

Aus der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. habil. U. Matis

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. habil. R. Köstlin
und Prof. Dr. habil. C. A. Deeg

Zum Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome (SARDS) beim Hund

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

von
Barbara Katharina Braus
aus
Marburg

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig Maximilians Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Referent: Prof. Dr. R. Köstlin

Korreferent: Jun. Prof. Dr. C. Deeg

Tag d. mündl. Prüfung: 18.7.2008

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
I. Einleitung	6
II. Literaturübersicht.....	8
2.1. Klinik	8
2.2. Ätiologie	8
2.2.1. Toxische Ursachen	9
2.2.2. Genetische Ursache	9
2.2.3. Stoffwechselbedingte Ursache	9
2.2.4. Autoimmunität und SARDS	10
2.3. Diagnose	10
2.4. Differenzialdiagnosen	11
2.5. Histologische Untersuchungen an SARDS-Augen	11
2.6. Therapie	12
2.7. Retinale Antigene	12
2.7.1. Autoantigene.....	12
2.7.2. Epitop Spreading	12
2.7.3. Molekulares Mimikry	13
2.7.4. Bystander Activation	13
2.7.5. Autoantigene retinaler Erkrankungen	14
2.7.6. Studien über das Vorkommen von Autoimmunreaktionen bei SARDS-Patienten	15
III. Veröffentlichung Nr. 1	16
IV. Veröffentlichung Nr. 2.....	34
V. Diskussion	49
VI. Zusammenfassung.....	60
VII. Summary.....	61
VIII. Literaturverzeichnis	62
IX. Danksagung.....	68

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AST	Aspartat-Aminotransferase
CAR	Cancer Associated Retinopathy
CRALBP	Cellular Retinaldehyde Binding Protein
CT	Computertomographie
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ERG	Electroretinogram
HSC	Hitzeschockprotein
IRBP	Interphotoreceptor Binding Protein
ISEL	in situ- end-labelling technique
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
kDa	Kilodalton
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSDB	Mass Spectrometry Protein Sequence Database
MOWSE	Molecular Weight Search
NO	Nitric Oxid
NSE	Neuron Specific Enolase
PBS-T-PVP	PBS-Tween Polyvinylpyrrolidone
RPE	Retinales Pigmentepithel
SARDS	Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome
TMEV-IDD	Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced disease
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOF	Time of Flight

I. Einleitung

„Das typische an der Erkrankung ist, dass der Hund nichts sieht, der Ophthalmologe aber auch nichts!“ (Grußendorf, 2006).

Das Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome (SARDS) ist eine äußerst seltene und dramatisch verlaufende Erkrankung des Hundes, die mit bilateraler Erblindung einhergeht (Acland und Aguirre 1986). Die Erblindung tritt plötzlich-, innerhalb weniger Tage bis Wochen auf. Am Auge sind keine Veränderungen sichtbar, die eine Erblindung erklären könnten, auch die Netzhaut erscheint ophthalmoskopisch zunächst völlig unauffällig (Vanisi et al. 1983). Eine elektroretinographische Überprüfung (ERG) zeigt aber eine fehlende retinale Funktion.

SARDS wurde erstmals 1983 beschrieben. Damals wurde eine Vergiftung der betroffenen Hunde als Ursache vermutet und die Krankheit daher „toxic metabolic retinopathy“ genannt (Vanisi et al. 1983). Andere Autoren vermuteten ein autoimmun bedingtes Geschehen (Bellhorn et al. 1988) oder einen Zusammenhang zwischen einem Hyperadrenokortizismus und SARDS (Mattson et al. 1992). Ätiologie und Pathogenese konnten aber bis heute nicht geklärt werden. Die wenigen Studien, die es über SARDS gibt, wurden überwiegend mit einer geringen Probandenzahl durchgeführt. Drei Studien (Bellhorn et al. 1988; Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006) die sich mit der Immunpathogenese beschäftigten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Bedeutung einer fehlgeleiteten Immunreaktion bei SARDS.

Mit der vorliegenden Dissertationsschrift wurde daher ein neuer Untersuchungsansatz verfolgt, um einen Beitrag zur Klärung der Ätiologie des SARDS zu leisten:

1. In einer Literaturstudie wurden die Forschungsergebnisse über SARDS zusammengestellt. Eigene Untersuchungsergebnisse wurden nachfolgend mit diesen Ergebnissen verglichen, Gemeinsamkeiten oder Abweichungen diskutiert.

I. Einleitung

2. Eine retrospektive Untersuchung der Patientendaten aus der Chirurgischen Tierklinik zeigte die Besonderheiten von SARDS-Patienten im Vergleich zu gesunden Tieren hinsichtlich Rasse, Alter und Geschlecht.
3. Eine Nachuntersuchung der SARDS-Patienten ermöglichte eine Beurteilung des Zustands der Netzhaut. Detaillierte Verlaufsuntersuchungen der Retina von erkrankten Patienten fehlten bislang in der Literatur. Durch die fotografische Dokumentation der retinalen Veränderungen konnte der Verlauf der Erkrankung dargestellt werden.
4. Durch ein Autoantikörperscreening wurde die These überprüft, dass SARDS eine Autoimmunerkrankung ist. Mit Hilfe eines Western Blots wurden potenzielle Autoantigene identifiziert, um zu überprüfen, ob Autoimmunreaktionen bei Hunden mit SARDS nachweisbar sind.

II. Literaturübersicht

2.1. Klinik

Die Symptome des SARDS werden von Autoren verschiedener Studien übereinstimmend geschildert. Kennzeichnend ist die Trias aus plötzlich eintretender Blindheit innerhalb weniger Tage bis einiger Wochen, einem ophthalmoskopisch unauffälligen oder nur leicht veränderten Fundus-, sowie einem erloschenen ERG (Acland et al. 1984; Acland und Aguirre 1986; Gränitz 2001; Mattson et al. 1992; Miller et al. 1998; Parshall 1989; van der Woerd et al. 1991). Typischerweise sind die betroffenen Tiere mittleren bis hohen Alters und oft weiblich-kastrierten Geschlechts (O'Toole et al. 1992). Alle Rassen können betroffen sein, obwohl von einer Häufung der Fälle bei Dackeln berichtet wird (van der Woerd et al. 1991). Viele Tiere sind leicht übergewichtig. Die Besitzer berichten oft von Polyurie, Polydipsie und Polyphagie, manchmal auch von Nyctalopie. Das Allgemeinbefinden der Hunde ist nicht gestört. Serologische Untersuchungen zeigen erhöhte Blutwerte: Bei ungefähr der Hälfte der Tiere sind bei Diagnosestellung Alkalische Phosphatase (AP) (Vanisi et al. 1983), Kortisol, Aspartat-Aminotransferase (AST) (Chastain et al. 1985) und Cholesterol (Acland und Aguirre 1986) erhöht. Bei Krankheitsbeginn ist der Fundus unauffällig oder zeigt allenfalls leichte Veränderungen in Form einer geringgradigen Hyperreflexie des Tapetum lucidums oder einer Attenuation der retinalen Gefäße. Er verändert sich erst einige Monate nach der Diagnose (Vanisi et al. 1983) dahingehend, dass sich die Blutgefäße der Netzhaut verringern oder vollständig verschwinden und eine vermehrte Reflexion des Tapetum lucidums auftritt. Der Fundus ähnelt dann dem Fundus eines Hundes mit weit fortgeschrittener progressiver Retinaatrophie (Dziezyc 2004).

2.2. Ätiologie

SARDS wurde erstmals 1977 auf der Midwest Veterinary Ophthalmology Conference in Columbus, Ohio, von Wolf und Vanisi vorgestellt (Vanisi et al. 1983). Sie wählten die Bezeichnung „toxic metabolic retinopathy“, da sie von einer Vergiftung der Hunde ausgingen. Eine andere Bezeichnung stammt von O'Toole et al. (1992), der das

II. Literaturübersicht

trügerisch unauffällige Bild der Funduskopie deskriptiv „silent retina syndrome“ nannte (O'Toole et al. 1992).

Seit der Erstbeschreibung wird die ungeklärte Ursache des SARDS in jeder Veröffentlichung erwähnt und diskutiert (Acland und Aguirre 1986; Acland et al. 1984; Curtis 1988; Mattson et al. 1992; Millichamp 1990; van der Woerd et al. 1991; Vanisi et al. 1983). Zur Klärung der Ätiologie gibt es bislang aber nur wenige Ansätze.

2.2.1. Toxische Ursachen

Zunächst wurde vermutet, dass ein defekter Fettmetabolismus für die Entstehung von SARDS verantwortlich sein könnte (Vanisi et al. 1983). Demnach würden freie Lipidradikale toxisch auf die Stäbchen und Zapfen wirken. Diese nicht näher untersuchte Hypothese entstand, da bei laborchemischen Untersuchungen etwa die Hälfte der Patienten erhöhte Cholesterol-, Alanin-Aminotransferase- (ALT), Alkalische Phosphatase- (AP) und Aspartat-Aminotransferase-Werte (AST) aufwiesen. Drei Tiere wurden mit dem Coombs-Test auf antinukleäre Antikörper untersucht, zusätzlich wurde der rheumatoide Faktor bestimmt, um einen Hinweis auf eine eventuell vorliegende autoimmune Genese zu erhalten. Alle Parameter waren bei den Tieren aber im Referenzbereich (Vanisi et al. 1983).

Histologische Untersuchungen ließen ebenfalls auf ein toxikologisches Geschehen schließen, da bei der Untersuchung zweier Augen ein massiver und selektiver Verlust der äußeren Segmente der Stäbchen und Zapfen vorlag. (O'Toole et al. 1992).

2.2.2. Genetische Ursache

Das gehäufte Auftreten von SARDS beim Dackel wurde von zwei Autoren beschrieben und daraufhin ein genetischer Zusammenhang vermutet, nicht aber näher untersucht (Gränitz 2001; van der Woerd et al. 1991).

2.2.3. Stoffwechselbedingte Ursache

Bei der Diagnosestellung zeigen typischerweise etwa die Hälfte der Patienten Anzeichen eines Hyperadrenokortizismus. Die Besitzer berichten von Polydipsie, Polyurie und Polyphagie. Alkalische Phosphatase (AP) (Vanisi et al. 1983), Kortisol, Aspartat-Aminotransferase (AST) (Chastain et al. 1985) und Cholesterol (Acland und

II. Literaturübersicht

Aguirre 1986) sind ebenfalls bei ungefähr der Hälfte der Tiere zu diesem Zeitpunkt erhöht. Daher wurde 1992 ein SARDS-Patient auf das Vorliegen eines Hyperadrenokortizismus untersucht (Mattson et al. 1992). Es wurde ein Low-Dose Dexamethason Suppressionstest, eine CT der Nebenniere und der Hypophyse durchgeführt. Der Verdacht eines Hyperadrenokortizismus bestätigte sich aber nicht.

2.2.4. Autoimmunität und SARDS

Bislang wurden drei Arbeiten über SARDS und eine mögliche autoimmune Ätiologie veröffentlicht (Bellhorn et al. 1988; Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006). In den Studien wurden Hundeseren auf das Vorhandensein von antiretinalen Antikörpern mittels ELISA und Western Blot untersucht. In zwei Studien wurden antiretinale Antikörper sowohl bei den gesunden-, als auch bei den erkrankten Hunden nachgewiesen (Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006). Unterschiede in der Spezifität oder Reaktivität beider Gruppen waren nicht feststellbar. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer dritten Studie (Bellhorn et al. 1988), in der antiretinale Antikörper in den Seren von fünf SARDS-Patienten mittels ELISA und Western Blot nachgewiesen werden konnten, jedoch nicht bei den drei gesunden Kontrolltieren.

2.3. Diagnose

Typischerweise werden SARDS-Patienten mit akuter Blindheit vorgestellt. Der Verlust der Sehfähigkeit entsteht innerhalb weniger Tage bis einiger Wochen (Acland et al. 1984; Vanisi et al. 1983). Eine Nachtblindheit wird anfangs von manchen Besitzern beobachtet (Acland et al. 1984). Der Fundus sieht unauffällig oder zumindest nahezu unauffällig aus. Veränderungen sind im Sinne einer leichten Hyperreflexie des Tapetum lucidum oder einer Attenuation der retinalen Gefäße zu sehen (Vanisi et al. 1983). Sie erklären das fehlende Sehvermögen jedoch nicht. Der Pupillarreflex ist erloschen oder nur reduziert auslösbar (Acland et al. 1984; O'Toole et al. 1992; Venter 1995). Um SARDS von einer Neuritis nervi optici zu unterscheiden, ist es essenziell, dass ein ERG abgeleitet wird (Acland und Aguirre 1986). Das erloschene ERG schließt eine Neuritis aus. Prinzipiell ist bei der Diagnostik von SARDS nur ein kurzes ERG Protokoll notwendig, das eine ja/nein Antwort über die Funktionalität der Retina liefert (Narfstrom 2002).

II. Literaturübersicht

Bei 40-60% der SARDS-Patienten werden zusätzlich systemische Krankheitsanzeichen und veränderte Laborwerte gefunden. Etwa die Hälfte der Tiere haben einen erhöhten alkalischen Phosphatase- und Cholesterinwert und leiden unter Polyphagie, Polydipsie und Polyurie (Acland und Aguirre 1986).

2.4. Differenzialdiagnosen

Eine plötzlich auftretende Blindheit kann durch eine akut erworbene, bilaterale Fehlfunktion in einem der vier folgenden Bereiche entstehen:

1. Plötzliche Trübung der durchsichtigen Medien des Auges
2. Störung der retinalen Funktion
3. Dysfunktion der reizweiterleitenden Strukturen
4. Zentrale Blindheit

Die verschiedenen Differenzialdiagnosen wurden bereits in der hier eingefügten eigenen Publikation (Tierärztliche Praxis, Kleintiere 2008, 36 1: 26-46) ausführlich erläutert (s.S. 36-37).

2.5. Histologische Untersuchungen an SARDS-Augen

Bislang wurden erst drei histologische Untersuchungen publiziert, in denen insgesamt 15 Augen (zwei, sechs und sieben) untersucht wurden (Acland et al. 1984; Miller et al. 1998; O'Toole et al. 1992). Alle Studien zeigten eine völlige Degeneration der Außensegmente der Stäbchen und Zapfen. Die Innensegmente der Stäbchen und Zapfen waren bei akut erblindeten Tieren noch vorhanden. In der Interphotorezeptor Matrix, die den Raum zwischen den Photorezeptoren und dem retinalen Pigmentepithel (RPE) ausfüllt, konnten zahlreiche Phagozyten nachgewiesen werden (Acland et al. 1984; O'Toole et al. 1992). Die innenliegenden Schichten der Retina (Ganglienzellschicht, innere plexiforme Schicht und innere Körnerschicht), die Choroidea und das retinale Pigmentepithel waren unverändert. (Acland et al. 1984).

Mit Hilfe der „in situ- end-labeling technique“ (ISEL) konnte nachgewiesen werden, dass bei akut an SARDS erblindeten Tieren in der äußeren Körnerschicht viele apoptotische Zellen vorlagen (Miller et al. 1998). Länger erkrankte Tiere

präsentierten dementsprechend eine Ausdünnung der äußeren Körnerschicht (O'Toole et al. 1992). Die ISEL-Technik färbt fragmentierte DNA an und weist so apoptotische Zellen nach. Unklar ist trotzdem, ob die apoptotischen Vorgänge aufgrund eines anderen, vorangehenden Stimulus einsetzen oder ob die Apoptose die auslösende Ursache von SARDS ist (Miller et al. 1998).

2.6. Therapie

Für die Behandlung von SARDS ist bislang keine erfolgreiche Therapie bekannt (Acland und Aguirre 1986; Mattson et al. 1992; Parshall 1989).

2.7. Retinale Antigene

2.7.1. Autoantigene

Jede körperfremde Substanz, die eine Immunreaktion induzieren kann, ist ein Antigen. Unter einem Autoantigen versteht man einen natürlichen Bestandteil des Körpers, der sich wie ein Antigen verhält (Tizard 2000). Erkennt das Immunsystem seine eigenen Proteine als fremd, resultiert eine Immunantwort gegen eigene Zellen und Gewebe. Die Krankheiten, die aus diesem Fehlverhalten resultieren, werden als Autoimmunerkrankungen bezeichnet.

Zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen gibt es momentan vor allem drei Theorien:

2.7.2. Epitop Spreading

Ein Epitop ist eine antigenetische Determinante oder ein Teil einer Oberfläche eines antigenetischen Moleküls, an das ein einzelner Antikörper bindet. Jedes Antigen besitzt verschiedene Epitope, die mit Antikörpern reagieren können. Unter dominanten Epitopen versteht man jene Epitope, auf die ein Tier initial reagiert, wenn es mit einem Protein oder infektiösen Agens konfrontiert wird. Durch die molekulare Struktur der Proteine sind manche Epitope versteckt (kryptisch), das heißt, dass sie aufgrund ihrer Lokalisation nicht mit interagierenden Antikörpern oder Lymphozyten in Berührung kommen. Deshalb kommt es weder zu einer Immunantwort gegen sie, noch zu einer Toleranzentwicklung (Powell und Black 2001).

II. Literaturübersicht

Durch das Epitop Spreading entwickeln sich Immunantworten gegen neue, unterschiedliche Epitope und nicht gegen das initial fokussierte, dominante Epitop. Dieser Vorgang entsteht vor allem durch die Gewebeschädigung bei der Erkrankung und führt dazu, dass versteckte Epitope plötzlich für das Immunsystem freiliegen und zu einer autoaggressiven Reaktion führen.

Richtet sich die Autoimmunantwort gegen unterschiedliche Epitope desselben Proteins spricht man vom intramolekularen Epitop Spreading, wenn sie sich gegen Epitope anderer Proteine richten, spricht man vom intermolekularen Epitop Spreading (Vanderlugt und Miller 2002).

Studien über Multiple Sklerose (MS), experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis und Theiler`s murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease (TMEV-IDD) zeigten, dass Epitope Spreading eine pathologische Rolle in der Aufrechterhaltung der jeweiligen Erkrankung spielt (McMahon et al. 2005).

