

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung
von Prof. Dr. B. Kaspers

**Charakterisierung des Autoantigens
„mitochondriale Malat-Dehydrogenase“
bei der equinen rezidivierenden Uveitis**

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

von
Thomas Benedikt Schmalzl
aus
München

München 2005

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meinen Eltern
meinem Bruder
und meinem verstorbenen Großvater

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	6
2 LITERATUR	7
2.1 Definition und Ätiologie.....	7
2.2 Symptome und Verlauf der ERU	8
2.3 Pathologisches Bild der ERU	9
2.4 Uveitis im Tiermodell (EAU)	10
2.5 Chronische, endogene Uveitiden des Menschen	12
2.6 Epitop-Spreading.....	12
2.7 T-Zellen in Uveitis.....	13
2.8 Autoantikörper und Uveitis	14
2.9 Malat-Dehydrogenase (MDH)	15
2.10 IgG-Unterklassen	17
2.10.1 IgG-Unterklassen beim Menschen	17
2.10.2 IgG-Unterklassen bei Autoimmunerkrankungen.....	17
2.10.3 IgG-Unterklassen bei Pferden	18
3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Untersuchungsmaterial	19
3.1.1 Kommerziell erhältliche Präparationen von mitochondrialer Malat- Dehydrogenase	19
3.1.2 Probenmaterial von ERU-Patienten und Kontrollpferden	19
3.1.3 Blut- und Serumgewinnung beim Pferd.....	20
3.1.4 Versuchsratten für die Immunisierungsversuche	20
3.2 Herstellung und Aufreinigung von polyklonalen Dotterantikörpern gegen mMDH	21
3.2.1 Immunisierung des Huhns	21
3.2.2 Aufreinigung von Dotterantikörpern.....	22
3.3 ELISA.....	24
3.3.1 Puffer und Lösungen.....	24
3.3.2 Serum- und Glaskörper-ELISA.....	25
3.3.3 Durchführung	25

3.3.4	Isotyp-ELISA	26
3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot.....	27
3.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.4.2	Western Blot.....	30
3.5	Coomassiefärbung von SDS-Gelen	31
3.6	Silberfärbung	32
3.7	Massenspektroskopische Analyse von Proteinen	33
3.8	Untersuchung der T-Zellantwort.....	35
3.8.1	Retinale Antigene und deren Peptide.....	35
3.8.2	Gewinnung von T-Lymphozyten.....	35
3.8.3	T-Zell-Proliferationsassay	36
3.9	Histologie	36
3.9.1	Puffer und Lösungen.....	36
3.9.2	Fixierung und Entwässerung der Organe.....	37
3.9.3	Hämalaun-Eosin(HE)-Färbung.....	38
3.9.4	CD3-Färbung	38
3.9.5	Glutamin Synthetase-Färbung	39
3.9.6	Glutamin Synthetase-fibrilläres saures Gliaprotein-Färbung	40
3.9.7	von Willebrand-Faktor-Färbung (vWF-Färbung)	41
3.10	Auswertung der Histologie	41
4	ERGEBNISSE	43
4.1	B-Zellreaktion	43
4.1.1	Serumantikörper-ELISA	43
4.1.2	Serumantikörper-Westernblot	44
4.1.3	Untersuchung der mMDH-Präparationen	45
4.1.4	GlaskörperELISA	47
4.1.5	IgG-Unterklassen-ELISA.....	48
4.2	T-Zellreaktion	49
4.2.1	T-Zellreaktion auf mMDH	49
4.2.2	T-Zellreaktion auf weitere retinale Antigene	50
4.2.3	Langzeituntersuchung der T-Zellreaktivität	51
4.3	Untersuchung der Uveitogenität von mMDH im Lewisratten-Modell	53
4.3.1	Histopathologische Befunde in den Augen der Versuchsratten	54
4.3.2	Gesunde Retina	56

4.3.3	Geringgradige Veränderung der Retina	57
4.3.4	Mittelgradige Veränderungen der Retina	59
4.3.5	Hochgradige Veränderungen der Retina.....	61
5	DISKUSSION	65
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	73
7	SUMMARY	74
8	LITERATURVERZEICHNIS	75

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure (engl. amino acid)
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua dest	Aqua destillata
CAR	Krebs assoziierte Retinopathie (engl. cancer associated retinopathy)
cMDH	cytosolische Malat-Dehydrogenase
cRALBP	zelluläres Retinaldehyd bindendes Protein
EAE	experimentelle allergische Encephalitis
EAU	experimentelle allergische Uveitis
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (engl. enhanced chemiluminescence)
ERU	equine rezidivierende Uveitis
FCA	Freund`s komplettes Adjuvans (engl. Freund`s complete adjuvans)
FCI	Freund`s inkomplettes Adjuvans (engl. Freund`s complete adjuvans)
x g	..fache Erdbeschleunigung
GK	Glaskörper
GPI	Glukose-6-Phosphat-Isomerase
HEU	experimentelle Uveitis des Pferdes (engl. horse experimental uveitis)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgG1	Immunglobulin der Klasse G, Unterklasse 1
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid bindendes Protein
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MDH	Malat-Dehydrogenase

MG	Molekulargewicht
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
mM	Millimolar
mMDH	mitochondriale Malat-Dehydrogenase
MS	Multiple Sklerose
OD	Optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PBS-T	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05% Tween
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
S-Ag	S-Antigen
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLE	systemischer Lupus Erythematoses
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung (engl. tris buffered saline)
TBS-T	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05% Tween
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethylendiamin
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TOF-Analysator	Flugzeitanalysator (engl. time of flight analyser)
vWF	von Willebrand-Faktor

1 Einleitung

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) stellt weltweit die häufigste Ursache für das Erblinden von Pferden dar (Spiess 1997). Die aktuellste Studie in Zentraleuropa ermittelte im Großraum Bonn eine Inzidenz von 7,6% (Szemes and Szemes 2000).

Die ERU entsteht spontan und hat einen durch rezidivierende Entzündungsschübe gekennzeichneten Verlauf. Der Mensch ist die einzige Spezies, in der ebenfalls eine spontane rezidivierende Uveitis auftritt. Für diese Uveitis im Menschen konnte inzwischen eine autoimmune Pathogenese nachgewiesen werden. Autoaggressive T-Helferzellen reagieren auf retinale Autoantigene und lösen so die Entzündung aus. Wichtige Erkenntnisse wurden im Tiermodell, der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU), gewonnen. In diesem Modell wurden die retinalen Autoantigene Interphotorezeptor Retinoid bindendes Protein (IRBP) und S-Antigen (S-Ag) entdeckt. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend konnten IRBP und S-Ag im Menschen, und IRBP im Pferd als Autoantigene identifiziert werden. Weiterhin konnte in der EAU ein Erfolg versprechender Therapieansatz erarbeitet werden. Orale Toleranzinduktion gegen IRBP unterdrückte eine durch IRBP induzierte EAU in der Lewis Ratte (Laliotou, Liveridge et al. 1997). So könnte die Identifizierung weiterer Autoantigene im Pferd nicht nur therapeutische Bedeutung für die ERU, sondern auch für die endogene Uveitis des Menschen haben.

Neue Untersuchungen der Autoantikörperprofile von ERU-Patienten gaben Hinweise auf zwei weitere, bisher unbekannte Autoantigene (Pompetzki 2003). Eines davon ist die Malat-Dehydrogenase (MDH). Um ein Protein als Autoantigen definieren zu können, müssen nach den Witebskyschen Postulaten (Witebsky, Rose et al. 1957) folgende Forderungen erfüllt werden:

- Das Antigen muss bekannt sein.
- Es müssen Antikörper und / oder eine zelluläre Immunreaktion gegen das körpereigene Antigen vorhanden sein.
- Durch Immunisierung mit dem Antigen muss die Krankheit auslösbar sein (bzw. muss ein Tiermodell etabliert sein, mit dem man eine entsprechende Krankheit durch Immunisierung mit dem Antigen auslösen kann).

Ziel dieser Arbeit war es daher, Immunreaktionen gegen MDH zu untersuchen und zu prüfen, ob diese als autoimmun charakterisiert werden können.

2 Literatur

2.1 Definition und Ätiologie

Die equine rezidivierende Uveitis ist bereits seit der Antike bekannt (Sillerud, Bey et al. 1987). Das Krankheitsbild wurde in der Literatur unter vielen Namen beschrieben. So findet es sich beispielsweise unter Bezeichnungen wie Mondblindheit, rezidivierende Iridozyklitis oder periodische Augenentzündung. Allerdings sind viele dieser Begriffe unterschiedlich oder unscharf definiert. Um Unklarheiten zu vermeiden, wird im Folgenden der Terminus „equine rezidivierende Uveitis“ (ERU) verwendet. Dieser ist definiert als serofibrinöse, nicht granulomatöse Entzündung der mittleren Augenhaut (Uvea) und benachbarter Strukturen eines oder beider Augen mit endogener, nicht traumatischer Ursache. Sie verläuft akut und chronisch rezidivierend und kann durch progrediente Zerstörung intraokulärer Strukturen zur Phthisis und Erblindung führen (Gerhards and Wollanke 2001).

Im Laufe der Zeit wurden viele verschiedene Theorien für die Ursache der ERU diskutiert. Leptospireninfektionen (Wollanke, Rohrbach et al. 2001) und eine autoimmunne Pathogenese (Deeg, Thurau et al. 2002b) werden heute als wahrscheinlichste kausale Ursachen angesehen.

Die Beweisführung für eine autoimmunne Pathogenese wurde inzwischen erbracht. Sowohl Antikörper als auch spezifische T-Zellreaktivität gegen die retinalen Proteine IRBP und S-Ag konnten nachgewiesen werden (Deeg, Kaspers et al. 2001). Außerdem konnte eine ERU-ähnliche Uveitis durch Immunisierung mit IRBP im Pferd induziert werden. (Deeg, Thurau et al. 2002b). Darüber hinaus scheinen noch weitere Autoantigene zu existieren. In einer neueren Untersuchung (Pompetzki 2003) wurden drei weitere potenzielle Autoantigene entdeckt. Recoverin wurde bereits früher im Zusammenhang mit der EAU untersucht. Es ist in der Lewis-Ratte hoch uveitogen. Die anderen zwei Antigene sind das „cellular Retinaldehyde-Binding-Protein“ (cRALBP) und die Malat-Dehydrogenase (MDH).

2.2 Symptome und Verlauf der ERU

Das klinische Bild der ERU stellt sich sehr variabel dar. (Spiess 1997; Gerhards and Wollanke 2001). Sowohl die Stärke als auch die Dauer und die Schäden der Entzündungsreaktionen sind sehr verschieden. Ein Entzündungsschub kann zu starker Störung des Allgemeinbefindens führen oder nahezu klinisch inapparent verlaufen. Zwischen den Schüben liegen unterschiedlich lange entzündungsfreie Perioden. Es können ein Auge oder beide beteiligt sein. Hinzu kommt, dass unterschiedliche Strukturen des Auges betroffen sein können. Blepharospasmus, Lakrimation und Photophobie treten vor allen Dingen bei starken Schmerzen des Auges auf. Rötung und Schwellung der Konjunktiven sind ein häufiges Symptom. Es tritt meist ein korneales Ödem auf, welches sich durch eine gräulich bis bläuliche Trübung der Kornea zeigt. Fibrin und Entzündungszellen aus der vorderen Augenkammer präzipitieren am Endothel der Kornea und schädigen dieses (Rebhuhn 1979; Spiess 1997). So kann Kammerwasser in die Hornhaut gelangen. Bei Uveitiden, die länger als 48 Stunden dauern, beginnt gewöhnlich eine von der Sklera ausgehende Vaskularisation der Kornea (Rebhuhn 1979). Das Kammerwasser kann durch Protein, Blut (Hyphaema) oder fibrinös hämorrhagisches Exsudat (Hypopyon) getrübt sein, wobei sich Blut und Exsudat meist ventral in der vorderen Augenkammer absetzen. Die Pupille ist miotisch. Durch diesen Zustand und durch Fibrinausschwitzungen von Iris und Ziliarkörper kann es zu Verklebungen zwischen Pupille und Linse kommen (hintere Synechie). Diese lockere Verbindung wird innerhalb einiger Tage bindegewebig durchbaut. An diesen Stellen ist die Diffusion von Kammerwasser in die Linse und damit der Linsenmetabolismus gestört. Es bilden sich fokale Katarakte der Linsenrinde und Linsenkapsel, welche sich im Laufe des Krankheitsgeschehens ausweiten können (Spiess 1997). Verklebt die Iris an der ganzen ringförmigen Auflagefläche mit der Linse kann das Kammerwasser nicht mehr von der hinteren Augenkammer in die vordere abfließen. Es entsteht ein Glaukom. Diese Form des Glaukoms kann der Untersucher durch eine Vorwölbung der Iris (Iris bombata) erkennen. Linsenluxationen oder Subluxationen treten in seltenen Fällen auf. Im Glaskörper zeigen sich Trübungen. Die Retina löst sich bei einigen Patienten ab. Verklumpungen von retinalem Pigmentepithel und retinale Narben sind die Folge einer Chorioretinitis. Diese stellen sich als hypopigmentierte Zonen mit darin enthaltenen kleinen, fokalen, hyperpigmentierten Bereichen da. Sie liegen nasal und temporal neben der Papille und wer-

den als Butterfly Lesions bezeichnet (Rebhuhn 1979). Die Veränderungen von Glaskörper und Retina sind häufig Zufallsbefunde, da eine auf die Choroidea begrenzte Entzündung keine Schmerzsymptomatik beim Pferd auslöst (Gerhards and Wollanke 2001). Eine Atrophie des Augapfels (Phtisis bulbi) ist meist Folge eines chronischen Geschehens. Die Prognose in Bezug auf den Erhalt des Augenlichts ist hierbei stets vorsichtig zu stellen. Bei schweren Entzündungsschüben kann es zur akuten Erblindung kommen. Die ERU spricht auf immunsuppressive Therapie (va. mit Kortikosteroiden) an. Allerdings kann die Behandlung den Verlauf meist nur mildern und hinauszögern, selten aber ganz stoppen. Bei mildereren Schüben und konsequenter Behandlung kann die Sehfähigkeit über Jahre erhalten bleiben (Gerhards and Wollanke 2001).

2.3 Pathologisches Bild der ERU

Bei pathohistologischen Untersuchungen von ERU geschädigten Augen wurde zu meist eine lymphozytäre Entzündung festgestellt. Dominierende Entzündungszellen sind T-Zellen. Sie sind in milden Stadien vor allem im Ziliarkörper und um die Blutgefäße der Choroidea zu sehen. In protrahierten Stadien sind sie sowohl diffus in der ganzen Uvea als auch in den Mantelzonen von Lymphfollikeln verteilt. Lymphfollikel bilden sich vor allem im Stroma der Iris unter dem Ziliarkörper (Deeg, Ehrenhofer et al. 2002a). Im Zentrum der Follikel befinden sich B-Zellen. Diese sind ansonsten wenig vertreten (Romeike, Brugmann et al. 1998). Die meisten aus dem Vitreus gewonnenen T-Lymphozyten proliferieren stark auf die retinalen Antigene S-Ag und IRBP (Deeg, Kaspers et al. 2001). Lymphozyten aus dem peripheren Blut dagegen reagieren schwach.

Immer, auch bei milden Verläufen, wurde eine Beteiligung der Retina beobachtet (Kalsow and Dwyer 1998; Deeg, Ehrenhofer et al. 2002a). In uveitischen Augen lassen sich MHC II positive Zellen nachweisen, in gesunden dagegen nicht (Kalsow and Dwyer 1998). Die Blut-Augenschranke ist während der Entzündung durchlässig (Halliwell and Hines 1985; Deeg, Kaspers et al. 2001).

2.4 Uveitis im Tiermodell (EAU)

Der Begriff „Experimentelle Autoimmune Uveitis/Uveoretinitis“ (EAU) beschreibt eine Erkrankung in Versuchstieren die durch Immunisierung mit retinalen Antigenen ausgelöst wird. Die Antigene werden fern vom Auge zusammen mit einem Adjuvans (meist Komplettes Freund'sches Adjuvans) injiziert (Caspi 1994; Nussenblatt and Gery 1996). (Wacker and Lipton 1968; Wacker and Lipton 1968). Zuerst wurde ein homologer retinaler Extrakt zur Immunisierung von Meerschweinchen verwendet. Aus diesem Extrakt gelang es verschiedenen Forschern mehrere uveitogene Antigene zu isolieren. Die beiden wichtigsten Antigene sind das S-Antigen und das IRBP.

S-Antigen

Das S-Antigen (soluble Antigen) wurde 1977 (Wacker, Donoso et al. 1977) aus der löslichen Phase eines Retinaextrakts identifiziert. Es kommt spezifisch in der Photorezeptorzellschicht (Kalsow and Wacker 1973) und der Pinealdrüse vor (Kalsow and Wacker 1977). Dieses 48 kDa große Molekül (Wacker, Donoso et al. 1977) ist in der Lewisratte besonders uveitogen (Rao, Wacker et al. 1979), im Pferd nur in Ausnahmefällen (Deeg, Reese et al. 2004). S-Antigen ist wie fast alle retinaspezifischen Proteine hoch konserviert (Faure, Mirshahi et al. 1984; Mirshahi, Boucheix et al. 1985; Lieb, Smith-Lang et al. 1991; Nussenblatt and Gery 1996).

Interphotorezeptor Retinoid Binding Protein (IRBP)

Interphotorezeptor Retinoid Binding Protein (IRBP) ist bei vielen Tieren sehr uveitogen. So konnte eine EAU durch IRBP in Lewis-Ratten (Gery, Wiggert et al. 1986b), Mäusen (Caspi, Roberge et al. 1988), Affen (Hirose, Kuwabara et al. 1986), Kaninchen (Eisenfeld, Bunt-Milam et al. 1987) und Pferden (Deeg, Thurau et al. 2002b) ausgelöst werden. Versuche an Lewisratten zeigten, dass vor allem das Peptid R14 das immunogene Epitop von IRBP ist (Aminosäuren 1169-1191). IRBP kommt vor allem im Interphotorezeptorraum der Retina vor, tritt aber auch in geringen Mengen in der Pinealdrüse und in der Hirnrinde auf.

EAU im Pferdmodell

Das Pferdmodell genannt Horse Experimental Uveitis (HEU) ist ein relativ neues EAU-Modell (Deeg, Thurau et al. 2002b). Die Uveitis wird durch das Antigen IRBP induziert. Die Uveitis beginnt am Tag 6 oder 7 nach der zweiten Immunisierung. Die

Intensität der Uveitis ist für vier bis fünf Tage konstant und klingt danach ab. Am Tag 16 nach der Immunisierung ist keine intraokuläre Entzündung mehr nachweisbar. Durch einen weiteren Boost mit IRBP ist die Uveitis reinduzierbar. Diese tritt sechs bis sieben Tage nach der Injektion auf. In einem von sieben Fällen wurden spontane Rezidive beobachtet. Histopathologische Untersuchungen (die Augen wurden am Tag 7 nach der vierten Immunisierung entnommen) zeigten in allen Augen eine Zerstörung der retinalen Architektur, Bildung von lymphfollikelartigen Strukturen im Ziliarkörperstroma, massive zelluläre Infiltration in der Nähe der Ora serrata und peripapilläre Ansammlung von Entzündungszellen. Die Mehrheit der Entzündungszellen konnte als T-Zellen charakterisiert werden (Deeg, Thurau et al. 2002b).

Das Besondere an diesem Modell ist, dass der Krankheitsverlauf im Gegensatz zu anderen EAU-Modellen nicht monophasisch, sondern reinduzierbar ist. Dies ist für Pathogenesestudien und die Entwicklung neuer Therapien interessant.

EAU im Lewis-Ratten-Modell

Das Lewis-Ratten-Modell ist heutzutage das am häufigsten angewandte EAU-Tiermodell. Der Verlauf der EAU ist bei der Lewis-Ratte monophasisch, meist akut und von kurzer Dauer. Die Latenzzeit und die Schwere der Entzündung sind abhängig von der Menge und Art des Antigens und der Menge und der Art des Adjuvans (Caspi 1994).

Histopathologisch kann eine Infiltration der Photorezeptorzellschicht mit Entzündungszellen beobachtet werden. Häufig infiltrieren Entzündungszellen auch andere Strukturen der Augen wie zum Beispiel Ziliarkörper, Iris und Glaskörper (Gery 1986a). Meist ist die Pinealdrüse ebenfalls entzündet (Kalsow and Wacker 1978).

Von der Photorezeptorschicht aus beginnt die Zerstörung der Retina. Nach Abklingen der Entzündung ist die Photorezeptorzellschicht oft ganz oder partiell vernichtet (Gery 1986a). Die restliche Retina ist, je nach Schwere der Entzündung, mehr oder weniger stark zerstört. Siehe dazu auch Abschnitt 3.10 „Auswertung der Histologie“.

Mithilfe des EAU Modells konnten zahlreiche Erkenntnisse gewonnen werden. Zum Beispiel konnten viele pathogene Epitope der uveitogenen Proteine identifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich bei der EAU um eine T-Zell medierte Erkrankung handelt (siehe Abschnitt 2.7).

2.5 Chronische, endogene Uveitiden des Menschen

Beim Menschen gibt es mehrere verschiedene endogene Uveitisformen. Bei allen wird eine autoimmune Reaktion als Pathogenese vermutet, bei einigen wurden diesbezügliche Hinweise gefunden, aber nur bei wenigen letztendlich der Nachweis erbracht. Die Stimulation von Lymphozyten durch retinale Antigene wurde vor allem am S-Antigen untersucht (de Smet and Chan 2001b). Bei vielen Uveitiden wie zum Beispiel der Retinitis pigmentosa (Yamamoto, Okajima et al. 1992), des Morbus Behçet und der Sarkoidose (de Smet, Bitar et al. 2001a) wurde eine zelluläre Stimulierung durch S-Ag nachgewiesen. Typisch für alle reagierenden Patientengruppen war die Tatsache, dass sie mehrere Epitope des S-Antigens erkannten. Bei einigen Patienten wurde die Reaktion über einen Zeitraum von 6 Monaten bis zu einem Jahr beobachtet. Es wurde festgestellt, dass sich die Reaktion im Laufe der Zeit auf andere Epitope verlegte. Dieses Phänomen bezeichnet man als Epitop-Spreading.

2.6 Epitop-Spreading

Entwickelt das Immunsystem im Laufe einer Autoimmunkrankheit eine Reaktion der T-Zellen gegen weitere Epitope, spricht man von (Epitop-) Spreading. Ist das neue Epitop auf demselben Molekül, nennt man dies intramolekulares Spreading, ist es auf einem anderen Molekül, spricht man von intermolekularem Spreading. Zuerst wurde Spreading bei der Multiplen Sklerose (MS) und bei der experimentellen allergischen Enzephalitis (EAE), ein Tiermodell zur Untersuchung der MS, beschrieben. MS und EAE sind chronische, in Schüben verlaufende Autoimmunreaktionen. Bei diesen Krankheiten dehnt sich die Immunreaktion auf neue körpereigene Epitope aus, während sich eine Toleranz gegen bereits autoantigene Epitope entwickelt. Dies geschieht bei der EAE in einer vorhersehbaren Reihenfolge, man spricht daher auch von einer „Epitope Spreading Cascade“ (Tuohy, Yu et al. 1998). Entwickelt sich eine Toleranz gegen ein Autoantigen, verbessert sich der Krankheitszustand sowohl bei der MS als auch bei der EAE. Greift die Immunreaktion auf ein neues Epitop über, ist dies mit einer Verschlechterung des Krankheitszustandes assoziiert. So ist der chronische schubweise Verlauf zu erklären (Tuohy, Yu et al. 1999). Es gelang durch gezielte Toleranzinduktion gegen Spreading Antigene, den Krankheitsverlauf im Modell zu unterbrechen (Yu, Johnson et al. 1996a).

Als Träger der Pathogenität wurden auf Spreading Antigene reagierende CD4⁺ T-Lymphozyten des Th1 Phänotyps identifiziert. (Yu, Johnson et al. 1996b; Tuohy, Yu et al. 1999).

Des Weiteren konnte auch bei der HEU ein Spreading innerhalb des IRBP auf andere IRBP-Epitope sowie auf S-Antigen-Peptide festgestellt werden (Deeg, Thurau et al. 2002b).

2.7 T-Zellen in Uveitis

Beteiligung von Th1-Zellen bei verschiedenen Uveitisformen

Lymphozyteninfiltrate in ERU-Augen bestehen zu 90% aus T-Zellen, wovon mehr als 50% CD4⁺ sind (Deeg, Kaspers et al. 2001). Von diesen wiederum sind ein Großteil Th1 Zellen (Gilger, Malok et al. 1999). In den Infiltraten in Augen von S-Ag immunisierten Lewis-Ratten waren bis zu 84% der Lymphozyten CD4⁺ (Barton, Calder et al. 1993). Bei der idiopathischen Uveitis des Menschen wurde eine signifikante Aktivierung der intraokulären Th1-Zellen beschrieben, die mit den klinischen Uveitisercheinungen positiv korrelierte (Deschenes, Char et al. 1988).

Bei humanen Uveitiden (de Smet, Yamamoto et al. 1990), bei der ERU (Deeg, Kaspers et al. 2001) und in den verschiedenen Tiermodellen (Gery 1986a; Barton, Calder et al. 1993; Deeg, Thurau et al. 2002b) konnte gezeigt werden, dass T-Zellen Peptide retinaler Proteine spezifisch erkennen, da in den Zellen mittels dieser Peptide proliferative Aktivität induziert werden konnte.

Pathogenität spezifischer Th1-Zellen

Durch adoptiven Transfer von T-Helferzellen gelang es, die EAU zu übertragen (Caspi, Roberge et al. 1986). Da diese T-Zellen IL-2 produzierten, konnte man sie als Th1- Zellen identifizieren. Diese spezifisch auf S-Antigen proliferierenden Zellen wurden aus immunisierten und erkrankten Lewisratten isoliert und in naive Lewisratten übertragen. Nach sechs bis acht Tagen brach bei den Empfängertieren ebenfalls die Krankheit aus. Damit war der Beweis erbracht, dass spezifische Th1 Zellen Uveitis auslösen.

