

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

Charakterisierung des Migrationsverhaltens und des
Zellmetabolismus von peripheren Pferde-Blutleukozyten
bei der equinen rezidivierenden Uveitis

von
Carmen Wiedemann
aus Heidenheim

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

Max und meiner Familie

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR	3
2.1 Equine rezidivierende Uveitis (ERU)	3
2.1.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis	3
2.1.2 Klinische Symptome und Therapie der ERU	4
2.1.3 Ätiologie und Pathogenese der ERU	7
2.2 Immunsystem und Autoimmunerkrankungen	10
2.2.1 Das Immunsystem.....	10
2.2.1.1 Immunologische Toleranz und die Rolle von T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen.....	12
2.2.2 Autoimmunität	13
2.2.3 Das Auge als immunprivilegiertes Organ	16
2.2.4 Autoimmune Uveitis des Menschen	17
2.2.5 Experimentelle induzierbare autoimmune Uveitis in Tiermodellen	19
2.2.6 ERU als spontanes Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen	20
2.3 Migration von Immunzellen	21
2.3.1 Die Bedeutung der Zellmigration	21
2.3.2 Arten der Zellmigration	25
2.3.3 Regulatorische Mechanismen der Zellmigration.....	25
2.4 Zellmetabolismus	27
2.4.1 Stoff- und Energiewechselwege eukaryotischer Säugerzellen	27
2.4.2 Die Rolle des Zellmetabolismus bei Inflammation und Autoimmunerkrankungen.....	28

3.4.2 Antikörper für die Immunzytochemie	46
3.4.3 FCF-Behandlung von PBL augengesunder Pferde	47
3.4.4 Immunzytochemische Färbung.....	48
3.5 Messung der Stoffwechseleigenschaften equiner PBL.....	49
3.5.1 Puffer und Lösungen für die Stoffwechselformung.....	49
3.5.2 Reagenzien des „Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kits“	50
3.5.3 Prinzip der Messung des Zellmetabolismus mittels Seahorse XFe24 Analyzer.....	51
3.5.4 Vorbereitungen am Vortag des Experiments.....	53
3.5.5 Etablierung und Durchführung der Stoffwechselformung.....	54
3.5.6 Statistische Auswertung	55
3.6 Migrationsversuche in 3D-Kollagenmatrix	56
3.6.1 Puffer und Lösungen für Migrationsassays mittels μ -Slides	56
3.6.2 Durchführung der Migrationsassays.....	57
3.6.3 Statistische Auswertung	58
3.7 Identifikation der Interaktionspartner von Septin 7 und DOCK8	59
3.7.1 Immunpräzipitation und Massenspektrometrie	59
3.7.1.1 Auswahl der massenspektrometrisch identifizierten Proteine nach Immunpräzipitation von PBL von an ERU erkrankten Pferden	60
4 ERGEBNISSE	63
4.1 Untersuchung des Migrationsverhaltens von PBL von gesunden und von an ERU erkrankten Pferden in 3D-Kollagenmatrix.....	63
4.1.1. Zielgerichtetes und schnelleres Wanderungsverhalten von PBL von an ERU erkrankten Pferden mit FCS als Chemoattractant.....	64

4.1.2 Ausbleibende chemotaktische Wirkung auf equine PBL mit IL-4 als Chemoattractant	66
4.1.3 IFN γ induziert hohe Wanderungsgeschwindigkeiten der PBL von an ERU erkrankten Pferden	68
4.1.4 PBL von an ERU erkrankten Pferden zeigen deutliches Wanderungsverhalten auf das Autoantigen CRALBP.....	70
4.1.5 Beeinträchtigung des Septin 7-Gerüsts durch FCF verändert das Migrationsverhalten der Lymphozyten von gesunden Pferden	72
4.1.6 Die Expression der Proteine Septin 7 und F-Aktin steht in Zusammenhang mit dem Migrationsverhalten equiner Lymphozyten.....	75
4.1.7 Veränderte Verteilung und Expression von Septin 7 und F-Aktin in gewanderten PBL von gesunden Pferden	77
4.1.8 Verminderte Expression von Septin 7 in gewanderten PBL von an ERU erkrankten Pferden	79
4.2 Identifikation metabolischer Eigenschaften von PBL gesunder Pferde und an ERU erkrankter Pferde.....	81
4.2.1 Messung der Stoffwechseleigenschaften von PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde anhand des OCR	82
4.2.2 Messung der Stoffwechseleigenschaften von PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde anhand des ECAR	84
4.3 Untersuchungen der Proteine ZAP70 und Cdc42 in PBL von gesunden und von an ERU erkrankten Pferden	86
4.3.1 Vergleichbare Expression von ZAP70 in PBL von gesunden und von an ERU erkrankten Pferden.....	87

4.3.1.1 Unterschiedliches Verteilungsmuster von ZAP70 in equinen Lymphozyten	88
4.3.2 Die Expression von Cdc42 ist in PBL von an ERU erkrankten Pferden deutlich erhöht	90
5 DISKUSSION	93
6 ZUSAMMENFASSUNG	117
7 SUMMARY	119
8 LITERATURVERZEICHNIS	121
DANKSAGUNG	147

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BRB	Blut-Retina-Schranke (<i>engl.</i> Blood-Retinal-Barrier)
BSA	Bovines Serum Albumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	Erkennungsmolekül an der Oberfläche von Zellen (<i>engl.</i> Cluster of Differentiation)
CCL	Chemokin-Ligand (<i>engl.</i> Chemokine Ligand)
CCR	Chemokin-Rezeptor (<i>engl.</i> Chemokine Receptor)
Cdc42	Zellteilungskontrollprotein 42 (<i>engl.</i> Cell division control protein 42)
CD4+ T-Zelle	CD4 positiver T-Lymphozyt
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CRALBP	Zelluläres Retinin-Aldehyd-bindende Protein, (<i>engl.</i> Cellular Retinaldehyde-binding Protein)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DZ	Dendritische Zellen
DMEM	Zellkulturmedium (<i>engl.</i> Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> Deoxyribonucleic acid)
DOCK8	Dedicator of Cytokinesis 8
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
ECAR	Extrazelluläre Ansäuerungsrate (<i>engl.</i> Extracellular Acidification Rate)
ECL	Enhanced-Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>engl.</i> Ethylenediaminetetraacetic Acid)

EZM	Extrazelluläre Matrix
engl.	Englisch
et al.	und andere (<i>lat. et aliae</i>)
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
FCCP	<i>engl.</i> Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FCS	Fetales Kälberserum (<i>engl.</i> Fetal calf serum)
FCF	Forchlorfenuron
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	GTP-bindende Proteine
h	Stunde
H ⁺	Proton
H+L	Schwere und leichte Kette (<i>engl.</i> Heavy and Light Chain)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAU	Humane autoimmune Uveitis
HCl	Salzsäure
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
ILK	Integrin-linked Kinase
IP	Immunpräzipitation
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LC	Flüssigchromatografie (<i>engl.</i> Liquid chromatography)
Lck	T-Zell spezifische-Tyrosinkinase (<i>engl.</i> Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)

Abkürzungsverzeichnis

I	Liter
M	Molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl.</i> Major histocompatibility complex)
MIC	Minimale Hemmkonzentration (<i>engl.</i> minimal inhibitory concentration)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mpH	Milli pH
mROS	Mitochondriale Reaktive Sauerstoff Spezies (<i>engl.</i> mitochondrial reactive oxygen species)
MS	Massenspektrometrie
MS	Multiple Sklerose
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate (<i>engl.</i> Oxygen Consumption Rate)
O ₂	Sauerstoff
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
p	Signifikanzwert (<i>engl.</i> probability-value)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS-Tween Lösung
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Abkürzungsverzeichnis

PVP(-T)	Polyvinylpyrrolidone (-Tween) Lösung
RA	Rheumatoide Arthritis
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> rounds per minute)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> Ribonucleic acid)
Rot/AA	Rotenon/Antimycin
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPMI	Zellkulturmedium (<i>engl.</i> Rosewell Park Memorial Institute)
RT	Raumtemperatur
S-Ag	S-Antigen
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate)
siRNA	<i>engl.</i> small interfering RNA
sec	Sekunden
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Tris-buffered saline)
TBS-T	TBS-Tween Lösung
TEM	Transendotheliale Migration
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethylendiamin
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> Transforming growth factor beta)
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>engl.</i> Toll-like receptor)
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRITC	Tetramethylrhodamin
TZR	T-Zell-Rezeptor
vgl.	Vergleichen
WB	Western Blot
ZAP70	<i>engl.</i> Zeta-chain TCR associated protein kinase 70

1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine immunmedierte, entzündliche Erkrankung des Auges und betrifft weltweit etwa 10-25 % der Pferde (Paschalis-Trela et al. 2017; Sandmeyer et al. 2017). Die Erkrankung zeichnet sich durch spontane, wiederkehrende Inflammationsschübe aus, wodurch intraokulare Strukturen zunehmend zerstört werden und letztendlich zu einem vollständigen Sehverlust führen können (Gerding and Gilger 2016). Die Ätiologie der ERU konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden, Studienergebnisse zeigen jedoch, dass es sich um eine T-Zell-medierte Autoimmunerkrankung handelt bei der autoreaktive T-Zellen okuläre Autoantigene angreifen (Schauer et al. 2018). Zudem stellt die ERU das einzig spontane Tiermodell der autoimmunen Uveitis des Menschen dar (Deeg et al. 2008). Durch bislang unbekannte Mechanismen sind aktivierte T-Zellen in der Lage die Blut-Retina-Schranke (BRB) zu überqueren und das Auge zu infiltrieren (Degroote et al. 2017). Da die Migration in das Auge eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der ERU darstellt, wurde in dieser Arbeit das Migrationsverhalten von PBL augengesunder und von an ERU erkrankten Pferden innerhalb einer dreidimensionalen, kollagendichten Umgebung untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Rolle von Septin 7, da dieses Protein bei der Organisation des Zytoskeletts und der Zellmigration wichtige Funktionen einnimmt (Beber et al. 2019; Neubauer and Zieger 2017) und in PBL von an ERU erkrankten Pferden geringer exprimiert wurde (Degroote et al. 2014). Des Weiteren wurde die Rolle bestimmter Interaktionsproteine von Septin 7 und DOCK8 näher untersucht, die das Migrationsverhalten equiner PBL beeinflussen könnten. Neben dem Migrationsverhalten könnte zudem die Rolle des Zellmetabolismus neue Hinweise für die Aufklärung Pathogenese assoziierter Mechanismen der ERU liefern. Da sowohl das Migrationsverhalten von PBL von an ERU erkrankten Pferden als auch der Zellstoffwechsel potentiell proinflammatorischer T-Zellen in der Pathogenese der ERU eine Schlüsselrolle spielen könnten, war es Ziel dieser Arbeit die Migrationseigenschaften sowie Stoffwechseleigenschaften equiner PBL erstmals näher zu charakterisieren.