2.7.3. Molekulares Mimikry

Molekulares Mimikry tritt auf, wenn Peptide eines Infektionserregers Ähnlichkeiten mit Sequenzen oder Strukturen von Autoantigenen haben. Werden diese Peptide dem MHC-Komplex präsentiert, können dadurch autoreaktive T-Zellen aktiviert werden (Karlsen und Dyrberg 1998). Die Immunantwort richtet sich durch die kreuzreaktive Immunreaktion zunächst gegen den Infektionserreger und später gegen körpereigenes Gewebe (Oldstone 1998). Die Pathogenese der autoimmunen Myocarditis (Wilkie et al. 2006), der Multiplen Sklerose (Libbey et al. 2007) oder der durch B3 Coxsackie Viren verursachten Myocarditis (Huber 2006) wird beispielsweise mit einer Infektion durch verschiedene Pathogene erklärt, die den körpereigenen Antigenen ähnlich sehen.

2.7.4. Bystander Activation

Bystander Activation heißt wörtlich übersetzt „Zuschauer Aktivierung“ und ist ein weiterer Mechanismus der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, der während einer viralen Infektion auftreten kann. Virusinfektionen führen zu einer signifikanten Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APC). Die aktivierten antigenpräsentierenden Zellen können wiederum autoreaktive T-Zellen aktivieren, die im aktivierten Zustand eine Autoimmunerkrankung auslösen (Libbey et al. 2007).

II. Literaturübersicht

Anders ausgedrückt werden spezifische T-Zellen, die gegen das Antigen „Y“ gerichtet sind, während einer Immunantwort gegen das Antigen „X“ aktiviert, weil sie in der Nähe der „X“-spezifischen Zellen liegen (Ehl et al. 1997).

Zusätzlich können auch virusspezifische T-Zellen eine Bystander Activation initiieren. Sie migrieren zu den Bereichen einer Virusinfektion, zum Beispiel zum Herz, Pankreas oder in das ZNS. Hier begegnen sie den virusinfizierten Zellen, die virale Peptide präsentieren. CD8⁺ T-Zellen erkennen die infizierten Zellen und geben zytotoxische Granula ab, die den Tod der infizierten Zelle bewirken. Die absterbenden Zellen, die CD8⁺ T-Zellen und die Makrophagen geben Zytokine ab, wie den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), TNF-β, Lymphotoxin und Nitric Oxid (NO). Diese Zytokine führen zu einer Vernichtung der uninfizierten Nachbarzellen (Duke 1989; Libbey et al. 2007; Smyth und Sedgwick 1998).

2.7.5. Autoantigene retinaler Erkrankungen

Das Vorkommen von Autoimmunreaktionen bei retinalen Erkrankungen wurde unter anderem bei einer Uveitis und einer Cancer Associated Retinopathy (CAR) beschrieben. Die Uveitis ist eine Entzündung des inneren Auges, die sowohl beim Menschen als auch beim Pferd mit rezidivierenden Entzündungsschüben einhergeht und unbehandelt zur Erblindung führt. Als Autoantigene bei einer Uveitis wurden unter anderem S-Antigen (Wacker 1977), Cellular Retinaldehyde Binding Protein (CRALBP) (Deeg et al. 2006), sowie Interphotoreceptor Binding Protein (IRBP) (Caspi et al. 1988) beschrieben.

Die Cancer Associated Retinopathy (CAR) ist eine paraneoplastische Retinopathie, die bilateral mit einem plötzlichen oder progressiven Visusverlust beim Menschen einhergeht. Das ERG der Patienten ist stark verändert oder ausgelöscht. CAR ist mit einem Lungenkarzinom assoziiert (Khan et al. 2006). Gefundene Autoantigene, die für CAR verantwortlich gemacht werden sind Alpha Enolase (Dot et al. 2005), Hitzeschockprotein (HSC 70) (Maeda et al. 2001) und Recoverin. Gegen Recoverin werden Antikörper gebildet, die auch an das Recoverin der Retina binden und hier zur Apoptose der Photorezeptoren und damit zur Erblindung führen (Thirkill et al. 1992).

2.7.6. Studien über das Vorkommen von Autoimmunreaktionen bei SARDS-Patienten

Insgesamt gibt es drei Studien über das Vorkommen antiretinaler Antikörper bei SARDS-Patienten (Bellhorn et al. 1988; Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006).

1988 wurden die Seren von 5 Patienten mit SARDS und drei augengesunden Tieren mittels ELISA und Western Blot untersucht (Bellhorn et al. 1988). Im Gegensatz zu den Negativkontrollen reagierten alle SARDS-Patienten sowohl im ELISA-, als auch im Western Blot positiv auf das aufgetrennte Retinagemisch. In der Studie wird allerdings nicht näher darauf eingegangen, welches Molekulargewicht die markierten Antigene hatten. Aus diesem Grund kann keine Aussage über die möglichen Antigene gemacht werden. Nur eine Abbildung zeigt eine positive Reaktion gegen eine Bande auf Höhe von 65 kDa bei SARDS-Patienten, auf die die Kontrolltiere nicht reagierten.

Aktuell wurden zwei weitere Studien durchgeführt (Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006), die zu einem anderen Ergebnis kamen. Die Experimente wurden mit 13 SARDS-Patienten und 5 gesunden Hunden (Keller et al. 2006) bzw. mit 17 SARDS-Patienten, 57 klinisch gesunden Tieren und 53 Tieren mit Neoplasien (Gilmour et al. 2006) durchgeführt. In beiden Studien zeigten sowohl gesunde-, als auch kranke Tiere im ELISA und Western Blot Reaktionen auf verschiedene Proteine im aufgetrennten Retinalysat.

III. Veröffentlichung Nr. 1

Titel: "Neuron Specific Enolase Antibodies in Patients with Sudden Acquired
Retinal Degeneration Syndrome

Autoren: Barbara K Braus, Stefanie M Hauck, Barbara Amann, Christine
Heinrich, Jens Fritsche, Roberto Köstlin, Cornelia A Deeg

Zeitschrift: Veterinary Immunology and Immunopathology, in press
(<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01652427>)

Neuron Specific Enolase Antibodies in Patients with Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome

Barbara K Braus*, Stefanie M Hauck**, Barbara Amann***, Christine Heinrich ****, Jens Fritsche*****, Roberto Köstlin*, Cornelia A Deeg***

* Department for Small Animal Surgery and Ophthalmology, Ludwigs Maximilians University München (LMU) Munich, Veterinärstr 13, D-80539 Munich. ** Institute of Human Genetics (GSF), Research Center for Environment and Health, Ingolstädter Landstr. 1, D-85764 Neuherberg. *** Institute for Animal Physiology, Ludwigs Maximilians University München (LMU) Munich, Veterinärstr. 13, D-80539 Munich. **** Willows Referral Service, 78 Tanworth Lane, Shirley, Solihull, West Midlands B90 4DF Great Britain. ***** Tierärztliche Praxis für Augenheilkunde, Kreuzhofstraße 10, D-81476 Munich.

Correspondence address:

Cornelia A Deeg, Institute for Animal Physiology, Ludwigs Maximilians University München (LMU) Munich, Veterinärstr. 13, D-80539 Munich, Germany. E-mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de, Telephone: +49 89 2180 1630, Fax: +49 89 2180 2554.

abstract

Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome (SARDS) is a disease characterised by sudden and bilateral vision loss of dogs. Previous studies failed to identify the underlying cause (Mattson et al., 1992; Van der Woerd et al., 1991) and earlier investigations about the occurrence of anti-retinal antibodies in SARDS patients showed inconsistent results. To provide a novel approach to those findings we designed a more detailed study. Autoantibodies of SARDS patients and normal controls were tested against the purified autoantigens S-antigen and Cellular Retinaldehyde Binding Protein (CRALBP) that play a role in human autoimmune uveitis. Next we tested the autoantibody binding pattern to whole retinal lysate. No difference in the incidence of autoantibodies could be found between SARDS patients and healthy controls while testing the well known autoantigens S-antigen

III. Veröffentlichung Nr. 1

and CRALBP. Potential novel, yet unknown autoantigens were identified by a screening test using the retinal proteome as autoantigenic source. In SARDS patients and normal controls, several retinal proteins were bound by IgG antibodies, but one band was strongly marked by SARDS patients. That band was excised, subjected to mass-spectrometry (MALDI/TOF-TOF) and identified as Neuron Specific Enolase. Binding of the IgG autoantibodies of SARDS affected dogs to this protein was verified using purified NSE, revealing 25% of NSE autoantibody-positive SARDS patients and 0% of negative controls. Our findings indicate that at least some dogs with SARDS have autoantibodies against NSE, although it is unclear whether these play a causative role in SARDS or whether they are the result of retinal destruction by another mechanism.

keywords: retinal degeneration, autoantibodies, NSE, retina, blindness, SARDS

abbreviations:

CAR: Cancer Associated Retinopathy

CRALBP: Cellular Retinaldehyde-binding Protein

ECL: Enhanced Chemiluminescence

ERG: Electroretinogram

IVIG: Intravenous Immunoglobulins

MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation

MSDB: Mass Spectrometry Protein Sequence Database

MOWSE: Molecular Weight Search

NSE: Neuron Specific Enolase

PBS-T-PVP: PBS-Tween Polyvinylpyrrolidone

SARDS: Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome

TOF: Time of Flight

1. introduction

Sudden Acquired retinal degeneration syndrome (SARDS) is a blinding disease in dogs. It was first described in 1977 (Vanisi et al., 1983). Since this time the occurrence of SARDS was reported several times in the United States, as well as in Africa and Europe (Acland et al., 1984; Granitz, 1994; Venter and Petrick, 1995). Patients with SARDS are presented with acute bilateral vision loss, mydriatic pupils and with little or no pupillary response to bright light. The fundus of acutely affected animals shows no or only subtle changes (Vanisi et al., 1983). Considerable changes like hyperreflectivity of the tapetum and attenuated retinal vessels are only seen several months after the onset of SARDS. Clinical confirmation is based on an extinguished electroretinogram (ERG) (Acland et al., 1984). Affected dogs are often middle aged to old and of female sex. Van der Woerdt reported a higher incidence in dachshunds (1991), but several breeds can be affected. About one third (Van der Woerdt et al., 1991) to one half (Acland et al., 1984; Parshall, 1989) of the SARDS affected dogs are presented with polydipsia and polyuria during the onset of the disease. Blood analysis revealed elevated amounts of Alkaline Phosphatase (AP), Cholesterol or Aspartat Aminotransferase (AST) in about 40 to 50 % of presented dogs (Acland and Aguirre, 1986; O'Toole et al., 1992; Parshall, 1989; Van der Woerdt et al., 1991; Vanisi et al., 1983). Histological examinations showed a selective loss of the photoreceptor layer in affected animals. In situ end-labeling technique demonstrated numerous apoptotic nuclei overwhelmingly located in the outer nuclear layer in dogs with SARDS (Acland et al., 1984; Miller et al., 1998). The aetiology of SARDS remains still unclear. Possible causes include a toxic effect to the rods and cones, mediated by an unknown toxin or by free lipid radicals (Vanisi et al., 1983). Several studies focused on SARDS as an autoimmune disorder (Bellhorn et al., 1988; Gilmour et al., 2006; Keller et al., 2006), but showed controversial findings. In 1988 five dogs with SARDS were examined that had demonstrable serum antibodies specific to pooled bovine retinal antigen contrary to three healthy dogs. Because of these findings SARDS was suspected as an autoimmune disease (Bellhorn et al., 1988). New investigations about SARDS and the occurrence of autoantibodies were made in 2006. Two studies detected autoantibodies against proteins of 25 and 50 kDa (Keller et al., 2006) or against a protein of 48 kDa (Gilmour et al., 2006) in healthy as well as in diseased dogs, but no qualitative or quantitative differences between both groups could be identified. SARDS as an autoimmune

disease appears questionable after those findings. However, an anecdotal report of two cases of SARDS describes a successful treatment with intravenous immunoglobulin (IVIg) (<http://www.iastate.edu/~nscentral/news/2007/may/blind.shtml>). IVIg is a well known therapy for immune mediated diseases (Sorensen et al., 1998). Those findings made it seem reasonable to provide a novel approach by testing SARDS sera with purified autoantigens and to search for autoantigens in whole retinal lysate.

2. materials and methods

2.1. animals

Serum was obtained from 24 dogs diagnosed with SARDS and 14 normal controls. Inclusion criteria for the SARDS group were: clinical signs (sudden blindness and an ophthalmoscopically normal or nearly normal fundus that could not explain blindness) and an extinguished ERG. The diagnosis was made directly after the onset of blindness. One third of the dogs showed signs of polydipsia, polyuria and polyphagia. Approximately 40% had elevated levels of alkaline phosphatase (AP), alanine aminotransferase (ALT) and Cholesterol. Blood samples were taken immediately after SARDS onset in 13 animals, after 1-4 years in 8 animals and after 5 to 8 years from 3 animals. The control group included ophthalmological healthy dogs that were gender and breed matched. Serum analysis revealed normal findings in these dogs. A complete ophthalmic examination was performed on all animals including a slit lamp examination, a direct and indirect ophthalmoscopy and a tonometry (TonoVet, Acri.Tec, Hennigsdorf). Serum was stored at -20 °C until usage.

2.2. western blots

A SDS-PAGE procedure followed by Western blot was used to screen serum samples for antiretinal antibodies and was done as described by Laemmli (Laemmli 1970). 20 µg of purified recombinant human CRALBP (Deeg et al., 2006), purified bovine S-Antigen (Deeg et al., 2001), porcine whole retina lysate and purified NSE (Biomol, Hamburg) was respectively applied to the polyacrylamide gel. The conformance of used proteins between the different species (dog/human and dog/bovine) were 91.4 % (CRALBP), 91.9% (S-Antigen) and 98.7% (Sorensen et al.). One part of the gel was cut off and used for silver- as well as colloidal Coomassie (Pierce, Bonn) staining. Blotting was performed on Hybond ECL (GE-Healthcare,

III. Veröffentlichung Nr. 1

Freiburg). The membrane was cut into 0.4 cm strips, blocked with PBS-Tween Polyvinylpyrrolidone (PBS-T-PVP) for one hour and incubated in the patient or normal control serum (S-Ag 1:10000, CRALBP 1:5000, retinal lysate 1:2000, NSE 1:50000) overnight. Strips were washed in PBS-T followed by incubation of rabbit anti-dog IgG POD antiserum (1:50000) (Sigma, Deisenhofen) for one hour. Enhanced chemiluminescence (ECL) (self made with solution A, consisting of Tris-HCl and Luminol, solution B consisting of para-Hydroxycoumarinsäure and Dimethylsulfoxide, and solution C consisting of H₂O₂) was used for detection of autoantibody reaction. Exposure to an X-ray film (GE Healthcare, Freiburg) enabled the documentation of the reaction.

2.3. mass spectrometry

The selected band was cut from silver-stained gels, destained, dehydrated in 100 µl of 40% acetonitrile (3 x 15 min), and subjected to overnight tryptic proteolysis in 5–10 µl of 1 mM Tris- HCl, pH 7.5, containing 0.01 µg/µl trypsin (Promega, Mannheim). MALDI-TOF/TOF peptide mass fingerprints were obtained on a Bruker Reflex III mass spectrometer (Bruker, Bremen) as described before (Deeg et al., 2006). Briefly samples were cocrystallized with a matrix consisting of 2,5-dihydroxybenzoic acid (Sigma, Deisenhofen) (20 mg/ml in 20% acetonitrile, 0.1% TFA) and 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid (Fluka, Neu Ulm) (20 mg/ml in 20% acetonitrile, 0.1% TFA) in a 9:1 ratio (v/v) on 400-µm AnchorChip targets (Bruker, Bremen). Database searches were performed using the Mascot software package (Matrix Science, London, UK) allowing one miscleavage and 100-ppm mass accuracy in all mammalian entries in the Mass Spectrometry Protein Sequence Database (MSDB). Score is given as probability based MOWSE (Molecular weight Search) scores and considered as significant if protein score were greater than 58 ($p < 0.05$) for SwissProt or scores greater 67 for MSDB (Table 1).

2.4. statistical methods

Statistical significance of differences between the frequency of S-Antigen, CRALBP and NSE in SARDS patients and normal controls was evaluated using fisher's exact test. A p-value of < 0.05 was considered significant.

3. results

To test the reaction from SARDS-sera to well known retinal autoantigens, we first checked the reactions of 24 SARDS sera and 14 controls against purified S-Antigen and CRALBP in Western blot analysis. 16.7 % of SARDS patients and 28.6 % of healthy controls reacted to S-Antigen (Figure 1a). In CRALBP we found 54.2 % of SARDS patients and 64.3 % of normal controls reacting positively (Figure 1b). We used Fisher's exact test to prove statistical significance. There was no significant difference between SARDS patients and normal controls referring to the reaction to S-Antigen ($p > 0.05$) or CRALBP ($p > 0.05$). Since no difference in autoantibody frequency was detectable to the known retinal autoantigens S-Antigen and CRALBP we next tested the autoantibody binding pattern to the retinal proteome (Figure 2). Both groups, SARDS patients and normal controls showed many reactions to different retinal proteins. One band at 47 kDa was strongly detected by SARDS patients. This protein was unambiguously localized on silver stained gel, excised and afterwards identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Spectrometric investigation identified it as Neuron Specific Enolase (Sorensen et al.). The positive reactions were verified with western blot analysis using purified (recombinant) NSE (Figure 3). Validation of the immune response with purified NSE confirmed the reaction of 25% SARDS patients to NSE (Figure 4). SARDS patient number 18, 19 and 21 are exemplary shown for positive reactions (Figure 3). Statistical significance was proven by Fisher's exact test. A positive correlation between SARDS and reaction to NSE ($p < 0,05$) was found.

