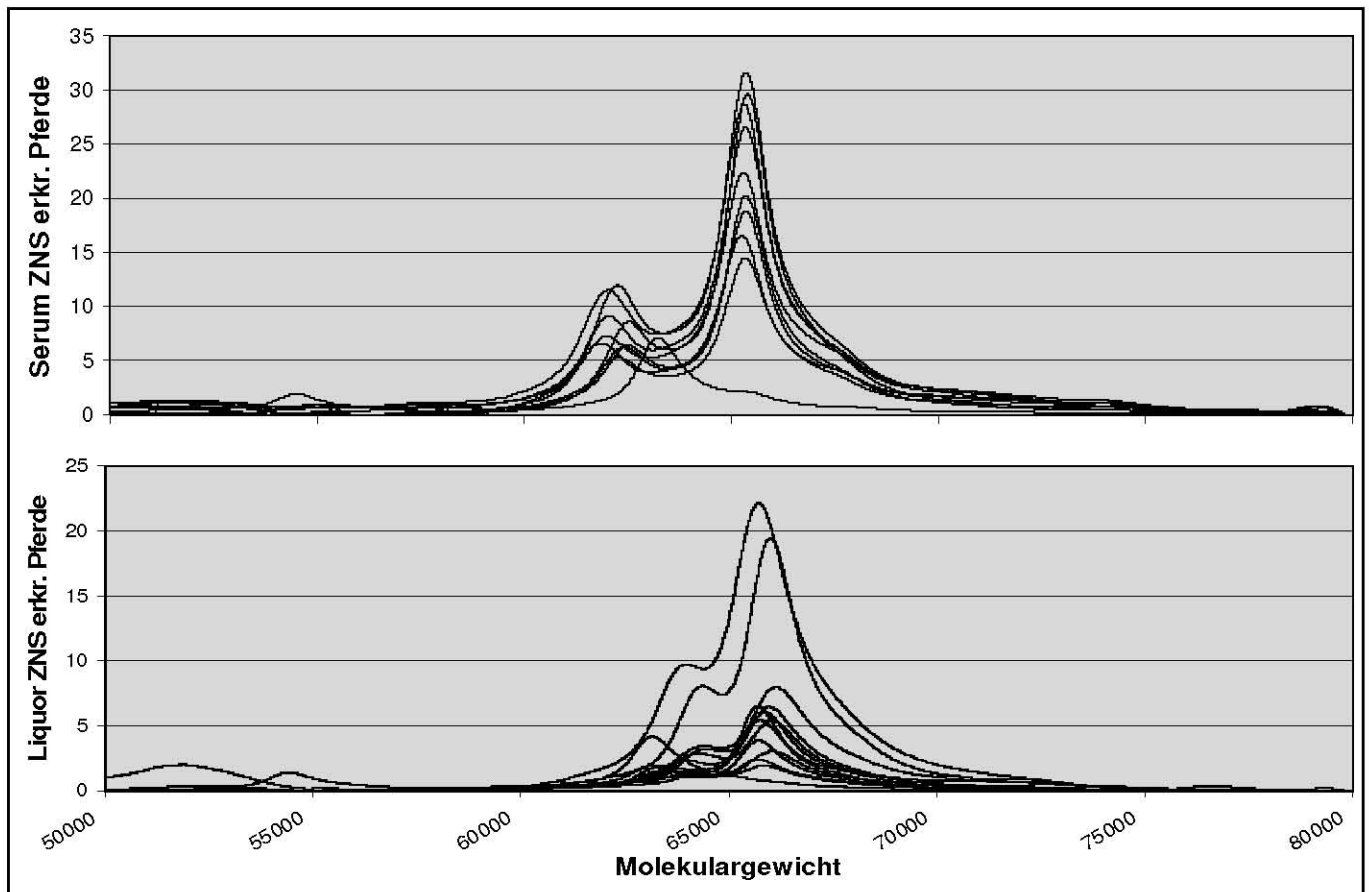


Abbildung 16: Vergleich des Proteinmusters im Serum und Liquor zentralnervös erkrankter Pferde im Bereich 50 – 80 kDa

12 Anhang

Publikationen:

Posterpräsentation beim DVG Kongress „Pferdekrankheiten“ am 10./11.02.2006 in Hannover

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. A. Grabner, der mir ermöglichte, die Untersuchungen sowohl in der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin als auch im Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam durchzuführen, indem er den Kontakt zu Herrn Professor Dr. F. J. Schweigert herstellte.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. F. J. Schweigert, möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine Unterstützung und wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Bei allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des Institutes für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam bedanke ich mich für die große Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Pferdeklinik, die mich bei der Probengewinnung unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei dem Züchter und Besitzer der Maultiere, Herrn Achim Rensch, für die Blutproben seiner Maultiere.

Die SELDI-Untersuchungen wurde aus Mitteln des Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziert, wofür ich meinen Dank aussprechen möchte.

Mein Dank gilt ebenso meinem Freund Herrn Dipl. Ing. Christoph Maurer für die Beratung bei der Formatierung und Datenbearbeitung.

Des Weiteren bedanke ich mich noch bei Frau Dr. Marlis Langmann und meiner Mutter Dr. Hildegard Schäfer für die ideelle und finanzielle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Franziska Aumer

Berlin, den 19. September 2008