2 LITERATUR

2.1 Equine rezidivierende Uveitis (ERU)

2.1.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis

Bei der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) handelt es sich um eine bei Pferden vorkommende, spontan auftretende Organ-spezifische Entzündung der mittleren Augenhaut, der Uvea (Gilger and Deeg 2011). Zur Uvea zählen die inneren Augenstrukturen sowie die Choroidea, der Ziliarkörper und die Iris. Bei einer Uveoretinitis ist zusätzlich die Retina betroffen (de Andrade et al. 2016). Die ERU kennzeichnet sich vor allem durch spontan auftretende und wiederkehrende Entzündungsschübe eines oder beider Augen und betrifft weltweit etwa 10-25 % der Pferdepopulation (Paschalis-Trela et al. 2017; Sandmeyer et al. 2017). Unter den equinen Augenerkrankungen stellt die ERU die häufigste Ursache für Erblindungen der betroffenen Augen dar und geht mit ideellen sowie mit hohen finanziellen Verlusten einher (Gerding and Gilger 2016). Die Erkrankung tritt bei Pferden jeden Alters auf und ist unabhängig vom Geschlecht (Sandmeyer et al. 2017). Das Vorliegen einer genetischen Disposition von an ERU erkrankten, deutschen Warmblutpferden wurde ermittelt indem überprüft wurde, ob die ERU vermehrt bei Pferden auftritt, die einen bestimmten ELA-Haplotyp aufweisen (Deeg, Marti, et al. 2004). Unter den 21 identifizierten ELA-A Haplotypen waren es 40 % der ERU-Pferde die den ELA-A Haplotyp A9 auf MHC-I-Klasse-Zellen trugen, dieser jedoch bei keinem der augengesunden Pferde nachgewiesen wurde (Deeg, Marti, et al. 2004). Somit konnte bei Warmblütern eine genetische Disposition an ERU zu erkranken mit dem MHC-Klasse-I-Haplotyp ELA-A9 assoziiert werden (Deeg, Marti, et al. 2004). Weitere Untersuchungen der genetischen Disposition der ERU bei Warmblütern beruhten neben den klassischen serologischen Techniken auf der sogenannten genom-wide association study (GWAS), bei der potentielle Genloci die an der Entstehung der ERU beteiligt sein könnten, identifiziert wurden (Kulbrock et al. 2013). Auf dem equinen Chromosom 20 (ECA 20) konnten Einzelnukleotid-Polymorphismen festgestellt werden, die am nächsten zu den Genloci von IL-17A und IL-17F lokalisiert waren (Kulbrock et al. 2013). Die Autoren schlussfolgerten, dass die Gene IL-17A und IL-17F

bei Warmblütern eine Rolle bei der Entstehung der ERU spielen könnten (Kulbrock et al. 2013). Bei Pferden, die als Fluchttiere gelten, ist die Sehfähigkeit von großer Bedeutung. Ein Verlust des Augenlichtes kann zu unvorhersehbaren Reaktionen des Pferdes führen und somit nicht nur das Pferd, sondern auch den Reiter und weitere Unbeteiligte gefährden. Bei der Erblindung des Pferdes ist aus tierschutzrechtlichen wie auch aus sicherheitsrelevanten Gründen eine Euthanasie unerlässlich. Die equine rezidivierende Uveitis stellt zudem ein geeignetes translationales Modell für die Erforschung der autoimmunen Uveitis des Menschen dar und ist das einzige spontane Tiermodell dafür (Deeg et al. 2002).

2.1.2 Klinische Symptome und Therapie der ERU

Die klinischen Erscheinungen der equinen rezidivierenden Uveitis können sich sehr vielfältig äußern. Neben dem Vorbericht, aus dem rezidivierende Entzündungsschübe an einem oder beiden Augen hervorgehen, ist eine weitreichende Untersuchung der vorderen und hinteren Augenkammer essentiell für die Diagnosestellung der ERU (McMullen and Fischer 2017). Nach Weitstellung der Pupillen kann die Augenuntersuchung mittels einer Spaltlampe, einem direkten oder indirekten Ophthalmoskop sowie einem Ultraschallgerät erfolgen (Gilger and Stoppini 2011; Plummer 2015). Während bei manchen Pferden die an ERU erkrankt sind kaum bis keine klinischen Symptome auftreten und die Erkrankung vorerst nicht erkannt wird, zeigen andere Pferde starke Entzündungsreaktionen an einem oder an beiden Augen (Gilger and Deeg 2011). Die ERU kann anhand der anatomischen Strukturen in eine vordere, intermediäre und hintere ERU eingeteilt werden (Gilger and Deeg 2011). Neben akuten Entzündungsphasen treten auch symptomfreie Phasen auf, die sich durch den wiederkehrenden Verlauf abwechseln (Gilger and Deeg 2011). Mit jedem rezidivierenden Entzündungsschub kommt es progressiv zu einer Zerstörung des betroffenen Gewebes (Gilger and Deeg 2011). In akuten Phasen sind die entzündeten Augen meist sehr schmerzempfindlich und Pferde können mit einer starken Abwehrreaktion bei Berührung der Augenumgebung reagieren (Gilger and Michau 2004). Klassische Symptome während eines akuten Schubes bei Beteiligung der vorderen Augensegmente wie dem Ziliarkörper und der Iris sind Blepharospasmus, Epiphora, Photophobie sowie Miosis (Fischer et al. 2019). Zudem fallen oftmals stark

gerötete Konjunktiven und eine Trübung der Hornhaut auf (Thangadurai et al. 2010). Neben fokalen Katarakten treten auch Synechien auf, die im späteren Verlauf nur noch operativ entfernt werden können (Frühauf et al. 1998; Gilger and Michau 2004). Darüber hinaus können auch die Strukturen des hinteren Augensegmentes betroffen sein, was zu Beginn oftmals nicht erkannt wird, da äußerlich sichtbare Symptome sowie Schmerzempfindlichkeit ausbleiben (Gilger and Deeg 2011). Diese Verlaufsform ist typisch für die hintere Uveitis (Gilger and Deeg 2011). Die Entzündung und Gewebsschädigung der im hinteren Augensegment befindlichen Strukturen des Glaskörpers, der Retina und der Choroidea haben gravierende Auswirkungen. Letztendlich kann die Degeneration der retinalen Strukturen zur vollständigen Erblindung des Auges führen (Gilger and Deeg 2011; Strobel, Wilkie and Gilger 2007). Da es bislang keine kausale Therapie der ERU gibt, steht an erster Stelle, die Symptome und ihre Spätfolgen bestmöglich einzudämmen. Dabei wird eine nichtinvasive, medikamentöse Therapie oder eine invasive, chirurgische Therapie beziehungsweise eine Kombination aus beiden Therapieformen gewählt (Fischer et al. 2019; McMullen and Fischer 2017). Die konservative Therapie beruht auf einer systemischen, antiinflammatorischen und analgetischen Therapie und auf einer lokalen, intravitrealen Verabreichung von immunsuppressiven Therapeutika (Gilger and Michau 2004). Das Immunsuppressivum Ciclosporin A wirkt, indem es die Produktion von aktivierten T-Helferzellen hemmt und dadurch erneute Inflammationsschübe verringert, und hat sich als erfolgsversprechende Therapie bewährt (Gerding and Gilger 2016; Gilger et al. 2010). Durch den Einsatz von antiinflammatorischen, suprachoroidalen Ciclosporin-haltigen Implantaten konnte die Sehfähigkeit von an ERU erkrankten Pferden erfolgreich verlängert werden (Gilger et al. 2006; Gilger et al. 2010). Weitere Therapieansätze mit dem immunsuppressiv wirkenden Makrolid-Antibiotikum Rapamycin, das durch Komplexbildung mit mTOR die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen verhindert, wurden in der Humanmedizin bei Uveitispatienten erfolgreich angewendet (Mikhail and Sallam 2013). Die Therapie mit Rapamycin wurde bei an ERU erkrankten Pferden jedoch noch nicht angewendet und müsste auf Wirkung und Erfolg untersucht werden. Wird bei an ERU erkrankten Pferden angenommen, dass eine bakterielle Infektion durch Leptospiren für die entzündlichen Schübe verantwortlich ist, kommen Antibiotika zum Einsatz (Brandes et al. 2007; Launois et al. 2019). Da im Rahmen operativer Eingriffe, der Pars Plana Vitrektomie (PPV), die verwendeten Glaskörperspüllösungen das Aminoglykosid-

Antibiotika Gentamicin enthalten (Werry and Gerhards 1992), wurde in einer aktuellen Studie getestet, ob die intravitreale, niedrig-dosierte Injektion von Gentamicin allein als alternative Therapie der ERU dienen kann (Fischer et al. 2019). Durch intravitreale Injektion von 4 mg Gentamicin konnte die Rezidiv- und Inflammationsrate bei an ERU erkrankten Pferde reduziert werden (Fischer et al. 2019). Jedoch ist neben der kontrovers diskutierten Hypothese, dass die ERU von Leptospiren ausgelöst wird, die Gabe von Gentamicin umstritten, da Gentamicin starke Nebenwirkungen zeigt und unter anderem neurotoxisch wirkt (Lindsey and Townes-Anderson 2018).

Zudem konnte die Leptospiren-spezifische Wirkung des Antibiotikums in dieser Studie nicht sicher nachgewiesen werden, da bei über 60 % der untersuchten Glaskörper- und Blutproben der ERU-Pferde der Leptospiren-Titer negativ war und der Rückgang der Inflammation nach Gentamicin-Injektion somit auf unbekanntem, immunmedierten Mechanismen beruhte (Fischer et al. 2019). Eine erfolgsversprechende Behandlung der ERU durch den invasiven, chirurgischen Eingriff der Pars Plana Vitrektomie geht durch die Entfernung des entzündlichen, veränderten Glaskörpermaterials mit einem deutlichen Rückgang der Rezidivrate einher (Gerhards 1997; Werry and Gerhards 1992). Nach der Entfernung von Fibrin, entzündetem und abgestorbenem Glaskörpergewebe sowie inflammatorischen Zellen wird zum einen die Sehfähigkeit gesteigert, zum anderen wird der progrediente Krankheitsverlauf mit wiederkehrenden Schüben eingedämmt (Gerhards 1997; Werry and Gerhards 1992). Es muss jedoch bedacht werden, dass wie bei den meisten operativen Eingriffen, mit intra- und postoperativen Risiken gerechnet werden muss. So kam es intraoperativ in seltenen Fällen zu irreversiblen Verletzungen der retinalen Strukturen oder es bildeten sich postoperative Katarakte aus, die das Sehvermögen der Pferde einschränkten (Gerhards 1997). Neben der immunsuppressiven Therapie, durch die die Inflammationen kontrolliert werden können, ist die Vitrektomie eine wirkungsvolle Therapieform die vor allem in Europa gute Erfolgsraten verschreibt (Spiess 2010). Dennoch kann die ERU nicht gänzlich geheilt werden, was vor allem am immunmedierten Krankheitsgeschehen und den noch unbekanntem, auslösenden Mechanismen liegt.