4. discussion

The dogs examined in this study resemble typical SARDS cases. They were presented with sudden vision loss, a normal or nearly normal fundus and an extinguished ERG. In addition the occurrence of polydipsia, polyuria could be noticed in 33% of our patients, elevated liver enzymes could be noticed in approximately in 40% of our SARDS cases. It was presumed earlier that those symptoms originate from an underlying hyperadrenocorticism, but this could not be clearly proven (Mattson et al., 1992). It is still unclear why SARDS patients show such systemic signs. There is no known relationship between autoantibodies against NSE and systemic illness. The suspicion of SARDS as an autoimmune disorder was presumed already twenty years ago and autoantibodies were found in five dogs with SARDS in

1988 (Bellhorn et al., 1988). Recently performed studies showed controversial results as no significant difference between SARDS patients and normal controls were found when autoantibodies were screened against retinal lysate (Gilmour et al., 2006; Keller et al., 2006). Autoantibodies have been found in different kinds of ocular diseases in humans and animals. Uveitis is a well known inflammatory process of the inner eye that can be driven by autoimmunity (Deeg et al., 2006). Untreated it proceeds to blindness by destroying the retina by severe inflammation. Other immune mediated retinal diseases, for example the Cancer associated retinopathy (CAR), are mediated by autoimmunity as well and lead to bilateral and often sudden blindness in humans. CAR is mainly driven by immune reactions to the autoantigens recoverin and alpha-enolase (Adamus et al., 1993). Autoimmune reactivity to those proteins results in apoptotic death of retinal cells (Adamus 2003) as seen in SARDS affected tissue as well (Miller et al., 1998). Although an assumed similarity between SARDS and CAR could not be proven (Keller et al., 2006) the histopathologic findings and the resemblance of the clinical appearance support the suspicion that SARDS could be driven by autoimmunity as well. Our first experiments testing autoantibody responses to purified S-Antigen and CRALBP showed no differences between SARDS patients and normal controls. Both groups were reacting equally to purified CRALBP and S-Antigen. Our findings about S-Antigen support the results from Gilmour (2006). She found increased immunologic activity against a 48 kD region on Western blots with retinal lysate in dogs with SARDS as well as in healthy controls. CRALBP and S-Antigen are well known autoantigens and responsible for autoimmune induced uveitis in horses (Deeg et al., 2006; Deeg et al., 2004). S-Antigen is a protein of 48 kD located selectively in the photoreceptor layer (Wacker et al., 1977) and is thought to participate either in the inactivation of the photoresponse or in the process of light adaptation or both (Palczewski et al., 1992). CRALBP is a component of the visual cycle, serving as substrate carrier protein. It is located in the retinal pigment epithelium and the retina (Crabb et al., 1988). An autoimmune reaction to any of those proteins could explain a vision loss because of inflammation or apoptotic processes. Hence we presumed a possible source of SARDS in the immune reaction to those two proteins, but could not prove this suspicion. We used proteins with highly conserved sequences for these screenings (bovine S-Antigen, 91.4% and human CRALBP, 91.9%) that were already validated in other studies for purity (Deeg et al., 2006). Since there is a slight difference between the canine

III. Veröffentlichung Nr. 1

sequence and the proteins used in our Western blots we cannot completely rule out that we have overlooked a reaction to a canine specific epitope, but another study supports our finding at least regarding S-Antigen, because they could also not detect a difference in the reaction pattern to a protein with 48 kD in canine retinal lysate (Gilmour et al., 2006). Further, autoimmune reactions are mostly generated against the most conserved structures of proteins (Chan and Tan, 1987; Goto et al., 2006; Gitlits et al., 1997). Therefore it is not likely that there are major responses to S-Antigen or CRALBP that play a role in SARDS and were missed out by our test in our opinion.

The next step was to look for different immune reactions of both groups to the retinal proteome. We found an interesting band that was strongly marked by SARDS patients and identified it definitely as NSE by MALDI-TOF/TOF. Investigations with purified NSE (human NSE, protein sequence homology 98.7%) confirmed our findings. Twenty-five % of our SARDS patients and none of the normal controls were reacting to purified NSE. NSE was detected earlier in neurons and neuroendocrine cells (Margo and Lavellee, 1986).

Immunohistological examinations revealed that NSE is expressed in a subpopulation of photoreceptors in the outer nuclear layer of the mouse retina and additionally ganglion, amacrine, bipolar, and horizontal cells (Rich et al., 1997). Occurrence of NSE autoantibodies in our SARDS patients could give evidence for an underlying autoimmune reaction in these patients. Autoantibodies itself can induce an autoimmune disease (Vincent et al., 1998), but most autoimmune diseases are T cell mediated. In these diseases, the autoantibodies develop as a secondary reaction to a CD4⁺ T cell reaction as known from a large percentage of autoimmune diseases such as autoimmune diabetes (Kurrer et al., 1997), multiple sclerosis (Thewissen et al., 2007) or autoimmune uveitis (Deeg et al., 2006). In these cases, autoantibodies are not directedly responsible for the pathogenesis of disease but reflect the
13 autoimmune response and can be used as a predictive marker (Aho et al., 1992; Lernmark, 2001; Seissler and Scherbaum, 2002). The relevance of the anti-NSE antibodies for SARDS pathogenesis can be tested by transferring the anti-NSE antiserum of these SARDS patients in other experimental animals. If the anti-NSE antibody generates SARDS directedly, the pathology will ensue after antibody transfer.

However, a study with mice where NSE antibodies were injected into mice did not replicate SARDS (Maruyama et al, 2000). SARDS was only described in dogs so far and we can only speculate that there is an additional factor that elicits the disease in dogs. Finally, the presence of anti-NSE antibodies could just reflect the tissue destruction of the retina and develop as epiphenomen due to retinal damage in SARDS. The percentage of only 25% anti-NSE antibody positive SARDS dogs can be explained in several ways. First, if the disease is mediated by anti-NSE antibodies, the antibody negative animals could represent advanced stages of SARDS. Five out of six animals showing anti NSE antibodies were suffering from SARDS less than 18 months. It is known from other autoimmune diseases that the autoantibody response diminishes with subsequent target tissue and therefore autoantigen destruction, e.g. in autoimmune thyroiditis (Wick et al., 1974). This was also shown in spontaneous autoimmune thyroiditis of dogs (Deeg et al., 1997) and in patients with primary open angle glaucoma. The titers of anti-NSE antibody in these patients were decreased with advancing glaucoma stages and/or deteriorating glaucomatous visual field loss. However, the authors did also not know whether the anti-NSE antibody production causes the destruction of retinal ganglion cells or not (Maruyama et al., 2002). On the other hand, NSE antibodies could develop secondary to a CD4⁺ T-cell response and the animals developing autoantibodies could indicate a more protective Th2 response in contrast to the autoantibody negative SARDS patients. Last, but not least the NSE-negative animals could point towards several different etiologies leading to the syndrome SARDS. Further studies are needed in order to identify the exact meaning of our findings for SARDS.

5. conclusion

Our findings suggest that an autoimmune reaction to NSE could contribute to the pathogenesis in SARDS. Further functional investigations on the character of the anti-NSE autoimmune reactions, e.g. the possible involvement of T-cells should be performed to gain further insight into this disease.

6. acknowledgement

We like to thank Ron Ofri for his helpful advice and Kerstin Leuzinger for procurement of SARDS patients.

This study was in part supported by the Hanns Seidel Stiftung e.V. and SFB 571.

7. references

Acland G. M., and Aguirre G. D. (1986) Sudden acquired retinal degeneration: clinical signs and diagnosis. Transactions of the 17th annual scientific program of the American College of Veterinary Ophthalmologists, p. 58 - 63.

Acland G. M., Irby N. L., Aguirre G. D., Gross D., Nitroy S. F., and Notarfrancesco K. 1984, Sudden acquired retinal degeneration in the dog: Clinical and morphologic characterization of the "Silent Retina" Syndrome. 15th Annu Meet Am Coll Vet Ophthalmol 15, 86-104.

Adamus G. 2003, Autoantibody-induced apoptosis as a possible mechanism of autoimmune retinopathy. Autoimmun Rev 2, 63-68.

Adamus G., Guy J., Schmied J. L., Arendt A., and Hargrave P. A. 1993, Role of anti-recoverin autoantibodies in cancer-associated retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 34, 2626-2633.

Aho K., Koskela P., Makitalo R., Heliovaara M., and Palosuo T. 1992, Antinuclear antibodies heralding the onset of systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 19, 1377-1379.

Bellhorn R. W., Murphy C. J., and Thirkill C. E. 1988, Anti-retinal Immunoglobulins in Canine Ocular Diseases. Semin Vet Med Surg (Small Anim) 3, 28-32.

Chan E. K., and Tan E. M. 1987, Human autoantibody-reactive epitopes of SS-B/La are highly conserved in comparison with epitopes recognized by murine monoclonal antibodies. J Exp Med 166, 1627-1640.

Crabb J. W., Johnson C. M., Carr S. A., Armes L. G., and Saari J. C. 1988, The complete primary structure of the cellular retinaldehyde-binding protein from bovine retina. J Biol Chem 263, 18678-18687.

Deeg C., Kaspers A., Hartmann K., 2nd, Kraft W., and Kaspers B. 1997, [Canine hypothyroidism: detection of anti-thyroglobulin autoantibodies]. Tierarztl Prax 25, 170-173.

Deeg C. A., Kaspers B., Gerhards H., Thureau S. R., Wollanke B., and Wildner G. 2001, Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 42, 393-398.

Deeg C. A., Pompetzki D., Raith A. J., Hauck S. M., Amann B., Suppmann S., Goebel T. W., Olazabal U., Gerhards H., Reese S., Stangassinger M., Kaspers B., and Ueffing M. 2006, Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. Mol Cell Proteomics 5, 1462-1470.

III. Veröffentlichung Nr. 1

Deeg C. A., Reese S., Gerhards H., Wildner G., and Kaspers B. 2004, The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2286-2292.

Gilmour M. A., Cardenas M. R., Blaik M. A., Bahr R. J., and McGinnis J. F. 2006, Evaluation of a comparative pathogenesis between cancer-associated retinopathy in humans and sudden acquired retinal degeneration syndrome in dogs via diagnostic imaging and western blot analysis. *Am J Vet Res* 67, 877-881.

Gitlits V. M., Sentry J. W., Matthew M. L., Smith A. I., and Toh B. H. 1997, Autoantibodies to evolutionarily conserved epitopes of enolase in a patient with discoid lupus erythematosus. *Immunology* 92, 362-368.

Goto N., Sugiura K., Ogawa Y., Watanabe A., Onouchi H., Tomita Y., and Muro Y. 2006, Anti7p80 coilin autoantibodies react with a conserved epitope and are associated with anti-DFS70/LEDGF autoantibodies. *J Autoimmun* 26, 42-51.

Granitz U. 1994, [Weak vision and blindness in the dog--a retrospective study]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 107, 295-299.

Keller R. L., Kania S. A., Hendrix D. V., Ward D. A., and Abrams K. 2006, Evaluation of canine serum for the presence of antiretinal autoantibodies in sudden acquired retinal degeneration syndrome. *Vet Ophthalmol* 9, 195-200.

Kurrer M. O., Pakala S. V., Hanson H. L., and Katz J. D. 1997, Beta cell apoptosis in T cell15 mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 213-218.

Laemmli U. K. 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lernmark A. 2001, Autoimmune diseases: are markers ready for prediction? *J Clin Invest* 108, 1091-1096.

Margo C. E., and Lavellee M. 1986, Gamma-enolase activity in choroidal melanoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224, 374-376.

Maruyama I., Ikeda Y., Nakazawa M., and Ohguro H. 2002a, Clinical roles of serum autoantibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients. *Tohoku J Exp Med* 197, 125-132.

Maruyama I., Ohguro, H., Ikeda, Y. 2000. Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1657-1665.

Mattson A., Roberts S. M., and Isherwood J. M. E. 1992, Clinical features suggesting

III. Veröffentlichung Nr. 1

- hyperadrenocorticism associated with sudden acquired retinal degeneration syndrome in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 28, 199-202.
- Miller P. E., Galbreath E. J., Kehren J. C., Steinberg H., and Dubielzig R. R. 1998, Photoreceptor cell death by apoptosis in dogs with sudden acquired retinal degeneration syndrome. *Am J Vet Res* 59, 149-152.
- O'Toole D., Roberts S., and Nunamaker C. 1992, Sudden acquired retinal degeneration ('silent retina syndrome') in two dogs. *Vet Rec* 130, 157-161.
- Palczewski K., Rispoli G., and Detwiler P. B. 1992, The influence of arrestin (48K protein) and rhodopsin kinase on visual transduction. *Neuron* 8, 117-126.
- Parshall C. (1989) Sudden acquired retinal degeneration and immune mediated uveitis/dermatitis as possible autoimmune diseases. The 13th annual kal Kan Symposium for the treatment of small animal diseases, Vernon.
- Rich K.A., Zhan Y., Blanks, J.C. 1997. Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 388, 47-63.
- Seissler J., and Scherbaum W. A. 2002, Are we ready to predict and prevent endocrine/organ specific autoimmune diseases? *Springer Semin Immunopathol* 24, 273-295.
- Sorensen P. S., Wanscher B., Jensen C. V., Schreiber K., Blinkenberg M., Ravnborg M., Kirsmeier H., Larsen V. A., and Lee M. L. 1998, Intravenous immunoglobulin G reduces MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 50, 1273-1281.
- Thewissen M., Somers V., Hellings N., Fraussen J., Damoiseaux J., and Stinissen P. 2007, CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol* 179, 6514-6523.
- Van der Woerd A., Nasisse M. P., and Davidson M. G. 1991, Sudden acquired retinal degeneration in the dog: clinical and laboratory findings in 36 cases. *Prog Vet Comp Ophthalmol* 1, 11-18.
- Vanisi S. J., Schmidt G. M., West C. S., Anderson R., Herrmann K., Ketring K., and Font R. L. (1983) Metabolic Toxic Retinopathie - Preliminary report. 14th Meeting of the Transactions of the American College of Veterinary Ophthalmologists, Vol. 14, p. 76-81.
- Venter I. J., and Petrick S. W. 1995, Akute Blindheit in 'n Hond verorsaak deur skielike verworwe retinale degenerasie. *Tydskr. S. Afr. vet. Ver.* 66, 32-34.

III. Veröffentlichung Nr. 1

Vincent A., Willcox N., Hill M., Curnow J., MacLennan C., and Beeson D. 1998, Determinant spreading and immune responses to acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Immunol Rev* 164, 157-168.

Wacker W. B., Donoso L. A., Kalsow C. M., Yankeelov J. A., Jr., and Organisciak D. T. 1977, Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* 119, 1949-1958.

Wick G., Sundick R. S., and Albin B. 1974, A Review: The Obese Strain (OS) of Chickens: An Animal Model with Spontaneous Autoimmune Thyroiditis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 3, 272-300.

Abbildungen und Tabellen

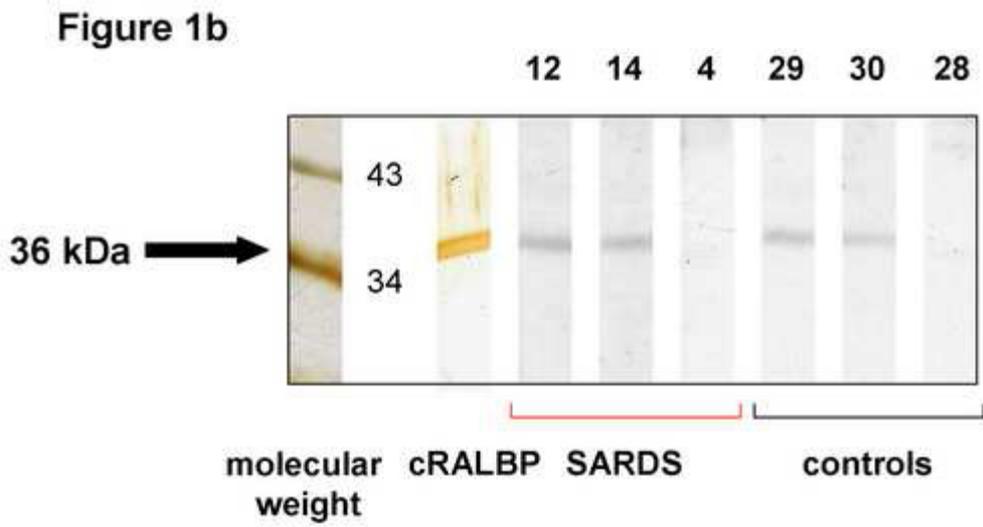
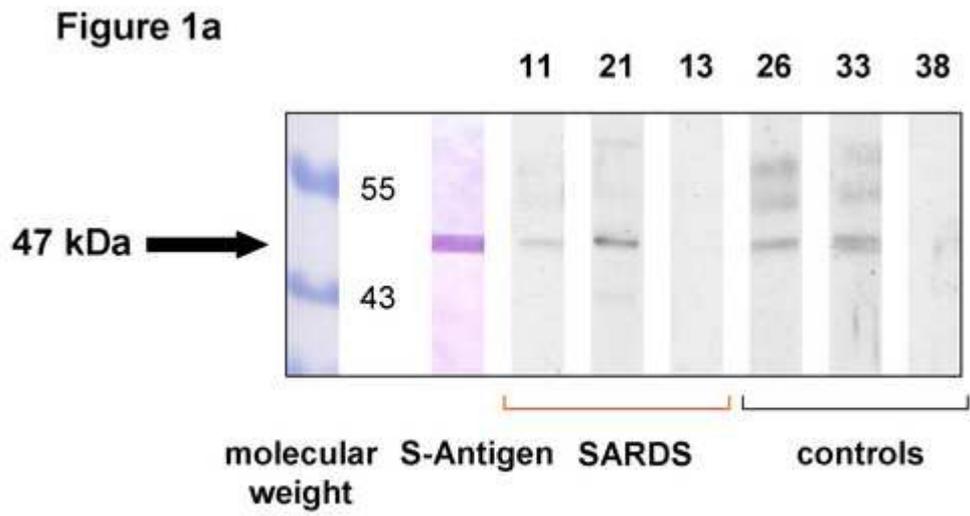