Speziell gegen die Th1-Antwort gerichtete Medikamente

Durch die Gabe von Rapamycin (Roberge, Xu et al. 1993) gelang es die Induktion einer EAU in Lewis-Ratten zu unterdrücken. Eine Forschergruppe berichtete von der erfolgreichen Anwendung von Cyclosporin A an Humanpatienten, bei denen die Therapie mit Kortison nicht angeschlossen (Nussenblatt, Palestine et al. 1983). Rapamycin und Cyclosporin A stören die Produktion bzw. die Signaltransduktion von IL-2 (Janeway 2002a).

Einfluss von Th2-Zellen auf die Th1-Antwort

Th1-Zellen stimulieren durch die Bildung von IL-2, IFN- γ , und TNF die zelluläre Immunantwort und hemmen die humorale Immunantwort. Th2-Zellen dagegen stimulieren mit der Produktion von IL-4 und IL-5 die humorale Immunantwort und hemmen gleichzeitig die Th1-Zellen. Daher wurde vermutet, dass eine Verschiebung in Richtung der humoralen Immunantwort von therapeutischer Bedeutung sein könnte, da so die zelluläre Immunantwort geschwächt werden würde (Ramanathan, de Kozak et al. 1996; Singh and Rai 2001). Im Rattenmodell aber zeigte sich, dass IL-4 Zugabe die Autoimmunreaktion in den meisten Fällen verstärkt (Ramanathan, de Kozak et al. 1996). Eine Untersuchung zur genetischen Prädisposition verschiedener Rattenlinien zeigte, dass zur Auslösung der EAU eine Th1-Antwort vonnöten ist, aber im Umkehrschluss das Vorhandensein einer Th2-Antwort nicht automatisch eine höhere Resistenz bedeutet (Sun, Rizzo et al. 1997).

2.8 Autoantikörper und Uveitis

Die Rolle der humoralen Immunantwort bei autoimmunen Uveitiden wird kontrovers diskutiert. In wieweit Autoantikörper an der Schädigung der uvealen Strukturen beteiligt sind, ist noch unklar. Manche Autoren schreiben den Antikörpern eine regulatorische Rolle, andere sogar eine protektive Rolle zu (de Smet and Chan 2001b). Dies wird mit dem oben genannten Phänomen (siehe Abschnitt 2.8) erklärt, dass nämlich Th1- und Th2-Antwort sich gegenseitig hemmen. Ist die Rolle der Antikörper bei der Pathogenese noch umstritten, werden sie bei vielen Autoimmunerkrankungen als diagnostisches Mittel genutzt. Zahlreiche Autoantigene bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wurden durch Autoantikörper identifiziert.

Bei dem Typ I Diabetes mellitus ist es zum Beispiel möglich auf verschiedene Diabetes-assoziierte-Autoantikörper zu testen. Ist ein Proband auf mehr als einen dieser

Autoantikörper positiv, wird er mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% Diabetes mellitus entwickeln (LaGasse, Brantley et al. 2002).

Untersuchungen zum systemischen Lupus erythematoses ergaben, dass schon zehn Jahre vor Krankheitsausbruch bei 78% der später Erkrankten antinukleäre Antikörper nachgewiesen werden konnten. Bei den Kontrollen dagegen war dies nur bei 3,8% möglich (Arbuckle, McClain et al. 2003; Scofield 2004).

Die „Cancer Associated Retinopathy“ (CAR) tritt in einer hohen Korrelation mit Autoantikörpern gegen Recoverin auf. Dabei werden in dem tumorösem Gewebe (fern des Auges) retinale Proteine, vor allem Recoverin, exprimiert. Es bildet sich eine Immunreaktion gegen dieses Antigen im Tumor. Die gegen Recoverin spezifischen und aktivierten Immunzellen eliminieren dies ebenfalls im Auge, was schließlich zur Blindheit führt. Die hochgradige Korrelation des Auftretens dieses Autoantikörpers mit CAR führte zum ersten kommerziell erhältlichen Bluttest zur Frühdiagnose von immunmediertem Visusverlust (Thirkill, Tait et al. 1992; Thirkill, Keltner et al. 1993; Thirkill 1996).

Weitere Beispiele in denen Autoantikörper diagnostisch genutzt werden sind in der Literatur zahlreich vorhanden (Scofield 2004), sie werden hier aus Platzgründen jedoch nicht weiter aufgeführt.

Die Antikörpertiter gegen S-Antigen und IRBP zeigten bei Humanpatienten mit endogenen Uveitiden jedoch keinen Unterschied zu denen von gesunden Probanden: S-Ag: Patienten 28%, Gesunde 30% (Doekes, van der Gaag et al. 1987) IRBP: Patienten und Gesunde 50% (Hoekzema, Hwan et al. 1990).

Autoantikörper gegen mMDH wurden, in Zusammenhang mit Uveitis, bisher nur bei ERU; und nur von Pompetzki beschrieben (Pompetzki 2003).

2.9 Malat-Dehydrogenase (MDH)

Neben der mitochondrialen MDH (mMDH) gibt es noch eine cytosolische MDH (cMDH auch soluble MDH (sMDH) genannt). Beide Enzyme kommen in allen eukariotischen Zellen vor. Sie sind Isoenzyme, da sie enzymatisch dieselben Eigenschaften besitzen. Beide katalysieren die Reaktion von L-Malat zu Oxalacetat mit Nikotinamidadenin-dinucleotid als Coenzym. Die MDHs sind essentiell für den Energiestoffwechsel der Zelle. Sie sind an Reaktionswegen beteiligt, die wichtige Stoffwechselprodukte vom Mitochondrium ins Cytosol und umgekehrt transportieren. Diese

Produkte sind zum Beispiel für die Gluconeogenese, die Fettsäuresynthese oder zur Energiegewinnung im Mitochondrium wichtig. Die mMDH ist Bestandteil des Citratzyklus.

Bei der MDH handelt es sich um ein Homodimer, sie setzt sich demnach aus zwei identischen Untereinheiten zusammen. Ein MDH-Monomer hat eine Masse von 35 kDa. Obwohl cMDH und mMDH die gleichen enzymatischen Eigenschaften sowie große strukturelle Ähnlichkeit besitzen sind sie doch keine sequenzhomologen Proteine. Die Aminosäuresequenz von cMDH und mMDH ist nur zu 23% homolog, wie eine Untersuchung bei der Maus zeigte (Joh, Takeshima et al. 1987a). Beide Enzyme sind hoch konserviert. Die speziesspezifischen Unterschiede sind bei Säugern sehr gering. So ist die mMDH Sequenz der Ratte zu der des Schweins zu 96% homolog (Grant, Roderick et al. 1987). Von dem 314 Aminosäuren langen Polypeptid einer Untereinheit sind, laut Grant, 12 (Grant, Roderick et al. 1987), laut Joh, 15 (Joh, Takeshima et al. 1987b) unterschiedlich. Diese liegen meist an der Oberfläche des Enzyms (Grant, Roderick et al. 1987). Durch die Translation entsteht zunächst pre-mMDH, ein Vorläuferprotein, welches um 24 Aminosäuren am NH₂-terminalen Ende länger ist als das reife Enzym (Grant, Roderick et al. 1987). Es ist um 1,5 bis 2 kDa größer als das der monomeren Form des reifen Proteins (Joh, Takeshima et al. 1987b).

Die mitochondriale MDH ist chromosomal kodiert und in der Matrix des Mitochondriums lokalisiert. Mehrere Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass der NH₂-terminale Aminosäureschwanz des pre-mMDH zur Verbringung ins Mitochondrium dient (Horwich, Kalousek et al. 1985; Hurt, Muller et al. 1985).

Die mMDH wird in der Retina stark exprimiert (persönliche Mitteilung Dr. M. Ueffing, Abteilung Humangenetik GSF). Am höchsten ist die MDH-Enzymaktivität in den inneren Segmenten der Photorezeptoren (Ross and Godfrey 1987). Im Verlauf einer experimentellen Uveitis, die durch die Implantation eines Messingsplitters in den Glaskörper ausgelöst wurde, konnte eine deutliche Erhöhung von der MDH-Aktivität im Glaskörper beobachtet werden (Reim, Lukow et al. 1989). Nach der Vermutung der Autoren stammt das Enzym aus einwandernden Lymphozyten und zugrunde gehenden Retinazellen. In der Retina nimmt die MDH-Aktivität ebenfalls zu, fällt aber vier Tage nach Implantation des Messingsplitters wieder ab. 28 Tage nach Versuchsbeginn war die Enzymaktivität deutlich unter der einer gesunden Retina.

2.10 IgG-Unterklassen

2.10.1 IgG-Unterklassen beim Menschen

Beim Menschen sind vier verschiedene IgG-Unterklassen bekannt: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Sie unterscheiden sich in Ihrer schweren Kette. Dies hat auch Auswirkungen auf ihre immunologischen Eigenschaften. So aktiviert IgG3 den klassischen Komplementweg sehr stark, IgG1 aktiviert ihn stark, IgG2 schwach und IgG4 gar nicht. IgG1 und IgG3 können an Makrophagen und Phagozyten binden, IgG2 kann das nicht, und von IgG4 kann es ein Teil der Moleküle (Janeway 2002b). Je nach Beschaffenheit des Antigens herrschen bestimmte IgG-Unterklassen vor (Jefferis and Kumararatne 1990). IgG1 und IgG3 sind vor allem bei der Reaktion gegen Proteine beteiligt. IgG2 kommt häufig nach der Immunisierung mit Polysacchariden vor, und IgG4 bei Personen mit Hypersensibilitäten und chronischen parasitärer Infektionen. T-Helferzellen und verschiedene Cytokine haben ebenfalls einen Einfluss darauf, welche Unterklasse produziert wird.

2.10.2 IgG-Unterklassen bei Autoimmunerkrankungen

Bei vielen Autoimmunkrankheiten treten nur bestimmte IgG-Unterklassen auf. Zum Beispiel bei Sjögren's Syndrom wird nur IgG1 gegen das Autoantigen gebildet, bei primärer biliärer Zirrhose IgG1-IgG3. Bei anderen Autoimmunerkrankungen lässt sich ein gewisser Zusammenhang zwischen den vorherrschenden IgG-Unterklassen und dem Krankheitsbild erkennen. Dies zeigt sich zum Beispiel bei dem systemischen Lupus Erythematodes (SLE). Bei SLE werden Antikörper gegen Doppelstrang-DNA gebildet. Das Krankheitsbild variiert je nach mengenmäßiger Verteilung der IgG-Unterklassen dieser Antikörper. Ist IgG1 die vorherrschende Unterklasse, gefolgt von IgG3, IgG2, und IgG4, dominiert zumeist Myositis das Krankheitsbild. Ist die Frequenz der Subklassen in der Reihenfolge IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, stehen häufig renale Komplikationen im Vordergrund. Bei der Reihenfolge IgG3, IgG1, IgG2, IgG4 treten vor allem Hautläsionen auf (Dueymes, Barrier et al. 1993). Langzeituntersuchungen zeigten, dass die individuelle Isotypverteilung jedes Patientenserums hierbei konstant bleibt (Winkler, Henschel et al. 1988).

Die Verteilung der IgG-Unterklassen kann aber nicht nur die Erscheinungsform der Krankheit sondern auch die Pathogenität der Autoantikörper, und damit die Schwere des Krankheitsverlaufes bestimmen. Bei einigen Autoimmunerkrankungen sind die

pathogenen Eigenschaften weitgehend auf Autoantikörper einer IgG-Unterklasse beschränkt. Ein Beispiel hierfür ist die Wegener-Klinger-Granulomatose. Hier werden neutrophile Granulozyten durch Antikörper gegen sie aktiviert, was diese zu dem so genannten „respiratory burst“ veranlasst. Als „respiratory burst“ wird die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Stickstoffoxiden aus den Granulozyten bezeichnet. Diese Substanzen schädigen das Gewebe und verursachen so diese Krankheit. Die absolute Menge an IgG sowie IgG1, IgG3 und IgG4 der Autoantikörper beeinflusste nicht die Kapazität den „respiratory burst“ zu induzieren (Mulder, Stegeman et al. 1995). Allerdings korrelierten Änderungen in der relativen Menge von IgG3 der Autoantikörper signifikant mit der Kapazität den „respiratory burst“ auszulösen. Das bedeutet, dass die Auslösung und die Schwere der Krankheit davon abhängen wie viel Prozent der Autoantikörper der IgG3 Unterklasse angehören (Mulder, Stegeman et al. 1995).

2.10.3 IgG-Unterklassen bei Pferden

Über die IgG-Unterklassen der Pferde weiß man heute noch nicht viel. Seit wenigen Jahren sind vier Unterklassen bekannt: IgGa, IgGb, IgGc und IgG(T) (Sugiura, Kondo et al. 1998). Man kann sie mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen die jeweilige Unterklasse unterscheiden. Neueste Untersuchungen der Genregion in der die konstanten Teile der schweren Kette codiert sind, ergaben, dass es insgesamt sieben IgG-Unterklassen beim Pferd gibt (Wagner, Miller et al. 2004). Die neue Nomenklatur spricht daher von IgG1 bis IgG7. IgG1 entspricht IgGa, IgG4 IgGb und IgG6 IgGc. Die bisher als IgG(T) bezeichnete Unterklasse setzt sich aus zwei Unterklassen zusammen: IgG3 und IgG5. Gegen IgG2 und IgG7 sind bisher noch keine Antikörper bekannt. Über die Funktionen und Eigenschaften der Pferde-IgG-Unterklassen weiß man noch wenig. Bisher konnte noch keine Unterklasse funktionell einer menschlichen Unterklasse zugeordnet werden (Steinbach, Deeg et al. 2002).

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Kommerziell erhältliche Präparationen von mitochondrialer Malat-Dehydrogenase

Folgende kommerziell erhältliche mMDH-Präparationen standen zur Verfügung.

- mMDH aus dem Rinderherz Fa. Sigma
- mMDH aus dem Schweineherz Fa. Sigma
- mMDH aus dem Schweineherz, lyophilisiert Fa. Calbiochem
- mMDH aus dem Schweineherz, lyophilisiert Fa. Worthington

Für die Immunisierung von drei Ratten wurde die Schweineherzpräparation der Firma Sigma 24 Stunden in PBS (siehe 3.3.1) in Dialyseschläuchen¹ dialysiert.

3.1.2 Probenmaterial von ERU-Patienten und Kontrollpferden

Alle ERU-Patienten stammten aus der Klientel der chirurgischen Tierklinik der Universität München. Dort wurden auch die Pars plana Vitrektomien durchgeführt. Die Diagnose equine rezidivierende Uveitis erfolgte dort anhand der von WERRY und GERHARDS (1992) aufgestellten Kriterien.

Für die Charakterisierung der humoralen Immunantwort von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU) auf mMDH wurden Seren von 358 Pferden getestet. Die Gruppe der an ERU erkrankten Tiere umfasste 263 Pferde. Die Kontrollgruppe umfasste 95 augengesunde Pferde. Außerdem wurden intraokuläre Proben aus 293 ERU-Augen, welche bei der therapeutischen Pars plana Vitrektomie von ERU-Patienten gewonnen wurden, auf anti-mMDH Antikörper untersucht. Die Vitrektomie Proben stammen von 270 Patienten, teilweise denselben Patienten von denen auch Serum gewonnen wurde.

T-Zellproliferationsassays wurden mit frischen Proben von 20 ERU-Patienten und neun Kontrolltieren durchgeführt. Mit diesen Assays wurde der Verlauf der Immunreaktion auf mMDH und verschiedene Autoantigene untersucht. Auf diese Pferde bestand im Rahmen des SFB Projekts der Arbeitsgruppe Deeg seit 18 Monaten regel-

¹ Fa. Karl Roth GmbH, Karlsruhe

mäßiger Zugriff. Von den Pferden wurde regelmäßig Blut in Lithium-Heparinröhrchen genommen.

3.1.3 Blut- und Serumgewinnung beim Pferd

Nach Desinfektion der Injektionsstelle mit 70%igem Ethanol² wurde Blut mit sterilen Spritzen³ aus der Vena cephalica entnommen und steril in die Lithium-Heparin-Blutröhrchen⁴ überführt, ohne die Blutzellen dabei zu zerstören. Das Serum wurde in ähnlicher Weise gewonnen. Die gefüllten Serumröhrchen⁵ wurden bei 37° C für zwei bis drei Stunden inkubiert. Das Serum wurde nach zehnminütiger Zentrifugation bei 650 x g abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20° C gelagert.

3.1.4 Versuchsratten für die Immunisierungsversuche

Für die Tierversuche zur Uveitogenität von mMDH wurden Lewisratten aus hauseigener Zucht verwendet. Die Ratten wurden in Kleingruppen in Macrolonkäfigen gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt.

Diese Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 209.1/211-2531-86/02).

Immunisierung der Lewis-Ratten

Die Lewis-Ratten wurden mit einer Emulsion aus 320µg mMDH⁶ (Kontrollen mit bovinen Serum-Albumin Fraktion V⁷) emulgiert in 100µl Freund's komplettem Adjuvans (FCA)⁸ subkutan immunisiert. Zusätzlich bekamen die Ratten 0,2 ml Pertussistoxin intraperitoneal appliziert. Die Ratten wurden 28 bis 31 Tage nach der Immunisierung getötet.

Präparation der Organe

Die Ratten wurden mit Ether narkotisiert und schmerzfrei getötet. Gleich im Anschluss wurde das Herz punktiert, um Blut zur Herstellung von Serum zu gewinnen. Die Serumherstellung entspricht der von Abschnitt 3.1.3. Von den Organen wurden

² Fa. Merck, Darmstadt

³ Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen

⁴ Fa. Sarstedt, Nümbrecht

⁵ Fa. Sarstedt, Nümbrecht

⁶ Präparation aus Schweineherz Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (siehe Abschnitt 4.1.3)

⁷ Fa. Applichem, Darmstadt

⁸ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Augen, Lymphonodi mandibulares, Milz, Leber und Gehirn entnommen. Die Augen wurden herauspräpariert, ohne die Bulbi oculi zu beschädigen. Die Lymphknoten wurden als Positivkontrolle für die Immunhistologie entnommen. Die Bauchhöhle wurde eröffnet, und Pankreas und Leber entnommen. Aus der Leber wurde ein Würfel mit einer Kantenlänge von circa 5mm geschnitten, der Rest des Organes wurde verworfen. Der Kopf der Ratte wurde mit einem Messer vom Rumpf getrennt, durch das Foramen occipitale magnum wurde mit einer Schere der Schädel eröffnet und das Gehirn freigelegt, ohne dieses dabei zu quetschen. Die Organe wurden gleich nach der Entnahme in Bouin'sche Fixierlösung (siehe 3.9.1) eingelegt.

3.2 Herstellung und Aufreinigung von polyklonalen Dotterantikörpern gegen mMDH

Antikörper gegen mMDH wurden hergestellt, um für ELISA-Versuche und für Westernblot-Analysen entsprechende Positivkontrollseren zu erhalten. Zur Gewinnung von polyklonalen anti-mMDH-Antikörpern wurde eine Henne der Linie Lohmann-Selected Leghorn⁹ verwendet. Das Tier wurde in einer Kleingruppe in einem Gitterrostkäfig gehalten mit handelsüblichem Alleinfuttermittel und mit Wasser ad libitum versorgt. Der Versuch wurde der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 211-2531.6-14/2001 angezeigt.

3.2.1 Immunisierung des Huhns

Vor der Immunisierung wurde ein Präimmunserum gewonnen. Das Blut wurde aus der Vena jugularis entnommen und bei 37° C für zwei bis drei Stunden inkubiert. Das Serum wurde nach zehnmütiger Zentrifugation bei 650 x g abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

Das Huhn wurde intramuskulär mit 300µg mMDH, emulgiert in 200 µl FCA, immunisiert. Nach vier Wochen wurde mit 300µg mMDH in 200 µl Freund's Incomplete Adjuvans (FIA)¹⁰ reimmunisiert. Nach dem Boost wurde wöchentlich Serum gewonnen. Es wurden fünf Eier für die Dotterpräparation verwendet, die eine Woche nach dem Zeitpunkt mit dem höchsten Serumantikörpertiter gelegt wurden.

⁹ Fa. Tierzucht Lohmann, Cuxhafen

¹⁰ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

3.2.2 Aufreinigung von Dotterantikörpern

3.2.2.1 Puffer und Material

TBS-Puffer pH 7,3

6,05 g Tris¹¹

43,5 g NaCl

mit 5N HCl auf pH 7,3 einstellen

ad 5000 ml Aqua bidest

10% Dextransulfatlösung

100,00 g Dextransulfat¹²

ad 1000 ml Aqua bidest

1M Calciumchloridlösung

147,00 g CaCl₂·2H₂O

ad 1000 ml Aqua bidest

Dialysepuffer pH 7,8

29,03 g Na₂HPO₄

45,00 g NaCl

1,65 g KH₂PO₄

ad 5000 ml Aqua bidest

Ammoniumsulfat

Dialyseschläuche¹³

¹¹ Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien: Fa. Applichem Darmstadt

¹² Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

¹³ Fa. Karl Roth GmbH, Karlsruhe

3.2.2.2 Präparation der Dotterantikörper

Die Dotter wurden vom Eiweiß getrennt, gewogen, aufgestochen und 1:10 mit TBS pH 7,3 verdünnt. Die Dottersuspension wurde nach folgendem Schema mit Dextransulfat entfettet:

- 30 min bei RT rühren
- 15 min bei 2000 x g zentrifugieren
- Überstand abgießen und das Sediment verwerfen
- zum Überstand je Gramm eingesetzten Dottermaterials 0,4 ml 10%ige Dextransulfatlösung zugeben
- 10 min bei RT rühren
- Zugabe von 1 ml der 1M Calciumchloridlösung je g eingesetztem Dotters
- 15 min bei RT rühren
- 15 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugieren
- den Überstand durch einen Faltenfilter filtrieren
- über Nacht bei 4°C gegen TBS-Puffer dialysieren

Fällung und Lösung des IgGs wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Gewicht des Dotterüberstandes bestimmen
- 26% massenanteilig Ammoniumsulfat zugeben
- 30 min bei RT rühren
- 15 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugieren
- Sediment in TBS resuspendieren (5 ml/Ei)
- über Nacht bei 4°C gegen TBS-Puffer dialysieren
- zweimal über Nacht bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysieren

Die so gereinigten Dotterantikörper wurden aliquotiert, und bei -20°C gelagert.

3.3 ELISA

3.3.1 Puffer und Lösungen

Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g	Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3) ¹⁴
6,00 g	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) ¹⁵

ad 1000 ml Aqua bidest.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2

8,00 g	NaCl
0,20 g	KCl
1,45 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
0,20 g	KH_2PO_4

ad 1000 ml Aqua dest.

PBS-T (0,05% Tween 20)

0,5 ml	Tween20 [®]
--------	----------------------

ad 1000 ml PBS.

1% BSA-PBS-T Lösung

1 g	Bovines Serum Albumin Fraktion V
-----	----------------------------------

ad 100 ml PBS-T, vor Gebrauch herstellen.

TMB-Puffer

8,2 g	Na-Azetat (CH_3COONa) ¹⁶
3,15 g	Zitronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$)

ad 1000 ml Aqua bidest.

¹⁴ Fa. Merck, Darmstadt

¹⁵ Fa. Merck, Darmstadt

¹⁶ Fa. Merck, Darmstadt

TMB-Stammlösung

6 mg 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB)¹⁷
ad 1 ml DMSO¹⁸.

TMB-Gebrauchslösung

332 µl	TMB Stammlösung
10 ml	TMB Puffer, 37°C
3,3 µl	30 % H ₂ O ₂

in der aufgeführten Reihenfolge mischen und sofort verwenden.

1 M Schwefelsäure

472 ml	Aqua dest.
28 ml	H ₂ SO ₄ 96%

3.3.2 Serum- und Glaskörper-ELISA

Der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) wurde verwendet, um mMDH-spezifische Antikörper in Pferdeseren und in Vitrektomieproben nachzuweisen. Dabei wurde das Antigen (mMDH¹⁹) an eine Platte gebunden und mit den zu untersuchenden Pferdeseren oder Vitrektomieproben beschickt. Antikörper in den Proben die das mMDH binden, wurden mit einem Peroxidase gekoppelten Anti-Pferd-IgG Antikörper²⁰ detektiert. Nach Zugabe des Substrats konnte diese Bindung anhand eines durch das Enzym vermittelten Farbumschlags im Photometer gemessen werden.

3.3.3 Durchführung

Eine NUNC-Maxisorb[®] Polystyren 96-Lochplatte²¹ wurde mit mMDH in einer Konzentration von 5 µg/ml Beschichtungspuffer mit 100 µl/Kavität beschichtet und mindestens 12h bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde mit Hilfe eines ELISA-Washers (Tecan M4/8R Columbus plus, Fa. SLT-Labinstrumente, Crailsheim) mit PBS-T gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 1% BSA-PBST-Lösung blockiert, um unspezifische Bindungen an die Platte zu verhindern.

¹⁷ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

¹⁸ Alfa Aesar, Karlsruhe

¹⁹ wenn nicht anders benannt, immer porcines mMDH, Fa. Sigma, Deisenhofen

²⁰ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

²¹ Fa. Nunc, Wiesbaden

Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen und 60 min bei 37°C mit dem entsprechenden Pferdeserum in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-T mit 100 µl/Kavität inkubiert. Die Probe wurde als Doppelansatz aufgetragen. Als Positivkontrolle diente die Dotterpräparation eines mit mMDH immunisierten Huhnes, sie wurde ebenfalls 1:500 verdünnt. Als Negativkontrolle diente ein ausgewähltes Serum eines augengesunden Kontrolltieres. Nach dem Waschen der Platte wurde der sekundäre Antikörper Anti-Horse-IgG Peroxidase (POD) in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS-T mit 100 µl/Kavität für 60 min. bei 37°C inkubiert. In die Kavitäten der Positivkontrolle wurde statt des Anti-Horse-IgG Antikörpers ein Anti-Chicken-IgG Antikörper (im Hause hergestellt nach dem Verfahren nach Erhard (Erhard, Von Quistorp et al. 1992)) in einer Verdünnung von 1:50000 gegeben. Platte wurde wiederum gewaschen und mit 100 µl/Kavität TMB Gebrauchslösung 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl/Kavität 1M Schwefelsäure abgestoppt und die optische Dichte (OD) im Plattenphotometer (Sunrise Remote, Fa. SLT-Labinstruments, Crailsheim) bei 450 nm gemessen.