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese der ERU

Die initialen Auslöser der equinen rezidivierenden Uveitis konnten bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Spiess 2010; Witkowski et al. 2016). Die erstmalige Beschreibung der equinen rezidivierenden Uveitis liegt über 2000 Jahre zurück und wurde als Mondblindheit deklariert (Malalana, Stylianides and McGowan 2015). Diese Bezeichnung beruhte auf der Annahme, dass die periodisch erscheinenden Entzündungsschübe und die damit einhergehende Erblindung mit dem abnehmenden Mond zusammenhängen könnten (Malalana, Stylianides and McGowan 2015). Seit Mitte des letzten Jahrhunderts wird die Beteiligung einer bakteriellen Infektion mit Leptospiren in Betracht gezogen, da in Glaskörperproben an ERU erkrankter Pferde hohe Antikörpertiter gegen Leptospiren gefunden wurden (Sauvage et al. 2019). Zunehmend hat sich in den vergangenen Jahren jedoch erwiesen, dass es sich bei der ERU um eine immunmedierte, genauer gesagt eine T-Zell medierte Erkrankung handelt (Degroote et al. 2017; Schauer et al. 2018). Die krankheitstypischen Merkmale wie die spontan auftretenden und wiederkehrenden Inflammationen sowie erfolgreiche Therapieansätze mit immunsupprimierenden Therapeutika sprechen für ein autoimmunmediertes Geschehen (Deeg 2008; Malalana, Stylianides and McGowan 2015). Des Weiteren konnten bei der Vielzahl an untersuchten histologischen Präparaten von an ERU erkrankten Pferdeaugen keine Leptospiren durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen werden (Kleinwort et al. 2016; Regan et al. 2012). Um die Pathogenese der ERU bei Pferden, das einzig spontane Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen, zu überprüfen, wurde ein Modell etabliert, indem die ERU bei Pferden experimentell durch periphere Immunisierung mit retinalem Autoantigen induziert wurde (Deeg et al. 2002). Bei sieben von sieben Pferden löste die Immunisierung mit dem retinalen Autoantigen Interphotorezeptor Retinoid-bindenden Protein (IRBP) eine Uveitis aus (Deeg et al. 2002). Die Untersuchung histologischer Augenpräparate von Pferden, die an induzierter ERU erkrankten, zeigte Veränderungen intraokularer Strukturen mit T-Zellinfiltraten (Deeg et al. 2002). Diese waren vergleichbar mit den Veränderungen bei spontan an ERU erkrankten Pferden oder bei Mäusen, die an der experimentellen autoimmunen Uveitis erkrankten (Caspi et al. 1988; Deeg et al. 2002). Somit konnte erstmals bewiesen werden, dass die ERU eine T-Zell-bedingte Immunantwort ist, die sich gegen

Autoantigene des Auges richtet, was durch weitere Studien belegt werden konnte (Deeg, Pompetzki, et al. 2006; Deeg, Reese, et al. 2004; Deeg et al. 2002). Neben IRBP konnte das zelluläre Retinin-Aldehyd-bindende Protein (CRALBP) als potentes okulares Autoantigen identifiziert werden (Deeg, Pompetzki, et al. 2006). Intraokulare Zellinfiltrate, die als tertiäres lymphatisches Gewebe bezeichnet werden, konnten in Paraffin eingebetteten Augenpräparaten von an ERU erkrankten Pferden immunhistochemisch nachgewiesen werden (Kleinwort et al. 2016). Dabei wurde deutlich, dass sich im Zellinfiltrat vor allem CD4+ T-Helferzellen (Th-Zellen) befanden, die unter anderem Transkriptionsfaktoren wie pSTAT1 und das T-Zell-Aktivierungsmolekül ZAP70 exprimierten (Gilger et al. 1999; Kleinwort et al. 2016). Eine Aktivierung von CD4+ Th-Zellen, dem vorherrschenden Zelltyp bei Pathogenese assoziierten Prozessen der ERU, findet im Thymus statt, wodurch sie sich zu unterschiedlichen Effektorzellen differenzieren können (Eagar and Miller 2019). Th1-Zellen des Pferdes produzieren vor allem proinflammatorische Zytokine wie IFN γ und IL-2 (Freer et al. 2017; Wagner, Burton and Ainsworth 2010). Zytokine, die bei an ERU erkrankten Pferden vermehrt im Auge sowie im Blut nachgewiesen werden konnten (Gilger et al. 1999; Saldinger et al. 2019). Durch weitere Untersuchungen des Zytokinprofils in Augen von an ERU erkrankten Pferden wurde neben einer Th1-Immunantwort auch die Beteiligung von Th17-T-Zellen bei der Pathogenese der ERU hervorgebracht (Regan et al. 2012; Simeonova, Krastev and Simeonov 2016). Th17-Zellen spielen bei Autoimmunerkrankungen eine große Rolle, unter anderem bei der autoimmunen Uveitis (Li et al. 2019) und der Multiplen Sklerose des Menschen (Capone et al. 2019). Th17-Zellen sind proinflammatorische Zellen und sekretierten in PBL von MS-Patienten die Zytokine IL-2, IL-21 und IL-17 signifikant stärker als PBL gesunder Kontrollen (Capone et al. 2019). Für die Differenzierung der humanen Th17-Zellen sind unter anderem IL-6, TGF- β und IL-23 notwendig (Capone et al. 2019). Da die Rolle der Th17-Zellen bei der ERU unbekannt war, wurden Augenpräparate von an ERU erkrankten Pferden immunhistochemisch angefärbt (Regan et al. 2012), um zu testen, ob ein Zytokinprofil vorliegt das auf eine Th17-zellvermittelte Reaktion hindeutet. Im Zytoplasma der nicht-pigmentierten Ziliarepithelzellen und der infiltrierenden CD3-positiven T-Zellen wurden die Zytokine IL-6, IL-17 und IL-23 nachgewiesen (Regan et al. 2012), wodurch eine Beteiligung der Th17-Immunantwort bei der ERU belegt werden konnte.

Gezeigt am Modell der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) produzierten Mäuse nach Immunisierung mit dem retinalen Autoantigen IRBP, IL-17-exprimierende, IRBP-spezifische T-Zellen (Peng et al. 2007). Diese Antigen-spezifischen Zellen wurden nach Expansion in naive Mäuse injiziert und lösten in diesen Mäusen eine schwerwiegende EAU aus (Peng et al. 2007), wodurch die Pathogenese assoziierte Beteiligung dieser Zellen bewiesen wurde. Die Bedeutung und Funktionen von Th17-Zellen bei der ERU wurden im Rahmen einer Studie, bei der in sechs Pferden eine Uveitis induziert wurde, näher untersucht und zeigte, dass IL-17 und das Autoantigen CRALBP in entzündeten Augen von an ERU erkrankten Pferden deutlich exprimiert wurden (Simeonova, Krastev and Simeonov 2016). Durch den Nachweis hoher Konzentrationen des Zytokins IL-17 in den Glaskörperproben der an ERU erkrankten Pferde wurde die mögliche Beteiligung der Th17-Zellen bei der Entstehung der equinen Uveitis gestärkt (Simeonova, Krastev and Simeonov 2016). Um zu klären, ob es sich bei der ERU um eine überschießende Inflammation handelt die durch Th1- oder Th17-T-Zellen initiiert wird, oder es sich um einen Mangel an regulatorischen Mechanismen handelt, wurde die Rolle der regulatorischen T-Zellen bei der ERU untersucht (Regan et al. 2012). Regulatorische T-Zellen (Tregs), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-T-Zellen, spielen bei der peripheren Toleranz eine wichtige Rolle, indem sie die inflammatorische Reaktion autoreaktiver T-Zellen verhindern können (Gery and Caspi 2018; Wing and Sakaguchi 2019). Aus Untersuchungen der T-Zellen von Maus und Mensch ist bekannt, dass Tregs einer differenzierten T-Zellpopulation angehören, die sich durch die spezifische und hohe Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 von anderen T-Zellen unterscheiden und immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- β produzieren (Gery and Caspi 2018; Wing and Sakaguchi 2019). Ein Mangel an Tregs kann die Entwicklung von Inflammationen und Autoimmunerkrankungen begünstigen, da eine notwendige Immunsuppression und die Kontrolle oder Hemmung von überschießenden Immunantworten nicht gegeben ist (Henriquez et al. 2014; Robbin et al. 2011). Die Untersuchung equiner T-Lymphozyten brachte die Heterogenität von Foxp3⁺ T-Zellen hervor, da CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen Foxp3 exprimierten und nach Aktivierung *in vitro* CD4⁺ Foxp3⁺ IFN γ ⁺ und CD4⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Zellen nachgewiesen wurden (Robbin et al. 2011). Da die Expression von CD8⁺ Foxp3⁺ T-Zellen sehr gering war, wurde diese Zellpopulation nicht näher charakterisiert (Robbin et al. 2011).

Zudem wurde in der Studie festgestellt, dass der Anteil an Tregs mit dem Alter der Tiere abnahm, was gegensätzlich zu den Studienergebnissen bei Mäusen ist, da der prozentuale Anteil Foxp3+ T-Zellen mit dem Alter anstieg (Robbin et al. 2011; Zhao et al. 2007). Die Kenntnisse über die Rolle und Funktion equiner Tregs sind insgesamt noch limitiert, da auch der Nachweis der regulatorischen T-Zellen durch die mangelnde Verfügbarkeit von Spezies-spezifischen Antikörpern erschwert wird (Robbin et al. 2011). Die Rolle und Beteiligung regulatorischer T-Zellen spielt bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen von Mensch und Tier eine große Rolle, jedoch ist fraglich ob und wie regulatorische Mechanismen gestärkt werden könnten, um Pathogenese assoziierte Mechanismen zu verhindern, die eine Autoimmunerkrankung auslösen (Chen, Colello, et al. 2019). Bei Pferden müsste die Rolle von CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen weiter erforscht werden, um herauszufinden ob die ERU nur durch einen Überschuss an proinflammatorischen T-Zellen, einen Mangel an Tregs oder durch eine Kombination aus beiden Faktoren ausgelöst wird.

2.2 Immunsystem und Autoimmunerkrankungen

2.2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zellen und Moleküle, die für eine regulierte und erfolgreiche Immunantwort auf Krankheitserreger, Toxine und körpereigene Schäden zuständig sind (Sirisinha 2014). Das Immunsystem sorgt für die Aufrechterhaltung eines intakten und geschützten Organismus und wird dabei in eine angeborene Immunantwort und eine erworbene, adaptive Immunantwort eingeteilt (Janeway and Medzhitov 2002; Wong and Germain 2018). Auch wenn das angeborene und das erworbene Immunsystem oftmals separat voneinander beschrieben werden, sind die beiden Systeme direkt aneinandergeschlossen.

Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch seine schnelle Immunantwort gegen fremde, krankheitserregende Organismen aus, die zur Produktion von Zytokinen und ko-stimulatorischen Molekülen und zur Elimination der Pathogene führt (Uchimura et al. 2018). Zur zellulären Abwehr des angeborenen Immunsystems zählen Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DZ), Mastzellen sowie neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten (Koenderman, Buurman and Daha 2014). Um

Pathogene zu erkennen weisen die Zellen sowohl oberflächliche als auch intrazelluläre Rezeptoren auf (Kubelkova and Macela 2019). Zu diesen als Pattern Recognition Receptors bezeichneten Rezeptoren zählen der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR), die Toll-like-Rezeptoren (TLR), sowie intrazellulär gelegene Pathogen-Erkennungssysteme wie die Proteine der NOD-Familie oder Protein-Kinasen, die nach viraler Infektion aktiviert werden (Franz and Kagan 2017). Durch die erforderliche Antigenpräsentation auf den Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), vorrangig den dendritischen Zellen, erhalten die Zellen des adaptiven Immunsystems über ihre B- oder T-Zell-Rezeptoren die notwendigen Signale um die nachfolgende, Antigen-spezifische Immunantwort einzuleiten (Garçon and Okkenhaug 2016). Die Interaktion zwischen Zellen des angeborenen Immunsystems und des adaptiven Immunsystems ist obligatorisch, um die zugrundeliegenden Auslöser der Inflammation zu bekämpfen (Eagar and Miller 2019). Damit T-Helferzellen (Th-Zellen) mit einer entsprechenden Immunantwort auf Antigene reagieren können, müssen MHC-Klasse-II-Moleküle von APZ die entsprechenden Antigene binden und präsentieren (Garçon and Okkenhaug 2016). Die Anfälligkeit Autoimmunerkrankungen wie der Behçet-Krankheit des Menschen, bei der sich oftmals eine schwerwiegende Uveitis manifestiert, oder der equinen rezidivierenden Uveitis der Pferde zu entwickeln, wurde mit MHC-Klasse-I-Molekülen in Verbindung gebracht (Deeg, Marti, et al. 2004; Rosenbaum, Lin and Asquith 2016; Tong et al. 2019). Analysen der equinen Leukozyten Antigene (ELA) ergaben, dass die Genloci für MHC-Klasse-I und -II-Moleküle auf dem Chromosom 20 liegen und die ELA-DRB, -DQA, -DQB und -DOB-Klasse-II-Moleküle kodieren (Miller et al. 2017; Viļuma et al. 2017). Bei Pferden, genauer gesagt Warmblütern, konnte eine genetische Disposition an ERU zu erkranken mit dem MHC-Klasse-I-Haplotyp ELA-A9 assoziiert werden (Deeg, Marti, et al. 2004). Das erworbene, adaptive Immunsystem zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass die beteiligten Effektorzellen durch eine immense Variabilität der Antigen-Rezeptoren sehr gezielt auf bestimmte Antigene reagieren können (Boehm and Swann 2014). Die Hauptfunktion von T-Zellen besteht darin, mit ihrer streng regulierten Immunantwort und der damit verbundenen Zytokinproduktion, andere Zellen des Immunsystems zu aktivieren und zum Herd der Inflammation zu rekrutieren (Lazarski et al. 2013). Zudem sind sie in der Lage ein sogenanntes Gedächtnis auszubilden, um bei erneuter gleicher Antigenpräsentation schnell zu reagieren (Majri et al. 2018).

2.2.1.1 Immunologische Toleranz und die Rolle von T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen

Damit T-Zellen endogene von fremden Antigenen unterscheiden können und vermieden wird, dass sich die Immunantwort gegen körpereigenes Gewebe richtet, ist die Immuntoleranz ausschlaggebend und wird durch verschiedene Toleranzmechanismen reguliert (Lu, Barbi and Pan 2017). Die Erkennung von potentiellen autoreaktiven T-Zellen ist entscheidend, um autoimmune Antworten zu verhindern und endogenes Gewebe unbeschädigt zu lassen. Die Mechanismen der Immuntoleranz für T-Zellen finden im Thymus statt (Gery and Caspi 2018). Während T-Zellen innerhalb des Thymus reifen findet eine positive und negative Selektion dieser Zellen statt (Gery and Caspi 2018).

Epitheliale Thymuszellen enthalten den Transkriptionsfaktor „Autoimmune Regulator“ (Aire),, der die Expression tausender, nicht-thymischer Antigene exprimieren kann (Ofstedal et al. 2015). Menschen, die eine Mutation des Aire-Gens aufweisen erkranken an dem autoimmunen polyglandulären Syndrom 1 (APS1), im Englischen auch autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) genannt (Meredith et al. 2015). In Aire -/- Mausmodellen wurde an Aire-Knockout-Mäusen gezeigt, dass sie eine spontane Uveitis entwickelten (Chen et al. 2013) oder eine autoimmune, chronisch progressive Entzündung multipler Organe zeigten, die der humanen APECED ähnelte (DeVoss et al. 2006). Im Gegensatz zu den schützenden Mechanismen des Aire-Gens wurden neue Erkenntnisse zur Funktion von Aire in einer Studie zur rheumatoiden Arthritis (RA) bei Menschen aufgedeckt, in der Aire eine bislang unbekannte, pro-inflammatorische Rolle bei der Entstehung der autoimmunen Erkrankung zugeschrieben wurde (Bergström et al. 2019). Aire wurde bei der Untersuchung des Transkriptoms aktivierter Fibroblasten-ähnlicher Synovialzellen (FLS) als eines von 24 RA-assoziierten Genen ermittelt und förderte die Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, unter anderem CXCL10, das mit der Krankheitsaktivität bei RA assoziiert wurde (Bergström et al. 2019). Zu weiteren regulatorischen Mechanismen, die bei der Reifung der T-Zellen im Thymus stattfinden, gehört die Induktion der Apoptose von entarteten Lymphozyten durch CD95 (Fas) (Williams et al. 2018). Trotz zentraler Toleranz kann es sein, dass autoreaktive T-Zellen im Thymus nicht selektiert werden und in die Blutbahn gelangen (Peterson and

Maltzman 2019). Es müssen dann die Mechanismen der peripheren Toleranz eingreifen, um die Reaktionen der autoreaktiven Zellen zu verhindern. Eine Form ist die klonale Anergie, die stattfindet, wenn T-Zellen Kontakt mit Antigenen haben ohne dass dabei ko-stimulatorische Signale durch CD28 und CD80/CD86 präsent waren (Kubach et al. 2007). Die T-Zell-Aktivierung bleibt somit aus und die Zellen geraten in einen anergen Zustand, in dem sie ihre Effektorfunktionen nicht mehr ausbilden können (McKinney et al. 2015). Obwohl die Reifung der T-Zellen nach Verlassen des Thymus abgeschlossen ist kann sich die T-Zelle durch sogenanntes Rezeptor-Editing weiterentwickeln (Nemazee 2006). Die TZR können sich so verändern, dass autoreaktive T-Zellen entstehen, die durch die zentrale Toleranz nicht mehr erkannt werden (Nemazee 2006).

Zusätzlich nehmen regulatorische T-Zellen bei der peripheren Toleranz eine wichtige Rolle ein (Gery and Caspi 2018). Die hohe Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 zeichnet regulatorische T-Zellen (Tregs) aus, nachgewiesen bei der Maus und beim Menschen, und steht im Zusammenhang immunologische Prozesse durch Hemmung oder Aktivierung zu steuern (Lu, Barbi and Pan 2017). Gerät die Balance zwischen potentiell autoreaktiven T-Effektorzellen und der körpereigenen Selbsttoleranz jedoch aus dem Gleichgewicht, kann es zu einer Dysregulation innerhalb des Immunsystems kommen, was die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigt.

2.2.2 Autoimmunität

Die Komplexität des Immunsystems birgt auch Gefahren, da neben der erfolgreichen Immunantwort gegen fremde Antigene, auch die Möglichkeit besteht, dass körpereigenes, gesundes Gewebe von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems angegriffen wird (Bing et al. 2019; Wang et al. 2018). So sind T- und B-Zellen in der Lage Antigen-bindende Rezeptoren zu bilden, die potentielle Autoantigene erkennen, diese binden und autoreaktive Immunantworten auslösen (Bayersdorf, Fruscalzo and Catania 2018). Das Problem dabei ist, dass im Falle einer Autoimmunerkrankung die verloren gegangene Selbsttoleranz nicht rückgängig gemacht oder therapiert werden kann. Bei Mensch und Tier sind zahlreiche Autoimmunerkrankungen bekannt, die entweder Organ-spezifisch sind und

beispielsweise gezielt β -Inselzellen des Pankreas bei Diabetes des Typ 1 oder retinale Antigene bei der autoimmunen Uveitis angreifen oder sich wie beim Systemischen Lupus Erythematodes (SLE) auf den Gesamtorganismus auswirken (Chen et al. 2017; Malalana, Stylianides and McGowan 2015; Takeshima et al. 2019). Die Prävalenz von Autoimmunerkrankungen in der Weltbevölkerung ist in den letzten Jahren angestiegen und beträgt derzeit etwa 5 % (Zhao et al. 2019). Es gibt mehrere Hypothesen, die mögliche initiiierende Faktoren für die Entstehung autoimmuner Erkrankungen verantwortlich machen. Dazu zählen die molekulare Mimikry, das Epitop Spreading und die Bystander-Aktivierung (Pacheco et al. 2019). Des Weiteren können eine genetische Prädisposition oder Umwelteinflüsse und infektiöse Erreger wie Viren oder Bakterien die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen (Anaya et al. 2016). Extrinsische Faktoren wie bakterielle oder virale Infektionen können durch molekulare Mimikry und Bystander-Aktivierung dazu führen, dass der Körper autoreaktive T-Zellen gegen endogenes Gewebe bildet (HoHsieh et al. 2017). Molekulare Mimikry beschreibt die Ähnlichkeit zwischen Epitopen fremder Antigene, beispielsweise viraler Proteine, und endogener Antigene des Wirtes, welche entweder durch Sequenzhomologie oder durch die Ähnlichkeit der Konformation der Epitope entsteht (Oldstone 1998). Es kommt zu einer Querreaktion zwischen dem fremden und körpereigenem Antigen, welche eine Bildung von Antikörpern gegen das Autoantigen auslösen kann (Neo et al. 2019; Oldstone 1998). Die autoreaktive Immunantwort bleibt bestehen, auch wenn der auslösende Faktor, etwa virale Proteine, eliminiert wurde. Für die Aufrechterhaltung der Autoimmunantwort ist die Präsenz der Fremdantigene nicht mehr nötig, da die Immunantwort auf körpereigene Antigene gerichtet ist (Oldstone 1998). Das autoantigene Epitop Ro, gegen das manche Patienten Autoantikörper bilden die am Systemischen Lupus Erythematodes leiden, ist nahezu homolog zum Epitop EBNA-1, das auf Epstein-Barr-Viren präsentiert wird und steht im Verdacht SLE durch molekulare Mimikry zu induzieren (Cassaniti et al. 2019; McClain et al. 2005). Des Weiteren wird bekräftigt, dass durch Epitop Spreading die wiederkehrenden Entzündungsschübe entstehen können, wie im Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), der Multiplen Sklerose (MS) des Menschen, demonstriert wurde (Lehmann et al. 1992). Der funktionelle Beweis des inter- und intramolekularen Spreadings konnte in einer weiteren Studie an Mäusen gezeigt werden (McRae et al. 1995). Dabei konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die zuvor durch adoptiven Transfer mit PLP139-151-spezifischen T-Zellen immunisiert