Figure 2a

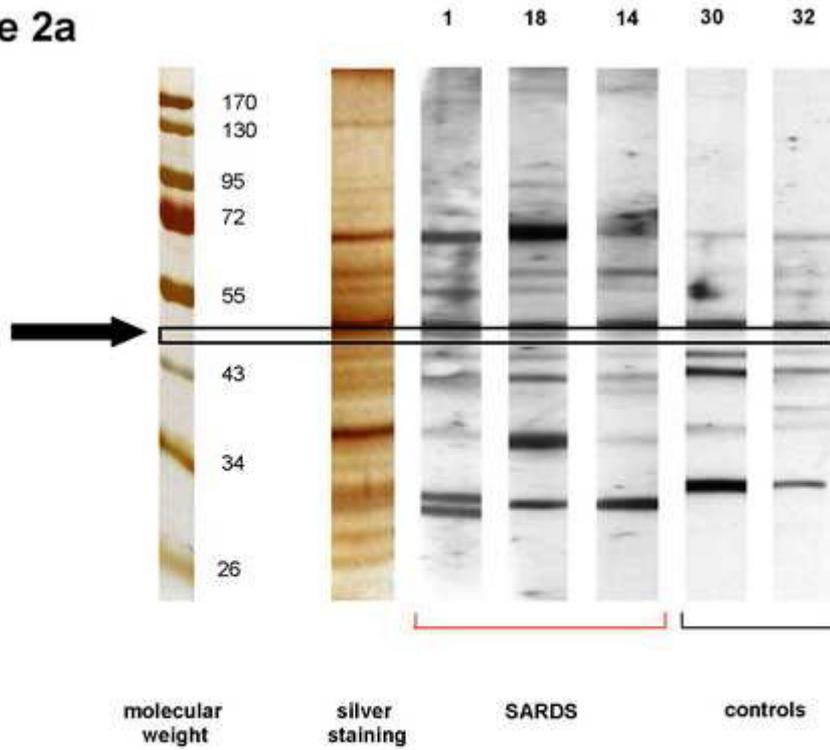


Figure 2b



Figure 3

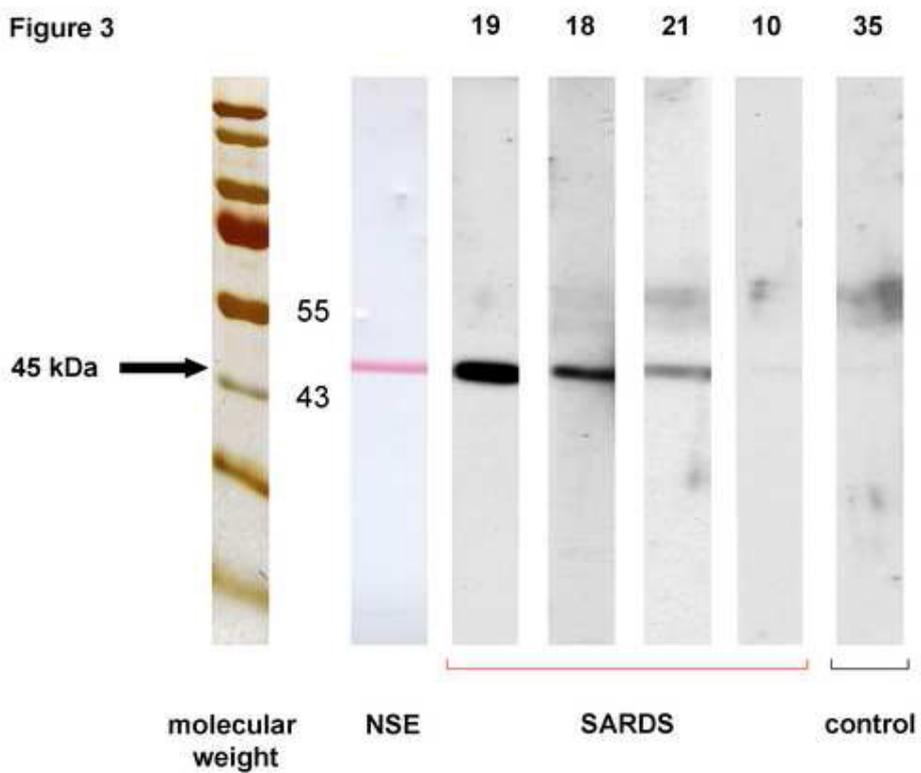


Figure 4

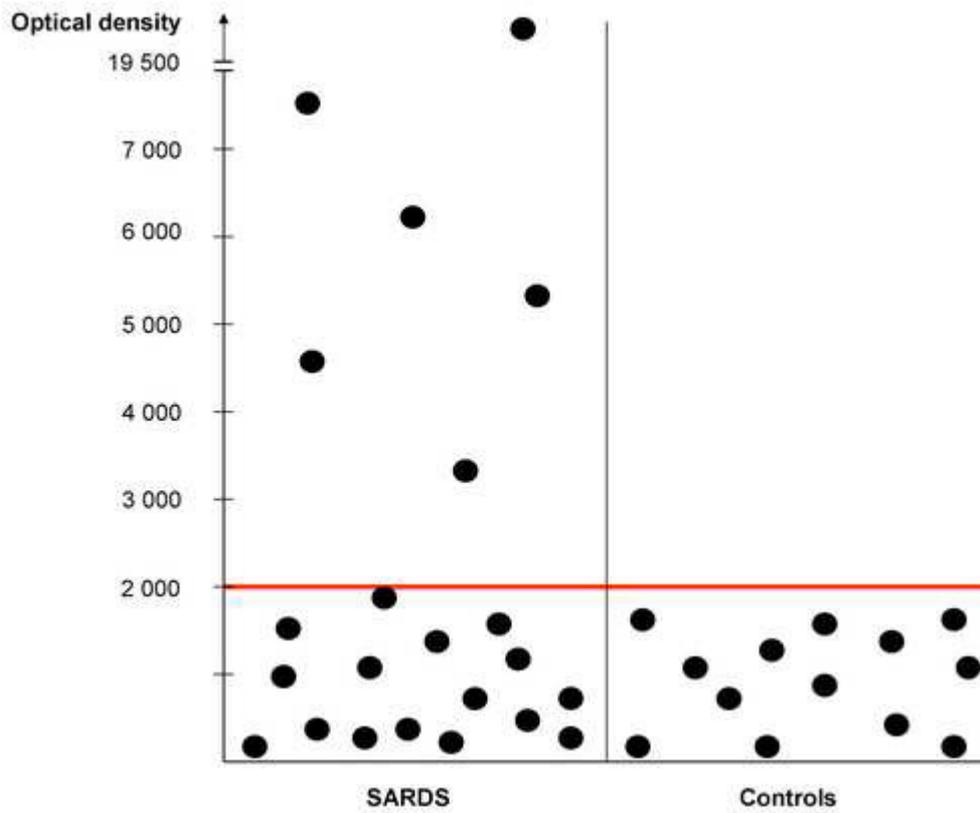


Table 1: Identification of candidate autoantigen

Band-ID	Protein Name	Species	Accession number	MW (Da)	PI	Protein Score
1 (black arrow)	Gamma-Enolase	human	ENOG_HUMAN	47107	4,91	66

Bildunterschriften

figure 1:

Western Blots using purified S-Antigen (1a) and CRALBP (1b) as autoantigens in SARDS affected dogs and normal controls. Anti S- Antigen and CRALBP autoantibodies were detectable in SARDS affected dogs and normal controls. There is no significant difference between the two groups.

figure 2:

Identification of different autoantigens. Porcine retinal proteins were dissociated by SDS-Page, blotted on nitrocellulose and then tested with SARDS- and control-sera. Many reactions to retinal antigens from SARDS patients and normal controls can be seen. Some reactions can be identified in all animals, others mainly in SARDS patients. The band of interest is assigned by a black arrow and is demonstrated enlarged underneath (Fig. 2b).

figure 3:

Purified NSE (lane 2: ponceau stain of transferred protein) probed with autoantibodies from SARDS patients and controls. Strong reactivity to purified NSE was only found in 25% of SARDS patients (exemplary shown number 18, 19 and 21).

figure 4:

Reactivity to NSE: 6 out of 24 patients affected by SARDS show higher reactivity to NSE than normal controls

table 1:

Identification of candidate autoantigen by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. The indicated band was identified as Gamma Enolase. Protein scores greater than 59 are significant ($p < 0.05$) as given by MASCOT.

IV. Veröffentlichung Nr. 2

Titel: "Der klinische Fall: Plötzliche Erblindung bei einer Dackelhündin"

Autor: B. K. Braus

Zeitschrift: Tierärztliche Praxis Kleintiere 2008, 36 1: 26-46.

Plötzliche Erblindung bei einer Dackelhündin

Patient

Rauhhaardackel, weiblich kastriert, 8 Jahre alt

Anamnese

Die Hündin läuft seit fünf Tagen plötzlich gegen Gegenstände, vor allem in fremder Umgebung. Ein Unterschied zwischen Tag- und Nachtsehen besteht nicht. Die Besitzerin bemerkte zudem, dass die Augen im auffallenden Licht grün aufleuchten. Kurz vor der Erblindung zeigte die Hündin vermehrte Unruhe und Polyphagie. Ein Trauma ist nicht bekannt. Bislang erfolgte keine Therapie.

Klinische Untersuchung

Die Hündin weist ein ungestörtes Allgemeinbefinden auf, erscheint aber desorientiert. Beim Freilauf im Untersuchungszimmer stößt sie sowohl im hellen als auch im abgedunkelten Raum an den Untersuchungstisch und Einrichtungsgegenstände. Bei der Augenuntersuchung fallen zunächst beidseits die mydriatischen Pupillen auf. Der direkte und indirekte Pupillarreflex lassen sich nur verzögert auslösen, die Drohreaktion und der Blendreflex („Dazzle Reflex“) sind negativ.

Augenlider und Adnexe zeigen sich unauffällig, Augenausfluss besteht nicht. Hornhaut, vordere Augenkammer und Linse sind beidseits transparent und reizlos. Anzeichen eines Traumas können nicht festgestellt werden. Abbildung 1 zeigt den Fundus des linken Auges. Unterschiede zwischen rechtem und linkem Augenhintergrund finden sich nicht. Der Augeninnendruck, gemessen mit dem TonoVet® beträgt rechts 20 mmHg, links 19 mmHg.

Problemliste

Anhand der erhobenen Befunde lässt sich folgende Problemliste aufstellen:

- Plötzliche Erblindung
- Mydriasis
- Negativer Pupillarreflex
- Polyphagie
- Unruhe

Differenzialdiagnosen

Das Hauptproblem ist die plötzliche, beidseitige Erblindung. Dafür kommen folgenden Differenzialdiagnosen in Betracht:

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Plötzliche Trübung der durchsichtigen Medien des Auges2. Akuter Verlust der retinalen Funktion3. Dysfunktion der reizweiterleitenden Strukturen4. Zentrale Blindheit |
|--|

Ad 1

Schwerwiegende **Trübungen** des vorderen oder hinteren Augenabschnitts können den Visus stark einschränken und bis zur Erblindung führen. Im Bereich des vorderen Augenabschnitts ist die diabetische Katarakt ein möglicher Befund. Im hinteren Abschnitt können vitreale oder retinale Einblutungen sowie uveitisch bedingte Fibrineinlagerungen eine plötzliche Erblindung hervorrufen.

Bei der vorgestellten Hündin ist der Fundus uneingeschränkt einsehbar und kein Anzeichen einer Eintrübung feststellbar.

Ad 2

Ein **akuter, vollständiger Verlust der retinalen Funktion** tritt entweder in Folge einer kompletten Netzhautablösung oder des Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome (SARDS) auf. Bei beiden Erkrankungen ist die Pupille weit und reagiert nicht oder nur verzögert auf Lichteinfall. Die Diagnose „Ablatio retinae“ kann ophthalmoskopisch gestellt werden. Beim SARDS erscheint die Netzhaut dagegen zunächst unauffällig.

Ophthalmoskopisch ist der Fundus unauffällig. Das SARDS kommt als Diagnose in Betracht.

Ad 3

Eine **Dysfunktion der reizweiterleitenden Strukturen** kann durch Glaukom, Neuritis Nervi optici, Traumata oder durch Tumoren am N.opticus bedingt sein. Auffallend ist immer die weite, nicht lichtresponsive Pupille.

IV. Veröffentlichung Nr. 2

Das Glaukom wird mit der Messung des Augeninnendrucks abgeklärt. Bei der Neuritis nervi optici manifestiert sich die Entzündung entweder nahe am Bulbus als Papillitis oder näher am Gehirn als retrobulbäre oder prälaminiäre Optikusneuritis. Eine Papillitis fällt ophthalmoskopisch durch Schwellung des Sehnervenkopfes auf. Bei einer retrobulbären oder prälaminiären Neuritis nervi optici erscheint der Fundus unauffällig. Die Entzündung des Sehnerven stellt die bedeutendste Differenzialdiagnose zum SARDS dar. Um die retrobulbäre Optikusneuritis von einem SARDS zu differenzieren, ist ein Elektroretinogramm abzuleiten. Im Gegensatz zum SARDS zeigt sich bei der Optikusneuritis eine erhaltene Netzhautfunktion.

Der Augeninnendruck der Hündin liegt beidseits im Referenzbereich. Der Fundus ist unauffällig. Eine retrobulbäre oder prälaminiäre Optikusneuritis kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

Ad 4

Als Ursache für **zentrale Blindheit** kommt eine chronische Enzephalitis (z.B. bedingt durch Staupe), eine Intoxikation, eine tentoriale Herniation oder ein Kopftrauma in Frage. Bei zentraler Blindheit sind alle okularen Funktionen erhalten. Neben dem Pupillarreflex ist auch der Blendreflex („Dazzle Reflex“) weiterhin positiv.

Aufgrund des ungestörten Allgemeinbefindens, des negativen Pupillarreflexes und Blendreflexes ist eine zentrale Erblindung bei der Hündin eher unwahrscheinlich.

Weiterführende Diagnostik

Um die Ursache der Erblindung genauer zu lokalisieren, wurde ein **Elektroretinogramm (ERG)** (RETIport©) abgeleitet. Hierfür erfolgt in Allgemeinanästhesie eine Stimulation der Retina durch Lichtblitze. Eine funktionstüchtige Netzhaut generiert elektrische Potentiale, die durch Nadelelektroden abgeleitet werden. Die physiologische Antwort auf einen spezifischen Lichtreiz ist eine biphasische Kurve mit zwei Kurvenmaxima (Abb.2a).

Bei der vorgestellten Hündin ergibt das Elektroretinogramm eine beidseits erloschene Netzhautfunktion, die sich als flache Linie (sog. Flatline; Abb. 2b) darstellt. Dadurch lässt sich die Ursache der Erblindung trotz des unauffälligen

Fundus auf die Retina lokalisieren und es kann die Diagnose SARDS gestellt werden.

Diagnose

Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome

Therapie

Bislang gibt es für das SARDS keine gesicherte Behandlung. Da zwischen dieser Erkrankung und der Neuritis nervi optici aber zumindest ophthalmoskopisch eine sehr große Ähnlichkeit besteht, rät Gränitz (Gränitz 2001) im Zweifel zur Behandlung mit Kortikosteroiden in absteigender Dosierung über mehrere Tage.

Im Mai 2007 wurden zwei blinde Hunde mit SARDS an der Iowa State University mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg) behandelt (<http://www.iastate.edu/~nscentral/news/2007/may/blind.shtml>). Die Tiere erlangten danach wieder einen wenn auch eingeschränkten Visus und konnten somit Gegenständen ausweichen. IVIg werden erfolgreich bei der Therapie autoimmuner Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose eingesetzt (Sorensen et al. 1998). Das aus dem gepoolten Plasma gesunder menschlicher Spender gewonnene Therapeutikum enthält vor allem hochgereinigtes, polyvalentes Immunglobulin G. Noch ist aber unklar, wie lange der durch die Behandlung mit IVIg wiedererlangte Visus erhalten bleibt. Bislang gibt es dazu keine Literaturangaben.

Prognose

Da es derzeit keine gesicherte Therapie für das SARDS gibt, ist die Prognose quo ad visus infaust.

Epikrise

Das Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome (SARDS) ist eine seltene Erkrankung beim Hund, die mit bilateraler Erblindung einhergeht. Es wurde erstmals 1977 erwähnt (Vanisi et al. 1983). Die Erblindung tritt plötzlich, innerhalb von wenigen Tagen bis Wochen auf. Ophthalmoskopisch erscheint die Netzhaut dabei völlig unauffällig. Nur durch die elektrophysiologische Überprüfung mittels Elektroretinogramm kann die fehlende retinale Funktion nachgewiesen werden.

IV. Veröffentlichung Nr. 2

Typischerweise haben die erkrankten Hunde ein mittleres bis hohes Alters und oft handelt es sich um weiblich-kastrierte Tiere (O'Toole et al. 1992). Alle Rassen können betroffen sein, obwohl von einer Häufung der Fälle bei Dackeln berichtet wird (van der Woerd et al. 1991). Auch retrospektive Untersuchungen (Daten nicht publiziert) an 39 Hunden mit SARDS im Münchener Raum ergaben ein vermehrtes Auftreten dieser Erkrankung beim Dackel. Zum Vergleich wurden die Daten des Kassen und Steueramtes München herangezogen, das die Hundesteuer verwaltet. Abbildung 3 zeigt, dass die Häufung von Dackeln mit SARDS nicht mit einer eventuellen Häufung dieser Rasse im Münchner Raum zu erklären ist. Auch eine Häufung von weiblich kastrierten Hündinnen (51,3 %) ließ sich im Münchner Patientengut nachweisen. Das Durchschnittsalter der untersuchten Patienten betrug 8,8 Jahre.

Viele der an SARDS erkrankten Tiere sind leicht übergewichtig. Besitzer berichten oft von Polyurie, Polydipsie und Polyphagie, manchmal auch von Nyctalopie. Das Allgemeinbefinden der Hunde ist nicht gestört. Die Bestimmung klinisch-chemischer Parameter ergibt oft auffällige Befunde. Bei ungefähr der Hälfte der an SARDS erkrankten Tiere sind erhöhte Werte der alkalischen Phosphatase (Vanisi et al. 1983), des Kortisols, der Aspartat Aminotransferase (Chastain et al. 1985) sowie des Cholesterins (Acland und Aguirre 1986) festzustellen.

Der Fundus präsentiert sich bei Krankheitsausbruch ophthalmoskopisch unauffällig oder weist allenfalls leichte Veränderungen in Form einer geringgradigen Hyperreflexie des Tapetum lucidum oder einer Attenuation der retinalen Gefäße auf (Abb. 4a). Eigene ophthalmologische Untersuchungen an 17 SARDS Patienten, die nach unterschiedlich langen Erkrankungsdauern erneut untersucht wurden zeigen, dass sich die Retina nach Krankheitsausbruch zunehmend degenerativ verändert (Abb. 4b-d). Der Fundus von Hunden mit länger andauerndem SARDS ähnelt dem von Hunden mit Progressiven Retinaatrophie. Im Gegensatz zum SARDS erblindenden Hunde mit PRA aber schleichend. Um die Vorgänge an der Retina graphisch darzustellen wurden die Fundi der Patienten fotografisch dokumentiert, miteinander verglichen und den Abbildungen 4a-d entsprechend nach einem Scoring beurteilt (Abb. 5). Bei dem Vergleich der Erkrankungsdauer mit dem Zustand der Retina zeigt sich, dass die ophthalmoskopisch erkennbare Degeneration der Netzhaut im Laufe der Zeit linear zunimmt.