3.3.4 Isotyp-ELISA

Beim Pferd sind drei verschiedene Isotyp-Hauptklassen bekannt: IgA, IgM und IgG. IgG wiederum kann in sieben Unterklassen unterteilt werden: IgG1 bis IgG7 (Wagner, Miller et al. 2004). Es standen gegen folgende Unterklassen Antikörper zur Verfügung IgG1(IgGa), IgG4 (IgGb), IgG6 (IgGc) sowie IgG3,5 (IgG(T)). In Klammern steht die alte Nomenklatur, die vom Hersteller der Antikörper eingeführt wurde (Sugiura, Kondo et al. 1998). IgG(T) wird hier als IgG3,5 bezeichnet, da der Antikörper zur Detektion von IgG(T) sowohl IgG3 als auch IgG5 bindet (Wagner, Miller et al. 2004). Gegen die neu entdeckten Unterklassen IgG2 und IgG7 (Wagner, Miller et al. 2004) standen keine Antikörper zur Verfügung.

Die Seren mit den höchsten Extinktionen aus dem Serum-ELISA (siehe Abschnitt 4.1.1) wurden auf jede IgG-Unterkategorie getestet, um festzustellen, ob gesunde Pferde Antikörper eines anderen Isotyps bilden als ERU-Patienten, oder ob das Vorkommen einer Unterklasse mit Krankheitserscheinungen der ERU korreliert.

Die Durchführung des ELISA entspricht weitgehend der von Abschnitt 3.3.3. Anders als dort beschrieben, wurde jedoch als sekundärer Antikörper der jeweilige anti-

Isotyp-Ak (monoklonale Maus- anti-Pferde-Isotyp²²) eingesetzt (1:5000 in PBS-T; 100µl pro Kavität, 1h bei 37°C). Diese Antikörper wurden wiederum mit einem spezifischen, gegen die Kappa-Kette des Mäuse IgG gerichteten, POD-Konjugats²³ (1:5000, 50µl pro Kavität, 1h bei 37°C) detektiert. Die Immunglobuline der Maus besitzen zu 95% die Kappa-Kette als leichte Kette. Die Immunglobuline des Pferdes besitzen zu 90% die Lamda-Kette als leichte Kette, und nur zu 10% die Kappa-Kette (Tizard 2000). Durch die Wahl des anti-Kappa-Kette-Maus Aks wird die Kreuzreaktivität mit den Antikörpern des Pferdeserums minimiert. Die Entwicklung des ELISAs entspricht der von Abschnitt 3.3.3.

Als Positivkontrolle wurde statt der anti-mMDH Hühnerantikörper ein hochtitriges ERU-Patientenserum verwendet.

3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Um die Serum-ELISA Ergebnisse zu bestätigen wurde eine Western Blot Analyse (Immunoblot) durchgeführt. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese trennt Proteine aus einem Gemisch in der Reihenfolge ihrer molaren Massen auf.

Die Bindungseigenschaften zwischen Proteinbanden aus dem SDS-PAGE und Serumantikörpern lassen sich untersuchen, nachdem die Proteine aus dem Gel auf eine andere Matrix, wie zum Beispiel Nitrozellulose transferiert worden sind.

So konnte kontrolliert werden, ob die mMDH-Präparationen Verunreinigungen mit anderen Proteinen enthalten, und ob die im Serum-ELISA positiv getesteten Seren spezifisch auf mMDH oder auf Verunreinigungen in den Präparationen reagierten.

²² Sämtliche anti-Pferde-IsotypAk wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Takeo Sugiura vom Equine Research Institute Shimotuga-Gun, Japan zur Verfügung gestellt

²³ Fa. Biozol, Eching

3.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.4.1.1 Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Herstellung von PBS und PBS-T siehe Abschnitt 3.3.1

1,5 M Gelpuffer, pH 8,8

18,15 g Tris

mit 5 M HCl auf pH 8,8 titrieren

ad 100 ml Aqua bidest.

10% Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)-Lösung

10,0g Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)

ad 100 ml Aqua bidest.

10% Ammoniumperoxidsulfatlösung

0,10 g Ammoniumperoxidsulfat

ad 1 ml Aqua bidest.

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

6,0 g Tris

mit 5 M HCl auf pH 6,8 titrieren

ad 100 ml Aqua bidest.

Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3

15,0 g Tris

72,0 g Glycin

5,0 g SDS

ad 1000 ml Aqua bidest.

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

3.4.1.2 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Die Gele mit einer Schichtdicke von 0,75 mm und einer Größe von 5 x 9 cm wurden in einer Biorad mini Protean II Gießkammer²⁴ hergestellt. Für das Analysegel mit einer Trennstrecke von 6,5 cm wurde eine 10%ige Acrylamidlösung verwendet, für das Sammelgel eine 4%ige.

	10%ige Lösung	4%ige Lösung
Aqua Bidest	4,20 ml	6,17 ml
Gelpuffer pH 8,8	2,50 ml	
Sammelpuffer pH 6,8		2,50 ml
Acrylamidlösung	3,30 ml	1,33 ml
SDS-Stock 10 %ig	100 µl	100 µl

Unmittelbar vor dem Gießen wurden jeweils 50 µl 10%ige Ammoniumpersulfatlösung und 20 µl TEMED einpipettiert. Für das Analysegel wurden 3,5 ml der 10%igen Lösung in die Kammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Polymerisierungszeit von 40 Minuten wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel über das Analysegel geschichtet. In das Sammelgel wurde der Probenkamm eingelassen, der nach weiteren 40 Minuten entfernt wurde.

3.4.1.3 Durchführung der Elektrophorese

Nach dem Einspannen in die Laufkammer (Biorad mini Protean II) wurden die Gele mit Laufpuffer überschichtet. Die Probe wurde im Verhältnis 1:3 mit dem Laemmli Probenpuffer²⁵ gemischt und 1 µg mMDH in die Probenaschen einpipettiert. Eine Tasche wurde mit einem vorgefärbten Größenstandard (10-180 kDa)²⁶ beschickt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt und beendet, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers den unteren Gelrand erreichte. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im SDS-Gel gefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

²⁴ Fa. Biorad, München

²⁵ Fa. Biorad, München

²⁶ Fa. Fermentas Life Sciences, Burlington, Kanada

3.4.2 Western Blot

3.4.2.1 Lösungen für das Semi-Dry-blotting

0,3 M Anodenpuffer I, pH 10,4

36,33 g Tris
200 ml Methanol, reinst²⁷

ad 1000 ml Aqua dest.

25 mM Anodenpuffer II, pH 10,4

3,03 g Tris
200 ml Methanol, reinst

ad 1000 ml Aqua dest.

Kathodenpuffer, pH 9,4

3,03 g Tris
5,25 g ϵ -Aminocaprinsäure²⁸
200 ml Methanol, reinst

ad 1000 ml Aqua dest.

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

10 g Polyvinylpyrrolidone (PVP40)²⁹

ad 1000 ml PBS-T

3.4.2.2 Durchführung des Semi-dry Blottings

Der elektrophoretische Transfer der Proteinbanden aus den mini-Gelen auf die Nitrocellulose erfolgte im Semi-dry-Elektroblotter (SM 17 556, Fa. Sartorius, Göttingen). Filterpapier und Nitrocellulosemembran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Während des Aufbaus wurden Einmalhandschuhe getragen. Das Blotsandwich wurde auf der mit Aqua dest. gespülten Plattenanode folgendermaßen aufgebaut:

1. 4 Lagen in Anodenpuffer I getränktes Filterpapier
2. 2 Lagen in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier
3. die in Aqua bidest getauchte Nitrocellulosemembran

²⁷ Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe

²⁸ Fa. Merck, Darmstadt

²⁹ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

4. das zu blottende SDS-Gel
5. 4 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier

Ein Glasstab wurde vorsichtig über das Blotsandwich gerollt um Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen zu entfernen. Abschließend wurde die mit destilliertem Wasser gespülte Plattenkathode aufgesetzt. Die Transferzeit betrug bei einer angelegten Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Nitrocellulose (56 mA/Gel) 1 Stunde.

3.4.2.3 Immunoblot

Nachdem die Membran mit einer PBS–Tween–Polyvinylpyrrolidone (PBS-T-PVP) Lösung blockiert wurde (Inkubationszeit mindestens 2 Stunden), wurde sie mit 1:500 in PBS-T verdünntem Patientenserum für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal für je 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wurde ein zweiter Peroxidase (POD)-konjugierter Antikörper verwendet. Die Membran wurde für eine Stunde mit dem 1:10000 in PBS-T verdünnten Kaninchen–anti-Pferd-IgG-POD-Antikörper³⁰ inkubiert. Vor der Sichtbarmachung des Signals durch die Enhanced-Chemiluminescence (ECL)-Entwicklung wurde die Membran sechsmal für je 10 Minuten mit PBS-T gewaschen. Die ECL-Lösung³¹ wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt und auf die Membran aufgetragen, die Detektion der Lumineszenz erfolgte mit einem Röntgenfilm³² bei einer Belichtungszeit von 1,5 Minuten. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur, die Membran wurde auf einem Plattenschüttler gewaschen und inkubiert.

3.5 Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Mit Hilfe der Coomassiefärbung ist es möglich die Proteinbanden in SDS-Gelen anzufärben. Auf diese Weise konnten die Proteinverunreinigungen der mMDH Präparationen sichtbar gemacht werden. So kann man einen Überblick über die Anzahl der Verunreinigungsfractionen erhalten und ist in der Lage die einzelnen Fractionen für die massenspektrometrische Untersuchung aus dem Gel auszuschneiden.

³⁰ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

³¹ Fa. Pierce, Rockford, USA

³² HR-E30 (100 NIF), Fa. FUJI, Tokio, Japan

Coomassie Färbelösung2,0 g Coomassie Brilliant Blue³³

500 ml Ethanol

100 ml Essigsäure

ad 1000 ml Aqua bidest.

Entfärbelösung

250 ml Ethanol

70 ml Essigsäure

ad 1000 ml Aqua bidest.

Die SDS-Gele werden erst 30 Minuten in der Färbelösung, und danach drei Stunden in der Entfärbelösung inkubiert.

3.6 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sensitivere Proteinfärbung als die Coomassiefärbung. Die Gele inkubierten der Reihe nach in den unten aufgeführten Lösungen für die angegebene Zeit. Die Inkubation fand in Glasschalen auf einem Schüttler statt. Alle Lösungen wurden frisch hergestellt.

Zeit	Lösung	Herstellung von 1 Liter
2 x 30 min	50 % Methanol 12 % Essigsäure 0,0185 % Formaldehyd ³⁵	500 ml Methanol ³⁴ (technisch) 200 ml Essigsäure (60%) + 500 µl Formaldehyd (37%) ad 1l Aqua dest
3 x 20 min	50 % Ethanol	500 ml Methanol ³⁶ (technisch) ad 1l Aqua dest

³³ Fa. Biorad, München

³⁴ Methanol, Essigsäure und Ethanol Fa. Merck, Darmstadt

³⁵ Fa. Merck, Darmstadt

³⁶ Methanol, Essigsäure und Ethanol Fa. Merck, Darmstadt

1 x 0,2 min	0,8 mM Na ₂ S ₂ O ₃ ³⁷	200 mg ad 1l Aqua dest
2 x 0,2 min	H ₂ O	
1 x 20 min	11,8 mM AgNO ₃ ³⁸ 0,028 % Formaldehyd	2g Ag NO ₃ +750 µl Formaldehyd (37 %) ad 1l Aqua dest
1 x 0,2 min	H ₂ O	
1 x 1-5 min	0,57 M Na ₂ CO ₃ 0,02 mM Na ₂ S ₂ O ₃ 0,0185 % Formaldehyd	60 g + 25 ml Na ₂ S ₂ O ₃ - Lösung (s.o.) + 500 µl Formaldehyd ad 1l Aqua dest
1 x 10 min	50 % Methanol 12 % Essigsäure	siehe oben
20 min	20 % Ethanol 2 % Glycerin	200 ml Ethanol 25 ml Glycerin (80%) ad 1l H ₂ O ad 1l Aqua dest

Danach wurden die Gele zum Quellen in Aqua dest. gelegt, bis sie die anfängliche Größe wieder erreicht hatten. Die Gele wurden in eine Folie verpackt und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.7 Massenspektroskopische Analyse von Proteinen

Mit Hilfe der massenspektroskopischen Analyse ist es möglich, die genaue Masse von Ionen zu bestimmen. Durch das Verfahren der Matrix unterstützten Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight (MALDI-TOF) ist man in der Lage, Proteinfragmente zu ionisieren und deren Massen zu bestimmen. Über ein Computerprogramm und

³⁷ Fa. Merck, Darmstadt

³⁸ Fa. Merck, Darmstadt

eine Datenbank, in der Daten aller bekannten Proteine gespeichert sind, kann man mit diesen Daten das Protein identifizieren.

Die zu untersuchenden Proteinbanden wurden aus dem Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten und mit 0,5 µl Trypsin³⁹ in 100 µl mM Tris (pH 7,5) an bestimmten Schnittstellen verdaut. Die Fragmente wurden mit einer Matrix aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)⁴⁰ kokristallisiert.

Die Matrix wird wie folgt hergestellt:

20 mg/ml DHB in 20% Acetonitril⁴¹ /0,1% TFA

20 mg/ml 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (HMB)⁴² in 20% Acetonitril /0,1% TFA

Vor der Verwendung werden die DHB- und die HMB-Lösung im Verhältnis 9:1 gemischt. 0,5 µl dieser Lösung wurden mit 0,5 µl Probe vermischt.

Nach Auskristallisation wurde diese Matrix in eine Hochvakuumröhre mit einem Flugzeitanalysator verbracht und mit einem Laser beschossen. Die zu analysierenden Fragmente wurden dadurch ionisiert und aus der Matrix in das Hochvakuum freigesetzt. Durch das elektrostatische Feld einer Beschleunigungselektrode wurden die Ionen beschleunigt. Die Geschwindigkeit, die sie dabei erreichten, ist abhängig von ihrer Masse und ihrer Ladung. Die Ionen gelangten in eine feldfreie Driftstrecke und trafen am Ende der Strecke auf einen Detektor. Die Zeit, die sie zum Zurücklegen dieser Driftstrecke benötigten, wurde gemessen. Aus der Zeit ließ sich das Masse/Ladungs-Verhältnis der Ionen bestimmen. Das Detektionssystem bestand aus einem Sekundärelektronenvervielfacher zur Verstärkung des Signals und einem Transientenrekorder zur Digitalisierung des Signals. Die Identifizierung der Proteine anhand der gemessenen Spektren erfolgte über die Sammeldatenbank Mascot Deamon. Sie ist im Internet frei zugänglich unter www.matrixscience.com. Für die möglichen Proteine ermittelt die Datenbank einen Score. Dieser Score ist der negative dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. Nach Angaben der Betreiber der Datenbank ist ein Score größer als 69 signifikant.

³⁹ Fa. Promega, Madison, USA

⁴⁰ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

⁴¹ Fa. Riedel de Häen, Seelze

⁴² Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

3.8 Untersuchung der T-Zellantwort

3.8.1 Retinale Antigene und deren Peptide

In den Proliferationsassays wurde die Reaktion von T-Zellen auf retinale Antigene getestet. Neben mMDH kamen hierbei zur Anwendung: S-Antigen⁴³, PDSAg⁴⁴ (Peptid des bovinen S-Antigen, aa 342-355 (Wildner and Thurau 1994)), S-Ag 286⁴⁵ (Peptid des bovinen S-Antigen, aa 286-297 (Gregerson, Fling et al. 1989)) und R14⁴⁶ (Peptid des bovinen IRBP; aa 1169-1191 (Sanui, Redmond et al. 1988)). Als Positivkontrolle wurde PPD⁴⁷, ein gereinigtes Proteinderivat von Tuberkulin, verwendet.

3.8.2 Gewinnung von T-Lymphozyten

Die Li-Heparinröhrchen⁴⁸ mit dem Pferdeblut wurden sanft geschwenkt, und dann 15 min aufrecht stehen gelassen. Ficoll-Lösung⁴⁹ wurde in Zentrifugenröhrchen⁵⁰ vorgelegt. Der Überstand mit den T-Lymphozyten wurde von der Phase mit den abgesetzten Thrombo- und Erythrozyten abgesaugt und vorsichtig auf die Ficoll-Lösung geschichtet, bis Überstand und Ficoll zu gleichen Teilen im Röhrchen vorlagen. Bei RT wurden die Röhrchen mit 400 x g für 25 min zentrifugiert. Die sich auf dem Ficoll gebildete Interphase (Lymphozyten) wurde abgesaugt und in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden mit gekühltem PBS gewaschen und bei 8°C und 400 x g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und die Zellen anschließend in 1640 RPMI^{®51} mit 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (P 100 IU/ml; S 10mg/ml)⁵² und 10% fetalem Kälberserum (FCS)⁵³ aufgenommen. Die Zellen wurden ausgezählt, und die Konzentration auf 5×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

⁴³ S-Antigen wurde freundlicherweise von Frau Dr. Wildner, Augenklinik der Ludwig Maximilian Universität, München zur Verfügung gestellt

⁴⁴ Biotrend, Köln

⁴⁵ Biotrend, Köln

⁴⁶ Biotrend, Köln

⁴⁷ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

⁴⁸ Fa. Sarstedt, Nümbrecht

⁴⁹ Biochrom AG, Berlin

⁵⁰ Corning Incorporated, New York, USA

⁵¹ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

⁵² Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

⁵³ Fa. Life Technologies, Karlsruhe

3.8.3 T-Zell-Proliferationsassay

Die Zellsuspension und die Antigene wurden nach folgendem Schema auf eine sterile 96-Lochplatte⁵⁴ pipettiert. Pro Kavität:

- 195 µl Medium
- 100 µl Zellsuspension (5×10^5 Zellen)
- 5 µl Proteinlösung (10 µg Antigen)

Nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C im Brutschrank (CO₂Auto-Zero, Heraeus Instruments, München) wurden die Zellen mit [methyl-³H]Thymidin⁵⁵ markiert (3,7 mBq / Kavität). Die Zellen inkubierten nochmals 16h im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit dem Harvester (Filtermate Harvester, Fa. Packard, Dreieich) geerntet. Dabei wurden die Zellen aus den Kavitäten gespült, lysiert und die freigesetzte DNA an Glasfaserfilter aufgefangen. Diese Filter wurden 30 min bei 80°C im Trockenschrank getrocknet, danach in Omni Filterkassetten⁵⁶ eingelegt und Szintillationsflüssigkeit (20µl / Kavität)⁵⁷ aufpipettiert. Die [³H]-Aktivität wurde im Beta-Counter (TopCount NXT Microplate, Packard Dreieich) gemessen.

Der Einbau des radioaktiven [methyl-³H]Thymidin in die DNA gibt Aufschluss über die proliferative Aktivität der Zellen. Der Stimulationsindex wurde errechnet, indem die [³H]-Radioaktivität der Probe (Zellen plus Antigen) durch die Kontrolle (Zellen ohne Antigen) geteilt wurde.

3.9 Histologie

3.9.1 Puffer und Lösungen

Bouin'sche Lösung

- 15 Teile gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung⁵⁸
- 5 Teile 35% Formol⁵⁹
- 1 Teil Eisessig

⁵⁴ Fa. Nunc, Wiesbaden

⁵⁵ Fa. Amersham, Freiburg

⁵⁶ Fa. Packard, Dreieich

⁵⁷ Fa. Perbio Science, Bonn

⁵⁸ Merck, Darmstadt

⁵⁹ Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe

TBS-T

1,21g TRIS

8,76g NaCl

ad 1l Aqua bidest, einstellen auf pH 7,3

und 0,05% Tween 20

0,1 M EDTA-Puffer pH 8,029,22g EDTA⁶⁰

ad 1l Aqua dest.

3.9.2 Fixierung und Entwässerung der Organe

Die Organe wurden in Bouin'scher Fixierlösung für 24 h fixiert. Danach wurden die Organe nach folgendem Schema entwässert:

- 70% Ethanol für 24h, dabei wurde das Ethanolbad einmal gewechselt. Während dieser Inkubationszeit wurden die Augen halbiert (Schnittführung durch Pupille und Nervus Opticus).
- 96% Ethanol 24h, Bad einmal gewechselt
- Isopropanol⁶¹ 24h, Bad einmal gewechselt
- Xylol⁶² 24h, Bad einmal gewechselt

Danach wurden die Schnitte mit folgender Paraffinreihe in Einbettkassetten ausgegossen:

- 1 Paraffin⁶³
- 3 Paraffin
- 6 Paraffin
- 9 Paraffin

Die einparaffinierten Organe wurden geschnitten (Mikrotom HM360, Fa. Microm, Walldorf) und die Schnitte auf Objektträger⁶⁴ verbracht.

⁶⁰ Perbio Science, Wien, Österreich

⁶¹ Fa. VWR, Darmstadt

⁶² Fa. VWR, Darmstadt

⁶³ ganze Paraffinreihe von Fa. Richard-Allen Scientific zu beziehen über Fa. Microm, Walldorf

⁶⁴ Fa. Menzel, Braunschweig

3.9.3 Hämalaun-Eosin(HE)-Färbung

Die nach Kapitel 3.9.2 hergestellten Schnitte wurden in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert, gefärbt und anschließend in aufsteigender Alkoholreihe entwässert.

Entparaffinieren:

- Xylol 2 x 5 min
- Isopropanol 2 x 5 min
- 98%iges Ethanol 5 min
- 70%iges Ethanol 5 min
- Aqua dest. 5 min

Färben:

- Hämalaun⁶⁵ 10 min
- Mit Aqua dest. abspülen
- Unter fließendem Leitungswasser 15 min
- Eosin 3 min

Entwässern:

- Aqua dest. 5 min
- 70%iges Ethanol 5 min
- 98%iges Ethanol 5 min
- Isopropanol 2 x 5 min
- Xylol 2 x 5 min

Die Schnitte wurden anschließend mit Eukitt⁶⁶ permanent eingedeckelt.

3.9.4 CD3-Färbung

Die Schnitte wurden entparaffiniert wie in Abschnitt 3.9.3

- Kochen in Citrat-Puffer pH 6,6⁶⁷ für 30 min im Wasserdampfbad bei 100°C
- Blockieren: TBS-T mit 1%BSA und 25 µl Kaninchenserum / ml TBS-T für 30 min
3x mit TBS-T je 5 min waschen
- Erster Ak: monoklonaler anti-CD3-Antikörper⁶⁸ 1h bei Raumtemperatur
3x mit TBS-T je 5 min waschen

⁶⁵ Fa. Richard-Allen Scientific zu beziehen über Fa. Microm, Walldorf

⁶⁶ Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

⁶⁷ Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

⁶⁸ zur Verfügung gestellt von E. Kremmer, GSF Neuherberg

- Zweiter Ak: Kaninchen anti-Ratten-IgG Antikörper biotiniert⁶⁹ 1: 1000 ; für 1h
3x mit TBS-T je 5 min waschen
- Brücke: Streptavidin-POD⁷⁰ 30 min bei RT (für DAB-Färbung) / Streptavidin-AP⁷¹ (für AProt-Färbung und für APschwarz-Färbung)
3x mit TBS-T je 5 min waschen
- Immunfärbung: DAB⁷² 50 s oder Alkalische Phosphatase Substrat Rot⁷³ 50 s
oder Alkalische Phosphatase Substrat Schwarz⁷⁴ 50s (je nach Färbung)
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun 30 s
- Aqua dest.
- Leitungswasser 15 min (fließend)

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Einbetten wie Abschnitt 3.9.3.

3.9.5 Glutamin Synthetase-Färbung

Um die Strukturveränderungen der Retina zu untersuchen, wurden müllerzellspezifische Antikörper verwendet. Glutamin Synthetase (GS) wird vor allem von Müllerzellen in der Retina exprimiert (Hauck, Suppmann et al. 2003).

- Kochen: 0,1 M EDTA-Puffer (pH 8,0) 15 min kochen
- Blockieren: Protein-Block-Serum-Free 30 min⁷⁵
- 3x mit TBS-T je 5 min waschen
- Erster Ak: anti-Maus-GS 1 : 500 in TBS-T mit 1% BSA, 1h bei RT
- 3 x mit TBS-T je 5 min waschen
- Zweiter Ak: Ziegen anti-Maus-IgG-AP⁷⁶ 1 : 400, 1h RT
- 3 x mit TBS-T je 5 min waschen
- Immunfärbung: Alkalische Phosphatase Substrat Rot 10 min
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.

⁶⁹ Fa. Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

⁷⁰ Elite Kit, Fa. Linaris Wertheim

⁷¹ Standard AP Kit, Fa. Linaris Wertheim

⁷² Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

⁷³ Fa. Linaris Wertheim

⁷⁴ Fa. Linaris Wertheim

⁷⁵ Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

⁷⁶ Fa. Dianova, Hamburg

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun 30 s
- Aqua dest.
- Leitungswasser 15 min (fließend)

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Einbetten wie Abschnitt 3.9.3.

3.9.6 Glutamin Synthetase-fibrilläres saures Gliaprotein-Färbung

GFAP (fibrilläres saures Gliaprotein) kommt, wie auch GS, in Müllerzellen vor. Es ist ein zytoplasmatisches, filamentäres Protein, welches einen Anteil des Zytoskeletts von Müllerzellen bildet.

- Kochen: 0,1 M EDTA-Puffer (pH 8,0) 15 min kochen
- Blockieren: Protein-Block-Serum-Free 30 min⁷⁷
- 3 x mit TBS-T je 5 min waschen
- Erster Ak: anti-Kaninchen-GFAP 1 : 250 plus anti-Maus-GS 1 : 500 in TBS-T mit 1% BSA 1h bei RT
- 3 x mit TBS-T je 5 min waschen
- Zweiter Ak: Ziegen anti-Kaninchen-IgG-POD⁷⁸ 1 : 200 plus Ziegen anti-Maus-IgG-AP⁷⁹
1 : 400, 1h RT
- 3 x mit TBS-T je 5 min waschen
- 1.Immunfärbung: Alkalische Phosphatase Substrat Rot 10 min (um GS zu Färben)
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.
- 2.Immunfärbung: Histogrün⁸⁰ 5 min (um GFAP zu Färben)
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun 30 s
- Aqua dest.
- Leitungswasser 15 min (fließend)

⁷⁷ Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

⁷⁸ Fa. Biorad, München

⁷⁹ Fa. Dianova, Hamburg

⁸⁰ Fa. Vector, zu beziehen über Fa.Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Einbetten wie Abschnitt 3.9.3.