wurden, T-Zellen gegen ein sekundäres enzephalitogenes Peptid, PLP178-191M, ausbildeten (McRae et al. 1995). Diese Befunde wurden mit den charakteristischen, wiederkehrenden Entzündungsschüben der Erkrankung assoziiert (McRae et al. 1995). Dabei reagiert das Immunsystem vorerst gegen ein Epitop eines fremden Antigens, das jedoch durch Veränderungen der TZR und BZR gegen weitere Epitope desselben Proteins aktiviert wird (Boldison et al. 2015). Im Verlauf kann sich die Immunantwort jedoch auch gegen Epitope endogener Antigene richten, wodurch autoreaktive Antworten begünstigt werden (Boldison et al. 2015). Der Nachweis von intramolekularem Spreading (Deeg et al. 2002) und intermolekularem Spreading (Deeg, Amann, et al. 2006) gelang durch Langzeitstudien von an ERU erkrankten Pferden, durch Untersuchungen der Immunantwort auf okuläre Autoantigene. Nach Immunisierung von Pferden mit IRBP wurde durch intermolekulares Epitop Spreading die Immunantwort auf weitere retinale Autoantigene wie S-Antigen sowie CRALBP ausgelöst (Deeg, Amann, et al. 2006). Diese Erkenntnisse könnten eine Erklärung für die bei der ERU charakteristischen, rezidivierenden Entzündungsschübe sein (Deeg, Amann, et al. 2006). In Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen steht zudem die Beteiligung der sogenannten Bystander-Aktivierung (Pacheco et al. 2019). Diese findet statt, wenn durch die Immunantwort Antigen-spezifischer T-Zellen auf ein Pathogen und durch die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-2 umliegende T-Zellen aktiviert werden, die zuvor nicht an der Antigen-spezifischen Immunantwort beteiligt waren (Pacheco et al. 2019). Die zuvor unbeteiligten T-Zellen können wiederum zur Produktion von Zytokinen angeregt werden, die umliegendes Gewebe zerstören und die Entstehung einer autoimmunen Antwort gegen endogenes Gewebe begünstigen (Pacheco et al. 2019). Als einen weiteren möglichen Grund für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wird die oftmals unbekannte Wirkung von Impfungen und den dabei verwendeten Adjuvanzen angeführt (van Aalst et al. 2017). In einem Mausmodell konnte die Bystander-Aktivierung von zuvor injizierter, markierter CD4+ T-Zellen im iliakalen Lymphknoten von Mäusen nachgewiesen werden, die durch die intramuskuläre Injektion von Kompletten Freund-Adjuvans immunisiert wurden (van Aalst et al. 2017). Die Heterogenität der regulatorischen und beteiligten Mechanismen in Autoimmunerkrankungen trägt dazu bei, dass die Entwicklung erfolgversprechender Therapieansätze erschwert wird.

2.2.3 Das Auge als immunprivilegiertes Organ

Die Bezeichnung des Immunprivilegs beruht auf einer Beobachtung, die die Forscher Peter Medawar und Kollegen erstmals Mitte des 20. Jahrhunderts gemacht haben, nachdem Hauttransplantate, die sie in die vordere Augenkammer von Kaninchen einsetzten, nicht direkt abgestoßen wurden (Medawar 1948). Die zu erwartende Immunantwort, also die Abstoßung des fremden Materials, die in anderen Bereichen des Körpers zu sehen war, trat erst sehr viel später ein. Die Forscher begründeten diese Beobachtungen dadurch, dass durch fehlende ableitende Lymphgefäße des Auges die Antigenpräsentation im Lymphknoten ausbleibt und somit keine Immunantwort eingeleitet werden kann (Medawar 1948). Bestimmte Organe, wie das Auge und das Gehirn, nehmen eine besondere Stellung im Organismus ein und werden als immunprivilegierte Organe bezeichnet (Horai et al. 2015). Die Stellung der immunprivilegierten Organe ist jedoch nicht mit einer immunologischen Ignoranz gegenüber dem Immunsystem zu vergleichen, sondern beruht vielmehr auf streng regulierten mechanischen und immunsuppressiven Mechanismen, die diese Organe vor immunmedierten Entzündungen schützen (Taylor 2016). Da die Retina nur über eingeschränkte Fähigkeiten verfügt, Gewebe zu erneuern und zu reparieren, ist jede noch so kleine Schädigung retinaler Strukturen mit schweren Folgen verbunden. Aus diesem Grund sind die schützenden Mechanismen des Auges essentiell (Chen, Luo, et al. 2019). Zum einen ist die Konzentration von MHC-Klasse II-positiven Antigenpräsentierenden Zellen, in murinen Augen sehr gering, wodurch eine Antigenpräsentation von vornherein reduziert ist (Streilein et al. 2002). Zum anderen enthält das Auge zusätzlich immunsuppressive Faktoren wie Neuropeptide, Zytokine wie TGF- β , Komplement- und Makrophagen-Hemmungsfaktoren (Stein-Streilein 2008). Zusätzlich dient die Blut-Retina-Schranke, mit den dazugehörigen Strukturen des retinalen Pigmentepithels (RPE), als Barriere zwischen intraokularen Strukturen und dem Immunsystem und trägt hauptsächlich als mechanischer Schutz zum Erhalt des immunprivilegierten Status bei (Taylor 2007). Das RPE sorgt durch seine festen Zellverbände dafür, dass es unter physiologischen Bedingungen für Bestandteile des Immunsystems kaum möglich ist, diese Barriere zu überwinden (Streilein et al. 2002). Zudem wurde der Mechanismus der sogenannten Anterior chamber associated immune deviation (ACAID) in Versuchen mit Mäusen beschrieben, die mit einer

abweichenden Immunantwort reagierten, nachdem ein in der Vorderkammer platziertes Antigen injiziert wurde (Streilein et al. 2002). Weitere Versuche an weiblichen C57BL/6 Mäusen haben gezeigt, dass nach subretinaler Injektion bestimmter Peptide, die jeweils MHCI- und MHCII-restriktive T-Zell-Epitope des HY-Antigen von männlichen Mäusen beinhalten, eine systemische Hemmung der Immunantwort von CD4+ und CD8+ T-Effektorzellen induziert wurde (Vendomèle et al. 2018). Mäuse, die zuvor subretinale Peptide injiziert bekamen, sekretierten nach subkutaner Injektion derselben Peptide, signifikant geringere Mengen T-Zell-spezifischer Zytokine und HY-spezifische CD4+ T-Zellen proliferierten weniger nach Stimulation *in vitro* (Vendomèle et al. 2018). Diese Erkenntnisse bekräftigen die Beteiligung des Auges als immunprivilegiertes Organ, eine immunmodulatorische Rolle im systemischen Immunsystem einzunehmen, wobei die genauen Mechanismen der Modulation und Regulation peripherer Immunantworten durch okulare Strukturen näher charakterisiert werden müssen (Vendomèle et al. 2018). Unter Berücksichtigung der besonderen immunologischen Stellung des Auges ist es von großem Interesse herauszufinden, wie sich periphere, autoreaktive T-Zellen gegen okulare Autoantigene richten können.

2.2.4 Autoimmune Uveitis des Menschen

Die autoimmune Uveitis des Menschen ist eine nicht-infektiöse, inflammatorische Erkrankung des Auges, bei der die stark pigmentierten und vaskularisierten Strukturen der Iris, des Ziliarkörpers sowie der Choroidea betroffen sein können (Selmi 2014). Auch wenn die Prävalenz weltweit nicht hoch ist, so sind die Spätfolgen der immunmedierten Uveitis mit Entstehung von Katarakten, Makulaödemen oder Glaukomen sehr gravierend (Dick et al. 2016). Letztendlich führt die autoimmune Uveitis des Menschen (HAU) laut US-amerikanischen Studien unbehandelt bei 10-15 % der erkrankten Patienten zu einem vollständigen Sehverlust (Dick et al. 2016; Thorne et al. 2016). Bis heute konnte die zugrundeliegende Ursache für die Entstehung der Erkrankung nicht aufgedeckt werden. Forschungsergebnisse sprechen jedoch dafür, dass es sich bei der HAU um eine T-Zell-medierte Autoimmunerkrankung handelt, bei der retinale Autoantigene durch autoreaktive CD4+ T-Zellen angegriffen werden (Lee et al. 2014). Mittels Seren von Patienten, die an der

Autoimmunkrankheit der Uveitis-assoziierten Juvenilen Idiopathischen Arthritis (JIAU) erkrankt waren, konnte eine Immunantwort auf okulare Antigene nachgewiesen werden (Busch et al. 2019). Die genetische Disposition an Uveitis zu erkranken wurde mit dem MHC-I-Klasse-Molekül HLA B27 assoziiert (Brewerton et al. 1973). Die Uveitis des Menschen wird nach der „International Uveitis Study Group (IUSG)“ mittels standardisierter Nomenklatur, „Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN)“ anhand der anatomischen Lokalisation der Veränderungen charakterisiert und eingeteilt (Jabs, Nussenblatt and Rosenbaum 2005). So kann die anteriore Uveitis von der intermediären und der posterioren Uveitis, sowie der Panuveitis unterschieden werden (Jabs, Nussenblatt and Rosenbaum 2005). Die vordere Uveitis und die Panuveitis gelten als die häufigsten Formen der immunmedierten Uveitis (Prete et al. 2016; Tesavibul et al. 2018). Die Therapie der HAU basiert auf der systemischen Verabreichung von Glukokortikoiden, die mit der Zeit jedoch durch immunmodulatorische Therapien ergänzt und teilweise ersetzt wurde, da bei Langzeittherapie die Gefahr an Diabetes, Osteoporose oder an schweren depressiven Störungen zu erkranken, stark erhöht ist (Dick et al. 2018; Kodati and Weng 2019). Die Applikation intravitrealer Kortikoid-Implantate wird bei Patienten entweder als begleitende Therapie zur systemischen Behandlung angewendet oder als Alternative, wenn eine systemische Behandlung mit Glukokortikoiden nicht möglich ist (Kodati and Weng 2019). Auch wenn die Rezidivraten dadurch verringert werden konnten, zeigten Patienten oftmals einen erhöhten intraokularen Druck und bildeten Glaukome oder Katarakte aus (Kodati and Weng 2019). Außerdem wird die Verabreichung von sogenannten Antimetaboliten wie Azathioprin oder T-Zell-Inhibitoren wie Cyclosporin, das auch zur ERU-Therapie bei Pferden angewendet wird, unternommen (Kodati and Weng 2019). Azathioprin konnte zufriedenstellende Wirkungen bei Patienten, die mit Morbus Behçet erkrankt waren, zeigen (Saadoun et al. 2010). Aktuelle, neue Therapieansätze umfassen die Gabe von Inhibitoren des Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) oder von Interleukin-6 (IL-6), da diese Zytokine in Blut- und Glaskörperproben betroffener Patienten erhöht vorkamen und somit die Bildung der Zytokinproduzierenden, Pathogenese assoziierten Zellen, hemmen könnten (Kodati and Weng 2019). Die Therapien haben jedoch alle gemein, dass sie die Inflammation zeitweise hemmen können, aber keine vollständige Heilung der Erkrankung mit sich bringen.