IV. Veröffentlichung Nr. 2

Die Ätiologie des SARDS ist bis heute ungeklärt. Nach der Erstbeschreibung der Erkrankung in den achtziger Jahren ging man zunächst von einem defekten Fettmetabolismus der betroffenen Tiere aus, durch den freie Lipidradikale toxisch auf Stäbchen und Zapfen wirken sollten (Vanisi et al. 1983). Auch O´Toole (1992) vermutete aufgrund histologischer Untersuchungen, die einen massiven und selektiven Verlust der äußeren Segmente der Stäbchen und Zapfen zeigten, ein toxisches Geschehen. Ein Nachweis konnte aber bislang nicht erbracht werden. Aufgrund der abweichenden Befunde bei den klinisch-chemischen Parametern sowie der Polydipsie und Polyphagie wurde auch ein Zusammenhang zwischen SARDS und einem Hyperadrenokortizismus vermutet (Mattson et al. 1992), der sich jedoch ebenfalls bis dato nicht bestätigen ließ.

Zwei im Jahr 2006 publizierte Studien untersuchten eine mögliche autoimmune Genese von SARDS. Beide Studien untersuchten Hundeseren auf das Vorhandensein von antiretinalen Antikörpern mittels ELISA und Western Blot. Die Autoantikörperprevalenz differierte jedoch zwischen gesunden Kontrolltieren und Hunden mit SARDS nicht (Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Studie von 1988, bei der Autoantikörper in den Seren von SARDS-Patienten nachgewiesen werden konnten (Bellhorn et al. 1988).

Fazit für die Praxis

Bei plötzlicher beidseitiger Erblindung und unverändertem Fundus sollte differenzialdiagnostisch an das SARDS gedacht werden. Oft sind Dackel betroffen. Um SARDS von einer Neuritis nervi optici abzugrenzen, ist ein Elektoretinogramm abzuleiten. Für SARDS gibt es bislang keine gesicherte Therapie.

Literatur

1. Gränitz U: Plötzliche Erblindung bei einem Dackel. *Tierärztl Praxis* 2001, 29:173-175.
2. Sorensen PS, Wanscher B, Jensen CV, Schreiber K, Blinkenberg M, Ravnborg M, Kirsmeier H, Larsen VA, Lee ML: Intravenous immunoglobulin G reduces MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 1998, 50:1273-1281.
3. Vanisi SJ, Schmidt GM, West CS, Anderson R, Herrmann K, Ketring K, Font RL: Metabolic Toxic Retinopathie - Preliminary report. *14th Meeting of the Transactions of the American College of Veterinary Ophthalmologists* 1983, 14:76-81.
4. O'Toole D, Roberts S, Nunamaker C: Sudden acquired retinal degeneration ('silent retina syndrome') in two dogs. *Vet Rec* 1992, 130:157-161.
5. van der Woerd A, Nasisse MP, Davidson MG: Sudden acquired retina degeneration in the dog: Clinical and laboratory findings in 36 cases. *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology* 1991, 1:11-18.
6. Chastain CB, Franklin RT, Ganjam VK, Madsen RW: Evaluation of the Hypothalamic Pituitary-Adrenal Axis in Clinically Stressed Dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1985, 22:435 - 442.
7. Acland GM, Aguirre GD: Sudden acquired retina degeneration: clinical signs and diagnosis. *Transactions of the 17th annual scientific program of the American College of Veterinary Ophthalmologists* 1986:58 - 63.
8. Schaarschmidt H, Prange, H.W. Price, W.J., White, R.F., Feuerstein, G., Storer, B.L.: Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular disease. *Stroke* 1994, 25:558-565.
9. Mattson AR, S. M.; Isherwood, J. M. E.: Clinical features suggesting hyperadrenocorticism associated with sudden acquired retinal degeneration syndrome in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1992, 28:199-202.
10. Keller RL, Kania SA, Hendrix DV, Ward DA, Abrams K: Evaluation of canine serum for the presence of antiretinal autoantibodies in sudden acquired retinal degeneration syndrome. *Vet Ophthalmol* 2006, 9:195-200.
11. Gilmour MA, Cardenas MR, Blaik MA, Bahr RJ, McGinnis JF: Evaluation of a comparative pathogenesis between cancer-associated retinopathy in humans

IV. Veröffentlichung Nr. 2

and sudden acquired retinal degeneration syndrome in dogs via diagnostic imaging and western blot analysis. *Am J Vet Res* 2006, 67:877-881.

12. Bellhorn RW, Murphy CJ, Thirkill CE: Anti-retinal Immunoglobulins in Canine Ocular Diseases. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 1988, 3:28 - 32.

Abbildungen:



Abb. 1

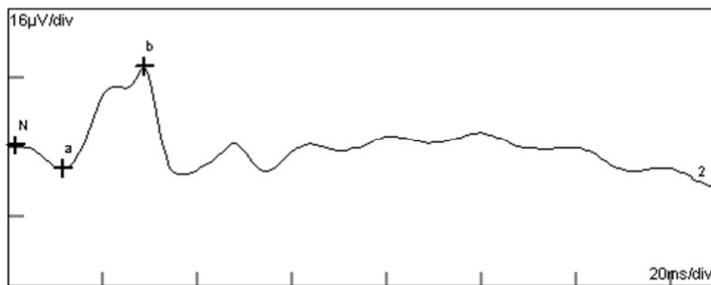


Abb. 2a

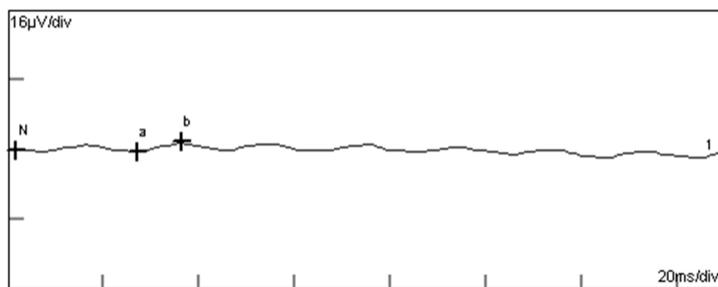


Abb. 2b

IV. Veröffentlichung Nr. 2

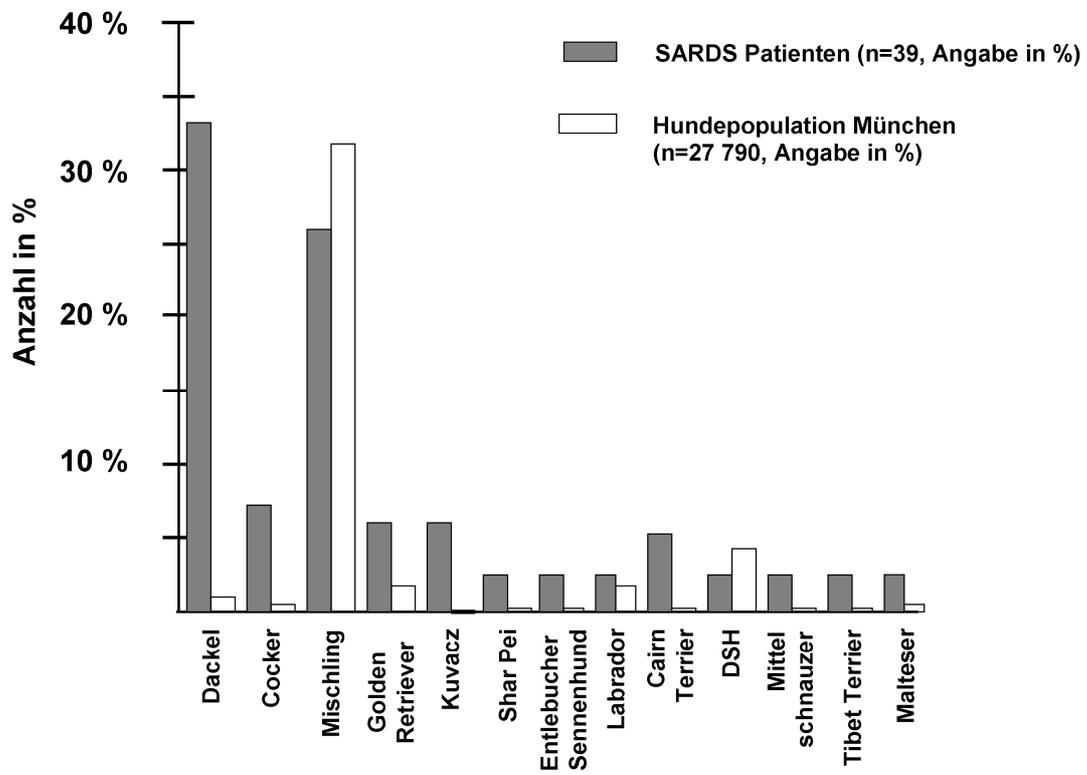


Abb. 3

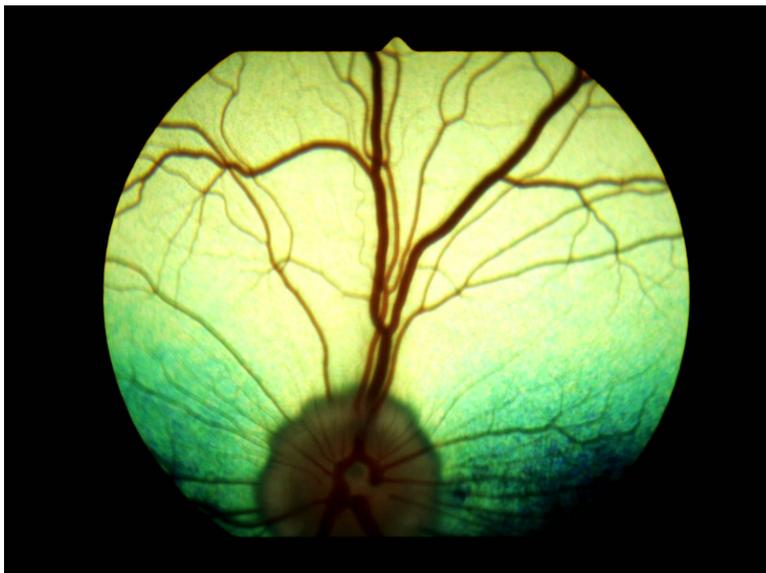


Abb. 4a

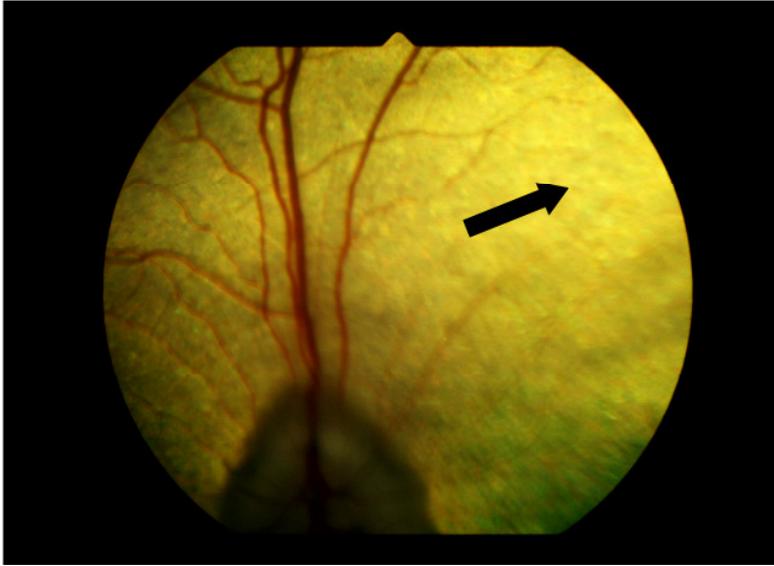


Abb. 4b

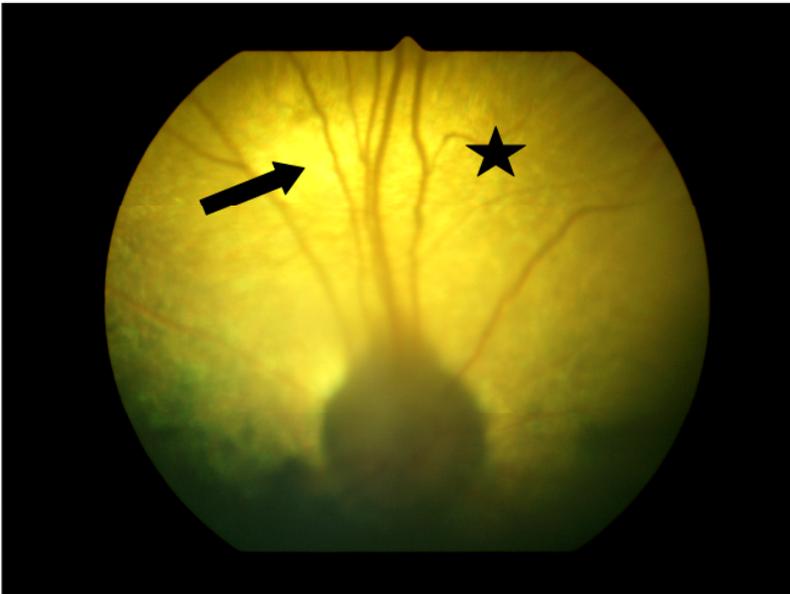


Abb. 4c

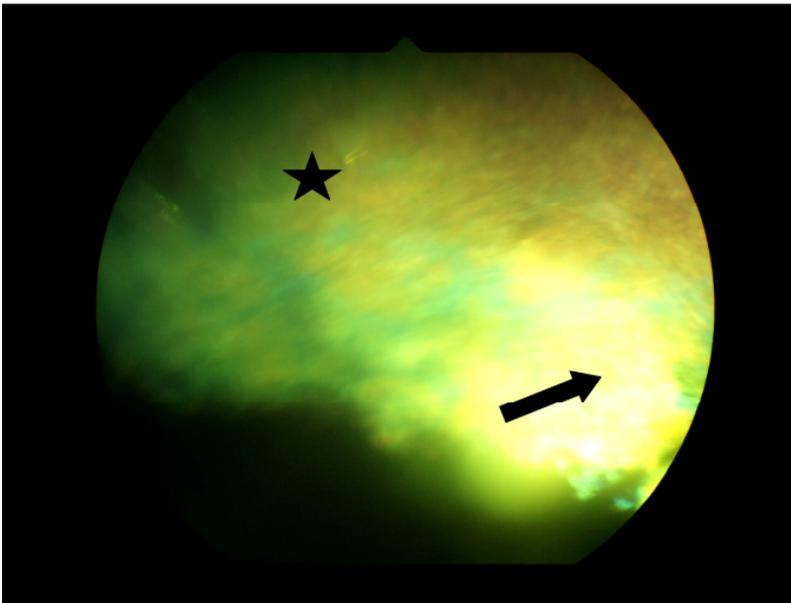


Abb. 4d

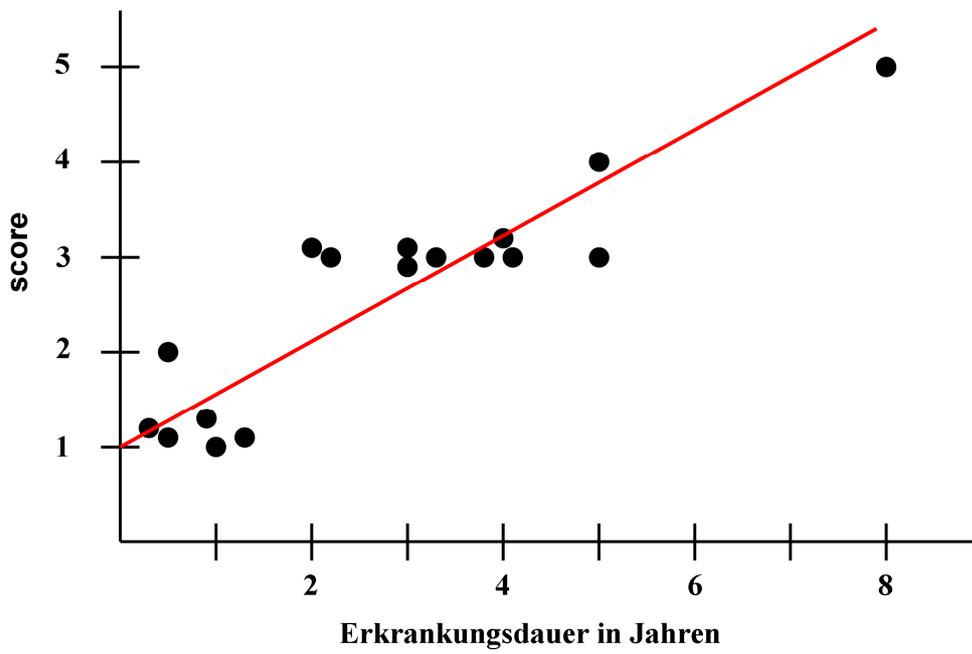


Abb. 5

Bildunterschriften

- Abb. 1 Fundus des linken Auges der Dackelhündin
- Abb. 2 Elektroretinogramm (ERG)
- a) Das physiologische ERG besteht aus einer typischen Kurvenform, die sich biphasisch aus der negativen a- und positiven b-Welle zusammensetzt.
- b) Erloschenes ERG: keine Netzhautfunktion vorhanden
- Abb. 3 Rassenverteilung von 39 an SARDS erkrankten Tieren im Vergleich zur Münchner Hundepopulation. Auffallend ist eine deutliche Häufung von an SARDS erkrankten Dackeln (33,3 Prozent; N=13). In der Münchner Hundepopulation gibt es nur 0,92 % gemeldete Dackel (N=256). Obwohl die Gesamtzahl der beiden Gruppen stark differiert, scheinen Dackel besonders häufig von SARDS betroffen zu sein.
- Abb. 4 Veränderungen des Fundus im Verlauf des SARDS; a) Fundus zu Erkrankungsbeginn: ohne besonderen Befund; b) geringgradig veränderter Fundus mit geringgradiger Hyperreflexie des Tapetum lucidum; c) mittelgradig veränderter Fundus mit deutlicher Gefäßattenuation; d) hochgradig veränderter Fundus mit massiver Hyperreflexie des Tapetum lucidum (Pfeil) und völligem Schwund der retinalen Gefäße (Stern)
- Abb. 5 Fundusveränderungen bei Patienten mit SARDS mit SARDS. Die Graphik zeigt, dass sich der Augenhintergrund dieser Tiere nach Erkrankungsausbruch zunehmend degenerativ verändert. Netzhautscore (entsprechend Abb. 4a-d): 1 = o.b.B., 2 = geringgradig verändert, 3 = mittelgradig verändert, 4 = hochgradig verändert, 5 = Fundus nicht einsehbar

IV. Veröffentlichung Nr. 2

Danksagung

Die beschriebenen Untersuchungen an Patienten im Münchener Raum wurden durch die Förderung der Hanns Seidel Stiftung e.V. ermöglicht.