3.9.7 von Willebrand-Faktor-Färbung (vWF-Färbung)

Der von Willebrand-Faktor ist ein Protein, das an der Thrombozytenadhäsion beteiligt ist. Es kommt in den Endothelzellen der Blutgefäße vor. Deshalb eignet es sich als Marker für Gefäße.

- Kochen: Histo-Enhance-Puffer⁸¹ für 20 min bei 96°C
- Blockieren: TBS-T mit 5% Kaninchenserum
- 3 x mit TBS-T je 5 min waschen
- Erster Ak: Kaninchen-anti-v.Willebrand-Faktor (human)⁸² 1 : 400
- 3 x mit TBS-T je 5 min waschen
- Zweiter Ak: Ziege-anti-Kaninchen-Biotin⁸³ 1 : 2000 1h
- 3 x mit TBS-T je 5 min waschen
- Immunfärbung: Streptavidin-AP (Vector Standard AP) 30 min
- 3 x mit TBS-T je 5 min waschen
- Farbstoff AP-Substrat schwarzbraun⁸⁴ 5min
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun 30 s
- Aqua dest.
- Leitungswasser 15 min (fließend)

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Einbetten wie Abschnitt 3.9.3.

3.10 Auswertung der Histologie

Es wurden in allen Fällen mehrere Schnitte zur Auswertung herangezogen. Die Schnittebene dieser Präparate geht durch die Pupille und den Nervus opticus. Die beiden Augäpfel eines Tiers wurden halbiert und alle vier Hälften in einen Paraffinblock eingebettet. Deswegen wurde bei der Auswertung keine Unterscheidung zwischen rechtem und linkem Auge getroffen. Es wurde die am stärksten veränderte

⁸¹ Fa. Vector, zu beziehen über Fa.Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

⁸² Fa.Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

⁸³ Fa. Vector, zu beziehen über Fa.Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

⁸⁴ Fa. Vector, zu beziehen über Fa.Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

Hälfte zur Auswertung herangezogen. Die histopathologischen Veränderungen wurden nach dem in Tabelle 1 dargestellten Schema beurteilt (Caspi, Chan et al. 1993).

Grad	Beschreibung
0	<ul style="list-style-type: none"> ▪ keine Anzeichen von Entzündung
0,5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ minimale Entzündungszeichen, Architektur der Retina im Schnittbereich weitgehend intakt ▪ Infiltration von Entzündungszellen in die Retina ohne Gewebeerstörung, eventuell Zerstörung der Photorezeptorschicht in weniger als $\frac{1}{4}$ der Retina im Schnittbereich ▪ fokale nicht-granulomatöse Infiltration von Monozyten in die Aderhaut, den Ziliarkörper und die Retina
1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ milde Entzündung und/oder Zerstörung der Photorezeptorschicht in mindestens $\frac{1}{4}$ der Retina ▪ fokale Bereiche der Zerstörung mit deutlichem Schwund der Photorezeptoren ▪ retinale perivaskuläre Infiltration und monozytäre Infiltration in den Glaskörper
2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ milde bis mittelgradige Entzündung und / oder Läsionen in mehr als einem Viertel der im Schnittbereich gelegenen Retina, bis zur äußeren Körnerschicht reichend ▪ kleine exudative Netzhautablösungen ▪ Granulombildung in Uvea, Ziliarkörper oder Iris ▪ retinale Vaskulitis mit seröser Netzhautablösung und Verlust von Photorezeptoren
3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ mittelgradige Entzündung und / oder Läsionen in mehr als einem Viertel der im Schnittbereich gelegenen Retina, bis zur inneren Körnerschicht reichend ▪ Verlust der retinalen Struktur, große exudative Netzhautablösungen, mäßig bis große Zahl von Zellen im Glaskörper
4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ hochgradige Entzündung und / oder Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als einem Viertel der Retina ▪ völlige Zerstörung der retinalen Struktur

Tabelle 1: Graduierung der histopathologischen Veränderungen im EAU-Rattenmodell (Caspi, Chan et al. 1993)

4 Ergebnisse

4.1 B-Zellreaktion

4.1.1 Serumantikörper-ELISA

Die humorale Immunantwort auf mMDH wurde bei 277 ERU-Patienten und 77 Kontrolltieren untersucht. Die Pferdeseren wurden im ELISA getestet. Von den Extinktionen sämtlicher Proben wurde der Leerwert abgezogen. Pro 96 Lochplatte wurden 10 Negativkontrollen mitgetestet. Diese Negativkontrollen sind Seren von augengesunden Pferden mit niedrigen Extinktionen. Es wurde ein Mittelwert aus den Extinktionen der Negativkontrollen gebildet. Wird der 4 fache Mittelwert als Positivkriterium zugrundegelegt, waren 24 von 277 (8,7%) Patienten und sieben von 77 (9,1%) Kontrollen positiv. Die Positivkontrolle, eine Dotterpäparation eines mit mMDH immunisierten Huhnes, war stets positiv. Acht Patienten zeigten eine deutlich höhere OD als alle anderen Pferde.

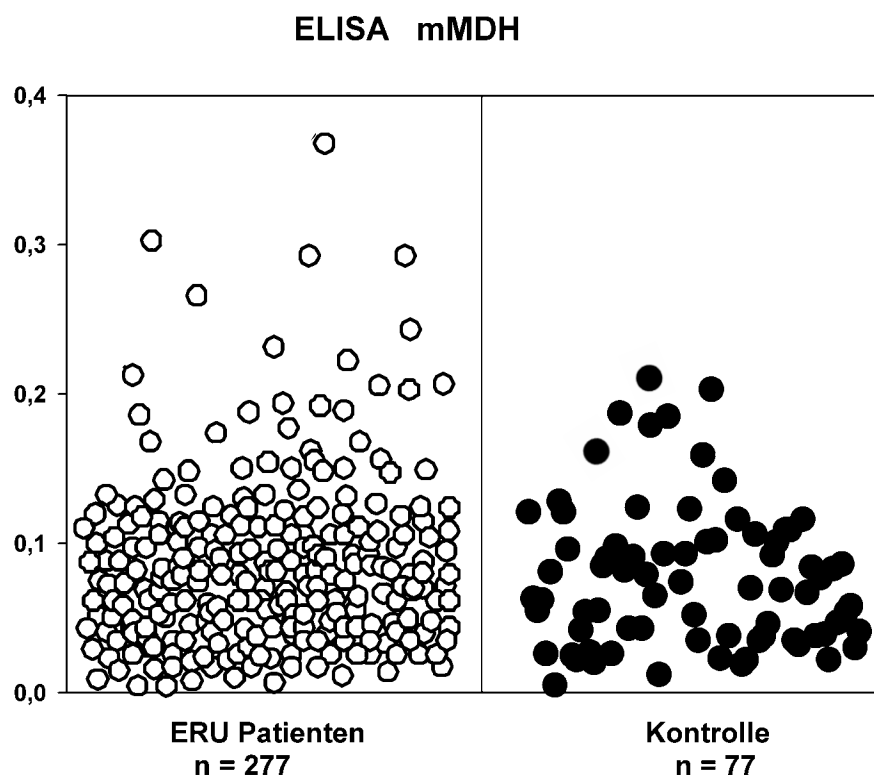


Abb. 1: Ergebnisse des Serumantikörper-ELISA links ERU-Patienten (leere Kreise), rechts 77 Kontrollen (gefüllte Kreise); die OD ist auf der X-Achse aufgetragen

4.1.2 Serumantikörper-Westernblot

Alle Seren von ERU-Patienten und Kontrolltieren die im Serumantikörper-ELISA (4.1.1) eine hohe OD aufwiesen, wurden im Westernblot getestet. Vier im ELISA negative Pferde mit niedrigen Extinktionen wurden als Negativkontrolle verwendet. Es zeigte sich, dass die meisten Seren eine Bande im Bereich von 35 bis 30 kDa dedektierten. mMDH hat eine Masse von 35 kDa (siehe Kapitel 2.9).

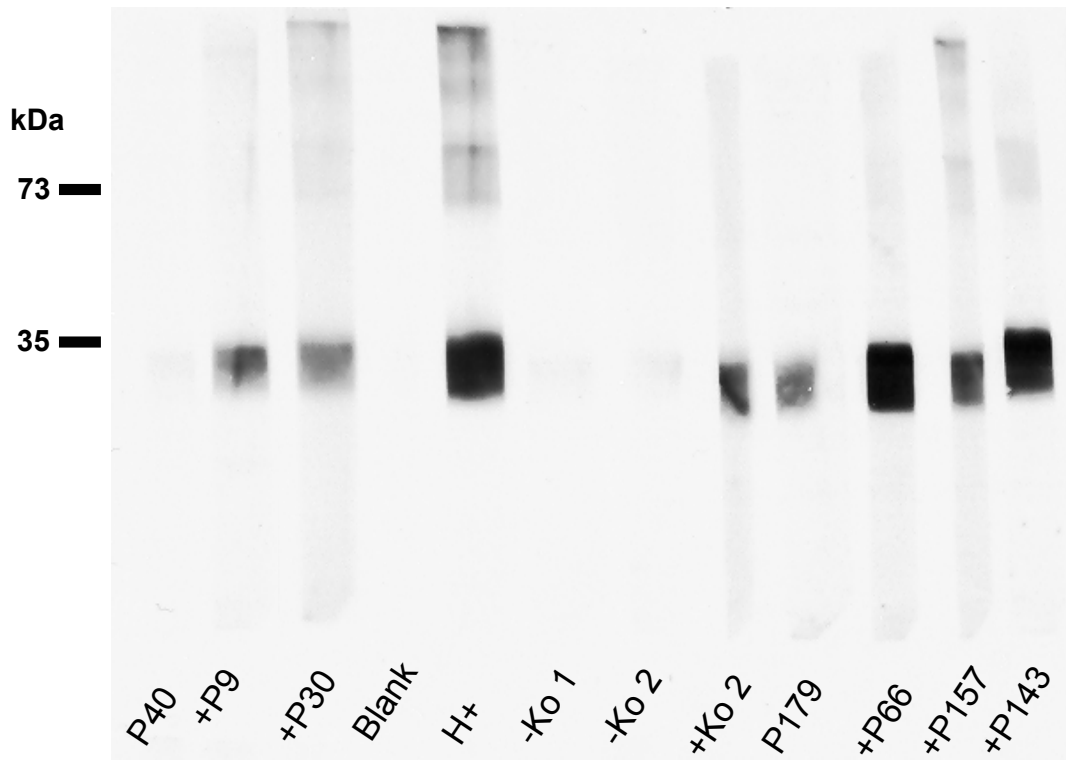


Abb. 2: Westernblot auf Serumantikörper gegen mMDH **P** bezeichnet Seren von ERU-Patienten die im ELISA negativ waren. Die mit **+P/+Ko** bezeichneten Proben waren im ELISA positiv. **-Ko** steht für die Pferdeseren, die im ELISA niedrige Extinktionen aufwiesen und hier als Negativkontrollen eingesetzt wurden. **H+** bezeichnet die Positivkontrolle (Huhn anti-mMDH IgG)

Drei Seren (P 111, P 27, +P28) dedektierten deutlich eine Bande im Bereich von 54 kDa, bei einem weiteren Serum (Ko7) war die Reaktion auf diese Bande fraglich (siehe Abb. 3). Eines der drei Seren war ein im Serumantikörper-ELISA positives Patientenserum. Sechs weitere Patientenseren waren im Westernblot negativ. Es konnten also sieben der 24 positiven Patientenseren nicht bestätigt werden. Von den sieben positiven Kontrollseren reagierte keines auf die 54 kDa Bande. Zwei der Positiven waren jedoch nicht im Westernblot positiv. Nach den Westernblot-Untersuchungen sind 17 Patienten und fünf Kontrollen eindeutig positiv.

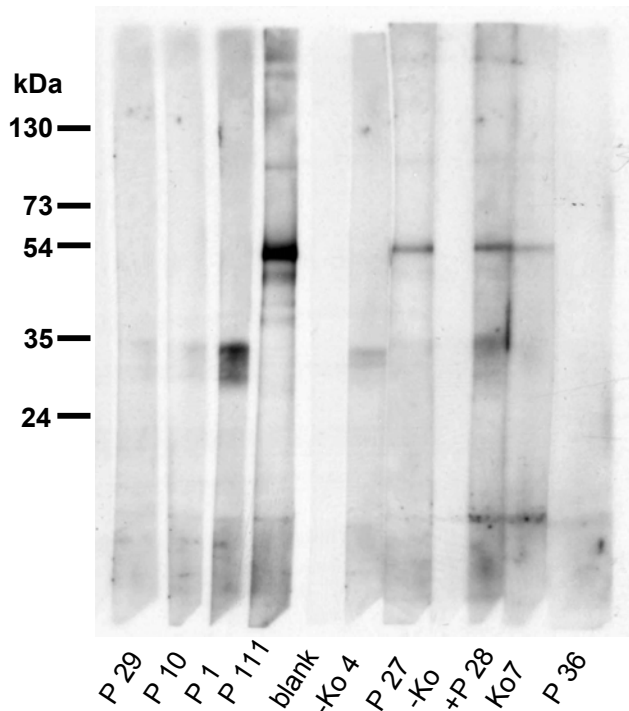


Abb. 3: Westernblot auf Serumantikörper gegen mMDH und Bande bei 54 kDa In diesem Blot sind die Seren zusammengellt die auf die 54kDa Bande reagierten. Drei (P111, P27, +P28) sind auf diese Bande positiv, ein weiteres Serum fraglich. Bei P111 sind weitere Banden angefärbt. Benennung wie Abb. 2.

4.1.3 Untersuchung der mMDH-Präparationen

Im Western Blot (siehe Abschnitt 4.1.2) zeigten drei Seren Aktivität gegen eine Bande bei 54 kDa. Es wurde eine massenspektroskopische Analyse durchgeführt, um das Protein dieser Bande zu identifizieren. Bei dieser Gelegenheit wurden verschiedene mMDH-Präparationen auf Verunreinigungen untersucht. Es wurden insgesamt vier kommerziell erhältliche Präparationen von drei verschiedenen Herstellern getestet. Von einer Präparation wurden mehrere Chargen getestet.

4.1.3.1 Untersuchung der mMDH-Präparationen in SDS-Gelen

Zuerst wurden die Präparationen durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteinbanden durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 4). Dabei zeigte sich, dass bei einem Produkt in einer Charge (A) drei Banden mehr zu sehen waren als in zwei anderen Chargen (B, C) desselben Produkts. Eine Präparation (E) zeigte eine deutliche Bande, die wesentlich größer war als die eigentliche mMDH-Bande. Nur eine Präparation (mMDH aus Schweineherz Fa. Sigma) zeigte keine Verunreinigungen in der Coomassie-Färbung (nicht abgebildet). Diese Präparation wurde erneut im SDS-Gel aufgetrennt und diesmal mit der wesentlich sensitiveren Silberfärbung gefärbt. In der Silberfärbung waren ebenfalls keine Verunreinigungen

sichtbar (siehe Abb. 5). Für alle weiteren Untersuchungen wurde nur diese Präparation verwendet.

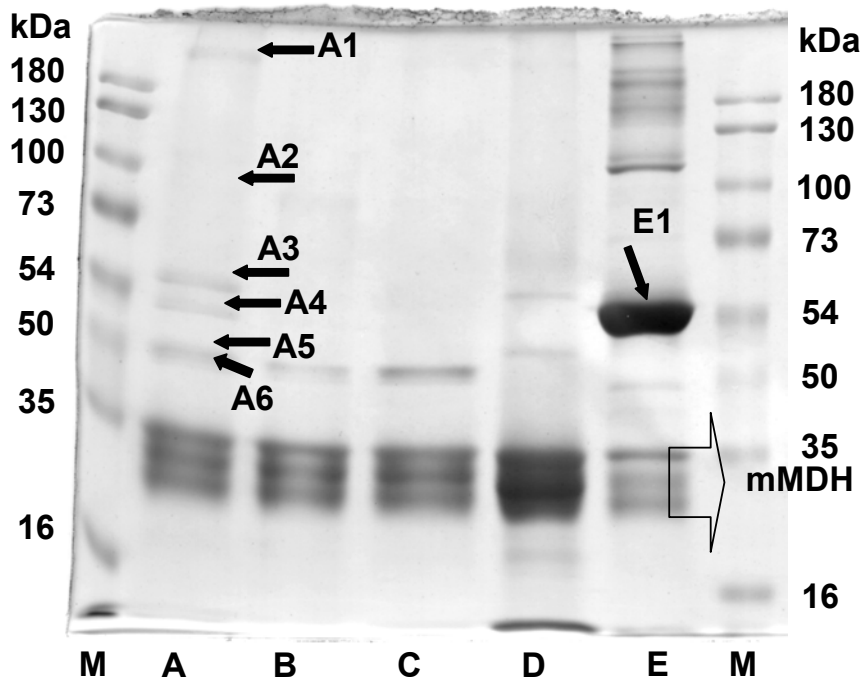


Abb. 4: Drei verschiedene mMDH Präparationen mit Verunreinigungen (SDS-Gel coomassiegefärbt) Die drei dicht hintereinander liegenden Banden in einer Größe von 27-35 kDa waren mMDH. Sie waren in jeder Präparation sichtbar. Bahn A-C verschiedene Chargen eines Produkts der Fa. Sigma, D Präparation Fa. Worthington, E Fa. Calbiochem. Die mit dem Buchstaben der Bahn und einer fortlaufenden Nummer gekennzeichneten Banden wurden in der MALDI-TOF untersucht.

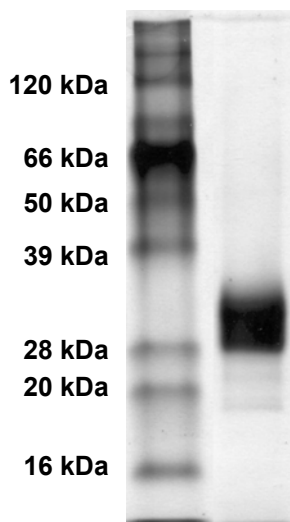


Abb. 5: Silbergefärbtes SDS-Gel mit mMDH-Präparation linke Bahn Molekulargewichtsmarker; rechte Bahn mMDH (Präparation aus Schweineherzen der Firma Sigma)

4.1.3.2 Massenspektroskopische Untersuchung der mMDH-Präparationen

Die in Abbildung Abb. 4 gekennzeichneten Banden, wurden im Labor der AG Ueffing in der GSF massenspektroskopisch untersucht. Citrat Synthase konnte in Präparation A und nachgewiesen werden (Abb. 4, Bande A6). In Präparation E ergab die Untersuchung ebenfalls Citrat Synthase als das wahrscheinlichste Protein. Allerdings ist ein Score von 54 noch nicht signifikant (erst ab 68) und in Abbildung Abb. 4 liegen A6 und E1 nicht ganz auf gleicher Höhe. In Präparation A konnte noch ein Fragment der konstanten Region der IgG2-Unterklasse (A1) sowie Albumin und eine weitere Bande MDH (A2) nachgewiesen werden. Nach der Position im Gel hatte das Protein dieser weiteren MDH-Bande eine Größe von ca. 115 kDa. Die Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Bande	Proteinname	Spezies	Score	MG in kDa
A1	IgG2 chain C region	Bos taurus	87	36,6 (Fragment)
A2	Pig MDH	Sus scrofa	71	32,2
A3	Konnte nicht identifiziert werden			
A4	Konnte nicht identifiziert werden			
A5	Bovine Albumin	Bos taurus	104	71,2
A6	Citrat-Synthase	Rattus norvegicus	80	52,2
E1	Citrat-Synthase	Rattus norvegicus	54	52,2

Tabelle 2: Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse Die Nummerierung der Banden ist mit der von Abb. 4 identisch

4.1.4 GlaskörperELISA

Zum Nachweis intraokulärer Antikörper gegen mMDH wurden Glaskörperproben von 270 verschiedenen ERU-Patienten untersucht. Glaskörperproben von zehn augengesunden Pferden dienten als Negativkontrolle. Als positiv wurden diejenigen Proben definiert, die um den Blank bereinigt, viermal so hohe Extinktionen wie die Negativkontrollen aufwiesen. 26 der 293 Glaskörperproben waren positiv. Das entspricht 9% der Glaskörperproben. Alle Negativkontrollen waren negativ.

4.1.5 IgG-Unterklassen-ELISA

Beim Menschen sind verschiedene Unterklassen von IgG bekannt. Sie haben zum Teil verschiedene immunologische Eigenschaften (siehe Kapitel 2.10.1). Um festzustellen, ob die Antikörper gegen mMDH bei ERU-Patienten anderen IgG-Unterklassen angehören als die Antikörper der Kontrolltiere, wurden die mMDH bindenden Antikörper auf ihre Unterklassen getestet. Es wurde auf IgG1, IgG4, IgG6 und IgG3,5 getestet. Um eine höhere Anzahl an Probanden zur Verfügung zu haben, wurden zusätzlich zu den Seren, die im Serumantikörper-ELISA als positiv definiert wurden (über dem vierfachen Mittelwert der Kontrollen; siehe 4.1.1), weitere Proben untersucht, die über dem 3,5 fachen Mittelwert lagen. Es wurden 14 Kontrollseren und 33 ERU-Seren getestet. Nicht alle der 33 IgG positiven Patientenseren (Positivkriterium 3,5facher Mittelwert; siehe 4.1.1) ließen sich in IgG-Unterklassen einteilen. Nur 20 der IgG positiven Seren waren gleichzeitig auf eine oder mehrere Unterklassen positiv. 14 Seren beinhalteten IgG4-, acht IgG3,5-Antikörper. Zwei Seren waren sowohl auf IgG4 als auch auf IgG3,5 positiv. IgG1 und IgG6 konnten in keinem Patientenserum detektiert werden.

Unterklasse	Patienten	Kontrolltiere
IgG	33	14
IgG1	0	1
IgG4	14	4
IgG6	0	2
IgG3,5	8	5
IgG positiv, auf Unterklassen negativ	13	6

Tabelle 3: Ergebnisse des Isotyp-ELISA bei Patienten und Kontrolltieren Die Seren mit IgG gegen mMDH wurden hier auf die Unterklassen dieser IgGs untersucht. Einige waren auf mehrere Unterklassen gleichzeitig positiv. In der Letzten Spalte sind die Seren aufgeführt, die auf keine Unterklasse positiv reagierten.

Von den 14 IgG-Positiven Kontrollseren reagierten nur acht auf IgG-Unterklassen. IgG1 konnte in einem Serum, IgG4 in vier, IgG6 in zwei und IgG3,5 in fünf Seren nachgewiesen werden. Zwei Kontrollseren waren mehrfach positiv. Ein Serum war auf alle IgG-Unterklassen positiv, ein weiteres auf IgG4, und IgG3,5. Die restlichen sechs Seren reagierten nur auf eine einzelne IgG-Unterklasse.

4.2 T-Zellreaktion

4.2.1 T-Zellreaktion auf mMDH

Erkennen T-Zellen ihr spezifisches Antigen, werden sie aktiviert. Sie beginnen daraufhin zu proliferieren. Im Folgenden wurde die Proliferation von T-Zellen ERU-erkrankter Pferde auf eine Stimulation mit mMDH untersucht. Die Untersuchung wurde bei 14 ERU-Patienten und neun Kontrolltieren durchgeführt. Ein Stimulationsindex von zwei oder höher wird als positiv gewertet. Es wurden vier Messungen, jeweils im Abstand von ungefähr einem Monat, durchgeführt. Die in Abb. 6 dargestellten Werte sind die Höchstwerte aus den vier Messungen.

Sieben Patienten zeigten T-Zellreaktivität auf mMDH (siehe Abb. 6). Von den Kontrollpferden reagierte keines.

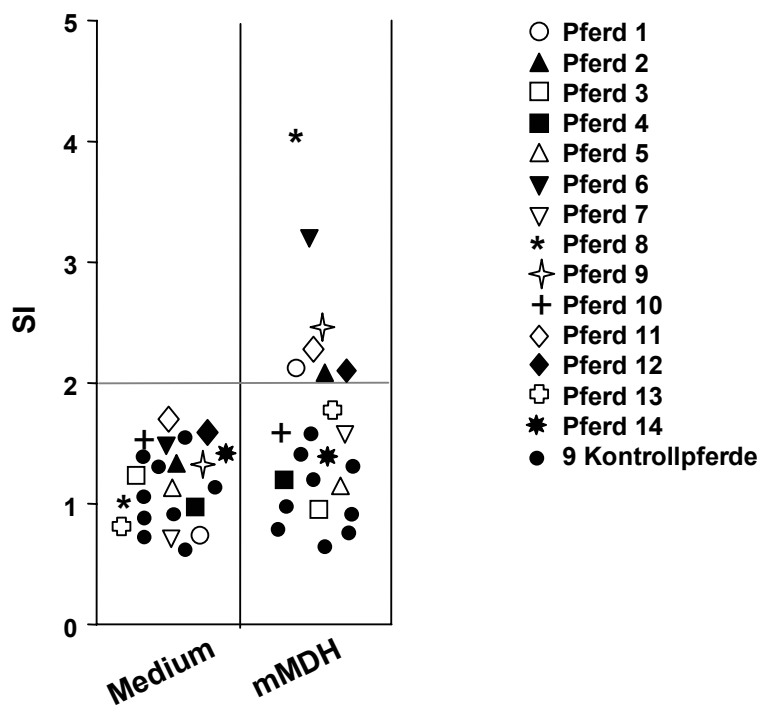


Abb. 6: T-Zellproliferation von 14 ERU-Pferden und 9 Kontrolltieren auf Stimulation mit mMDH Die linke Spalte (Medium) zeigt die proliferative Aktivität ohne Antigen. Sie ist die Negativkontrolle. Der Stimulationsindex (SI) ist auf der X-Achse aufgetragen. Ab einem SI von zwei (waagrechte Linie) wird die T-Zellreaktivität als positiv bewertet. Die neun Kontrolltiere sind durch schwarze Punkte, die Patienten durch entsprechende Symbole gekennzeichnet. Die Werte repräsentieren die Höchstwerte aus vier Messungen.