2.2.5 Experimentelle induzierbare autoimmune Uveitis in Tiermodellen

Für die Erforschung bestimmter Krankheiten ist es oftmals notwendig, neben der Identifizierung und Charakterisierung bestimmter Zellen und Erreger außerhalb des Wirtes, *in vitro*, die Prozesse und Auswirkungen bestimmter physiologischer und pathologischer Mechanismen innerhalb des Organismus zu untersuchen. Dabei dienen Tiermodelle dazu, bestimmte Erkrankungen nachzuahmen und durch auslösende Reize zu induzieren und die Folgen der Erkrankungen entsprechend zu analysieren. Im Falle der humanen autoimmunen Uveitis (HAU) spielen vor allem experimentelle Tiermodelle mit Ratten und Mäusen eine wichtige Rolle.

Erste Studienergebnisse zur Induktion einer experimentellen Uveitis durch Immunisierung mit dem Interphotorezeptor Retinoid-bindenden Protein (IRBP) lieferten Experimente an Ratten (Gery et al. 1986). Es folgte die Entwicklung des vor über 20 Jahren in den USA entwickelten Mausmodells, der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU), das seither von zahlreichen Forschern adaptiert wurde (Caspi et al. 1988). Zahlreiche Studien lieferten somit aufschlussreiche Ergebnisse zur Pathogenese der HAU (Caspi et al. 1988; Caspi et al. 2008). Im Rahmen dieser Forschungsarbeiten konnte das retinale Interphotorezeptor Retinoid-bindende Protein für die Induktion einer Uveitis in der Maus etabliert werden (Caspi et al. 1988). Die erfolgreiche Induktion einer Uveitis durch Immunisierung mit IRBP konnte auch bei Kaninchen (Eisenfeld, Bunt-Milam and Saari 1987), Pferden (Deeg et al. 2002) und weiteren Versuchstieren demonstriert werden. Die Vorteile, die sich aus experimentellen Tiermodellen ergeben, liegen mitunter an der Möglichkeit, umfassende sowie reproduzierbare Versuche zu unterschiedlichen Pathogenese assoziierten Mechanismen durchzuführen (Chen et al. 2013). Zudem können bestimmte Mechanismen bei der Pathogenese der EAU gezielt beeinflusst werden, indem bestimmte Gene oder Proteine ausgeschaltet werden (Chen et al. 2013; Egwuagu et al. 1999). Eine EAU-Studie an Ratten demonstrierte, dass IL-17-produzierende Th17-Zellen vorrangig bei der initialen und monophasischen Inflammation eine Rolle spielen, jedoch die Th1-Immunantwort durch IFN γ für die wiederkehrenden Entzündungsschübe verantwortlich ist (Kaufmann, Diedrichs-Möhring and Wildner 2012). Die Untersuchung von regulatorischen T-Zellen bei der

induzierten Uveitis zeigte, dass IRBP-immunisierte Mäuse, die CD4⁺ CD25⁺ Tregs aus EAU Mäusen injiziert bekamen, keine EAU entwickelten (Sun et al. 2010). Aus weiteren Experimenten an Mäusen wurde ersichtlich, dass eine erhöhte Expression regulatorischer T-Zellen in Zusammenhang mit abgeschwächten Krankheitssymptomen und einer reduzierten Produktion von IFN γ durch T-Helferzellen stand (Silver et al. 2015). Anhand dieser Ergebnisse wurde bekräftigt, dass regulatorische T-Zellen für eine kürzere Überlebensdauer der intraokularen autoreaktiven T-Zellen verantwortlich sein können (Silver et al. 2015).

Experimentelle Tiermodelle tragen zu einem besseren Verständnis potentieller regulatorischer Mechanismen im Rahmen der Pathogenese der humanen autoimmunen Uveitis bei. Da man in den etablierten und streng regulierten Tiermodellen jedoch weiß, welche auslösenden Faktoren für die nachfolgenden Inflammationen und klinischen Symptome verantwortlich sind, können durch experimentell induzierte Modelle keine Erkenntnisse zur Ätiologie von spontan auftretenden Erkrankung gewonnen werden. Trotz umfassender Erkenntnisse, die man aus Tiermodellen über die beteiligten Immunzellen der zu untersuchenden Erkrankung gewinnen kann, ist es für die Aufklärung der autoimmunen Uveitis unabdingbar, Pathogenese assoziierte und regulatorische Mechanismen anhand von Patientenproben zu untersuchen.

2.2.6 ERU als spontanes Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen

Tiermodelle können dazu beitragen, die Pathogenese verschiedener, humaner Erkrankungen besser zu verstehen. Experimentell induzierte Uveitis-Tiermodelle haben jedoch alle gemeinsam, dass sie die spontan auftretende Natur der HAU nicht widerspiegeln können. Hinzu kommt, dass die auslösenden Faktoren bei der EAU bekannt sind und bewusst angepasst werden können (Chen et al. 2013). Des Weiteren muss beachtet werden, dass sich Verlauf und Symptomatik der HAU bei jedem Patienten individuell ausprägen kann und Beobachtungen bei Mäusen aus homogenen Inzuchtstämmen nur bedingt vergleichbar sind (Chen et al. 2013). Im Gegensatz dazu dient das Pferd als geeignetes Tiermodell für die humane Uveitis, da es das einzige Tiermodell ist, bei dem die Erkrankung spontan und wiederkehrend

auftritt (Deeg et al. 2008). Die retinalen Proteine S-Ag und IRBP konnten auch beim Pferd erfolgreich als Uveitis-induzierende Autoantigene identifiziert werden (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2002). Es folgte die Identifikation eines weiteren, im Pferd gefundenen, retinalen Autoantigens, dem zellulären Retinin-Aldehyd-bindenden Protein (CRALBP) (Deeg, Pompetzki, et al. 2006).

Das in Müller-Glia Zellen und in Zellen des retinalen Pigmentepithels exprimierte Protein konnte in nachfolgenden Studien auch auf den Menschen übertragen und als humanes retinales Autoantigen identifiziert werden (Deeg et al. 2007), wodurch die Gemeinsamkeit zwischen der ERU und der HAU hervorgehoben wird. Die rezidivierende Uveitis des Pferdes stellt somit ein vielversprechendes Tiermodell dar, da neben den eindeutigen Parallelen zur HAU auch die hohe Prävalenz der ERU in der Pferdepopulation eine umfassende Verfügbarkeit von Blut- und Glaskörperproben gewährleistet. Erkenntnisse zu Pathogenese assoziierten Mechanismen der ERU, die durch vielfältige Experimente und Untersuchungen von peripheren Blutlymphozyten und infiltrierten, vitrealen Lymphozyten auf proteomischer und molekularer Ebene gemacht wurden (Degroote et al. 2014; Kleinwort et al. 2016; Schauer et al. 2018), könnten translational auf die HAU bezogen werden.

2.3 Migration von Immunzellen

2.3.1 Die Bedeutung der Zellmigration

Die Fähigkeiten und Eigenschaften die Zellen besitzen, um sich fortzubewegen und zu migrieren, sind für einen lebenden Organismus essentiell. Bereits während der frühen embryologischen Entwicklung, der Wundheilung und den dynamischen Prozessen einer Immunantwort, sind Zellen in Bewegung (Petrie, Doyle and Yamada 2009). Dabei ist die Art und Weise der Zellmigration abhängig von der Zellart. Eine aktive und gerichtete Bewegung ist zudem wichtig, um eine optimale Immunantwort zu gewährleisten (Petrie Aronin et al. 2017). Die Untersuchung der Zellmigration ist ein wichtiger Bestandteil zum besseren Verständnis physiologischer und pathologischer Prozesse. Die ersten Beobachtungen der Zellmigration erfolgten zunächst in zweidimensionalen Systemen und entwickelten sich im Laufe der Zeit von dreidimensionalen Systemen bis hin zu vierdimensionalen Modellen oder intravitalem

Aufnahmen, womit *in vivo* Bedingungen simuliert werden können (Haston, Shields and Wilkinson 1982; Torcellan, Stolp and Chtanova 2017; Yam and Chtanova 2019). Durch den Vergleich der Wanderungseigenschaften in 2D- und 3D-Systemen wurde deutlich, dass sich die Zellen in einer zweidimensionalen Umgebung anders verhalten als in einer dreidimensionalen Umgebung (Haston, Shields and Wilkinson 1982). Die Präsenz einer extrazellulären Matrix hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Fortbewegung der Zellen und zeigt, welche komplexen regulatorischen Mechanismen an diesen Prozessen beteiligt sind (Caswell and Zech 2018). So kann in einer 3D-Umgebung demonstriert werden, wie die Migration der Zellen durch das extrazelluläre Gewebe beeinflusst wird (Rommerswinkel et al. 2014). Zahlreiche Studien zu Wanderungseigenschaften von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten sowie Stamm- und Tumorzellen ergaben bereits interessante Einblicke und neue Erkenntnisse zu den verschiedenen Arten der Fortbewegung (Weninger, Biro and Jain 2014). Durch Untersuchungen im Lymphknoten stellte sich heraus, dass die Migration und Lokalisation der T-Zellen zu APZ für einen schnellen und erfolgreichen Antigenkontakt essentiell ist und die Immunantwort des Wirtes davon abhängt (Baptista et al. 2019; Qi, Kastenmüller and Germain 2014). Auf der Suche nach fremden Antigenen zirkulieren Lymphozyten zwischen peripheren Blutgefäßen, Lymphknoten und Lymphgefäßen, um letztendlich wieder in periphere Blutbahnen zu gelangen (Girard, Moussion and Forster 2012). Dies wird als Rezirkulation bezeichnet (Girard, Moussion and Forster 2012). Naive T-Lymphozyten können Blutgefäße nur über bestimmte Venolen verlassen, die mit einem kubischen Endothel ausgekleidet sind, den high endothelial venules (HEV) (Miyasaka and Tanaka 2004). Das sogenannte homing der Zellen findet in vier Schritten statt: Rollen, Aktivierung, Adhäsion und Diapedese (Fernandez-Borja, van Buul and Hordijk 2010; Muller 2016). Selektine, Chemokine, Integrine und die entsprechenden Liganden führen zu einer Adhäsion zwischen Immunzellen und Endothelzellen (Girard, Moussion and Forster 2012). T-Lymphozyten des Menschen exprimieren die Integrine lymphocyte-associated-antigen-1 (LFA-1) und very late antigen-4 (VLA-4), die an die Liganden intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) binden und für die Adhäsion und Migration an Endothelzellen der Blutgefäße entscheidend sind (Dominguez, Anderson and Hammer 2015). Die Expression der Moleküle wird differenziell reguliert und kann das Migrationsverhalten der Zellen bei einer Entzündung und unter verstärkten, hämodynamischen