V. Diskussion

Obgleich das SARDS bereits erstmals auf der Midwest Veterinary Ophthalmology Conference in Columbus, Ohio erwähnt (Vanisi et al. 1983), ist die Ursache der Erkrankung nach wie vor nicht geklärt.

Alle Autoren schildern die Klinik des SARDS gleich: Typisch sei die plötzliche Erblindung innerhalb weniger Tage bis Wochen. Die Tiere werden mit weiter, meist nicht oder kaum lichtresponsiver Pupille vorgestellt. Die Retina der betroffenen Tiere zeigt keine ophthalmoskopisch wahrnehmbaren Veränderungen, das Elektroretinogramm beweist aber die erloschene Netzhautfunktion.

Bis heute gibt es keine wissenschaftlich erwiesene Therapie für das SARDS. Da die Ähnlichkeit von SARDS mit der Neuritis nervi optici aber zumindest ophthalmoskopisch sehr groß ist, wurde die Behandlung mit Kortikosteroiden in absteigender Dosierung über mehrere Tage empfohlen (Gränitz 2001), eine Therapie, die bei der Neuritis nervi optici erfolgversprechend ist, bei SARDS allerdings nicht.

Als Ursache des SARDS wurde zunächst eine toxische Zerstörung der Photorezeptoren aufgrund von freien Lipid-Radikalen vermutet, die speziell die äußeren Segmente der Photorezeptoren zerstören sollen (Vanisi et al. 1983). Diese Überlegung entstand, weil man bei laborchemischen Untersuchungen bei der Hälfte der SARDS-Patienten erhöhte Cholesterol, Alanin-Aminotransferase (ALT), Alkalische Phosphatase (AP) und Aspartat-Aminotransferase (AST) Werte fand. Diskutiert wurde daraufhin, dass diese Veränderungen einen defekten Fettmetabolismus und daraus resultierend die Bildung freier Lipidradikale repräsentieren könnten (Vanisi et al. 1983).

Aufgrund der hohen Konzentration an ungesättigten Fettsäuren, dem permanenten Lichteinfall und dem hohen Verbrauch an Sauerstoff reagiert die Retina sehr sensibel auf oxidative Schäden (Zapata et al. 2007). Die ungesättigten Fettsäuren der Retina könnten rasch durch freie Radikale geschädigt werden. Dabei ist der prinzipielle Mechanismus dieses Zellschadens die Lipid Peroxidation, die bei oxidativem Stress in aeroben Organismen auftritt (Zapata et al. 2007). Trotzdem ist die spezielle Entstehung von Lipid-Radikalen, die auf die Retina einwirken könnten bislang nicht experimentell stichhaltig nachgewiesen.

V. Diskussion

In der Humanmedizin werden freie Radikale mit der Entstehung der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) in Verbindung gebracht. Von dieser Erkrankung sind vor allem ältere Menschen über 65 Jahren betroffen (Drobek-Slowik et al. 2007). Die Makula betroffener Augen atrophiert. Daraufhin setzt eine Gefäßneubildung von der Choroidea ausgehend ein, die die Funktion der normalerweise gefäßlosen Makula stark einschränkt (Jager und Klaver 2007). Es wird vermutet, dass die Erkrankung aufgrund einer Abnahme von antioxidativen Enzymen entstehen könnte. Die Abnahme dieser Enzymkonzentration in der Retina wird durch eine Erhöhung von Stickstoffmonoxiden und eine gesteigerte Lipid-Peroxidation erklärt (Evereklioglu et al. 2003).

Der Verlauf von SARDS und AMD ist komplett unterschiedlich. SARDS verläuft mit akuter Erblindung ohne sichtbare Veränderungen an der Netzhaut, die AMD verläuft schleichend mit sichtbaren, lokalisierten Veränderungen.

Es gibt keine Studien darüber, dass ein vermehrtes Auftreten von freien Radikalen zu so einem akuten Krankheitsverlauf führt, wie es bei SARDS beobachtet wird. Zudem ist das SARDS nicht auf eine Region der Retina, etwa der area centralis retinae, die in etwa der menschlichen Makula entspricht, beschränkt, sondern betrifft alle Photorezeptoren gleichermaßen (Acland et al. 1984).

Es gibt bislang nur Studien bei Mäusen, die die Wirkung von freien Radikalen in der Retina untersucht haben (Yu et al. 2008). Oxidativer Stress, und damit die Bildung von freien Radikalen, wurde hier durch die Gabe von organophosphorhaltigen Insektiziden induziert. Die histologische Untersuchung zeigte das Auftreten von geschrumpften Zellen, ZellkernfrAGMENTATION und das Auftreten von apoptotischen Zellen. Eine ophthalmologische Untersuchung des Auges, eine allgemeine Untersuchung der Tiere oder aber das Ableiten eines Elektoretinogrammes wurde nicht durchgeführt (Yu et al. 2008). Eine direkte Vergleichbarkeit zum SARDS beim Hund ist daher nicht gegeben.

Eine weitere Hypothese zur Entstehung des SARDS ist die systemische Intoxikation der betroffenen Tiere (O'Toole et al. 1992). Nachdem die Retinae von zwei erkrankten Hunden histologisch untersucht und eine selektive, massive Zerstörung der Stäbchen und Zapfen beobachtet wurde, wurde vermutet, dass diese spezifischen Veränderungen durch eine systemische Intoxikation oder durch radioaktive Strahlung entstehen könnten (O'Toole et al. 1992). Konkrete Untersuchungen in dieser Richtung wurden von den Autoren nicht durchgeführt und

V. Diskussion

es erscheint auch fraglich, ob derartige Studien gewinnbringend wären. Es ist daher unwahrscheinlich, dass eine Intoxikation sich nur lokal auf das Auge auswirken soll oder die radioaktive Strahlung nur ein einzelnes Tier anstatt einer bestimmten Population an dem Ort der Exposition betreffen soll.

Beschrieben ist allerdings die plötzliche Erblindung zweier Hunde nach Gabe von Ivermectin (Ketring 1989). Dabei waren an der Retina deutliche Veränderungen zu sehen, neben einer Schwellung an der Papille waren retinale Falten und eine partielle Ablatio retinae zu beobachten.

Der Unterschied zwischen einer Ivermectin Intoxikation und SARDS ist erheblich. Bei SARDS ist der Fundus unauffällig, bei einer Ivermectin Intoxikation zeigen sich die oben beschriebenen Veränderungen (Schwellung der Papille, retinale Falten, partielle Ablatio retinae). Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass Hunde mit SARDS vor Krankheitsbeginn eine Intoxikation erlitten haben, außerdem wird in der Literatur bei SARDS Patienten nie über eine Applikation von Ivermectin berichtet (Acland und Aguirre 1986; Acland et al. 1984; Gilmour et al. 2006; Gränitz 2001; Keller et al. 2006; O'Toole et al. 1992; van der Woerd et al. 1991). Um eine eventuelle Intoxikation von SARDS Patienten zu erkennen, müssten akut an SARDS erblindete Patienten einem Screening auf toxikologische Veränderungen unterzogen werden. Ohne entsprechende Untersuchungen kann die Möglichkeit einer Intoxikation deshalb bislang weder bestätigt, noch verworfen werden.

Viele Studien über SARDS berichten von klinischen Symptomen erkrankter Tiere, die durch das Vorliegen eines Hyperadrenokortizismus erklärbar wären. So wird in der Literatur immer wieder über Polyurie, Polydipsie, Polyphagie, Gewichtszunahme und Lethargie der SARDS Patienten berichtet (Acland und Aguirre 1986; Parshall 1989; Vanisi et al. 1983). Es wurde deshalb diskutiert, ob die betroffenen Tiere an einem Hyperadrenokortizismus leiden könnten. Eine Studie untersuchte daraufhin einen Hund mit SARDS und den oben beschriebenen Veränderungen, konnte aber trotz erhöhter Serumkortisolwerte keinen Hyperadrenokortizismus feststellen (Mattson et al. 1992). Die Autoren vermuteten deshalb, dass die Veränderungen der Serumwerte von dem untersuchten Tier aufgrund von Stress zustande gekommen seien, den das Tier durch die Erblindung erleidet (Mattson et al. 1992) oder dass SARDS Patienten an einem wie auch immer gearteten physiologischen Hyperadrenokortizismus haben sollen (Acland und Aguirre 1986).

V. Diskussion

Bekannt ist, dass raumfordernde hypophysäre Makroadenome, die sekundär zu einem Hyperadrenokortizismus führen, eine Atrophie des Tractus opticus aufgrund einer Kompression verursachen können (Fracassi et al. 2007). Die Erblindung ist in dem Fall nicht auf metabolische Veränderungen, sondern auf den raumfordernden Prozess zurückzuführen (Fracassi et al. 2007; Miller 1991).

Im Jahr 2006 wurden 15 SARDS Patienten an der Oklahoma State University auf das Vorhandensein von hypophysären Neoplasien mittels Computertomographie untersucht. Keines der Tiere hatte einen derartigen Tumor, der entweder durch Kompression auf den Tractus opticus oder durch metabolische Veränderungen Neben den computertomographischen Untersuchungen wurden keine weiteren Tests durchgeführt und es bleibt daher weiterhin fraglich, ob SARDS-Patienten überhaupt an einem Hyperadrenokortizismus leiden. Trotzdem ist die Symptomatik der Patienten auffallend und es müssten weitere Studien an einer ausreichenden Patientenzahl durchgeführt werden, um diese Hypothese zu untermauern.

Aufgrund des gehäuften Auftretens von SARDS beim Dackel wurde eine genetische Ätiologie des SARDS schon früher vermutet. Dackel scheinen in einem Teil der Studien überproportional häufig von SARDS betroffen zu sein (Gränitz 2001; van der Woerd et al. 1991). Die retrospektiven Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten auch hier, dass der Dackel besonders häufig betroffen war. 33,3% (13 von 39). Um diese Prädisposition nicht durch eine zufällige Häufung von Dackeln im Münchner Raum relativieren zu müssen, wurden die SARDS-Daten mit den Daten des Kassen und Steueramtes verglichen, das die Hundesteuer verwaltet. Hier ist der Dackel nur mit einer Häufigkeit von 0,92 % in der Münchner Hundepopulation vertreten. Der Aspekt einer genetischen Disposition erscheint daher möglich und sollte weitergehend anhand von Stammbaumanalysen untersucht werden. Neue Fälle von SARDS sollten außerdem multizentrisch der Rasse zugeordnet werden, um die Häufung beim Dackel zu überprüfen.

Eine weitere Hypothese für die Ätiologie des SARDS ist eine Autoimmunreaktion gegen retinale Antigene. Dies wurde bisher in drei Studien untersucht (Bellhorn et al. 1988; Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006). Nur in einer Untersuchung (Bellhorn et al. 1988) wurden bei fünf von fünf untersuchten SARDS Hunden und bei keinem der gesunden Kontrolltiere zirkulierende antiretinale Antikörper nachgewiesen. Die exakten Ziel-Autoantigene wurden allerdings nicht weiter charakterisiert und es ist

V. Diskussion

unklar, um welche Proteine es sich handelt. Allein eine Abbildung zeigt eine Bande eines SARDS Patienten auf einer Höhe von 65 kDa beim Autoantikörperscreening im Western Blot gegen Gesamtextrakt retinaler Proteine (Bellhorn et al. 1988).

Aktuell wurden zwei weitere Studien durchgeführt (Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006), die zu einem anderen Ergebnis kamen. Die Studien wurden deshalb angelegt, weil eine Ähnlichkeit zwischen SARDS und der humanen Cancer Associated Retinopathy (CAR) vermutet wurde. Bei CAR handelt es sich um eine paraneoplastische Retinopathie, bei der bilateral ein plötzlicher oder progressiver Visusverlust auftritt. Das ERG der Patienten ist stark verändert oder ausgelöscht. CAR wird mit einem Lungenkarzinom assoziiert, das das retinaspezifische Protein Recoverin exprimiert (Adamus et al. 1993; Khan et al. 2006). Gegen Recoverin werden Antikörper gebildet, die auch an das Recoverin der Retina binden und hier zur Apoptose der Photorezeptoren und damit zur Erblindung führen (Thirkill et al. 1992). Weitere identifizierte Autoantigene bei der CAR sind Alpha Enolase (Dot et al. 2005) und das Hitzeschockprotein 70 (Hsc 70) (Maeda et al. 2001).

Die Experimente wurden mit jeweils 13 SARDS Patienten und 5 gesunden Hunden (Keller et al. 2006) bzw. mit 17 SARDS Patienten, 57 klinisch gesunden Tieren und 53 Tieren mit Neoplasien (Gilmour et al. 2006) durchgeführt. In beiden Studien zeigten sowohl gesunde, als auch kranke Tiere im ELISA und Western Blot Reaktionen auf verschiedene Proteine im aufgetrennten Retinalysat aber es konnten keine Unterschiede in der Antikörperbindungshäufigkeit zwischen gesunden und kranken Tieren festgestellt werden.

Die Probandenzahl aller drei Studien ist gering, es handelte sich um jeweils 5 (Bellhorn et al. 1988), 13 (Keller et al. 2006) und 17 (Gilmour et al. 2006) getestete Patientenserum. Die Versuche wurden mit sehr niedrig angesetzten Verdünnungen (1:200-1:2000) der Seren durchgeführt, was im Western Blot zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Tatsächlich zeigten bei den 2006 durchgeführten Untersuchungen (Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006) alle SARDS Patienten und Negativkontrollen vielfache positive Reaktionen auf das getestete Retinalysat, was die Ergebnisse als fragwürdig erscheinen lässt. Ob eine Titration der Antikörper durchgeführt wurde, um festzustellen, ob der Western Blot im linearen Bereich der Antikörperbindung durchgeführt wurde, ist weder dem Methoden-, noch dem Ergebnisteil der Publikationen zu entnehmen (Gilmour et al. 2006; Keller et al. 2006).

V. Diskussion

Alle drei Studien verwendeten Retinalysat, um Autoantigene zu identifizieren, dabei wurde aber keine eindeutige Identifikation der Banden mittels Massenspektrometrie vorgenommen. Die gefundenen Banden wurden stattdessen nur anhand eines mitgelaufenen Molekulargewichtsmarkers von ihrer Größe her eingeschätzt, aber nicht eindeutig anhand ihrer Sequenz identifiziert. Weitere Versuche mit einzelnen, aufgereinigten Proteinen wurden ebenfalls nicht durchgeführt, so dass eine eindeutige Identifikation der Banden und eine Validierung der Ergebnisse ausstehen.

Um zur Klärung der Ätiologie des SARDS beizutragen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein ausführlicheres Konzept zur Untersuchung von SARDS Patienten auf das Vorhandensein von antiretinalen Antikörpern erstellt und durchgeführt. Die humorale Immunreaktion gegen retinale Antigene von 24 an SARDS erkrankten Tieren sowie 14 gesunden Hunden wurde mittels Western Blot Verfahren getestet. Die SARDS Patienten wurden bei Diagnosestellung komplett ophthalmologisch untersucht und ein ERG abgeleitet, um die Krankheit sicher zu diagnostizieren. Die Vergleichsgruppe bestand aus einer Gruppe von ebenfalls ophthalmologisch untersuchten und als augengesund befundenen Tieren.

Im Rahmen des Antikörperscreenings mittels Western Blot Verfahren wurden zunächst die Seren beider Gruppen gezielt auf die beiden bekannten Autoantigene Cellular Retinaldehyd Binding Protein (CRALBP) und S-Antigen getestet.

CRALBP ist ein wasserlösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 36,378 kDa (Crabb 1988). Es wurde zuerst 1977 von Futtermann et al. in der bovinen Retina nachgewiesen. Im Rahmen ihrer Versuche konnten sie feststellen, dass es Komplexe mit exogenem, radioaktivem 11-cis-Retinal bildet. Aufgrund dieser Fähigkeit, wurde es als Cellular Retinaldehyd Binding Protein (CRALBP) benannt (Saari und Crabb 2005). Es wird angenommen, dass CRALBP eine wichtige Rolle als Substrat steuerndes Protein im visuellen Zyklus innerhalb des RPEs spielt. (Saari et al. 1982). Es ist in den Müller-Gliazellen und im retinalen Pigmentepithel lokalisiert (Bunt-Milham und Saari 1983). In Rattenwelpen, die eine Woche alt waren, wurde CRALBP zusätzlich im Ziliarkörperpigmentepithel und im äußeren Epithel der Iris gefunden (Eisenfeld et al. 1985). Darüber hinaus wurde es im Ziliarkörper, der Kornea, der Glandula pinealis, im N. opticus und im Gehirn nachgewiesen, nicht jedoch in den Stäbchen und Zapfen der Retina (Saari 1997).

V. Diskussion

Mutationen am Gen RLBP1, das CRALBP codiert, führt beim Menschen zu retinalen Degenerationen (Morimura et al. 1999). Durch die Mutationen kommt es zu einer strukturellen Veränderung von CRALBP, daraufhin ist die Bindungsfähigkeit von 11-cis-Retinal gestört und die Regeneration der retinalen Pigmente ist eingeschränkt oder geht gänzlich verloren. Klinisch tritt zunächst eine verlängerte Dunkeladaptionszeit auf. Später kommt es zu Nachtblindheit, progressivem Gesichtsfeldverlust und Attenuation der retinalen Gefäße (Morimura et al. 1999).

Eine Bildung von Autoantikörpern gegen CRALBP könnte eine Erblindung der SARDS-Patienten erklären. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchungen zeigen aber, dass sowohl kranke, als auch gesunde Tiere gleich häufig Autoantikörper gegen CRALBP aufweisen (siehe Artikel: Neuron Specific Enolase Antibodies in Patients with Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome Veterinary Immunology and Immunopathology, Seite 22). Eine Autoimmunreaktion gegen CRALBP ist daher offensichtlich nicht für die Entstehung von SARDS verantwortlich.