4.2.2 T-Zellreaktion auf weitere retinale Antigene

Nach der Spreading-Theorie liegt eine T-Zellreaktion gegen ein bestimmtes Antigen nur zu einem bestimmten Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs vor. Aus diesem Grund wurde die T-Zellreaktion auf weitere Autoantigene getestet. Es wurde auf S-Ag, PDSAg und R14 getestet. PDSAg ist ein Peptid von S-Ag. R14 ist ein sehr immunogenes Peptid von IRBP (siehe Abschnitt 2.4).

Kein Patient reagierte auf alle drei Antigene (PDSAg und S-Ag wurden als ein Antigen gezählt, da PDSAg ein Peptid von S-Ag ist). Sieben Patienten reagierten auf zwei Antigene gleichzeitig. Drei Tiere reagierten auf ein Antigen und fünf auf keines. Bei keinem Kontrolltier zeigte sich auf irgendein Autoantigen eine T-Zellstimulation.

Auf S-Ag reagierten 5 Patienten positiv, auf PDSAg (ein Peptid von S-Ag) reagierten vier, und auf R14 (ein Peptid von IRBP) drei. Von den mMDH positiven Tieren reagierten drei sowohl auf PDSAg als auch auf S-Ag. Ein weiteres mMDH positives ERU-Pferd reagierte auf PDSAg und R14, nicht aber auf S-Ag.

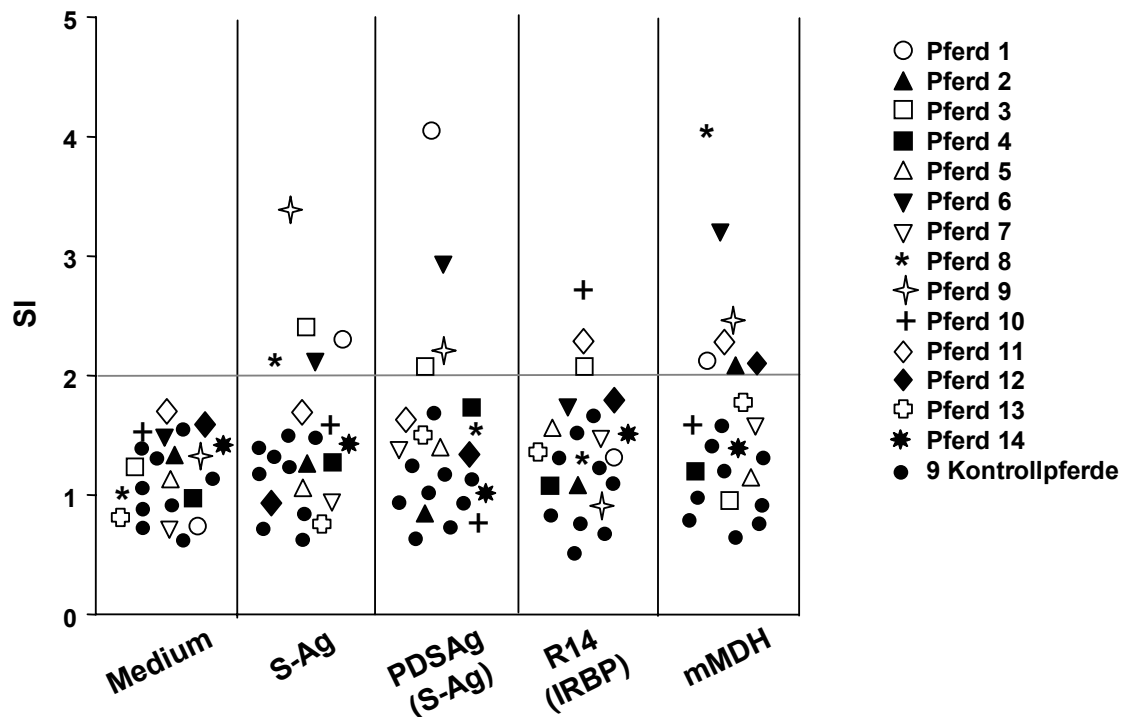


Abb. 7: T-Zellproliferation von 14 ERU-Pferden und 9 Kontrolltieren gegen mehrere retinale Antigene Die linke Spalte (Medium) ist die Negativkontrolle. Ab einem SI von 2 (waagrechte Linie) ist die T-Zellreaktivität gegen das entsprechende Antigen positiv. Die Werte repräsentieren die Höchstwerte aus vier Messungen, welche im Abstand von einem Monat gewonnen wurden.

4.2.3 Langzeituntersuchung der T-Zellreaktivität

Bei Pferd 8 und Pferd 11 wurde eine Untersuchung der Proliferation über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Bei Pferd 8 (siehe Abb. 8) fand die erste Messung während eines Uveitisschubes statt. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine hohe T-Zell-Proliferation auf mMDH festgestellt. Es konnte zusätzlich eine geringgradige proliferative Aktivität auf S-Ag, nicht aber auf R14 oder auf S-Antigenpeptide beobachtet werden. Die darauf folgende Messung in der schubfreien Zeit ergab keinerlei Aktivität mehr. Die Reaktivität gegen mMDH stieg daraufhin wieder an, fiel bis zum nächsten Schub wieder ab, war aber noch positiv. Die T-Zellen proliferierten dann gegen S-Ag 286 während des zweiten Schubs.

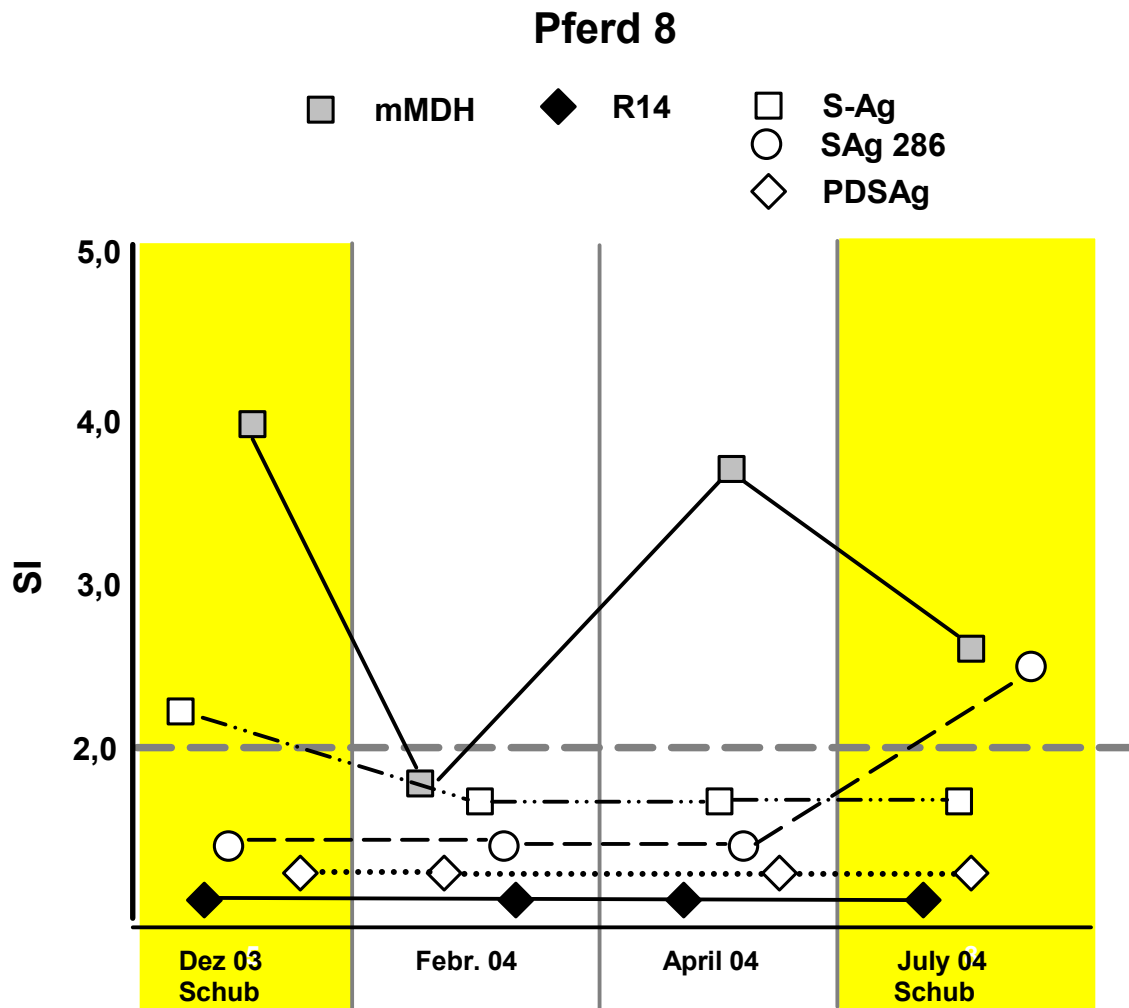


Abb. 8: T-Zellproliferation Pferd 8 Die Abbildung zeigt die spezifische proliferative Aktivität von T-Zellen gegen verschiedene retinale Antigene (durch Symbole dargestellt). Jede Spalte entspricht einer Untersuchung auf T-Zellreaktivität. Die Zeiträume, in denen das Pferd einen Uveitisschub hatte, sind farblich unterlegt.

Bei Pferd 11 (siehe Abb. 9) folgten drei Schübe im Abstand von zwei bis drei Monaten. Während und zwischen den ersten beiden Schüben konnte ein Stimulationsindex von mindestens 2,4 gegen mMDH festgestellt werden. Danach fiel die proliferative Aktivität gegen mMDH unter den Stimulationsindex von zwei. Gegen PDS-Ag begannen T-Zellen zu diesem Zeitpunkt zu proliferieren. Die proliferative Aktivität stieg bis zum zweiten Schub an. Die T-Zellreaktion auf R14 befand sich zu Beginn des Untersuchungszeitraumes auf einem positiven Niveau, bei den weiteren Messungen zeigte sich keine positive Reaktion mehr. Die Aktivität gegen S-Ag stieg am Ende des Untersuchungszeitraumes an.

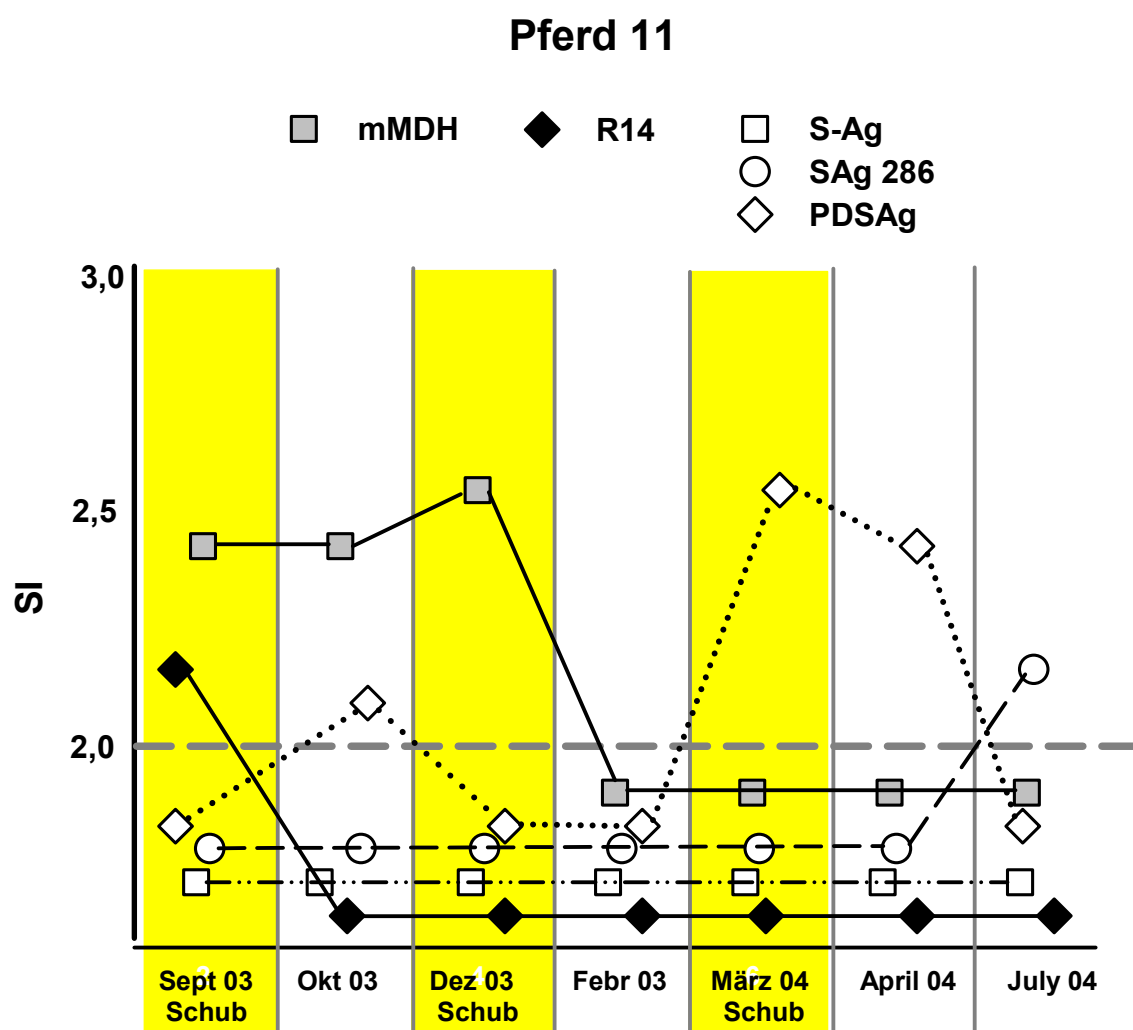


Abb. 9: T-Zellproliferation Pferd 11 Die Abbildung zeigt die spezifische proliferative Aktivität von T-Zellen gegen verschiedene retinale Antigene (durch Symbole dargestellt). Jede Spalte entspricht einer Untersuchung auf T-Zellreaktivität. Die Zeiträume, in denen das Pferd einen Uveitisschub hatte, wurde farblich unterlegt.

4.3 Untersuchung der Uveitogenität von mMDH im Lewis-Ratten-Modell

Um die Uveitogenität von mMDH zu testen, wurden elf Lewis-Ratten in vier unabhängigen Versuchen mit mMDH in FCA und Pertussistoxin immunisiert. Zusätzlich wurden fünf Ratten als Negativkontrollen mit bovinem Serum Albumin immunisiert. Die Ratten wurden 28 bis 31 Tage nach der Immunisierung getötet. Die Augen der Ratten wurden histologisch untersucht und analog des Beurteilungsschemas nach Caspi (siehe Abschnitt 3.10) bewertet. Zusätzlich wurden die Seren auf Antikörper gegen mMDH untersucht, um festzustellen, ob die Ratten eine immunologische Reaktion auf mMDH aufwiesen, und ob ein adäquater Tötungszeitpunkt gewählt wurde. Alle Ratten besaßen deutlich erhöhte Antikörpertiter gegen mMDH. Sowohl im ELISA wie auch im Western-Blot (siehe Abb. 10) wurden alle Seren der mMDH immunisierten Ratten eindeutig positiv getestet.

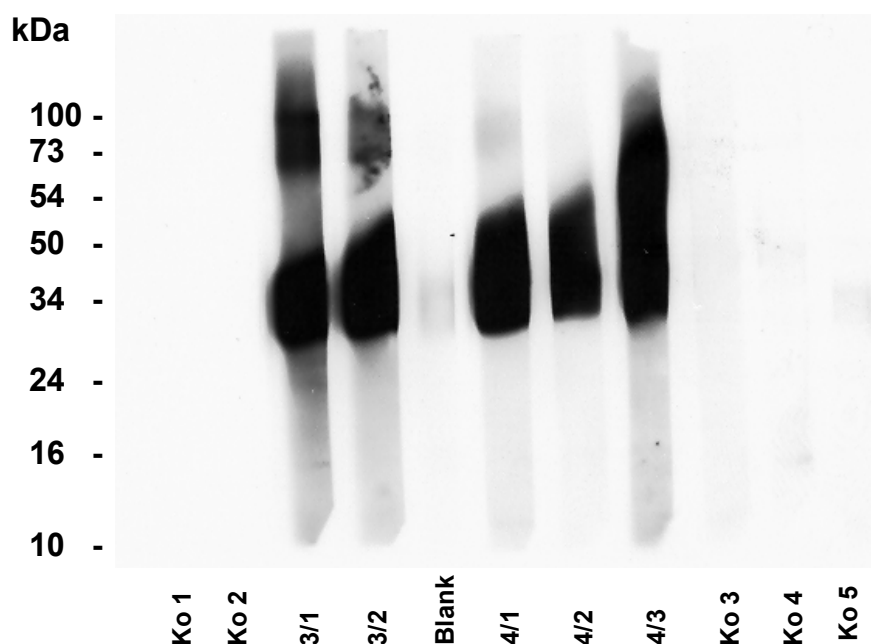


Abb. 10: Westernblotuntersuchung der Versuchsrattenserum auf Antikörper gegen mMDH
mMDH (30-35 kDa) ist bei allen Versuchstieren deutlich angefärbt. Die Kontrollen (bezeichnet durch Ko) sowie der Blank zeigen keine Reaktion auf mMDH.

4.3.1 Histopathologische Befunde in den Augen der Versuchsratten

Bei zehn von 14 mMDH immunisierten Ratten konnten pathologische Veränderungen in der Uvea von unterschiedlicher Schwere nachgewiesen werden. Keine Veränderungen traten bei den Kontrollratten auf. Sowohl bei den mMDH immunisierten Ratten als auch bei den Kontrollratten traten keinerlei Veränderungen in Gehirn, Milz, Pankreas und Leber auf. Bei drei Ratten wurde die mMDH Präparation vor der Immunisierung dialysiert, um Effekte von Chemikalien der mMDH Präparation auszuschließen. Diese Ratten sind durch ein D vor der Nummer gekennzeichnet. In den folgenden zwei Tabellen sind die Einzelbefunde sowie der Score für die Schwere der histologischen Veränderung der Kontrollratten sowie der Versuchsratten aufgeführt.

Nummer	Pathohistologischer Befund	Score
Ko 1	keine pathologischen Veränderungen	0
Ko 2	keine pathologischen Veränderungen	0
Ko 3	keine pathologischen Veränderungen	0
Ko 4	keine pathologischen Veränderungen	0
Ko 5	keine pathologischen Veränderungen	0
Gesamtscore		0

Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung der histologischen Befunde der Kontrollratten

Nummer	Pathohistologischer Befund	Score
Exp 1 / Rt 1	keine pathologischen Veränderungen	0
Exp 1 / Rt 2	keine pathologischen Veränderungen	0
Exp 1 / Rt 3	Zerstörung der retinalen Struktur unter kompletter Auflösung der Rezeptorzellschicht und der 2. Neuronschicht auf ein 1/11 der Retina im Schnittbereich	0,5
Exp2 / Rt 1	keine pathologischen Veränderungen	0
Exp2 / Rt 2	hochgradige Lymphozyteninfiltration im GK, vor allem um den Ziliarkörper, Neovaskularisation in der 2. und 3. Neuronschicht, dadurch Faltung der Retina	1
Exp2 / Rt 3	Fibrinablagerungen im GK, lymphozytäre Infiltrate entlang der Retina, des Ziliarkörpers und der Iris; geringgradige Strukturveränderungen in allen Schichten	1,5
Exp2 / Rt D1	in 2/7 der Retina im Schnittbereich Auflösung der Photorezeptorschicht und strukturelle Veränderung der inneren Körnerzellschicht (2. Neuron). Fibrinablagerungen im Glaskörper vor allem um den Ziliarkörper	3
Exp2 / Rt D2	geringgradige Faltung und Vaskularisation der Retina	0,5
Exp2 / Rt D3	eine fokale Läsion mit Auflösung der beiden Körnerzellschichten, sonst geringgradige strukturelle Unregelmäßigkeiten durch Neovaskularisation	1
Exp3 / Rt 1	starke Durchblutung der Retina, geringgradige Auffaltung in der äußeren Körnerschicht	0,5
Exp3 / Rt 2	¼ der Retina im Schnittbereich zerstört, Auflösung der Photorezeptorzellschicht, Verklebung mit der Choroidea in diesem Bereich, in der übrigen Retina viele Gefäße	4
Exp4 / Rt 1	Zerstörung der Photorezeptor- und der 2. Neuronschicht auf der Hälfte der Retina im Schnittbereich	4
Exp4 / Rt 2	geringgradige T-Zellinfiltration	0,5
Exp4 / Rt 3	keine pathologischen Veränderungen	0
Gesamtsscore		1,2

Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung der histologischen Befunde der mit mMDH immunisierten Ratten

4.3.2 Gesunde Retina

In Abb. 10 ist eine gesunde Rattenretina abgebildet und der Aufbau der Retina dargestellt. Die einzelnen Schichten stellen sich bei der gesunden Retina jeweils gleichmäßig und homogen dar. Die Dicke der Retina nimmt von dem Ziliarkörper zur Area centralis leicht, aber gleichmäßig zu.

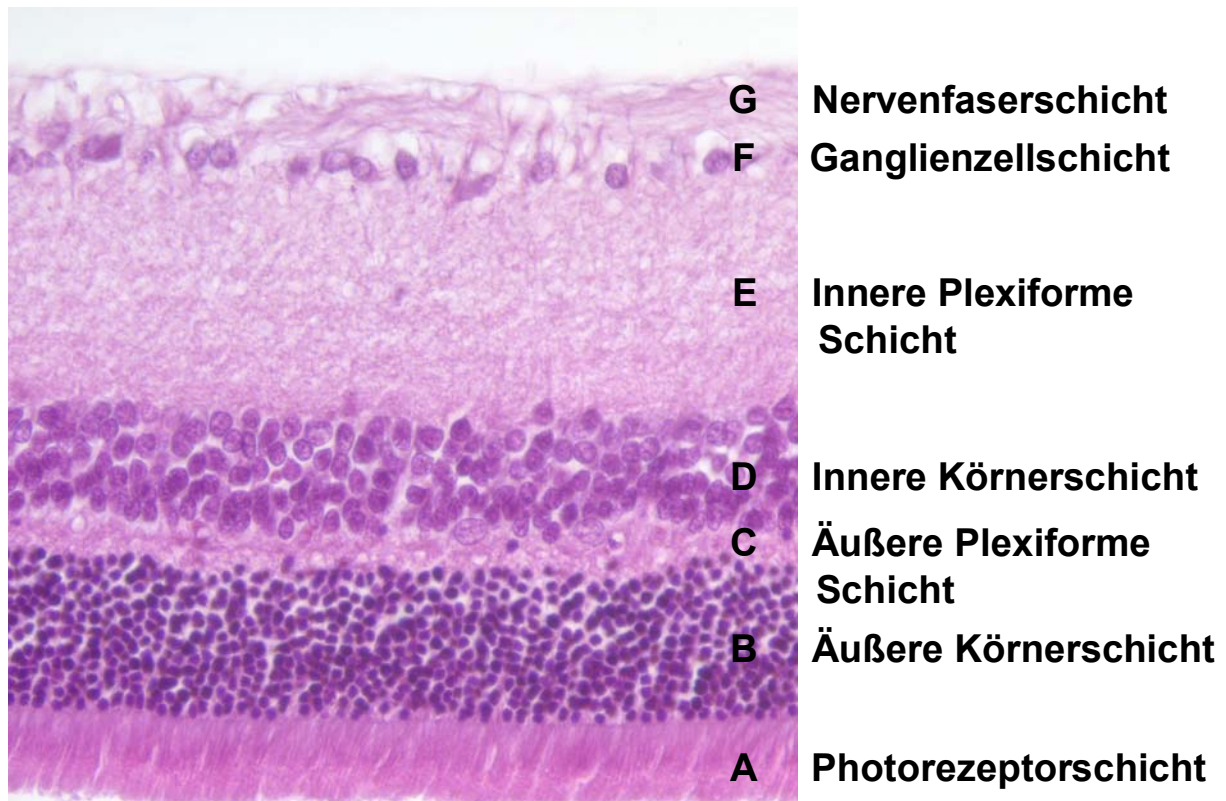


Abb. 11: gesunde Retina einer Ratte (HE, 40x) **A** Photorezeptorschicht; **B** Äußere Körnerschicht, bestehend aus den Zellkernen der Photorezeptorzellen; **C** Äußere Plexiforme Schicht, axonale Fortsätze der Photorezeptorzellen (I. Neuron); **D** Innere Körnerschicht, Zellkerne der bipolaren Nervenzellen (II. Neuron); **E** Innere Plexiforme Schicht, Axone der bipolaren Nervenzellen und dendritische Fortsätze der multipolaren Ganglienzellen; **F** Ganglienzellschicht, multipolare Ganglienzellen, III. Neuron; **G** Nervenfaserschicht, Neuriten der Ganglienzellen

4.3.3 Geringgradige Veränderung der Retina

Vier Ratten wiesen geringgradige histopathologische Veränderungen auf (Score 0,5). Bei den geringgradig veränderten Augen war eine Fältelung der Retina zu beobachten, die zumeist dadurch entstand, dass einzelne Schichten fokal verdickt oder verdünnt waren (Siehe Abb. 12). Diese Verdickungen einzelner Schichten traten oft um Blutgefäße herum auf, vor allem in der inneren plexiformen Schicht sowie in der Ganglienzellschicht. Auffällig war auch eine Zunahme der Zahl sowie der Dicke von Blutgefäßen. Diese Zunahme war gegenüber den Kontrollen bei 4 Ratten mit geringgradigen Veränderungen festzustellen. Anhand von Immunfärbungen mit anti-CD3 Antikörpern konnten vereinzelt T-Zellinfiltrationen nachgewiesen werden.