Einwirkungen, beeinflussen (Dominguez, Anderson and Hammer 2015). Durch inflammatorische Zytokine, die eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen auf Endothelzellen induzieren, können vermehrt neutrophile Granulozyten oder T-Zellen aus dem Blut an den Entzündungsherd rekrutiert werden (Nourshargh and Alon 2014). Die gerichtete Migration von Leukozyten ist essentiell für eine optimale Immunantwort und kann durch bestimmte Signale verstärkt werden. Dabei werden Zellen durch Chemotaxis, durch Signalproteine wie Chemokine unter Ausbildung eines Konzentrationsgradienten, in eine bestimmte Richtung gelockt, welche entscheidend zur Positionierung und dem Zellmigrationsverhalten beitragen kann (Biswenger et al. 2018; Griffith, Sokol and Luster 2014). G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren werden in humanen und murinen Leukozyten unterschiedlich exprimiert und können, am Beispiel von CCR7 in naiven T-Zellen, an die Chemokine CCL21 und CCL19 binden und so über die HEV in Lymphknoten gelangen (Griffith, Sokol and Luster 2014). Im Lymphknoten erfolgt die CCR7-abhängige Migration durch die Konzentrationsgradienten von CCL19 und CCL21, bis sie die T-Zellzone erreichen, in der sie den Kontakt zu APZ suchen (Griffith, Sokol and Luster 2014). Dabei induzieren die Chemokine eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit der T-Zellen, die der effizienten Suche nach passenden APZ dient (Park, Hwang and Kehrle 2016). Die Beteiligung des Chemokinrezeptors CCR5 in murinen Th1-Zellen konnte am EAU-Modell mittels der Methode der Scanning Laser Ophthalmoskopie (SLO) untersucht werden (Crane et al. 2006). Dabei konnte *in vivo* eine CCR5-abhängige Rekrutierung von Th1-Zellen an der BRB demonstriert werden, die die transendotheliale Migration der Zellen über die Blut-Retina-Schranke ermöglichte (Crane and Liversidge 2008; Crane et al. 2006). Bereits zu Krankheitsbeginn der EAU verändert sich die lokale Expression verschiedener Chemokine und Chemokinrezeptoren von Endothelzellen der BRB, die das Eindringen von Zellen in das Gewebe ermöglichen (Crane and Liversidge 2008).

Auch bei der Autoimmunerkrankung der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) des Menschen konnte demonstriert werden, dass die in der untersuchten Synovialflüssigkeit befindlichen CD4⁺ T-Zellen neben E-Selektin und P-Selektin, CCR5 exprimierten und der Chemokinrezeptor somit an der Infiltration der T-Zellen aus dem Blut in die betroffenen Gelenke beteiligt war (Issekutz et al. 2011). In equinen Lymphozyten und im Rahmen der Pathogenese der ERU, wurde die Rolle der Chemokine und –rezeptoren noch nicht untersucht, da im Falle der ERU vor allem die

Verfügbarkeit Spezies-spezifischer Marker limitiert ist. Die Tatsache, dass JIA-Patienten als häufigste Begleiterscheinung an einer Uveitis erkranken ist sehr interessant und könnte ein Indiz für ähnliche, Pathogenese assoziierte Mechanismen bei der Migration der autoreaktiven T-Zellen bei der ERU, darstellen (Busch et al. 2019; Issekutz et al. 2011). Die transendotheliale Migration (TEM) beschreibt einen weiteren Prozess der stattfindet, wenn Lymphozyten durch das Endothel von Blutgefäßen wandern (Schimmel, Heemskerk and van Buul 2017). Durch intravitale Aufnahmen in der Maus konnte gezeigt werden, dass die meisten Lymphozyten das Endothel parazellulär überquerten (Yan et al. 2019). Dabei bildeten sie vorübergehende Lücken zwischen zwei benachbarten Endothelzellen, um zwischen diesen Zellen das Endothel zu durchqueren (Yan et al. 2019). Zudem wurde durch das grün fluoreszierende Protein LifeAct-GFP, das an F-Aktin bindet, gezeigt, dass die TEM und die spätere Migration von Lymphozyten Aktin-abhängig ist (Yan et al. 2019).

Durch die Umstrukturierung des zytoskelettalen Aktin-Gerüsts veränderte sich die Form der Lymphozyten und führte zur Ausbildung eines vorgestülpten, vorderen Zellpols, der Protrusion (Yan et al. 2019). In dreidimensionaler Umgebung zeigen T-Zellen eine beträchtliche Verformbarkeit, die von der raschen Umstrukturierung des Zytoskeletts reguliert wird und abhängt (Svitkina 2018). Das hochmolekulare fibrilläre Gerüst im vorderen Zellfortsatz, Lamellipodium, baut sich aus Aktinfilamenten auf, die über den Proteinkomplex Arp2/3 (actin-related-protein 2/3) im 70° Winkel miteinander verknüpft werden, wodurch ein verzweigtes Netzwerk entsteht und der Zelle zusätzlich Stabilität verleiht (Blanchoin et al. 2014). Durch die aktive Ausbildung des vorderen, leitenden Zellpols und die Kontraktion des Aktin-Gerüsts mithilfe des Motorproteins Myosin wird die Migration und Vorwärtsbewegung von Zellen ermöglicht (Marelli-Berg and Jangani 2018). Durch die Kontraktion des Zytoskeletts wird Druck auf die Zelle und ihr Zytoplasma aufgebaut, der nur am vorderen leitenden Zellpols in Bewegungsrichtung ausweichen kann, wodurch die Vorwärtsbewegung der Zelle ermöglicht wird und der hintere Zellpol, Energie-unabhängig, nachgezogen werden kann (Poincloux et al. 2011). Neben der treibenden Kraft der Aktin-abhängigen Lamellipodien bei der Migration wurde durch neue Studien die Rolle des Zellkerns in amöboid migrierenden Zellen hervorgebracht (Renkawitz et al. 2019). Echtzeit-Aufnahmen von dendritischen Zellen zeigten, dass sich der Zellkern am vorderen Ende der Zellen lokalisierte und die Zellen den Weg entlang des geringsten Widerstandes wählten (Renkawitz et al. 2019).

2.3.2 Arten der Zellmigration

Es lassen sich hauptsächlich zwei Typen der Fortbewegungsart von Zellen beschreiben. Langsam-migrierende Zellen zeigen einen mesenchymalen, Adhäsions-abhängigen Typ der Migration, der typisch für Fibroblasten, Tumorzellen, Endothelzellen und Keratinozyten ist (Tomasova et al. 2019). Diese Zellen migrieren mit einer Geschwindigkeit von etwa einer Zelllänge pro Stunde, wandern also langsamer als 1 μm pro Minute (Friedl, Zänker and Bröcker 1998). Dabei zeigen sie im Gegensatz zu schnell-migrierenden Zellen eine eher diffuse Wanderung (Tomasova et al. 2019). Im Gegensatz dazu zeigen schnell-migrierende neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen sowie T-Zellen eine amöboide Art der Fortbewegung (Lammermann and Germain 2014). Diese Migrationsart konnte bei murinen und humanen Leukozyten in dreidimensionalen Matrices beobachtet werden und zeichnete sich durch eine gerichtete, Integrin-unabhängige und Adhäsions-arme Migration innerhalb der EZM aus (Lammermann et al. 2008; Lammermann and Germain 2014). Die Geschwindigkeit dieser Zellen kann anhand ihrer Länge pro Minute festgemacht werden. So wandern beispielsweise Lymphozyten mit etwa 8-10 μm pro Minute (Lammermann and Germain 2014).

2.3.3 Regulatorische Mechanismen der Zellmigration

Die Zellmigration hängt entscheidend von der Umstrukturierung des Zytoskeletts unter Polymerisation und Depolymerisation von Aktinstrukturen ab (Yan et al. 2019). Dabei stellt F-Aktin die filamentöse, polymerisierte Form des Aktins dar und weist eine starke ATPase-Aktivität auf (Marelli-Berg and Jangani 2018). Durch Motorproteine wie Myosin, wird die zelluläre Bewegung unterstützt, indem Myosine an die Aktinfilamente binden und sich entlang dieser bewegen (Lammermann and Sixt 2009). Die amöboide Art der Migration von Lymphozyten wird durch die schnell ablaufende Veränderung des Aktin-Zytoskeletts ermöglicht, bei der die Aktin-Polymerisation essentiell für die Fortbewegung der Lymphozyten ist und in der Ausbildung von Pseudopoden und vorgestülpten, vorderen Zellpolen resultiert (Renkawitz et al. 2009). Da die Zellmigration zeitlich und räumlich reguliert werden muss, gibt es verschiedene

Proteine, die für die Weiterleitung der Signale von Zellrezeptoren an die entsprechenden Effektoren zuständig sind (Warner, Wilson and Caswell 2019). Eine wichtige Rolle spielen dabei die Rho-GTPasen, die einen großen Einfluss auf den Umbau des Aktinzytoskeletts haben und somit an der Zellmigration beteiligt sind (Warner, Wilson and Caswell 2019). Neben den GTPasen wird auch den Septinen eine tragende Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts zugeschrieben (Dolat et al. 2014; Mostowy and Cossart 2012). Septine, GTP-bindende und Membran-interagierende Proteine stehen im Zusammenhang mit vielen zellulären Prozessen wie der Zellteilung, der Organisation des Zytoskeletts und der Zellmigration (Beber et al. 2019; Neubauer and Zieger 2017). Durch die Interaktion mit den zytoskelettalen Komponenten der Mikrotubuli sowie den Intermediär- und Aktinfilamenten, werden die Septine auch als vierte Komponente des Zytoskeletts deklariert (Mostowy and Cossart 2012). Zur Septin-Familie zählt auch Septin 7, das eine Schlüsselrolle bei vielen regulatorischen Mechanismen einnimmt und auch andere Septine beeinflusst (Abbey, Gaestel and Menon 2019; Abbey et al. 2016; Zhang et al. 2016). In Bezug auf die Zellmigration durch dichtes Gewebe wurde gezeigt, dass Septin 7-defiziente T-Zellen aus einer murinen T-Zelllinie, eine geringere Zellrigidität und eine erhöhte Migrationsbereitschaft durch kleine Poren aufwiesen (Tooley et al. 2009). Diese Ergebnisse sind sehr interessant im Hinblick auf die Pathogenese der ERU, da gezeigt wurde, dass Septin 7 in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden signifikant niedriger exprimiert wird (Degroote et al. 2014; Schauer et al. 2018). Zusätzlich gibt es neue Erkenntnisse dazu, dass Septine auch dazu in der Lage sind, mechanische Signale in biochemische Signale umzuwandeln und bei der Interaktion zwischen zytoskelettalen Strukturen und dem Zellkern beteiligt sein könnten (Lam and Calvo 2019). Aus weiteren Studien zur Zellmigration humaner Lymphozyten geht hervor, dass die Lokalisation des Zellkerns auch eine wesentliche Rolle bei der Fortbewegung der Zellen spielen kann und gibt neue Einblicke in die Regulation und Interaktion zwischen zytoskelettalen Strukturen und dem Zellkern (Renkawitz et al. 2019). Auf die Rolle der Septine, vor allem Septin 7, bei der Zellmigration und der Beteiligung an regulatorischen Mechanismen in pathologischen Zuständen wie bei der autoimmunen rezidivierenden Uveitis der Pferde, wird im Rahmen dieser Arbeit näher eingegangen. Durch die aktuelle Literaturrecherche (Stand: September 2019) wurden keine Beschreibungen zum Migrationsverhalten equiner PBL im Rahmen der ERU oder in vergleichenden Uveitis-Tiermodellen gefunden. Anhand der Rechercheergebnisse

kann davon ausgegangen werden, dass das Migrationsverhalten von equinen Lymphozyten im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben und interpretiert werden.