Deshalb wurden in einem zweiten Versuch 24 Patientenseren und 14 Kontrollseren auf das bekannte Autoantigen S-Antigen getestet. S-Antigen ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa (Shinohara 1987) und wurde zuerst von Wacker 1977 beschrieben. Ein Synonym für S-Antigen ist Arrestin. Es besitzt eine inhibitorische Funktion in der aktivierten Phototransduktionskaskade und bindet an die phosphorylierte Form von licht-aktiviertem Rhodopsin. Es blockiert so die Interaktion von Rhodopsin mit dem G-Protein Transduzin (Burns und Baylor 2001; Hurley et al. 1998). S-Antigen kann vermutlich zusätzlich die retinale Freisetzung von Rhodopsin inhibieren (Sommera 2006). Mit Hilfe immunohistochemischer Färbungen wurde S-Antigen in den Außensegmenten der Photorezeptoren (Yajima et al. 1983), in Müller Zellen (Chan 1984) und in der Pinealdrüse (Kalsow und Wacker 1977) nachgewiesen.

S-Antigen wird mit der Entstehung von entzündlichen, autoimmunvermittelten Augenerkrankungen beim Menschen in Zusammenhang gebracht. Dabei handelt es sich um die retinale Vaskulitis (Dumonde et al. 1985) und um die autoimmunmedierte Uveitis (Suleyman et al. 1987). Im Tierversuch führte die Injektion von S-Antigen sowohl bei der Ratte (Wiggert 1991) wie beim Pferd (Deeg et al. 2004) zur Induktion von monophasischer Uveitis.

V. Diskussion

In den hier durchgeführten Versuchen war kein Unterschied in der Antikörperbindungshäufigkeit zu S-Antigen zwischen gesunden und kranken Hunden zu sehen (siehe Artikel: Neuron Specific Enolase Antibodies in Patients with Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome Veterinary Immunology and Immunopathology, Seite 22). Beide Gruppen reagierten gleich häufig positiv auf S-Antigen. Das bestätigt die Funde von Gilmour (2006), der ebenfalls eine immunologische Aktivität gegen ein Protein von 48 kDa bei gesunden und kranken Hunden fand, ohne dass die Bindungshäufigkeit oder -stärke differierte. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Immunreaktion gegen S-Antigen in der Ätiologie des SARDS anscheinend keine Rolle spielt.

Die Überprüfung der Hundeseren auf die beiden Antigene CRALBP und S-Antigen wurde wegen einer möglichen Analogie zwischen Uveitis und SARDS durchgeführt. Da die Untersuchungen zeigten, dass es keinen Zusammenhang zwischen SARDS und einer Autoantikörperbildung gegen S-Antigen oder CRALBP gab wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, um die Patienten- und Kontrollseren gegen das gesamte Retinaproteom zu testen.

Hierzu wurde porcines Retinalysat mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit den Seren der beiden Gruppen getestet. SARDS Patienten reagierten dabei besonders deutlich auf ein Protein, das mittels Massenspektrometrie eindeutig als Neuron Specific Enolase (Sorensen et al. 2007) identifiziert wurde (siehe Artikel: Neuron Specific Enolase Antibodies in Patients with Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome Veterinary Immunology and Immunopathology, Seite 22). Mit aufgereinigter NSE wurde dieses Ergebnis bestätigt. 25 % der SARDS Patienten reagierten positiv auf das aufgereinigte NSE, dagegen keine der Kontrollen.

Enolase ist eines der am häufigsten exprimierten Proteine im Körper und kommt in vielen verschiedenen Organismen vor. 1934 wurde Enolase von Lohman und Mayerhof entdeckt, als sie die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat in Pyruvat im Muskelextrakt untersuchten. Die durch Enolase vermittelten Reaktionen besetzen eine Schlüsselrolle im metabolischen Pfad der Fermentation sowie der Glykolyse.

Bei Vertebraten kommt das Enzym in drei isomeren Formen (alpha, beta und gamma) vor: Alle Arten von Enolase bestehen aus 2 identischen Untereinheiten und haben ein Molekulargewicht zwischen 82 000 und 100 000 Dalton (Wold 1971).

V. Diskussion

Alpha Enolase, auch als Enolase 1 bekannt, ist ein glykolytisches Enzym und wird in den meisten Geweben exprimiert. Es ist ein Homodimer, das aus 2 Alpha Untereinheiten besteht. Alpha Enolase wurde als Autoantigen der Hashimoto Enzephalopathie identifiziert (Yoneda et al. 2007). Auch Patienten mit Autoimmun mediierter Retinopathie bildeten Autoantikörper gegen Alpha Enolase (Magrys et al. 2007). Beta Enolase wurde bislang in Herz und Skelettmuskelzellen gefunden. Der absolute Wert von Beta Enolase im Serum korreliert mit der Zerstörung von Muskelgewebe und kann so als Diagnostikum für die Bewertung von Muskelüberlastung herangezogen werden (Chosa et al. 2003).

Gamma Enolase (Neuron Specific Enolase, NSE) wurde bislang in Zellen neuroektodermalen Ursprungs gefunden und macht 1,5% des gesamten löslichen Proteins im Gehirn aus. Gamma Enolase ist im neuronalen Zell-Zytoplasma zu finden, sowie in den Dendriten des menschlichen ZNS (Barone et al. 1993). Ebenso wie Alpha-Enolase ist auch Gamma-Enolase am Vorgang der Glykolyse beteiligt und hat neurotrophe Eigenschaften.

Studien an Mäusen haben ergeben, dass Antikörper gegen NSE bevorzugt eine Subpopulation an Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht binden (Rich et al. 1997). Die Photorezeptoren konnten als Zapfen identifiziert werden. Daneben wurde NSE auch von Ganglienzellen und allen Zellen der inneren Körnerschicht (Amakrinen-, Bipolar-, und Horizontalzellen) exprimiert (Rich et al. 1997).

Das Auftreten von anti-NSE Antikörpern in SARDS Patienten könnte ein Hinweis auf eine autoimmune Genese des SARDS sein. Autoantikörper können durch molekulares Mimikry, Epitope Spreading oder Bystander Aktivierung entstehen und eine Autoimmunerkrankung auslösen.

Die meisten Autoimmunerkrankungen sind allerdings T-Zell mediiert. Das bedeutet, dass die Antikörper sekundär zu einer CD4⁺ T-Zell Reaktion entstehen. CD4 ist ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche von T-Helfer Zellen, regulatorischen T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird. Bezüglich T-Zellen hat CD4 eine Funktion als Co-Rezeptor für den T-Zell Rezeptor (TCR). CD4 amplifiziert das Signal, das durch den TCR generiert wird, indem es Tyrosin Kinase freisetzt, die wiederum die Aktivierung von weiteren Molekülen bewirkt, die in die Signalkaskade einer aktivierten T-Zelle involviert sind (Miceli und Parnes 1993).

Bei Erkrankungen wie dem autoimmunen Diabetes mellitus (Kurrer et al. 1997), der multiplen Sklerose (Thewissen et al. 2007) oder der autoimmunen Uveitis beim Pferd

V. Diskussion

(Deeg et al. 2006) sind die Autoantikörper nicht direkt für die Pathogenese der Erkrankung verantwortlich, sondern entstehen sekundär zur pathogenetischen T-Zellreaktion, reflektieren aber dadurch das ablaufende Geschehen. Diese Autoantikörper können aber als prädiktive Marker genutzt werden.

Die Relevanz der anti-NSE Antikörper für die Entstehung von SARDS könnte im Tiermodell überprüft werden. Dazu ist das anti-NSE Serum der positiv reagierenden Tiere in Versuchstiere zu transferieren. Sollte daraufhin SARDS entstehen, wäre das der Beweis für die Rolle von anti-NSE Antikörpern als Auslöser für die Erkrankung. Durch den Antikörpertransfer wird eine Immunreaktion gegen NSE ausgelöst. Sollte der Transfer negativ verlaufen, wäre ein nächster Schritt die Generierung von autoreaktiven T-Zellen gegen NSE. Diese Zellen würden wieder in Versuchstiere verbracht werden und die Tiere auf das Auftreten einer Immunerkrankung untersucht. Da SARDS bislang nur beim Hund beobachtet wurde, sollte man ausschließlich Hunde als Versuchstiere verwenden.

Das Auftreten von anti-NSE Antikörpern könnte auch durch eine Zerstörung des retinalen Gewebes entstehen. Durch die wie auch immer ausgelöste Zerstörung des retinalen Gewebes werden die im gesunden Gewebezustand verdeckten Epitope dem Immunsystem erstmalig präsentiert und dadurch die Bildung einer Autoimmunreaktion initiiert. Die Autoantikörper wären dann als Folge der Gewebeerstörung zu verstehen und nicht als auslösendes Agens. Diese Hypothese könnte wiederum im Tiermodell überprüft werden: Sollte bei der Übertragung von NSE-Antikörpern kein SARDS entstehen, sondern nur nach Übertragung der autoreaktiven T-Zellen, wäre das ein Beweis dafür, dass Antikörper gegen NSE zwar entstehen, wenn das Protein durch Zerstörung frei gesetzt wird, Autoantikörper aber per se nicht krankheitsmachend sind.

Erstaunlich scheint auf den ersten Blick die geringe Anzahl der NSE Antikörper positiven Tiere in dieser Studie zu sein (siehe Artikel: Neuron Specific Enolase Antibodies in Patients with Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome Veterinary Immunology and Immunopathology, Seite 22). Dies kann folgendermaßen erklärt werden: Die Blutproben der an SARDS erkrankten Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entweder direkt nach Krankheitsbeginn oder Wochen, Monate oder Jahre danach entnommen. Auffallend ist, dass fünf von sechs Anti-NSE Antikörper positive SARDS Patienten weniger als 18 Monate erkrankt waren. Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass anti-NSE Antikörper negative Tiere weiter

V. Diskussion

fortgeschrittene Stadien des SARDS zeigen und daher einen abgesunkenen Spiegel an anti-NSE-Antikörpern haben. Von anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der autoimmunen Thyreoiditis (Wick et al. 1974) oder von Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom (Maruyama et al. 2002) ist dieses Phänomen ebenfalls bekannt: Die Autoantikörperantwort nimmt mit zunehmender Zerstörung des Zielgewebes ab, weil dadurch das auslösende Agens für die Bildung der Autoantikörper nicht mehr präsent ist. Dies hat sich auch im Patientengut hier gezeigt: Von sechs NSE-Antikörper positiven SARDS Patienten litten fünf weniger als 18 Monate an SARDS. Um dies zu verifizieren, müsste allerdings eine noch größere Anzahl von SARDS Patienten in verschiedenen Stadien der Erkrankung untersucht werden. Tiere, die frisch an SARDS erkrankt sind, müssten nach dieser Hypothese viele Antikörper gegen NSE haben, Patienten mit lange andauerndem SARDS weniger. Letztendlich könnten NSE-Antikörper negative Patienten auch Tiere repräsentieren, die das Syndrom SARDS aufgrund einer anderen Ätiologie entwickelt haben.

Ziel der vorgelegten-Arbeit war es, einerseits klinische Aspekte, Veränderungen des Augenhintergrunds, Rassen- und Geschlechtsverteilung und andererseits einen neuen Ansatz zur Klärung der Ätiologie der Erkrankung zu erarbeiten. Dass 25% der SARDS-Patienten positiv auf NSE-Antikörper reagierten, deutet auf eine autoimmune Ätiologie der Erkrankung hin.

VI. Zusammenfassung

Zum Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome (SARDS) beim Hund

Ziel der Arbeit war es, einen Beitrag zur Klärung der Ätiologie des SARDS zu leisten. Dafür wurde zunächst die Literatur zusammengetragen und anhand der Untersuchung von 39 SARDS-Patienten aus dem Einzugsgebiet der Klinik die Krankheitsentwicklung in ihren verschiedenen Stadien dokumentiert. Hierbei fiel auf, dass ein Drittel der Tiere Dackel waren und 51,3% der erkrankten Tiere weiblich kastriert. Die SARDS-Patienten waren durchschnittlich 8,8 Jahre alt (von 3 Monaten bis 13 Jahren). Der ophthalmoskopische Befund zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Auftreten der Erkrankung konnte mittels Fundusfotografie bei 17 Patienten dokumentiert werden. Die Fundusveränderungen wurden anhand der Bilder in verschiedene Grade eingeteilt und miteinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen an der Retina linear im Bezug zur Erkrankungsdauer zunehmen und schließlich dem Bild einer weit fortgeschrittenen generalisierten Progressiven Retina Atrophie (GPRA) ähneln.

In einem weiteren Teil der Studie wurde durch ein Autoantikörperscreening die Hypothese überprüft, dass SARDS eine Autoimmunerkrankung sei.

Mittels Western Blot Verfahren wurden zunächst die Seren von 24 SARDS-Patienten und 14 augengesunden Hunden auf die gereinigten Autoantigene S-Antigen and Cellular Retinaldehyde Binding Protein (CRALBP) getestet. Hier konnte kein Unterschied zwischen gesunden und kranken Tieren festgestellt werden. In einem weiteren Schritt wurde aufgetrenntes retinales Proteom im Western Blot getestet, um potentielle neue, bislang unbekannte Autoantigene zu identifizieren. Dabei zeigten SARDS-Patienten vor allem eine deutliche Reaktion gegen ein Protein, das im Massenspektrometer (MALDI/TOF-TOF) als Neuron-Spezifische-Enolase (NSE) identifiziert werden konnte. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurden die Patienten- und Kontrollseren erneut mit aufgereinigter Enolase getestet. 25 % der SARDS Patienten und keines der gesunden Kontrolltiere reagierten positiv auf NSE. Die Ergebnisse gaben einen Hinweis auf eine mögliche autoimmune Genese des SARDS. Noch bleibt aber unklar, ob die Antikörper gegen NSE die Ursache für die Entstehung der Erkrankung sind oder ob sie sekundär aufgrund der Zerstörung retinalen Gewebes entstehen. Weitere Untersuchungen müssten dafür durchgeführt werden.

VII. Summary

About the Sudden Acquired Retinal Degeneration Syndrome in the dog.

The subject of the study was to investigate the aetiology of SARDS.

Following an initial literature review, patient data and clinical findings from 39 Patients were collected and analysed. One specific observation was that one third of all patients comprised Dachshunds and that 51.3 % of affected animals were female neutered. The average age of SARDS patients was found to be 8.8 years (range 3 months to 13 years). The ophthalmoscopic appearance of the fundus of SARDS patients was documented at different stages of the disease during serial examinations with the help of fundus photography. This revealed degenerative retinal changes which were found to progress linear following the onset of SARDS, finally resembling dogs with severe generalised progressive retinal degeneration.

In the second part of the study, the hypothesis that SARD is an autoimmune disease, was tested with the help of autoantibody screening. In a first step, serum from 24 SARDS patients and 14 normal controls were assessed for autoantibodies to the purified autoantigens S-Antigen and CRALBP with the help of a western blot. No difference in the incidence of autoantibodies could be found between SARDS patients and healthy controls while testing the well known autoantigens S-antigen and CRALBP.

In a second step, an attempt was made to identify new autoantigens by testing the entire retinal proteom as an autoantigenic source, again using Western blot techniques. Following the initial detection of a reaction against a specific protein found almost exclusively in SARDS patients, it was possible to identify this protein with the help of mass spectrometry (MALDI/TOF/TOF) as NSE. These findings were verified by the binding of IgG antibodies to purified NSE in 25% of the SARDS patients and 0% of the normal control dogs.

The results of this study suggest that an autoimmune aetiology of SARDS involving autoantibodies against NSE is possible. However, it is unclear whether these play a causative role in SARDS or whether they are the result of retinal destruction by another mechanism. Further investigations into a possible autoimmune aetiology of SARDS are therefore indicated and the role of NSE as an autoantigen must be further assessed.

VIII. Literaturverzeichnis

- Acland, G. M., Aguirre, G. D.: Sudden acquired retina degeneration: clinical signs and diagnosis. Transactions of the 17th annual scientific program of the American College of Veterinary Ophthalmologists, 1986; 58 - 63.
- Acland, G. M., Irby, N. L., Aguirre, G. D., Gross, D., Nitroy, S. F., Notarfrancesco, K.: Sudden acquired retinal degeneration in the dog: Clinical and morphologic characterization of the "Silent Retina" Syndrome. Trans Am Coll Vet Ophthalmol 1984; 15: 86 - 104.
- Adamus, G.: Autoantibody-induced apoptosis as a possible mechanism of autoimmune retinopathy. Autoimmun Rev, 2003; 2: 63-8.
- Adamus, G., Guy, J., Schmied, J. L., Arendt, A., Hargrave, P. A.: Role of anti-recoverin autoantibodies in cancer-associated retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993; 34: 2626-33.
- Barone, F. C., Clark, R. K., Price, W. J., White, R. F., Feuerstein, G. Z., Storer, B. L., Ohlstein, E. H.: Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. Brain Res, 1993; 623: 77-82.
- Bellhorn, R. W., Murphy, C. J., Thirkill, C. E.: Anti-retinal Immunoglobulins in Canine Ocular Diseases. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal), 1988; 3: 28 - 32.
- Blanchard, G. L., Howard, D. R., Krehbiel, J. D., Keller, W. F.: Amaurosis and associated electroretinographic alterations in canine distemper. J Am Vet Med Assoc, 1973; 163: 976-8.
- Brooks, D. E.: Glaukoma in the dog and cat. Vet Clin North Amer, Small Anim Pract, 1990; 20: 775 -97.
- Bunt-Milham, A. H., Saari, J. C.: Immunocytochemical Localization of Two Retinoid-binding Proteins in Vertebrate Retina. J Cell Biol, 1983; 97: 703-712.
- Burns, M. E., Baylor, D. A.: Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. Annu Rev Neurosci, 2001; 24: 779-805.
- Caspi, R. R., Roberge, F. G., Chan, C. C., Wiggert, B., Chader, G. J., Rozenszajn, L. A., Lando, Z., Nussenblatt, R. B.: A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. J Immunol, 1988; 140: 1490-5.
- Chambers, E. D. D., U.; Gaarder, J.; Hanson, S. M.; kern, T.J.; Lindley, D.M.; Miller, P.; Wilcock, B., 2001 *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. Vol. 3, Slatter, Douglas H., 640 pp.
- Chan, C.-C. R., LA; Nussenblatt, R; Muellenberg-Coulombre, C; Hsu, S; Polestine, AG; Lando, Z; BenEzra, D: Monoclonal Antibodies to Müller's Cells of the Retina. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984; 25: 1007-1012.
- Chastain, C. B., Franklin, R. T., Ganjam, V. K., Madsen, R. W.: Evaluation of the Hypothalamic Pituitary-Adrenal Axis in Clinically Stressed Dogs. Journal of the American Animal Hospital Association, 1985; 22: 435 - 442.
- Chosa, E., Sekimoto, T., Sonoda, N., Yamamoto, K., Matsuda, H., Takahama, K., Tajima, N.: Evaluation of human beta-enolase as a serum marker for exercise-induced muscle damage. Clin J Sport Med, 2003; 13: 209-12.
- Crabb, J. G., S; Harris, SE; Saari, JC: Cloning of the cDNAs Encoding the Cellular Retinaldehyde-binding Protein from Bovine and Human Retina and Comparison of the Protein Structures. J Biol Chem, 1988; 263: 18688-18692.
- Curtis, R.: Retinal diseases in the dog and cat: an overview and update. Journal of small animal practice, 1988; 29: 397 - 415.