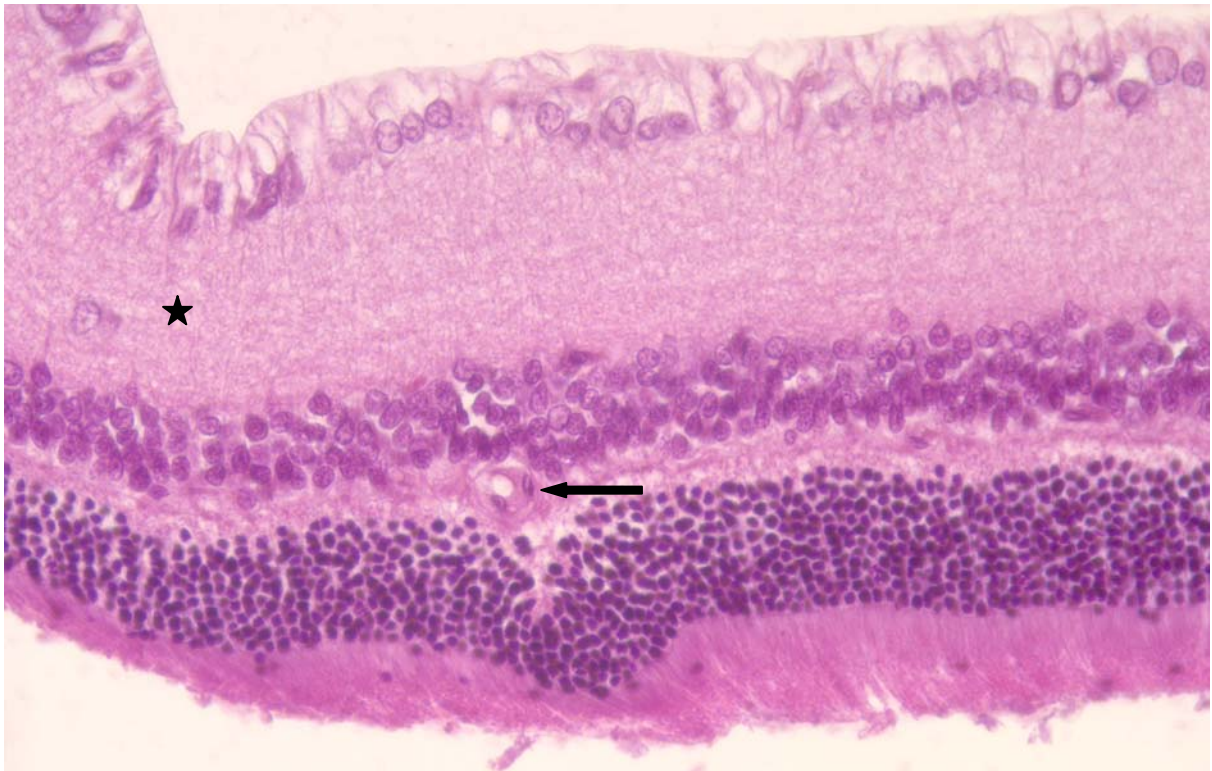


Abb. 12: geringgradige Veränderung der Retina (Exp1/Rt3, HE, 40x) In der Nähe eines Blutgefäßes (Pfeil) faltet sich die Photorezeptorzellschicht; links im Bild Faltung der gesamten Retina (Stern)

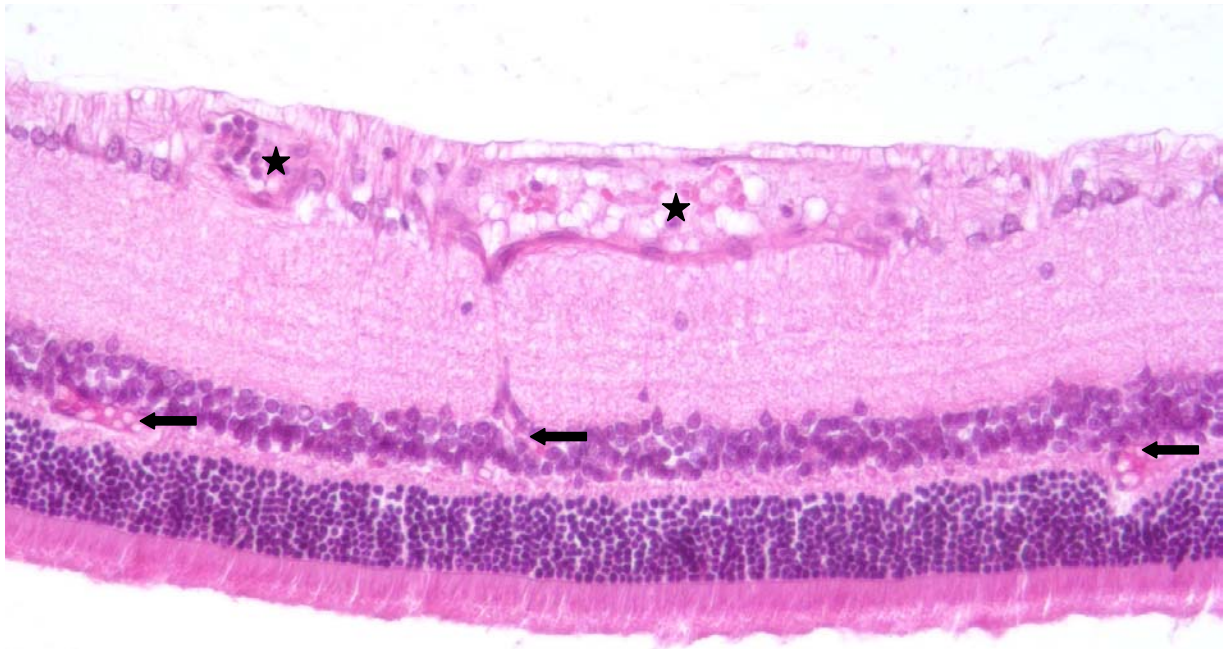


Abb. 13: Neovaskularisation der Retina (Exp3/Rt1, HE, 40x) Sterne: großes Blutgefäß in der Nervenfaserschicht; waagrechte Pfeile kleine Blutgefäße in der äußeren plexiformen Schicht

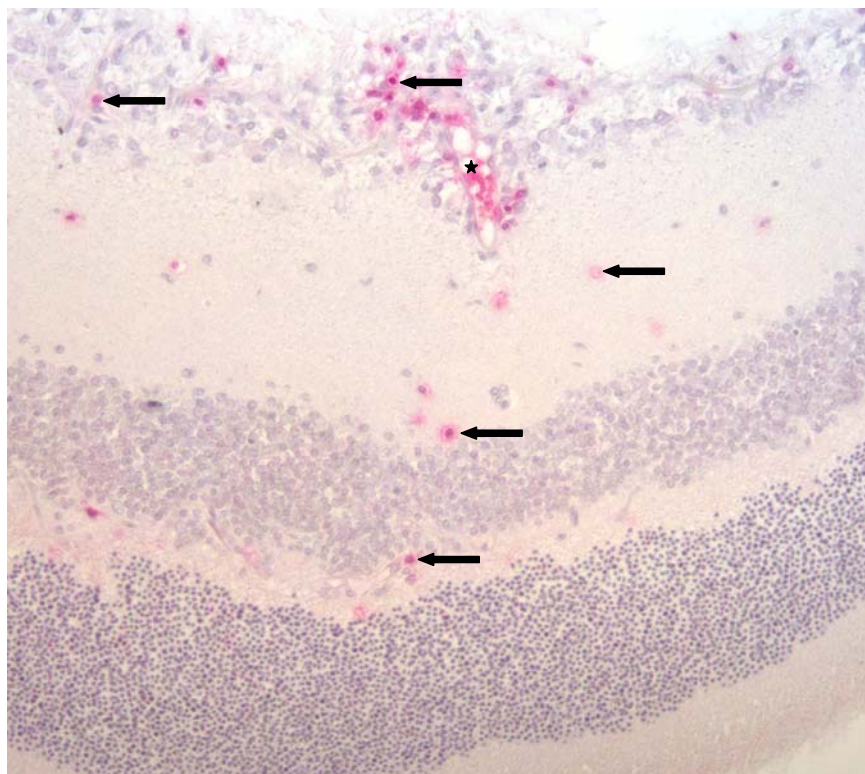


Abb. 14: Infiltration der Retina mit T-Zellen (Exp2/RT2, CD3-Färbung, 20x) Ausgehend von einem Blutgefäß (Stern) infiltrieren die T-Zellen (rot gefärbt, 5 Zellen exemplarisch durch Pfeile gekennzeichnet) die Retina.

4.3.4 Mittelgradige Veränderungen der Retina

Drei Ratten wiesen mittelgradige Veränderungen auf. Bei zwei dieser Ratten wurden die histopathologischen Veränderungen mit einem Score von 1, bei einer mit 1,5 bewertet. Bei zwei Ratten wurden hochgradige Infiltrationen mit CD3-positiven Zellen im Ziliarkörper beobachtet (Abb. 15). In dem den Ziliarkörper umgebenden Glaskörperbereich zeigte sich eine Infiltration von Zellen mit lymphozytärer Morphologie. Die Zellen im Glaskörper konnten mit Hilfe der CD3-Färbung überwiegend als T-Zellen identifiziert werden. Mehrere Ratten hatten Fibrinablagerungen im Glaskörper. Die T-Zellinfiltration in der Retina und der Choroidea zeigte sich teils fokal um Blutgefäße, teils diffus. Es zeigten sich fokale Läsionen, die zumeist mit einer Zerstörung der Photorezeptorfortsätze oder den ganzen Rezeptorzellen einhergehen. Auch hier war die Anzahl der Blutgefäße vermehrt (siehe Abb. 16).

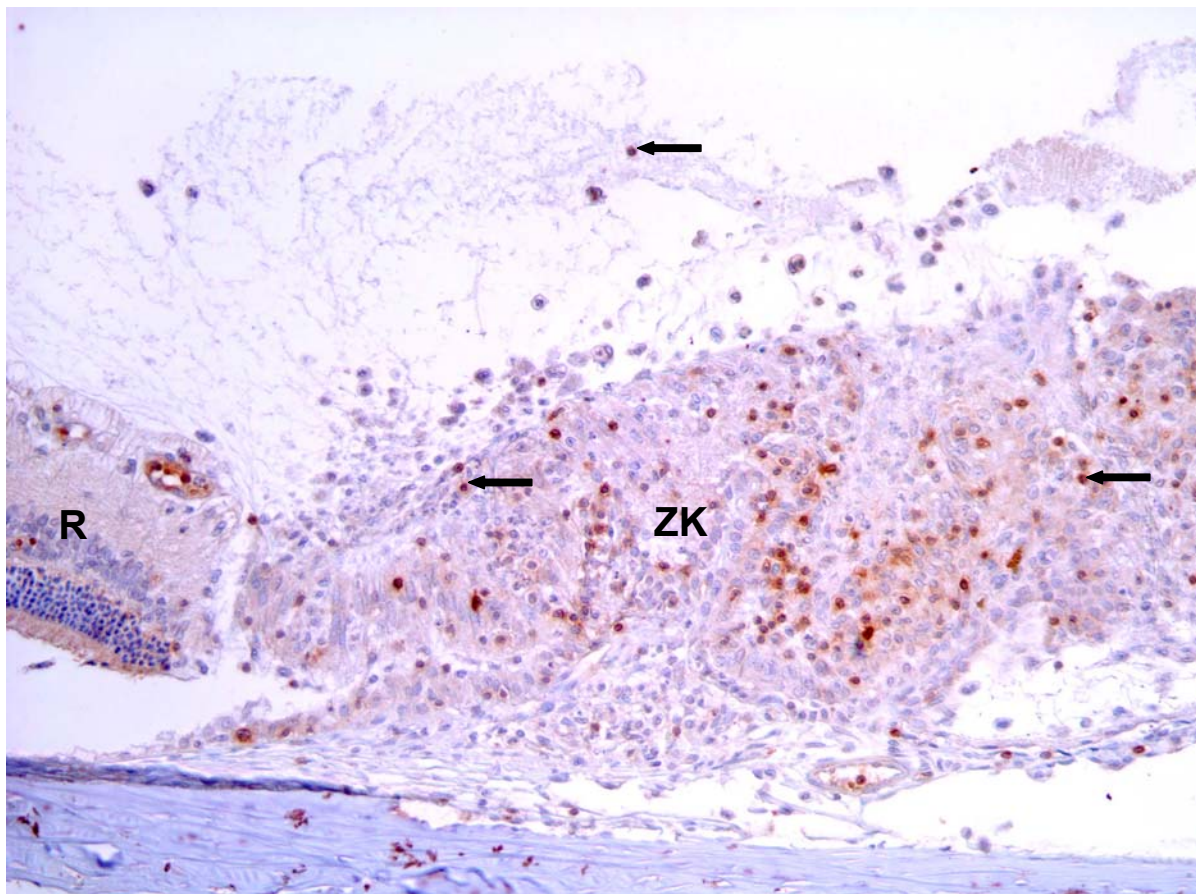


Abb. 15: Infiltration des Ziliarkörpers mit T-Zellen (Exp2/Rt2, CD3-Färbung, 20x) die T-Zellen (CD3⁺) sind braun gefärbt (einige durch Pfeile gekennzeichnet), R Retina, ZK Ziliarkörper

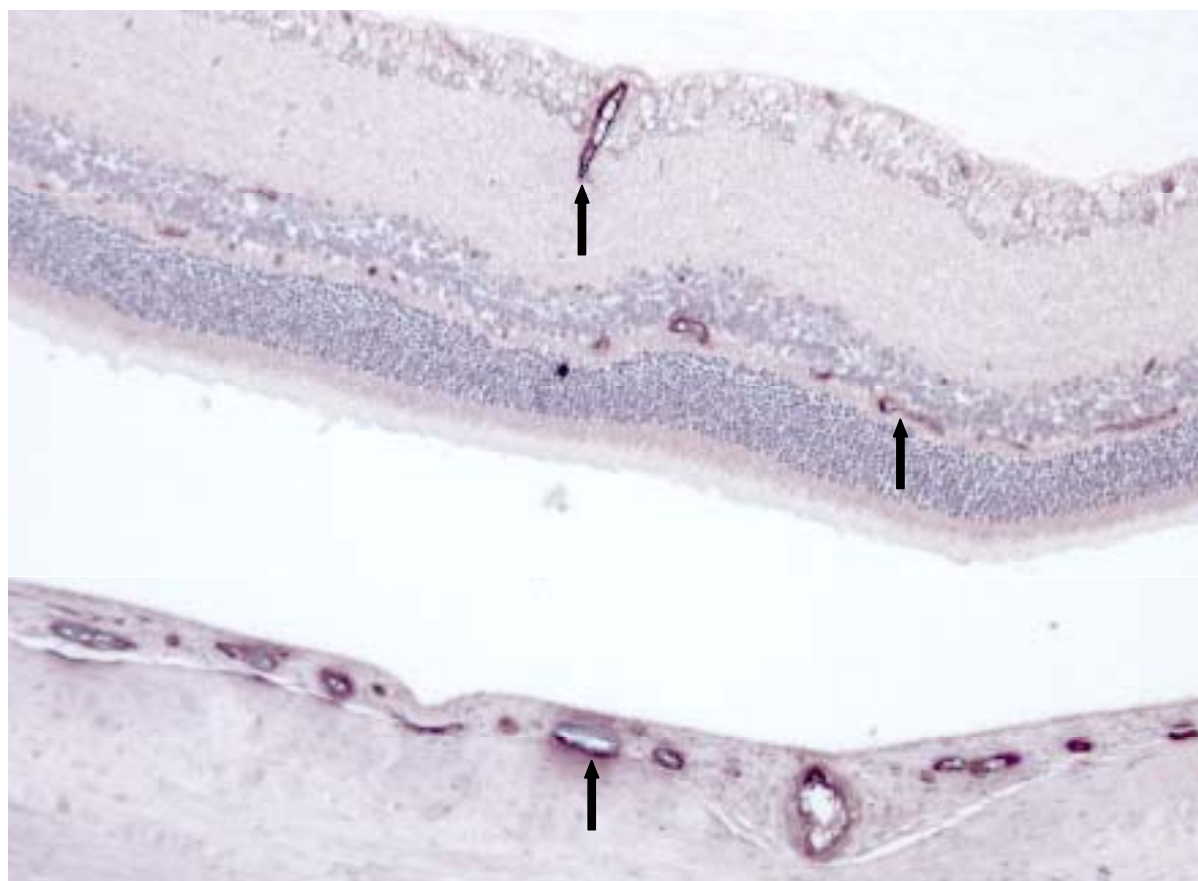


Abb. 16: Mittelgradig veränderte Retina (Exp3/Rt1, von Willebrand-Faktor-Färbung (vWF-Färbung) 20x) Die vWF-Färbung zeigt eine Vermehrung der Blutgefäße (Pfeile)

4.3.5 Hochgradige Veränderungen der Retina

Drei Ratten wiesen hochgradige Veränderungen auf. Sie wurden mit einem Score von drei oder höher beurteilt. Die Läsionen nahmen hier einen großen Bereich der Retina ein. Die Photorezeptorzellschicht wurde in den Läsionsbereichen komplett zerstört. Die innere Körnerzellschicht wurde ebenfalls an vielen Stellen zerstört. Auch hier konnten T-Lymphozyteninfiltrationen nachgewiesen werden. T-Zellen sind vor allem in der Nähe von Blutgefäßen (siehe Abb. 18), in der Choroidea und in dem Bereich, in dem die Zerstörung der Photorezeptorzellen vor sich geht (siehe Abb. 19), zu sehen.

Bei einigen Läsionen ist die Zone, in der die aktive Zerstörung der Photorezeptoren vor sich geht, klein. Bei anderen erstreckt sich dieser Bereich über ein großes Areal. In Arealen, in denen die Photorezeptorzellen komplett zerstört wurden, lässt die Infiltration mit CD3+ Zellen in der Retina nach (siehe Abb. 20).

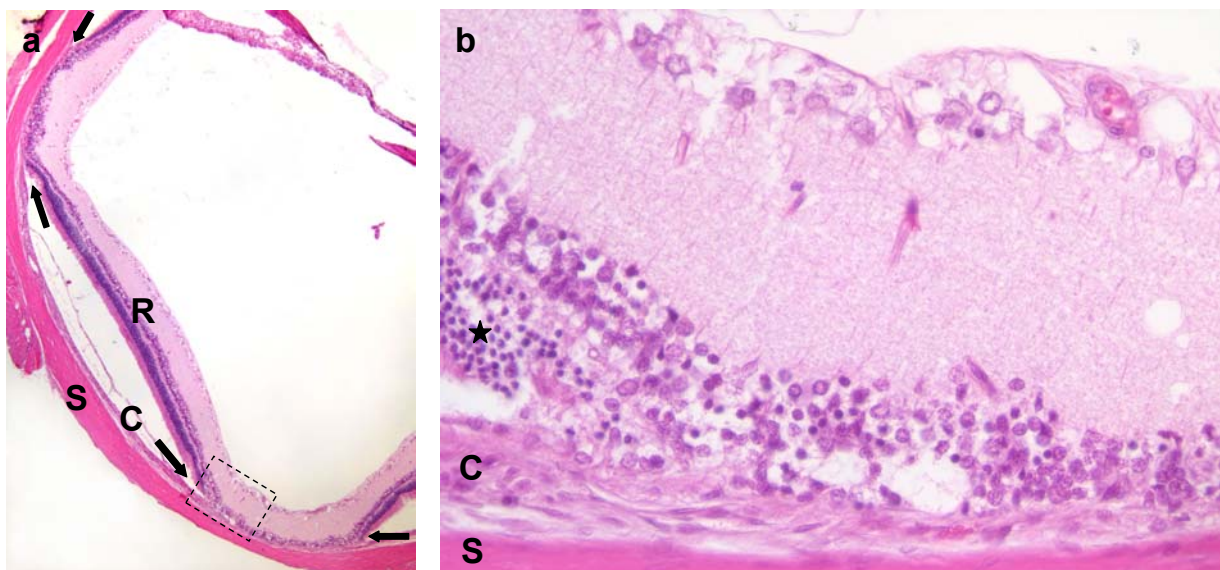


Abb. 17 a: Hochgradig verändertes Auge (Exp3/RtD2 HE, 5x) S Sklera, C Choroidea, R Retina; Zwischen den Pfeilspitzen liegt der veränderte Bereich; Das gestrichelte Rechteck umgrenzt den Bereich, der in Bild b vergrößert dargestellt ist.

b: Vergrößerung (40x) aus a Am Rand der Läsion sind noch Photorezeptorzellen (Stern) zu erkennen, in der Läsion wurden alle komplett zerstört. Die Struktur der inneren Körnerzellschicht ist deutlich verändert, die Retina mit der Choroidea (C) verklebt.

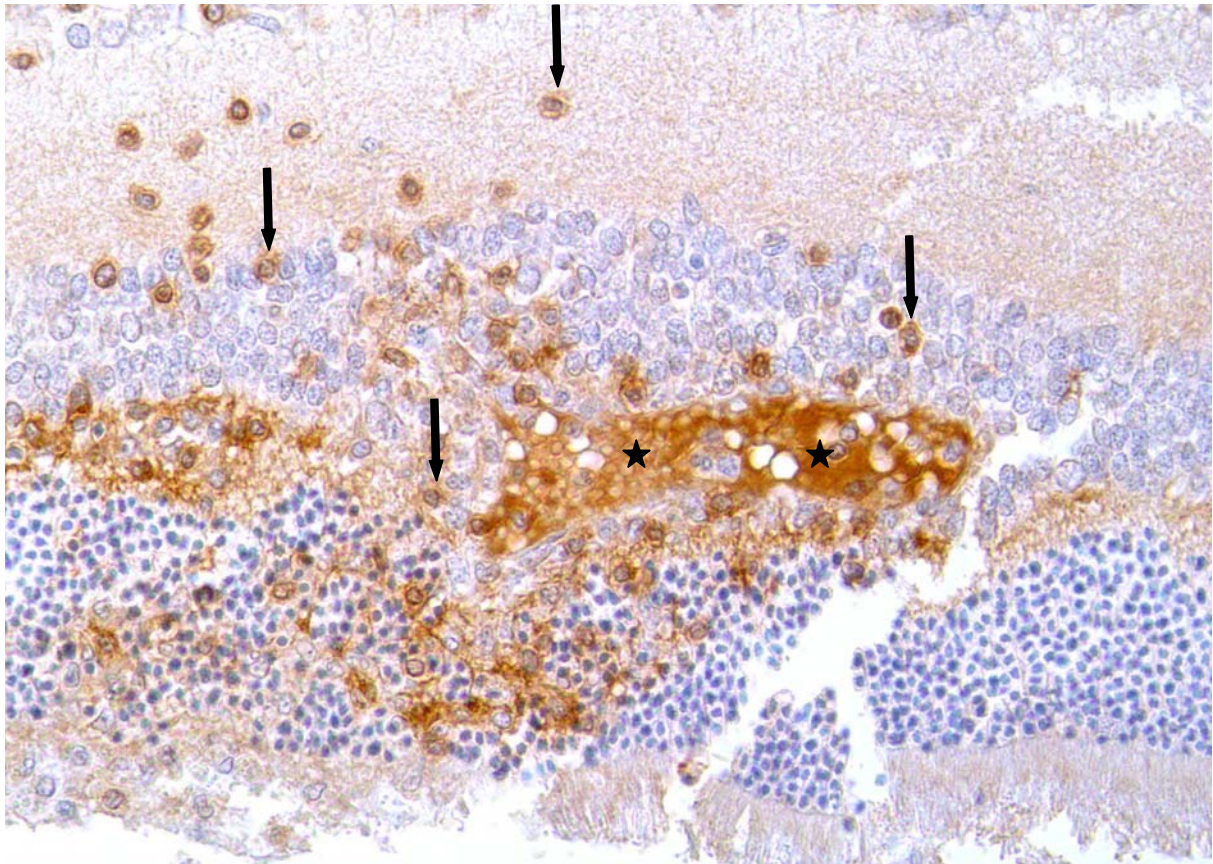


Abb. 18: T-Zellinfiltration um ein Blutgefäß (Exp3/Rt3, CD3-Färbung, 40x) Blutgefäß (Sterne) in einem Bereich mit hochgradiger Zerstörung (Pfeile kennzeichnen einige T-Zellen)

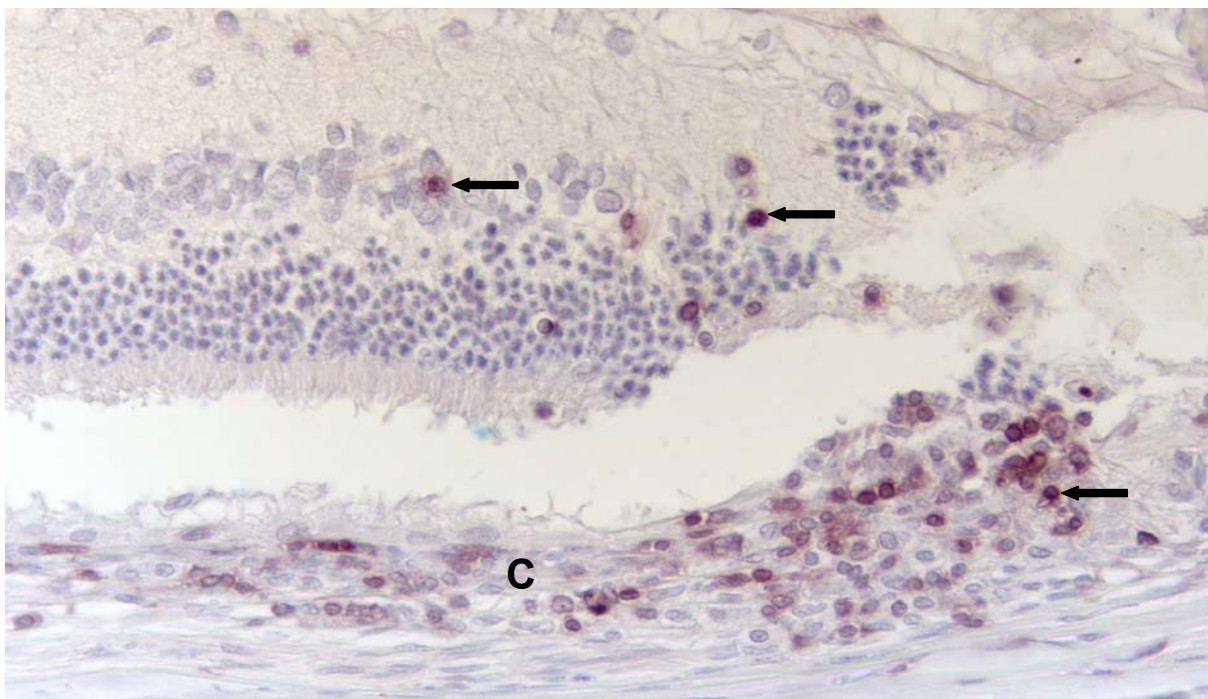
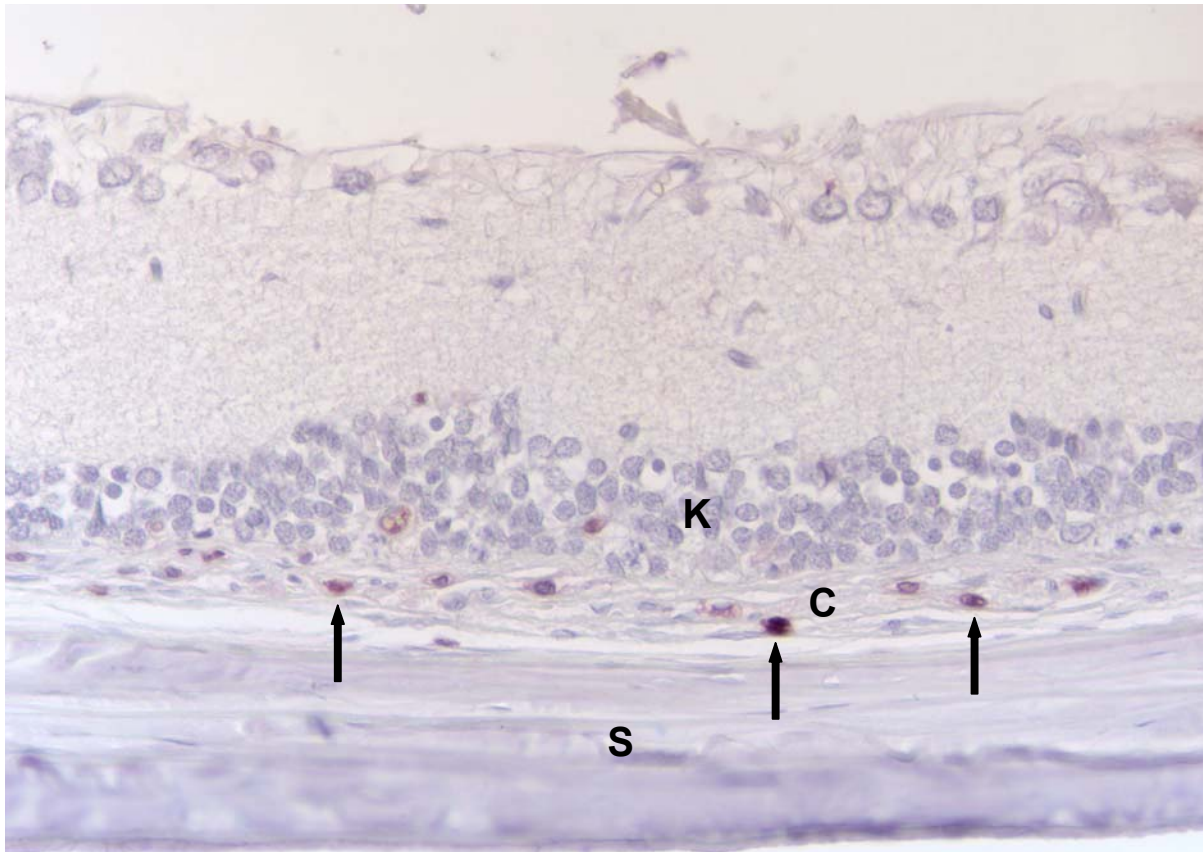


Abb. 19: T-Zellinfiltration in Choroidea und Photorezeptorzellschicht im Zerstörungsbereich (Exp4/Rt,1 CD3-Färbung, 40x) C Choroidea, einige T-Zellen durch Pfeile gekennzeichnet



*Abb. 20: Nachlassende T-Zellinfiltration nach Zerstörung der Photorezeptorschicht (CD3-Färbung 40x) T-Zellen (**Pfeile**) sind fast nur noch in der stark durchbluteten Choroidea (**C**) noch zu sehen; **K** Innere Körnerzellschicht schließt gleich an Choroidea an, Photorezeptorschicht fehlt komplett; **S** Sklera,*

Um die strukturellen Veränderungen der Retina darzustellen, wurden immunhistologische Färbungen auf Glutamin Synthetase (GS) sowie auf das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) durchgeführt. In der gesunden Retina ließen sich Müllerzellkörper und ihre Zellfortsätze durchgehend anfärben. Die Expression von GS nahm im Bereich von Läsionen deutlich ab (Abb. 21b und Abb. 22 b). Dagegen zeigte sich in der GFAP-Färbung in gesunder Retina lediglich eine Anfärbung der Müllerzellfüße und in veränderter Retina eine deutliche Zunahme der GFAP Expression in allen Schichten (Abb. 22b).

Eine Doppelfärbung von GFAP und GS bestätigte die Zunahme der Reaktivität für GFAP und die Abnahme der GS Expression in verändertem retinalem Gewebe (Abb. 22 a, b).

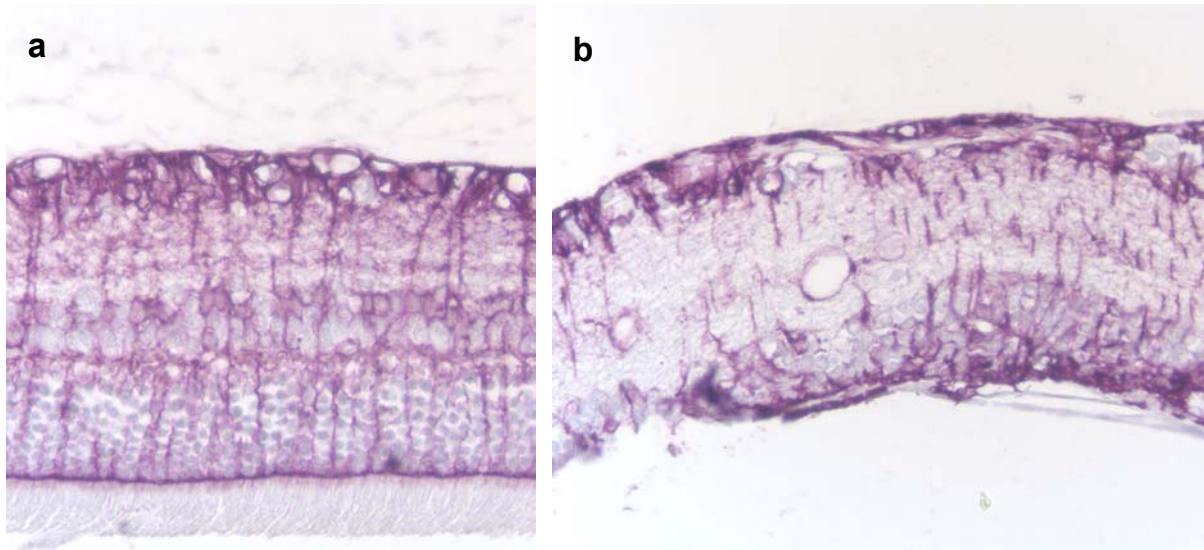


Abb. 21: a gesunde Retina b veränderte Retina in GS Färbung (Exp.4/Rt.1, 40x) Im veränderten Bereich (b) ist im Vergleich zum gesunden Bereich (a) deutlich eine Verminderung des angefärbten Gewebes zu sehen.

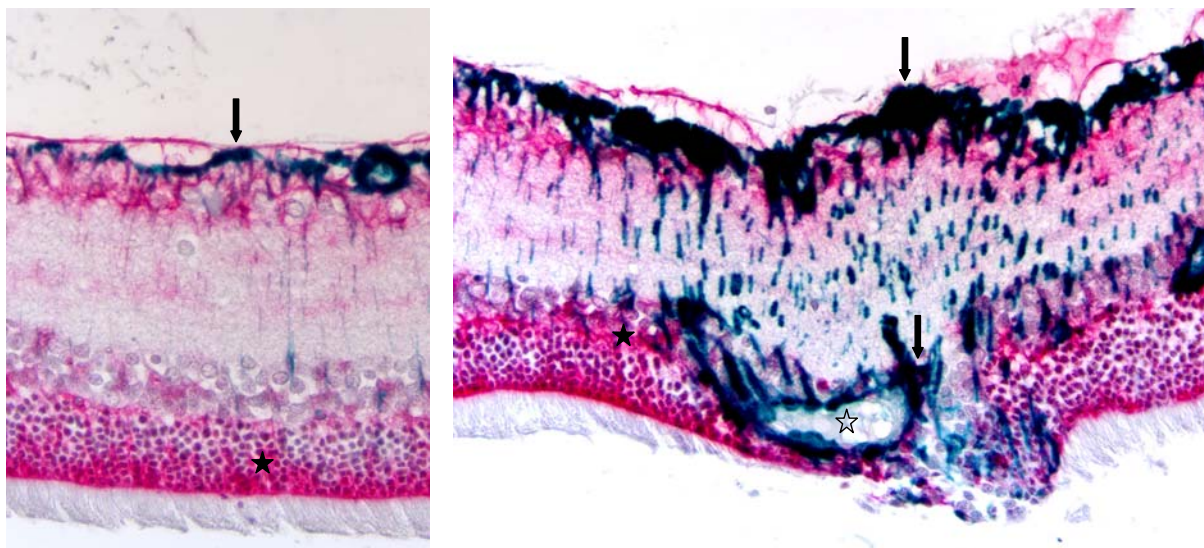


Abb. 22: a Gesunde Retina b Veränderte Retina GS-GFAP-Doppelfärbung (Exp.4/Rt.1, 40x) Pfeile zeigen GFAP gefärbte Stellen, schwarze Sterne zeigen GS gefärbten Bereich, transparenter Stern zeigt veränderten Bereich, der im Gegensatz zum gesunden Bereich nicht GS gefärbt ist.

5 Diskussion

ERU ist eine weit verbreitete Augenerkrankung bei Pferden. Sie verläuft schubweise und ist charakterisiert durch das Auftreten autoreaktiver T-Zellen im Auge (Deeg, Kaspers et al. 2001). Für IRBP, ein retinales Autoantigen, welches sowohl bei humanen Uveitiden als auch bei verschiedenen EAU-Modellen beschrieben wurde, ist eine Beteiligung an der ERU als Autoantigen bereits in früheren Studien nachgewiesen worden (Deeg, Thurau et al. 2002b). Neuere Untersuchungen identifizierten weitere retinale Proteine, gegen die im Serum von ERU-Patienten Autoantikörper nachgewiesen werden konnten. Eines dieser Proteine, die mMDH, ein in jeder Körperzelle vorkommendes Enzym, wird hier in dieser Arbeit genauer untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob es an der Pathogenese der ERU beteiligt ist und ob es als Autoantigen zu charakterisieren ist.

Dass Antikörper gegen körpereigene Proteine gebildet werden, ist nicht unbedingt pathologisch und ihr Vorhandensein muss nicht automatisch zu einer Autoimmunkrankheit führen. Der Immunologe Witebsky erstellte Definitionskriterien für Autoantigene, die er in drei Postulaten (Witebsky, Rose et al. 1957), welche bis heute Gültigkeit besitzen (Rose and Bona 1993), zusammenfasst.

Zum einen muss das Antigen bekannt sein. Dies war in diesem Fall bereits erfüllt. Eine Untersuchung der humoralen Immunantwort von ERU-Patienten auf Reaktivität gegen retinale Antigene identifizierte mMDH als potenzielles Autoantigen (Pompetzki 2003).

Zweitens müssen Antikörper und / oder eine zelluläre Immunreaktion gegen das körpereigene Antigen vorhanden sein. Drittens muss eine entsprechende Krankheit durch Immunisierung mit dem Antigen in einem Tiermodell auslösbar sein. Anhand dieser Postulate wurde bewertet, ob mMDH bei der ERU als Autoantigen angesehen werden kann.

Hierzu wurde zunächst die humorale Immunantwort von ERU Patienten im Vergleich zu augengesunden Kontrolltieren untersucht.

Auf der Ebene der Autoantikörper konnte kein quantitativer Unterschied zwischen ERU-Patienten und Kontrolltieren festgestellt werden. 6,1% (17 von 277) der Patienten wiesen Serumantikörper gegen mMDH auf. Von den augengesunden Kontrollpferden besaßen 6,5% (5 von 77) Antikörper gegen mMDH. Die Häufigkeit der Patienten mit Serumantikörpern gegen mMDH gleicht also der der Kontrolltiere.

Bei einigen Autoimmunkrankheiten ist nicht nur die Menge der Antikörper für die Pathogenese von Bedeutung, sondern auch deren Zusammensetzung aus verschiedenen IgG-Unterklassen.

So hängt die Pathogenität der Autoantikörper bei der Wegener-Klinger-Granulomatose des Menschen davon ab, wie viel Prozent der Autoantikörper der IgG3-Unterklasse angehören (Mulder, Stegeman et al. 1995) (siehe auch Abschnitt 2.10.2).

Um zu sehen, ob solch ein qualitativer Unterschied zwischen der Autoantikörperantwort der Patienten und der Kontrolltiere besteht, wurden die Antikörper gegen mMDH auf ihre IgG-Unterklassen untersucht.

Gegen IgG2 und IgG7, welche erst vor kurzem entdeckt wurden (Wagner, Miller et al. 2004), standen keine monoklonalen Antikörper zur Verfügung. Darüber hinaus stand zur Detektion von IgG3 und IgG5 nur ein Antikörper zur Verfügung, der beide Unterklassen bindet (Hier IgG3,5 genannt).

Sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen konnten nicht alle IgG-positiven Seren einer Unterklasse zugeordnet werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass IgG2 und IgG7 nicht untersucht werden konnten. Absolut eindeutige Ergebnisse, die eine belastbare Interpretation zulassen, gab es nicht. Interessant ist jedoch, dass in den Patientenserum nur IgG4 und IgG3,5 detektiert wurden, in der Kontrollpopulation dagegen jeder Subtyp mindestens einmal nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte IgG4 bei den Patienten (42%) häufiger detektiert werden als bei den Kontrollpferden (29%).

Allerdings ist die Zahl der untersuchten Seren zu gering, um gesicherte Aussagen zu treffen. Dies wäre als weiterführende Untersuchung interessant, besonders wenn in den nächsten Jahren mehr über die funktionellen Eigenschaften der einzelnen IgG-Unterklassen beim Pferd bekannt wird, und gegen alle Unterklassen Antikörper zur Verfügung stehen.

In den intraokulären Proben von 293 ERU-Patienten wurden bei 26 (9%) mMDH-Antikörper nachgewiesen, bei den 10 Proben von den augengesunden Tieren dagegen in keiner. Dies könnte auf eine lokale Antikörperproduktion im Auge hindeuten, wie sie beim Menschen vielfach beschrieben wurde (Meek, Speijer et al. 2003). Ebenfalls denkbar ist, dass es bei schweren Uveitiden zu einem Zusammenbruch der Kammerwasserschranke kommt, so dass Antikörper aus dem Serum ins Auge ge-

langen (Halliwell and Hines 1985; Deeg, Kaspers et al. 2001). Welche dieser beiden Theorien richtig ist, lässt sich anhand dieser Daten nicht beurteilen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die humorale Immunantwort auf mMDH keine eindeutigen Beweise für die Autoantigenität von mMDH liefert. Allerdings wird die ERU als T-Zell-medierte Krankheit angesehen. Bei humanen Uveitiden, die man ebenfalls als T-Zell-vermittelt charakterisierte, konnte man gegen die beiden retinalen Autoantigene IRBP und S-Ag ebenfalls keine unterschiedliche Antikörperantwort zwischen Patienten und Kontrollen feststellen (Doekes, van der Gaag et al. 1987; Forrester, Stott et al. 1989; Hoekzema, Hwan et al. 1990). Somit können die vorliegenden Daten auch nicht als Indiz dafür gewertet werden, dass mMDH kein Autoantigen ist.

Bei den meisten autoimmunen Erkrankungen, wie auch bei den autoimmunen Uveitiden, kommt den T-Zellen in der Pathogenese die entscheidende Rolle zu. Im EAU-Modell der Lewis Ratte konnte gezeigt werden, dass allein durch den adoptiven Transfer von T-Zellen, welche spezifisch gegen retinale Autoantigene reagierten, Uveitis von erkrankten Tieren in gesunde Empfängertiere übertragen werden konnte (Caspi, Roberge et al. 1986). Bei der ERU (Deeg, Kaspers et al. 2001), bei humanen Uveitiden (de Smet, Yamamoto et al. 1990) und bei den verschiedenen Tiermodellen (z.B. (Gery 1986a; Barton, Calder et al. 1993; Deeg, Thureau et al. 2002b) konnte nachgewiesen werden, dass T-Zellen retinale Autoantigene spezifisch erkennen.

Aus diesem Grund wurde die T-Zellantwort von ERU-Patienten gegen mMDH untersucht. Sieben von 14 (50%) ERU-Patienten wiesen Reaktivität mMDH-spezifischer T-Zellen auf, von den neun Kontrollen dagegen keine. Diese Befunde zeigen eindeutig, dass im Verlauf einer ERU eine spezifische T-Zellantwort gegen mMDH auftritt. Nach dem zweiten Witebskyschen Postulat muss entweder eine humorale oder eine zelluläre Immunreaktion oder beides gegen das Autoantigen festgestellt werden. Es konnte zwar keine eindeutige humorale, aber eine zelluläre Immunreaktion festgestellt werden. Das zweite Witebskysche Postulat ist somit erfüllt.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die T-Zellreaktivität gegen bekannte Autoantigene im Vergleich zu der gegen mMDH darstellt. Als Vergleichsautoantigene boten sich S-Ag und IRBP an. Sie sind die am Besten untersuchten und gelten als die immunogensten retinalen Autoantigene. Daher wurden S-Ag, einige Peptide von S-Ag und R14, ein Peptid von IRBP, ausgewählt.

Es reagierten mehr Patienten auf mMDH (7 Patienten) als auf S-Ag (5), PDSA_g (4) oder auf R14 (3). Auffällig war, dass kein Patient auf alle drei Antigene reagierte. (S-Ag und PDSA_g, ein Peptid von S-Ag, wurden hier als ein Antigen gezählt.)

Dies könnte ein Hinweis auf verschiedene Uveitis-Untergruppen sein, bei welchen jeweils T-Zell-Reaktivität gegen ein unterschiedliches Spektrum von Antigenen vorliegt.

Eine zweite Interpretation, welche plausibler erscheint, wäre die Annahme, dass hier Epitop-Spreading stattfindet.

Epitop-Spreading wurde bei der EAE, einem Tiermodell der Multiplen Sklerose entdeckt. Dabei verlagert sich die T-Zellreaktion gegen ein Epitop eines Autoantigens auf ein anderes Epitop, während gegen das erste Toleranz induziert wird. Toleranz bedeutet, dass das Immunsystem das Peptid nicht mehr als fremd ansieht, und die Immunreaktion dagegen einstellt. Die Krankheit zeigt einen schubweisen Verlauf, auf dem Höhepunkt der Immunreaktion gegen ein Epitop kommt es zu einer Verstärkung der Krankheitssymptome. Bei Toleranzinduktion und Überspringen der Immunantwort auf ein neues Epitop bessert sich die Krankheitsymptomatik vorübergehend, manchmal bis zur Beschwerdefreiheit (Tuohy, Yu et al. 1999).

Es wäre interessant zu sehen, ob der Anstieg der T-Zellreaktivität gegen mMDH (oder ein anderes Antigen) mit dem Krankheitsgeschehen korreliert. Darüber hinaus könnte man eventuell wichtige Erkenntnisse für eine Therapie gewinnen. Im EAE-Modell zeigte sich, dass das Epitop Spreading in einer genau feststehenden Reihenfolge vor sich geht. Dies wurde als „Epitope Spreading Cascade“ benannt (Tuohy, Yu et al. 1998). Interessant ist dabei auch, dass sich die Immunreaktion von einem Epitop eines Proteins auf ein anderes Protein verlagerte, um sich danach auf ein anderes Epitop des ersten Proteins zurückzuverlagern (Yu, Johnson et al. 1996a). Durch diese immer gleiche Reihenfolge war man in der Lage, durch gezielte Toleranzinduktion auf bestimmte Peptide die Spreading Kaskade an dieser Stelle zu beenden (Yu, Johnson et al. 1996a). Die Toleranz wurde durch Verfüttern des Peptids erreicht.

Dieses Epitop Spreading konnte auch in der MS des Menschen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich, dass das Spreading dort nicht in einer einheitlichen Reihenfolge stattfindet (Goebels, Hofstetter et al. 2000).

Im Rahmen des SFB 571 wird eine Langzeitstudie an mehreren Patienten durchgeführt. Hiervon sind zwei in dieser Doktorarbeit aufgeführt. Bei beiden Pferden stieg in

jedem Entzündungsschub die Reaktion gegen eines der untersuchten Antigene an, um in der schubfreien Zeit wieder abzufallen.

Beide Pferde hatten zu dem Zeitpunkt, als die höchste Aktivität gegen mMDH gemessen wurde, einen Uveitisschub. Pferd 11 wies gleichzeitig keine positive proliferative Aktivität gegen ein anders Autoantigen auf, Pferd 8 eine leicht positive gegen S-Ag. In der darauf folgenden Messung nach dem Uveitisschub konnte keine positive Aktivität gegen mMDH mehr gemessen werden. Dieses deutet darauf hin, dass der Entzündungsschub durch die T-Zellreaktion gegen mMDH verursacht wird. Allerdings könnte die T-Zellreaktion gegen mMDH auch sekundär bei der Entzündung entstehen, ohne direkt an der Pathogenese beteiligt zu sein, sozusagen als Bystander-Reaktion. Dass bei Pferd 8 die Reaktion gegen mMDH noch einmal anstieg, ohne dass ein Schub diagnostiziert werden konnte, könnte ein Indiz dafür sein.

Eine eindeutige Reihenfolge in der sich die Immunreaktion gegen die Antigene richtet, ist nicht zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der ERU auf jeden Fall eine T-Zellreaktivität gegen mMDH vorliegt und das zweite Witebskysche Postulat somit erfüllt ist. Um fundierte Aussagen zum Epitop Spreading im Zusammenhang mit der ERU machen zu können, sind aber noch weitere Ergebnisse der im Rahmen des SFB 571 laufenden Versuche notwendig.

Um das dritte Kriterium der Witebskyschen Postulate zu erfüllen, muss durch Immunisierung mit dem potenziellen Autoantigen entweder im Pferd selbst, oder in einem geeigneten Tiermodell die Krankheit auslösbar sein. Es wurde hier das Modell der Lewis-Ratte gewählt. Dieses Modell hat sich weltweit als das Standardmodell zur Untersuchung autoimmuner Krankheiten im Auge etabliert (Caspi 1994).

Um bewerten zu können, ob durch die Immunisierung mit mMDH eine Uveitis ausgelöst wurde, wurden die Ratten nach einem festgelegten Zeitraum getötet und die Augen histopathologisch untersucht. 71% (10 von 14) der mit mMDH immunisierten Ratten entwickelten nach den histopathologischen Befunden eine Uveitis. Bei den Kontrollen konnte dagegen bei keiner Ratte Uveitis nachgewiesen werden. Mitochondriale MDH ist also uveitogen, da durch eine Immunisierung mit demselben eine Uveitis auslösbar ist. Damit ist auch klar, dass die T-Zellreaktion gegen mMDH keine Bystander-Reaktion ist, sondern ein kausaler Bestandteil der Pathogenese.

Obwohl mMDH ein ubiquitäres Protein ist, welches in jeder Körperzelle vorkommt, zeigten sich nur Veränderungen im Auge. Die untersuchten Kontrollorgane Gehirn, Pankreas, Milz und Leber waren ohne besonderen Befund. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Zerstörung der Retina in der Photorezeptorschicht begann, die Schicht, in der in einer Untersuchung am Meerschwein, auch die höchste Konzentration von mMDH in der Retina gefunden wurde (Ross and Godfrey 1987). Eine Autoimmunreaktion gegen ein ubiquitär vorkommendes Protein führt nicht automatisch zu einer generalisierten Krankheit.

Ein Beispiel hierfür findet sich bei einem Mausmodell zur rheumatoiden Arthritis. In der K/BxN Maus entstehen pathogene Antikörper gegen das Enzym Glucose-6-Phosphat Isomerase (GPI) (Matsumoto, Maccioni et al. 2002). Obwohl GPI im Zytoplasma aller Körperzellen vorkommt, tritt eine Immunreaktion nur in den Gelenken auf. Die Antikörper gegen GPI sind das pathogene Agens. Überträgt man die Antikörper in gesunde Empfängertiere lösen diese allein die Krankheit aus (Matsumoto, Maccioni et al. 2002). Dass eine Immunreaktion spezifisch im Gelenk stattfindet, erklären sich die Autoren folgendermaßen:

Die GPI wird wahrscheinlich nicht in den Gelenken gebildet, sondern diffundiert wohl aus dem Blut dort hinein. Sie konnte auf den Oberflächen des Knorpels nachgewiesen werden, wo sie wahrscheinlich durch unspezifische Bindungen an Proteoglykane fixiert wird.

Die Auslösung der Arthritis in diesem Mausmodell ist abhängig von der Aktivierung des alternativen Komplementweges durch die anti GPI-Autoantikörper (Ji, Ohmura et al. 2002). Im Gegensatz zu anderen Geweben wie zum Beispiel den Nieren Glomerula, an die GPI ebenfalls bindet, ist im Gelenk die Kontrolle der alternativen Komplementaktivierung durch Inaktivatoren kaum vorhanden (Fearon 1978; Meri and Pangburn 1990). So wird die Komplementreaktion in anderen Geweben weitgehend verhindert, nicht aber in den Gelenken. Als Indiz dafür konnte gezeigt werden, dass die Autoantikörper-GPI-Komplexe in den Gelenken mit der Komplement Komponente C3 assoziiert sind, nicht aber in der Niere oder anderen Geweben. Die nahezu ungehemmt ablaufende Komplementkaskade zerstört die Knorpelzellen, aktiviert die Immunzellen und führt so zur Arthritis. IgG1, welches an der Auslösung des alternativen Komplementweges beteiligt ist, stellt hier die vorherrschende Unterklasse dar (Kouskoff, Korganow et al. 1996; Maccioni, Zeder-Lutz et al. 2002). IgG3 und IgG2a die vor allem den klassischen Komplementweg auslösen und in diesem Zusammen-

hang Nephritiden verursachen können (Takahashi, Itoh et al. 1993; Gonzalez and Waxman 2000), sind in geringeren Mengen vorhanden.