VIII. Literaturverzeichnis

- Davis, L. E., Kornfeld, M., Mooney, H. S., Fiedler, K. J., Haaland, K. Y., Orrison, W. W., Cernichiari, E., Clarkson, T. W.: Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Ann Neurol*, 1994; 35: 680-8.
- Deeg, C., Pompetzki, D., Raith, A. J., Hauck, S. M., Amann, B., Suppmann, S., Goebel, T. W. F., Olazabal, U., Gerhards, H., Reese, S., Stangassinger, M., Kaspers, B., Ueffing, M.: Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics*, 2006; May, 11.
- Deeg C. A., Reese S., Gerhards H., Wildner G., and Kaspers B.: The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004; 45: 2286-2292.
- Dot, C., Guigay, J., Adamus, G.: Anti-alpha-enolase antibodies in cancer-associated retinopathy with small cell carcinoma of the lung. *Am J Ophthalmol*, 2005; 139: 746-7.
- Drobek-Slowik, M., Karczewicz, D., Safranow, K.: [The potential role of oxidative stress in the pathogenesis of the age-related macular degeneration (AMD)]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2007; 61: 28-37.
- Duke, R. C.: Self recognition by T cells. I. Bystander killing of target cells bearing syngeneic MHC antigens. *J Exp Med*, 1989; 170: 59-71.
- Dumonde, D. C., Kasp-Grochowska, E., Banga, J. P., Sanders, M. D., Graham, E., Stanford, M. A., Faure, J. P., De Kozak, Y., Van Tuyen, V.: Autoimmune mechanisms in inflammatory eye disease. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 1985; 104 (Pt 3): 232-8.
- Dziezyc, J., Millichamp, N.J. , 2004 *Colour Atlas of canine and feline ophthalmology*. 245 pp.
- Ehl, S., Hombach, J., Aichele, P., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M.: Bystander activation of cytotoxic T cells: studies on the mechanism and evaluation of in vivo significance in a transgenic mouse model. *J Exp Med*, 1997; 185: 1241-51.
- Eisenfeld, A. J., Bunt-Milam, A. H., Saari, J. C.: Localization of retinoid-binding proteins in developing rat retina. *Exp Eye Res*, 1985; 41: 299-304.
- Elisevich, K. V., Ford, R. M., Anderson, D. P., Stratford, J. G., Richardson, P. M.: Visual abnormalities with multiple trauma. *Surg Neurol*, 1984; 22: 565-75.
- Evereklioglu, C., Er, H., Doganay, S., Cekmen, M., Turkoz, Y., Otlu, B., Ozerol, E.: Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Doc Ophthalmol*, 2003; 106: 129-36.
- Fracassi, F., Mandrioli, L., Diana, A., Hilbe, M., Grinwis, G., Gandini, G.: Pituitary macroadenoma in a cat with diabetes mellitus, hypercortisolism and neurological signs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 2007; 54: 359-63.
- Futtermann, S., Saari, J. C., Blair, S.: Occurrence of a binding protein for 11-cis-retinal in retina. *J Biol Chem*, 1977; 252: 3267-3271.
- Gilmour, M.: Sudden acquired retinal degenerations syndrome (SARDS): What we know and don't know. <http://www.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1cod...> 2006.
- Gilmour, M. A., Cardenas, M. R., Blaik, M. A., Bahr, R. J., McGinnis, J. F.: Evaluation of a comparative pathogenesis between cancer-associated retinopathy in humans and sudden acquired retinal degeneration syndrome in dogs via diagnostic imaging and western blot analysis. *Am J Vet Res*, 2006; 67: 877-81.
- Gränitz, U.: Plötzliche Erblindung bei einem Dackel. *Tierärztliche Praxis*, 2001; 29: 173-175.
- Gruber, T. A., Costigan, P., Wilkinson, G. T., Seawright, A. A.: Chronic methylmercurialism in the cat. *Aust Vet J*, 1978; 54: 155-60.

VIII. Literaturverzeichnis

- Heywood, R.: Intraocular haemorrhage in the Beagle dog. *J Small Anim Pract*, 1973; 14: 107-9.
- Grußendorf, H. 2006, persönliche Mitteilung
- Huber, S. A.: Autoimmunity in coxsackievirus B3 induced myocarditis. *Autoimmunity*, 2006; 39: 55-61.
- Hurley, J. B., Spencer, M., Niemi, G. A.: Rhodopsin phosphorylation and its role in photoreceptor function. *Vision Res*, 1998; 38: 1341-52.
- Jager, M. J., Klaver, C. C.: Macrophages feel their age in macular degeneration. *J Clin Invest*, 2007; 117: 3182-4.
- Kalsow, C. M., Wacker, W. B.: Pineal reactivity of anti-retina sera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1977; 16: 181-4.
- Karlsen, A. E., Dyrberg, T.: Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. *Semin Immunol*, 1998; 10: 25-34.
- Keller, R. L., Kania, S. A., Hendrix, D. V., Ward, D. A., Abrams, K.: Evaluation of canine serum for the presence of antiretinal autoantibodies in sudden acquired retinal degeneration syndrome. *Vet Ophthalmol*, 2006; 9: 195-200.
- Ketring, K. L.: presumed ocular toxicity of ivermectin *Proceedings of the 13th Annual Kal Kan Symposium*, 1989; 109-110.
- Khan, N., Huang, J. J., Foster, C. S.: Cancer associated retinopathy (CAR): An autoimmune-mediated paraneoplastic syndrome. *Semin Ophthalmol*, 2006; 21: 135-41.
- Kurrer, M. O., Pakala, S. V., Hanson, H. L., Katz, J. D.: Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94: 213-8.
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-5.
- Libbey, J. E., McCoy, L. L., Fujinami, R. S.: Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*, 2007; 79: 127-47.
- Lohmann, K., Meyerhof, O.: Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglyzerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure *Biochem*, 1934; 273: 60-72.
- Maeda, T., Maeda, A., Maruyama, I., Ogawa, K. I., Kuroki, Y., Sahara, H., Sato, N., Ohguro, H.: Mechanisms of photoreceptor cell death in cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001; 42: 705-12.
- Magrys, A., Anekonda, T., Ren, G., Adamus, G.: The role of anti-alpha-enolase autoantibodies in pathogenicity of autoimmune-mediated retinopathy. *J Clin Immunol*, 2007; 27: 181-92.
- Maruyama, I., Ikeda, Y., Nakazawa, M., Ohguro, H.: Clinical roles of serum autoantibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients. *Tohoku J Exp Med*, 2002; 197: 125-32.
- Mattson, A., Roberts, S. M., Isherwood, J. M. E.: Clinical features suggesting hyperadrenocorticism associated with sudden acquired retinal degeneration syndrome in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc.*, 1992; 28: 199-202.
- McMahon, E. J., Bailey, S. L., Castenada, C. V., Waldner, H., Miller, S. D.: Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med*, 2005; 11: 335-9.
- Miceli, M. C., Parnes, J. R.: Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv Immunol*, 1993; 53: 59-122.
- Miller, P. E., Galbreath, E. J., Kehren, J. C., Steinberg, H., Dubielzig, R. R.: Photoreceptor cell death by apoptosis in dogs with sudden acquired retinal degeneration syndrome. *Am J Vet Res*, 1998; 59: 149-52.

VIII. Literaturverzeichnis

- Miller, W. H., Jr.: Parapituitary meningioma in a dog with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc*, 1991; 198: 444-6.
- Millichamp, N. J.: Retinal degeneration in the dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1990; 20: 799-835.
- Morimura, H., Berson, E. L., Dryja, T. P.: Recessive mutations in the RLBP1 gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctata albescens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999; 40: 1000-4.
- Narfstrom, K.: Electroretinography in veterinary medicine--easy or accurate? *Vet Ophthalmol*, 2002; 5: 249-51.
- O'Toole, D., Roberts, S., Nunamaker, C.: Sudden acquired retinal degeneration ('silent retina syndrome') in two dogs. *Vet Rec*, 1992; 130: 157-61.
- Oldstone, M. B.: Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *Faseb J*, 1998; 12: 1255-65.
- Olin, D. D., Rogers, W. A., MacMillan, A. D.: Lipid-laden aqueous humor associated with anterior uveitis and concurrent hyperlipemia in two dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 1976; 168: 861-4.
- Parshall, C., 1989: Sudden acquired retinal degeneration and immune mediated uveitis/dermatitis as possible autoimmune diseases. *The 13th annual kal Kan Symposium for the treatment of small animal diseases*, Vernon.
- Peiffer, R. L., Petersen-Jones, S. M., 1997 *Small Animal Ophthalmology: A Problem-oriented Approach*. Saunders, 238 pp.
- Powell, A. M., Black, M. M.: Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol*, 2001; 26: 427-33.
- Rich, K. A., Zhan, Y., Blanks, J. C.: Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol*, 1997; 388: 47-63.
- Riis, R. C., 2002 *Small animal ophthalmology secrets*. Hanley & Belfus, xv, 332 , [8] of plates pp.
- Saari, J. C., Bredberg, L., Garwin, G. G.: Identification of the endogenous retinoids associated with three cellular retinoid-binding proteins from bovine retina and retinal pigment epithelium. *J Biol Chem*, 1982; 257: 13329-33.
- Saari, J. C., Crabb, J. W.: Focus on Molecules: Cellular Retinaldehyde-binding Protein (CRALBP). *Exp Eye Res*, 2005; 81: 245-246.
- Saari, J. H., J; Possin, DE; Fariss, RN; Leonard, J; Garwin, GG; Crabb, JW, Milam, All: Cellular Retinaldehyde-binding protein is expressed by oligodendrocytes in the optic nerve and brain. *Glia*, 1997; 21: 259-268.
- Shinohara, T. D., L.; Wistow, G.; Dietzschold, B.; Craft, C.; Tao, R.: The Structure of Bovine Retinal S-Antigen: Sequence Analysis and Identification of Monoclonal Antibody Epitopes and Uveitogenic Site. *Jpn J Ophthalmol*, 1987; 31: 197-206.
- Smyth, M. J., Sedgwick, J. D.: Delayed kinetics of tumor necrosis factor-mediated bystander lysis by peptide-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1998; 28: 4162-9.
- Sommerer, M. E. F., D.L.: Arrestin can act as a regulator of rhodopsin photochemistry *Vision Research Volume 46, Issue 27, December 2006, Pages 4532-4546*, 2006; 46: 4532-4546.
- Sorensen, P. S., Wanscher, B., Jensen, C. V., Schreiber, K., Blinkenberg, M., Ravnborg, M., Kirsmeier, H., Larsen, V. A., Lee, M. L.: Intravenous immunoglobulin G reduces MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology*, 1998; 50: 1273-81.
- Strobel, B. W., Wilkie, D. A., Gilger, B. C.: Retinal detachment in horses: 40 cases (1998-2005). *Vet Ophthalmol*, 2007; 10: 380-5.

VIII. Literaturverzeichnis

- Suleyman, S., Dumonde, D. C., Banga, J. P.: Idiotypic expression of antibodies to retinal S-antigen in experimental autoimmune uveoretinitis. *Immunology*, 1987; 62: 537-41.
- Thewissen, M., Somers, V., Hellings, N., Fraussen, J., Damoiseaux, J., Stinissen, P.: CD4⁺CD28^{null} T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol*, 2007; 179: 6514-23.
- Thirkill, C. E., Tait, R. C., Tyler, N. K., Roth, A. M., Keltner, J. L.: The cancer-associated retinopathy antigen is a recoverin-like protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992; 33: 2768-72.
- Tizard, I. R., 2000 *Veterinary Immunology An Introduction*. Vol. 6, W.B. Saunders Company, 482 pp.
- van der Woerd, A., Nasisse, M. P., Davidson, M. G.: Sudden acquired retina degeneration in the dog: Clinical and laboratory findings in 36 cases. *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology*, 1991; 1: 11-18.
- Vanderlugt, C. L., Miller, S. D.: Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2002; 2: 85-95.
- Vanisi, S. J., Schmidt, G. M., West, C. S., Anderson, R., Herrmann, K., Ketring, K., Font, R. L.: Metabolic Toxic Retinopathie - Preliminary report. 14th Meeting of the Transactions of the American College of Veterinary Ophthalmologists, 1983; 14: 76-81.
- Venter, I. J. P., S.W.: Akute Blindheit in 'n Hond verorsaak deur skielike verworwe retinale degenerasie. *Tydskr. S. Afr. vet. Ver.*, 1995; 66: 32-34.
- Wacker, W., Donoso, LD, Kalsow, CM, Yankeelov, JA Jr, Organisciak DT.: Experimental allergic uveitis: isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol*, 1977; 119: 1949-1958.
- Walde, I. S., E.H., Köstlin, R.G., 1996 *Atlas der Augenerkrankungen bei Hund und Katze*. Vol. 2, F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 360 pp.
- Wick, G., Sundick, R. S., Albin, B.: A review: The obese strain (OS) of chickens: an animal model with spontaneous autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol*, 1974; 3: 272-300.
- Wiggert, B. K., G. Long, K.O.; Inouye, L; Gery, I.; Chader, G.J.; Aguirre, G.D. : Interphotoreceptor Retinoid-binding Protein (IRBP) in Progressive Rod-cone Degeneration (prcd)-Biochemical, Immunocytochemical and Immunologic Studies. *Exp Eye Res* 1991; 53: 389-398.
- Wilkie, D. A., Gemensky-Metzler, A. J., Colitz, C. M., Bras, I. D., Kuonen, V. J., Norris, K. N., Basham, C. R.: Canine cataracts, diabetes mellitus and spontaneous lens capsule rupture: a retrospective study of 18 dogs. *Vet Ophthalmol*, 2006; 9: 328-34.
- Williams, D. L., Barrie, K., Evans, T. F., 2002 *Veterinary ocular emergencies*. Butterworth-Heinemann, x, 106, [4] of plates pp.
- Wold, 1971: *The Enzymes*. New York, Academic Press, 499-538.
- Yajima, S., Seki, F., Takano, S., Usui, M.: Localization of S-antigen by enzyme-labelled antibody method and electron microscopy. *Jpn J Ophthalmol*, 1983; 27: 526-34.
- Yoneda, M., Fujii, A., Ito, A., Yokoyama, H., Nakagawa, H., Kuriyama, M.: High prevalence of serum autoantibodies against the amino terminal of alpha-enolase in Hashimoto's encephalopathy. *J Neuroimmunol*, 2007; 185: 195-200.
- Yu, F., Wang, Z., Ju, B., Wang, Y., Wang, J., Bai, D.: Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative

VIII. Literaturverzeichnis

stress and protection of combination of vitamins C and E. *Exp Toxicol Pathol*, 2008; 59: 415-23.

Zapata, G. L., Guajardo, M. H., Terrasa, A. M.: The in vitro protective effect of alpha-tocopherol on oxidative injury in the dog retina. *Vet J*, 2007.

IX. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. R. Köstlin für die Überlassung des Themas und seiner stetigen Unterstützung. Seine Hilfsbereitschaft und das stets in mich gesetzte Vertrauen haben mich den Weg in die faszinierende Welt der Ophthalmologie finden lassen und mir äußerst wertvolle Erfahrungen vermittelt.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg. Ohne sie hätte ich nie einen so spannenden Ansatz zur Erforschung des SARDS verfolgen können. Vermutlich hätte ich auch nie gelernt, was wissenschaftliches Arbeiten bedeutet und wie man einen Artikel von A-Z verfasst und auf den Weg bringt. Das physiologische Institut ist mir so zur zweiten Heimat geworden. Ich habe hier stets Unterstützung und konstruktive Kritik erhalten und hatte sogar als „Leihdotorandin“ einen eigenen Arbeitsplatz und eine fantastische Betreuung.

Bärbl Amann hat mir meine ersten Schritte im Labor sehr erleichtert. Darüber hinaus hat sie mir einen kompetenten Umgang mit Powerpoint, Photoshop und Co. vermittelt, auch wenn sie bis heute vorgibt, von diesen Dingen keine Ahnung zu haben und darauf besteht, dass sie angeblich nie wieder einem Doktoranden helfen wird.

Das Doktorandenteam in der Physiologie hat mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Besonders in der Abschlussphase, als ich die letzten Änderungen von England aus vornehmen musste oder das Führungszeugnis beantragt werden musste, war die Hilfe von Hanna Zipplies und Roxanne Kramer von unschätzbarem Wert!

Zu letzt gilt mein Dank den vielen Menschen, die mich auf die richtige Spur gebracht haben oder mich in meinem Vorhaben unterstützt haben, so z.B. Ron Ofri aus Israel, der die Idee zu dem Autoantikörperscreening hatte, Jens Fritsche und Christine Heinrich, die mir Ihr Patientengut und Ihre Datenbank zur Verfügung stellten, Kerstin Leuzinger, die mich über jeden neuen SARDS Patienten unverzüglich unterrichtete sowie Eva Ludwig, die mit (histo-) pathologischem Rat stets zur Seite stand. Ein besonderer Dank gilt darüber hinaus Markus Glatt für technische Unterstützung mittels detaillierter Fernkurse per Mail, meinen in jeder Hinsicht zur Seite stehenden Eltern sowie der Hanns Seidel Stiftung, die mir ein sorgenfreies Doktorandendasein ermöglichte.