Die Autoren machten außerdem die Beobachtung, dass bei fortschreitender Zerstörung des Knorpels mehr GPI an dessen Oberfläche bindet, was wiederum zur Akkumulation von Antikörpern führt und den Entzündungsprozess verstärkt. Die Autoren mutmaßen, dass durch die Zerstörung der Knorpeloberfläche vermehrt Proteoglykane freigelegt werden, an welche wiederum mehr GPI unspezifisch binden kann.

Dass bei ERU genau derselbe Mechanismus vorliegt, ist nicht anzunehmen, da die hier ermittelten Daten gegen ein Antikörper induziertes Geschehen sprechen, wie es bei dem Mausmodell zur rheumatoiden Arthritis der Fall ist. Dennoch zeigt dieses Beispiel dass in speziellen Geweben ein spezifischer Pathomechanismus auftreten kann, so dass eine Immunreaktion gegen ein ubiquitäres Enzym nur ein lokales Krankheitsgeschehen auslöst.

Das Auge ist ebenfalls ein spezielles Gewebe, es ist ein so genannter immunprivilegiertes Ort. Das heißt, es steht mit dem Immunsystem des restlichen Körpers nur bedingt im Kontakt, getrennt durch die Blut-Retina-Schranke, welche im physiologischen Zustand nicht aktivierte Zellen des Immunsystems weitgehend vom Auge fernhält. So können unter normalen Bedingungen im Auge kaum T- und B-Zellen und keine Granulozyten nachgewiesen werden (Wakefield, McCluskey et al. 1992; Yang, Das et al. 2000). Lediglich dendritische Zellen passieren in größerer Anzahl die Blut-Retina-Schranke (Stephens, Holt et al. 1995). Auch liegt im gesunden Auge ein augenspezifisches immunsuppressives Milieu vor, welches vor allem die zelluläre Immunantwort unterdrückt (Meek, Speijer et al. 2003). So wäre es nicht verwunderlich, wenn im Auge, wie im Gelenk der K/BxN Maus, ein organspezifischer Pathomechanismus vorliegt, während im restlichen Gewebe keine Schädigung auftritt.

Wie genau die Uveitis ausgelöst wird, ist sowohl bei der ERU, als auch der EAU sowie bei den verschiedenen Humanuveitiden nicht geklärt. Die alte Vorstellung, dass das Immunsystem mit retinalen Antigenen nicht in Kontakt kommt und wenn doch diese dann als fremd ansieht und eine Immunreaktion startet, stimmt nicht und ist heute überholt. Dendritische Zellen wandern aus dem Auge zur Milz und präsentieren dort die okulären Antigene (Streilein 1997). Da sie aber durch das immunsuppressive Milieu des Auges geprägt wurden (Cousins, McCabe et al. 1991) induzieren sie die Produktion von CD8-Supressorzellen (Bando, Ksander et al. 1991). Die Präsen-

tation der okulären Antigene durch die dendritischen Zellen induziert also Toleranz, und keine Immunreaktion.

Andererseits ist es nicht ungewöhnlich, dass Antikörper und / oder T-Zellreaktivität gegen ein körpereigenes Protein vorliegt, ohne dass dies eine Autoimmunkrankheit zur Folge hätte.

Es ist die Intensität der Immunreaktion, beziehungsweise die Effektivität der Immunexpression, die den Unterschied zwischen pathologisch und physiologisch ausmacht (Bieganowska, Ausubel et al. 1997). Wird durch eine Autoimmunreaktion eine gewisse Anzahl von Effektorzellen in das Auge rekrutiert, so wandelt sich das antiinflammatorische Milieu durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus diesen Zellen in ein proinflammatorisches Milieu (de Smet and Chan 2001b). In diesem Zusammenhang könnte im Auge eine Immunreaktion gegen mMDH ablaufen, während im restlichen Körper die Immunreaktion gegen dieses Enzym auf einem physiologischen Niveau gehalten wird.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass alle drei Witebskyschen Postulate erfüllt wurden, mMDH also ein Autoantigen ist und als solches eine Rolle in der Pathogenese der ERU spielt. Eine interessante weiterführende Untersuchung wäre, durch Immunisierung eines Pferdes Uveitis auszulösen und diese klinisch sowie immunologisch mit ERU zu vergleichen.

6 Zusammenfassung

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine weit verbreitete Augenerkrankung, die weltweit die Hauptursache für das Erblinden von Pferden darstellt. Vorausgehende Untersuchungen wiesen darauf hin, dass das Enzym mitochondriale Malat-Dehydrogenase (mMDH) als Autoantigen an der ERU beteiligt ist. Ziel der Arbeit war es, die Beteiligung von mMDH an der ERU zu untersuchen und die Hypothese zu prüfen, dass mMDH als Autoantigen definiert werden kann.

Als Definitionskriterien für ein Autoantigen dienten die Witebskyschen Postulate. Diese besagen, dass erstens das Antigen bekannt sein muss, zweitens sich eine humorale und / oder zelluläre Immunreaktion gegen das Antigen nachweisen lassen muss, und drittens eine entsprechende Krankheit in einem Tiermodell durch Immunisierung mit dem Antigen zu induzieren ist, um das Antigen als Autoantigen definieren zu können.

Da mMDH schon in vorausgegangenen proteomischen Untersuchungen als potentielles Autoantigen identifiziert werden konnte, war das erste Kriterium bereits erfüllt.

Die Untersuchung der humoralen Immunantwort gegen mMDH bei ERU-Patienten erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten und augengesunden Kontrollpferden.

Eine spezifische T-Zellantwort auf mMDH ließ sich dagegen bei 43% der Patienten nachweisen, nicht jedoch bei Kontrolltieren. Mehr Patienten reagierten auf mMDH als auf ein anderes der getesteten retinalen Autoantigene. Eine Langzeituntersuchung an zwei Pferden zeigte, dass T-Zellreaktivität gegen ein einzelnes retinales Autoantigen nur einen begrenzten Zeitraum vorhanden ist. Diese Untersuchungen ließen vermuten, dass T-Zellreaktivität gegen mMDH im zeitlichen Zusammenhang mit Entzündungsschüben auftritt.

Um mMDH auf das dritte Postulat zu prüfen, wurden Lewis-Ratten mit dem Enzym subkutan immunisiert. Die Lewis Ratte ist ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung autoimmuner Uveitiden. Histologische Untersuchungen 30 Tage nach der Immunisierung ergaben, dass zehn von 14 Ratten (71%) Uveitis entwickelten, von den sechs Kontrollratten dagegen zeigte keine Anzeichen der Krankheit.

Die drei Witebskyschen Postulate konnten alle erfüllt werden, somit kann mMDH als ein Autoantigen mit einer Beteiligung an der Pathogenese der ERU angesehen werden.

7 Summary

Characterisation of the autoantigen “mitochondrial malate dehydrogenase” in the equine recurrent Uveitis

Equine Recurrent Uveitis (ERU) is a wide spread disease of the eye, which is the main cause for blindness in horses worldwide. Previous studies indicated that the enzyme mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) is involved in ERU-pathophysiology as an autoantigen. The purpose of this thesis was to investigate the role of mMDH in ERU and to proof the hypothesis, that mMDH can be defined as an autoantigen. Whitesky's postulates were taken as criteria for the definition of an autoantigen. Accordingly the respective antigen has to be known, a humoral and / or cellular immunoreaction against this antigen has to be shown and finally an equivalent disease has to be induced in an animal model by immunization.

As mMDH was previously identified by proteomic studies as a potential autoantigen, the first of the postulates was already met prior to this investigation.

Investigation of the humoral immunoreaction against mMDH did not show an evidential difference between ERU-patients and control horses with healthy eyes.

In contrast, a specific T-cell reaction against mMDH, was shown in 43% of the patients, but in none of the control horses. More patients showed reactivity against mMDH than to any other of the tested retinal autoantigens. A long-term study including two horses showed that T-cell reactivity against a single retinal autoantigen can only be observed during a limited period of time. This study led to the assumption that T-cell reactivity against mMDH occurs in connection with phases of inflammation.

In order to investigate if mMDH would also met the third criterion of Witebsky's Postulates, Lewis rats were subcutaneously immunized with the enzyme. The Lewis rat is an established animal model for the research of autoimmune Uveitis. Histological analysis of the eyes 30 days after immunisation revealed that ten out of 14 rats (71%), developed uveitis, whereas non of the six control rats showed signals of the disease.

The three Witebsky Postulates were all met, so the hypothesis that mMDH is an autoantigen which plays a role in the pathogenesis of ERU could be confirmed.

8 Literaturverzeichnis

Arbuckle, M. R., M. T. McClain, et al. (2003). "Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus." N Engl J Med **349**(16): 1526-33.

Bando, Y., B. R. Ksander, et al. (1991). "Characterization of specific T helper cell activity in mice bearing alloantigenic tumors in the anterior chamber of the eye." Eur J Immunol **21**(8): 1923-31.

Barton, K., V. L. Calder, et al. (1993). "Isolation of retinal lymphocytes in experimental autoimmune uveoretinitis: phenotypic and functional characterization." Immunology **78**(3): 393-8.

Bieganowska, K. D., L. J. Ausubel, et al. (1997). "Direct ex vivo analysis of activated, Fas-sensitive autoreactive T cells in human autoimmune disease." J Exp Med **185**(9): 1585-94.

Caspi, R. R. (1994). Experimental Autoimmune Uveoretinitis - Rat and Mouse in: Autoimmune Disease Models: A Guidebook. I. COHEN and A. MILLER, Academic Press: 57-81.

Caspi, R. R., C. C. Chan, et al. (1993). "Recruitment of antigen-nonspecific cells plays a pivotal role in the pathogenesis of a T cell-mediated organ-specific autoimmune disease, experimental autoimmune uveoretinitis." J Neuroimmunol **47**(2): 177-88.

Caspi, R. R., F. G. Roberge, et al. (1988). "A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens." J Immunol **140**(5): 1490-5.

Caspi, R. R., F. G. Roberge, et al. (1986). "T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat." J Immunol **136**(3): 928-33.

Cousins, S. W., M. M. McCabe, et al. (1991). "Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(8): 2201-11.

de Smet, M. D., G. Bitar, et al. (2001a). "Human S-antigen determinant recognition in uveitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(13): 3233-8.

de Smet, M. D. and C. C. Chan (2001b). "Regulation of ocular inflammation--what experimental and human studies have taught us." Prog Retin Eye Res **20**(6): 761-97.

de Smet, M. D., J. H. Yamamoto, et al. (1990). "Cellular immune responses of patients with uveitis to retinal antigens and their fragments." Am J Ophthalmol **110**(2): 135-42.

Deeg, C. A., M. Ehrenhofer, et al. (2002a). "Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses." Exp Eye Res **75**(2): 127-33.

- Deeg, C. A., B. Kaspers, et al. (2001). "Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(2): 393-8.
- Deeg, C. A., S. Reese, et al. (2004). "The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(7): 2286-92.
- Deeg, C. A., S. R. Thurau, et al. (2002b). "Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease." Eur J Immunol **32**(9): 2598-606.
- Deschenes, J., D. H. Char, et al. (1988). "Activated T lymphocytes in uveitis." Br J Ophthalmol **72**(2): 83-7.
- Doekes, G., R. van der Gaag, et al. (1987). "Humoral and cellular immune responsiveness to human S-antigen in uveitis." Curr Eye Res **6**(7): 909-19.
- Dueymes, M., J. Barrier, et al. (1993). "Relationship of interleukin-4 to isotypic distribution of anti-double-stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus." Int Arch Allergy Immunol **101**(4): 408-15.
- Eisenfeld, A. J., A. H. Bunt-Milam, et al. (1987). "Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein." Exp Eye Res **44**(3): 425-38.
- Erhard, M. H., I. Von Quistorp, et al. (1992). "Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulins G, M, and A using monoclonal antibodies." Poult Sci **71**(2): 302-10.
- Faure, J. P., M. Mirshahi, et al. (1984). "Production and specificity of monoclonal antibodies to retinal S antigen." Curr Eye Res **3**(6): 867-72.
- Fearon, D. T. (1978). "Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(4): 1971-5.
- Forrester, J. V., D. I. Stott, et al. (1989). "Naturally occurring antibodies to bovine and human retinal S antigen: a comparison between uveitis patients and healthy volunteers." Br J Ophthalmol **73**(2): 155-9.
- Gerhards, H. and B. Wollanke (2001). "Uveitis bei Pferden - Diagnose und Therapie." Pferdeheilkunde **17**: 319-329.
- Gery, I. (1986a). "Retinal Specific Antigenes and Immunopathogenic Processes They Provoke." Progress in Retinal Research **5**: 75-108.
- Gery, I., B. Wiggert, et al. (1986b). "Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein." Invest Ophthalmol Vis Sci **27**(8): 1296-300.

Gilger, B. C., E. Malok, et al. (1999). "Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis." Vet Immunol Immunopathol **71**(1): 17-28.

Goebels, N., H. Hofstetter, et al. (2000). "Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence." Brain **123 Pt 3**: 508-18.

Gonzalez, M. L. and F. J. Waxman (2000). "Glomerular deposition of immune complexes made with IgG2a monoclonal antibodies." J Immunol **164**(2): 1071-7.

Grant, P. M., S. L. Roderick, et al. (1987). "Comparison of the precursor and mature forms of rat heart mitochondrial malate dehydrogenase." Biochemistry **26**(1): 128-34.

Gregerson, D. S., S. P. Fling, et al. (1989). "Identification of T cell recognition sites in S-antigen: dissociation of proliferative and pathogenic sites." Cell Immunol **123**(2): 427-40.

Halliwell, R. E. and M. T. Hines (1985). "Studies on equine recurrent uveitis. I: Levels of immunoglobulin and albumin in the aqueous humor of horses with and without intraocular disease." Curr Eye Res **4**(10): 1023-31.

Hauck, S. M., S. Suppmann, et al. (2003). "Proteomic profiling of primary retinal Muller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions." Glia **44**(3): 251-63.

Hirose, S., T. Kuwabara, et al. (1986). "Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein." Arch Ophthalmol **104**(11): 1698-702.

Hoekzema, R., S. B. Hwan, et al. (1990). "Serum antibody response to human and bovine IRBP in uveitis." Curr Eye Res **9**(12): 1177-83.

Horwich, A. L., F. Kalousek, et al. (1985). "A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein." Embo J **4**(5): 1129-35.

Hurt, E. C., U. Muller, et al. (1985). "The first twelve amino acids of a yeast mitochondrial outer membrane protein can direct a nuclear-coded cytochrome oxidase subunit to the mitochondrial inner membrane." Embo J **4**(13A): 3509-18.

Janeway, C. A. (2002a). Immunologie. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Janeway, C. A. (2002b). Immunologie. Berlin, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Jefferis, R. and D. S. Kumararatne (1990). "Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance." Clin Exp Immunol **81**(3): 357-67.

Ji, H., K. Ohmura, et al. (2002). "Arthritis critically dependent on innate immune system players." Immunity **16**(2): 157-68.

- Joh, T., H. Takeshima, et al. (1987a). "Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding mammalian cytosolic malate dehydrogenase. Comparison of the amino acid sequences of mammalian and bacterial malate dehydrogenase." J Biol Chem **262**(31): 15127-31.
- Joh, T., H. Takeshima, et al. (1987b). "Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding mammalian mitochondrial malate dehydrogenase." Biochemistry **26**(9): 2515-20.
- Kalsow, C. M. and A. E. Dwyer (1998). "Retinal immunopathology in horses with uveitis." Ocul Immunol Inflamm **6**(4): 239-51.
- Kalsow, C. M. and W. B. Wacker (1973). "Localization of a uveitogenic soluble retinal antigen in the normal guinea pig eye by an indirect fluorescent antibody technique." Int Arch Allergy Appl Immunol **44**(1): 11-20.
- Kalsow, C. M. and W. B. Wacker (1977). "Pineal reactivity of anti-retina sera." Invest Ophthalmol Vis Sci **16**(2): 181-4.
- Kalsow, C. M. and W. B. Wacker (1978). "Pineal gland involvement in retina-induced experimental allergic uveitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **17**(8): 774-83.
- Kouskoff, V., A. S. Korganow, et al. (1996). "Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity." Cell **87**(5): 811-22.
- LaGasse, J. M., M. S. Brantley, et al. (2002). "Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study." Diabetes Care **25**(3): 505-11.
- Laliotou, B., J. Liversidge, et al. (1997). "Interphotoreceptor retinoid binding protein is a potent tolerogen in Lewis rat: suppression of experimental autoimmune uveoretinitis is retinal antigen specific." Br J Ophthalmol **81**(1): 61-7.
- Lieb, W. E., L. Smith-Lang, et al. (1991). "Identification of an S-antigen-like molecule in *Drosophila melanogaster*: an immunohistochemical study." Exp Eye Res **53**(2): 171-8.
- Maccioni, M., G. Zeder-Lutz, et al. (2002). "Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice." J Exp Med **195**(8): 1071-7.
- Matsumoto, I., M. Maccioni, et al. (2002). "How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease." Nat Immunol **3**(4): 360-5.
- Meek, B., D. Speijer, et al. (2003). "The ocular humoral immune response in health and disease." Prog Retin Eye Res **22**(3): 391-415.
- Meri, S. and M. K. Pangburn (1990). "Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(10): 3982-6.

Mirshahi, M., C. Boucheix, et al. (1985). "Retinal S-antigen epitopes in vertebrate and invertebrate photoreceptors." Invest Ophthalmol Vis Sci **26**(7): 1016-21.

Mulder, A. H., C. A. Stegeman, et al. (1995). "Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Wegener's granulomatosis: a predominant role for the IgG3 subclass of ANCA." Clin Exp Immunol **101**(2): 227-32.

Nussenblatt, R. B. and I. Gery (1996). "Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease." J Autoimmun **9**(5): 575-85.

Nussenblatt, R. B., A. G. Palestine, et al. (1983). "Cyclosporin A therapy in the treatment of intraocular inflammatory disease resistant to systemic corticosteroids and cytotoxic agents." Am J Ophthalmol **96**(3): 275-82.

Pompetzki, D. (2003). Untersuchung der humoralen Immunantwort von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis auf die Erkennung retinaler Autoantigene. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilian-Universität, München.

Ramanathan, S., Y. de Kozak, et al. (1996). "Recombinant IL-4 aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in rats." J Immunol **157**(5): 2209-15.

Rao, N. A., W. B. Wacker, et al. (1979). "Experimental allergic uveitis: clinicopathologic features associated with varying doses of S antigen." Arch Ophthalmol **97**(10): 1954-8.

Rebhuhn, W. C. (1979). "Diagnosis and treatment of equine uveitis." J. Am. Vet. Med. Assoc. **175**: 803-808.

Reim, M., K. Lukow, et al. (1989). "[Enzyme activities of the retina and vitreous body following experimental implantation of a brass splinter]." Klin Monatsbl Augenheilkd **195**(6): 363-7.

Roberge, F. G., D. Xu, et al. (1993). "Treatment of autoimmune uveoretinitis in the rat with rapamycin, an inhibitor of lymphocyte growth factor signal transduction." Curr Eye Res **12**(2): 197-203.

Romeike, A., M. Brugmann, et al. (1998). "Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU)." Vet Pathol **35**(6): 515-26.

Rose, N. R. and C. Bona (1993). "Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited)." Immunol Today **14**(9): 426-30.

Ross, C. D. and D. A. Godfrey (1987). "Distribution of activities of aspartate aminotransferase isoenzymes and malate dehydrogenase in guinea pig retinal layers." J Histochem Cytochem **35**(6): 669-74.

Sanui, H., T. M. Redmond, et al. (1988). "Synthetic peptides derived from IRBP induce EAU and EAP in Lewis rats." Curr Eye Res **7**(7): 727-35.

- Scofield, R. H. (2004). "Autoantibodies as predictors of disease." Lancet **363**(9420): 1544-6.
- Sillerud, C. L., R. F. Bey, et al. (1987). "Serologic correlation of suspected *Leptospira interrogans* serovar pomona-induced uveitis in a group of horses." J Am Vet Med Assoc **191**(12): 1576-8.
- Singh, V. K. and G. Rai (2001). "Cytokines in posterior uveitis: an update." Immunol Res **23**(1): 59-74.
- Spieß, B. M. (1997). "[Equine recurrent uveitis]." Schweiz Arch Tierheilkd **139**(3): 126-33.
- Steinbach, F., C. Deeg, et al. (2002). "Equine immunology: offspring of the serum horse." Trends Immunol **23**(5): 223-5.
- Stephens, R. J., P. G. Holt, et al. (1995). "Functional studies of major histocompatibility class II-positive dendritic cells and resident tissue macrophages isolated from the rat iris." Immunology **85**(4): 630-7.
- Streilein, J. W. (1997). "Regulation of ocular immune responses." Eye **11 (Pt 2)**: 171-5.
- Sugiura, T., T. Kondo, et al. (1998). "Production of monoclonal antibodies to six isotypes of horse immunoglobulin." Vet Immunol Immunopathol **62**(2): 145-51.
- Sun, B., L. V. Rizzo, et al. (1997). "Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveitis involves more than a predisposition to generate a T helper-1-like or a T helper-2-like response." J Immunol **159**(2): 1004-11.
- Szemes, P. A. and H. G. Szemes (2000). "Untersuchung zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn." Prakt. Tierarzt **81**: 408-420.
- Takahashi, S., J. Itoh, et al. (1993). "Cloning and cDNA sequence analysis of nephritogenic monoclonal antibodies derived from an MRL/lpr lupus mouse." Mol Immunol **30**(2): 177-82.
- Thirkill, C. E. (1996). "Lung cancer-induced blindness." Lung Cancer **14**(2-3): 253-64.
- Thirkill, C. E., J. L. Keltner, et al. (1993). "Antibody reactions with retina and cancer-associated antigens in 10 patients with cancer-associated retinopathy." Arch Ophthalmol **111**(7): 931-7.
- Thirkill, C. E., R. C. Tait, et al. (1992). "The cancer-associated retinopathy antigen is a recoverin-like protein." Invest Ophthalmol Vis Sci **33**(10): 2768-72.
- Tizard, J. R. (2000). Veterinary Immunology-An Introduction. Philadelphia, W.B. Saunders Company.

- Tuohy, V. K., M. Yu, et al. (1998). "The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis." Immunol Rev **164**: 93-100.
- Tuohy, V. K., M. Yu, et al. (1999). "Regression and spreading of self-recognition during the development of autoimmune demyelinating disease." J Autoimmun **13**(1): 11-20.
- Wacker, W. B., L. A. Donoso, et al. (1977). "Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina." J Immunol **119**(6): 1949-58.
- Wacker, W. B. and M. M. Lipton (1968). "Experimental allergic uveitis. I. Production in the guinea pig and rabbit by immunization with retina in adjuvant." J Immunol **101**(1): 151-6.
- Wacker, W. B. and M. M. Lipton (1968). "Experimental allergic uveitis. II. Serologic and hypersensitive responses of the guinea pig following immunization with homologous retina." J Immunol **101**(1): 157-65.
- Wagner, B., D. C. Miller, et al. (2004). "The complete map of the Ig heavy chain constant gene region reveals evidence for seven IgG isotypes and for IgD in the horse." J Immunol **173**(5): 3230-42.
- Wakefield, D., P. McCluskey, et al. (1992). "Distribution of lymphocytes and cell adhesion molecules in iris biopsy specimens from patients with uveitis." Arch Ophthalmol **110**(1): 121-5.
- Wildner, G. and S. R. Thureau (1994). "Cross-reactivity between an HLA-B27-derived peptide and a retinal autoantigen peptide: a clue to major histocompatibility complex association with autoimmune disease." Eur J Immunol **24**(11): 2579-85.
- Winkler, T. H., T. A. Henschel, et al. (1988). "Constant isotype pattern of anti-dsDNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus." Clin Exp Immunol **72**(3): 434-9.
- Witebsky, E., N. R. Rose, et al. (1957). "Chronic thyroiditis and autoimmunization." J Am Med Assoc **164**(13): 1439-47.
- Wollanke, B., B. W. Rohrbach, et al. (2001). "Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis." J Am Vet Med Assoc **219**(6): 795-800.
- Yamamoto, J. H., O. Okajima, et al. (1992). "Cellular immune responses to retinal antigens in retinitis pigmentosa." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **230**(2): 119-23.
- Yang, P., P. K. Das, et al. (2000). "Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina." Ocul Immunol Inflamm **8**(3): 149-57.
- Yu, M., J. M. Johnson, et al. (1996a). "A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune en-

cephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease." J Exp Med **183**(4): 1777-88.

Yu, M., J. M. Johnson, et al. (1996b). "Generation of autonomously pathogenic neo-autoreactive Th1 cells during the development of the determinant spreading cascade in murine autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci Res **45**(4): 463-70.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herrn Prof. Dr. B. Kaspers danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Besonders danke ich Frau Dr. Cornelia Deeg für die hervorragende fachliche Betreuung und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Ausarbeitung diese Arbeit.

Frau Babara Amman danke ich sehr herzlich für die großzügig gewährte Hilfe.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immunologie bedanke ich mich für die kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft.

Der Arbeitsgruppe Ueffing an der GSF Neuherberg danke ich für die Unterstützung und die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse von Proteinen.

Weiter danke ich allen, die mich bei der Anfertigung der Arbeit unterstützt haben, insbesondere Frau Dr. Sonia Kotloff, Herrn Elmar von Trauwitz, Herrn Albert Raith und Frau Ingrid Riehl.

Zuletzt bedanke ich mich ganz besonders bei meiner Familie, die mir das Studium der Tiermedizin und die anschließende Promotion durch ihre Unterstützung erst ermöglicht hat.

Lebenslauf

Name: Thomas Benedikt Schmalzl
Geburtsdatum: 13. 10. 1975
Geburtsort: München
Vater: Winfried Schmalzl
Mutter: Babara Schmalzl
Geschwister: Stefan Schmalzl

Schulbildung:

1982-1986 Grundschule Starnberg
1986-1995 Gymnasium Kempfenhausen
Juli 1995 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Hochschulbildung:

1996-2002 Studium der Tiermedizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Juli 2002 Tierärztliches Staatsexamen
Februar 2003 Tierärztliche Approbation
seit Januar 2003 Doktorand am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Tierernährung der Ludwig-Maximilians-Universität München