2.4 Zellmetabolismus

2.4.1 Stoff- und Energiewechselwege eukaryotischer Säugerzellen

Damit Zellen des Immunsystems in der Lage sind mit einer adäquaten Immunantwort zu reagieren und ihre Zell-spezifischen Funktionen sowie zytoskelettalen Prozesse während der Migration umsetzen zu können, benötigen sie laufend Energie (Gaber et al. 2019). Säugerzellen besitzen vielfältige Möglichkeiten, Energie über bestimmte Stoffwechselwege zu produzieren. Abhängig von der Zellart sind sie zudem in der Lage ihren Substratbedarf anzupassen und auf alternative Energiegewinnungswege auszuweichen, nachdem beispielsweise die Aktivierung einer T-Zelle stattgefunden hat (Galgani, De Rosa and Matarese 2015). Die zwei Hauptenergiegewinnungswege eukaryotischer Zellen sind die sauerstoffabhängige, oxidative Phosphorylierung, die innerhalb der Mitochondrien stattfindet sowie die sauerstoffunabhängige Glykolyse, die im Zytoplasma der Zellen abläuft (Pearce and Pearce 2017; van der Windt, Chang and Pearce 2016). Nicht aktivierte T-Lymphozyten befinden sich in einem Zustand, indem der Energiebedarf der Zelle über oxidative Stoffwechselwege durch verschiedene Substrate wie Aminosäuren, Fettsäuren sowie Glukose gedeckt werden kann (Gaber et al. 2019). Nach Aktivierung durch Antigenpräsentation naiver, reifer T-Zellen ist ihr Energie- und Substratbedarf von der aeroben Glykolyse abhängig, sie nehmen an Größe zu, proliferieren und differenzieren sich zu T-Effektorzellen oder Tregs (Desdín-Micó, Soto-Heredero and Mittelbrunn 2018). Der sogenannte Immunmetabolismus von T-Zellen kann durch veränderte Energie- und Stoffwechselwege, die abhängig von der T-Zell-Subpopulation sind, die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen (Gaber et al. 2019; Stathopoulou, Nikoleri and Bertias 2019). Funktionell unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen können anhand ihres Zellmetabolismus und ihrer bevorzugten Substratnutzung eingeordnet und voneinander unterschieden werden (Desdín-Micó, Soto-Heredero and Mittelbrunn 2018). So können T-Gedächtniszellen anhand ihrer vorrangig aeroben,

mitochondrialen Energiegewinnung von T-Effektorzellen differenziert werden, die ihren Energiebedarf über glykolytische Wege gewinnen (Almeida et al. 2016; Bantug et al. 2017), was mittels bestimmter Messverfahren, beispielweise mit dem Extracellular Flux Analyzer ermittelt werden kann (van der Windt, Chang and Pearce 2016). Im Rahmen der CD4+ T-Zell-Aktivierung spielt vor allem die schnelle Energiegewinnung eine Rolle, die über die aerobe Glykolyse gedeckt wird (Macintyre et al. 2014; Michalek et al. 2011). Durch *in vitro* Untersuchungen muriner T-Zellen wurde bestätigt, dass die T-Effektorzellen Th1-, Th2 und Th17-Zellen abhängig von glykolytischen Stoffwechselwegen sind, während Tregs ihre Energie vorrangig über Fettoxidation durch Fettsäuren gewinnen konnten (Michalek et al. 2011). Durch Versuche an Mäusen wurde gezeigt, dass aktivierte CD4+ T-Zellen den Glukosetransporter (Glut-1) vermehrt exprimierten und somit die Aufnahme von Glukose in die Zelle erhöhten und ihre proinflammatorischen Effektorfunktionen steigern konnten, indem die Produktion von IFN γ und IL-2 zunahm (Macintyre et al. 2014). Stoffwechseleigenschaften und der Bedarf an bestimmten Substraten lassen somit Rückschlüsse auf die beteiligten Zellen bei Inflammationen oder Autoimmunerkrankungen unbekannter Pathogenese, zu. Durch die Identifizierung und Charakterisierung Pathogenese assoziierter Veränderungen von Stoffwechselwegen in Immunzellen, können neue Mechanismen aufgeklärt und neue potentielle Therapieansätze generiert werden (Patel and Powell 2017).

2.4.2 Die Rolle des Zellmetabolismus bei Inflammation und Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen stellen Forscher seit Beginn ihrer Entdeckung vor eine Vielzahl an Fragestellungen, die bis heute noch nicht alle beantwortet werden konnten. So ist bei den meisten Autoimmunerkrankungen noch kein kausaler Grund für die Entstehung der pathologischen autoreaktiven Zustände gefunden worden und erschwert somit die Entwicklung passender Therapieansätze. Aufgrund der Komplexität der verschiedenen Mechanismen, die während einer Immunantwort beteiligt sind, ist es für die Erforschung von Krankheiten jedoch wichtig nicht nur einen Aspekt zu betrachten, sondern sich auf mehrere Faktoren zu stützen. Wie sich die Verfügbarkeit und Nutzung von Substraten auf den Zellmetabolismus auswirkt, sowie

auf die regulatorischen und funktionellen Mechanismen der Zellen, wurde lange Zeit unterschätzt. Da die Untersuchungen des Zellmetabolismus meist an gesunden Zellen unternommen wurden, war es Ziel weiterer Forschung, unbekannte und veränderte Mechanismen des Metabolismus der bestimmten Zellen aufzudecken, die bei der Entstehung autoimmuner Erkrankungen beteiligt sind (Abboud et al. 2018; Rhoads, Major and Rathmell 2017). Metabolische Unterschiede zwischen gesunden und pathogenen T-Lymphozyten könnten demnach eine Erklärung für veränderte, T-Zell-medierte Immunantworten bei Autoimmunerkrankungen liefern (Gaber et al. 2019). Durch die Entfernung von Glut-1 in murinen CD4+ T-Zellen im EAE-Mausmodell der MS wurde die Generierung und Proliferation der Zellen reduziert und verminderte den Schweregrad des Krankheitsverlaufs, wodurch der Bedarf von Glukose zur Energiegewinnung potentiell autoreaktiver Zellen bei Autoimmunerkrankungen hervorgehoben wurde (Macintyre et al. 2014; Yin et al. 2015). Bei der aeroben Glykolyse wird Glukose in Laktat umgewandelt, wodurch weitaus weniger Energie in Form von ATP generiert wird als durch die oxidative Phosphorylierung, bei aktivierten T-Zellen jedoch eine rasche Verfügbarkeit von Metaboliten für bevorstehendes Zellwachstum und Proliferation darstellt (MacIver, Michalek and Rathmell 2013; Vander Heiden, Cantley and Thompson 2009). Neben Glukose und dem glykolytischen Stoffwechselweg, der für die Aktivierung von T-Zellen entscheidend ist, darf die Rolle der Mitochondrien nicht unbeachtet gelassen werden, da die dort generierten Substrate, mitochondriale Reaktive Sauerstoff Spezies (mROS), ebenfalls an der T-Zellaktivierung beteiligt sind, wie an murinen T-Zellen *in vitro* und *in vivo* demonstriert wurde (Sena et al. 2013; Weinberg, Sena and Chandel 2015). Bei der Autoimmunerkrankung SLE konnte eine erhöhte zelluläre mitochondriale Masse in CD4+ T-Zellen mit einer erhöhten mROS Produktion in Verbindung gebracht werden (Takeshima et al. 2019). Durch den oxidativen Stress gingen Zellen vermehrt in Apoptose und die erhöhte Konzentration an Zelldebris führte zu einer Aktivierung des Immunsystems (Takeshima et al. 2019). Somit kann eine erhöhte Konzentration von mROS in CD4+ T-Zellen mit einer erhöhten Aktivierung des Immunsystems assoziiert werden, wodurch autoreaktive Reaktionen, wie im Falle des SLE, begünstigt werden können (Sena et al. 2013; Takeshima et al. 2019). Angesichts der Tatsache, dass sich Lymphozyten, unabhängig von ihrem Oberflächenproteom, aufgrund ihres Energie- und Stoffwechsels funktionell voneinander unterscheiden lassen, ist die Untersuchung des Zellmetabolismus eine interessante und vielversprechende Methode (van der

Windt, Chang and Pearce 2016). Durch die Untersuchung des Zellstoffwechsels können metabolisch veränderte Zellen auffindig gemacht werden, wodurch Rückschlüsse auf das Vorliegen bestimmter T-Zell-Populationen und hypermetabolischer, potentiell autoreaktiver Zellen, gezogen werden können. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten equinen Lymphozyten, von augengesunden und an der autoimmunen rezidivierenden Uveitis erkrankten Pferde, konnten erstmals anhand ihrer metabolischen Aktivität, ihrer Substratnutzung sowie der Adaptation der Energiegewinnungswege, nach Hemmung bestimmter Substratwege näher charakterisiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die Proben von insgesamt 52 gesunden und von 62 an equiner rezidivierender Uveitis (ERU) erkrankten Pferden verwendet. An ERU erkrankte Pferde wurden in der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität München (Klinikleitung Prof. Dr. Lutz S. Göhring) vorgestellt. Anhand des Vorberichts, aus dem akute und wiederkehrende Entzündungsschübe hervorgehen sowie anhand klinischer Kriterien wie Blepharospasmus, vermehrtem Tränenfluss und Miosis, wurde die Diagnose der ERU gestellt (Fischer et al. 2019; Gilger and Michau 2004). Im Rahmen der operativen Behandlung der an ERU erkrankten Pferde wurde Blut über die Jugularvene entnommen. Die Blutproben augengesunder Kontrolltiere stammen mitunter von Pferden aus der Klinik für Pferde der LMU München sowie von Tieren aus Privatbesitz. Die Anzeige und die Genehmigung der Blutentnahme bei den Kontrolltieren erfolgte über die Regierung von Oberbayern mit der Genehmigungsnummer 55.2Vet-2532.Vet_03-17-88. Die Blutproben wurden in unterschiedlichen Versuchen eingesetzt und die genaue Anzahl der verwendeten Proben in den jeweiligen Experimenten aufgelistet.

Migrationsversuche innerhalb einer 3D-Kollagenmatrix in Echtzeit:

- PBL von 14 Kontrollpferden und 17 ERU-Pferden
- Migrationsversuche mit FCF-behandelten PBL von zwei Kontrollpferden

Immunzytochemische Untersuchung von Septin 7 und F-Aktin in PBL nach Wanderung auf Glasobjektträgern:

- Unbehandelt: PBL von drei Kontrollpferden
- FCF-behandelt: PBL von drei Kontrollpferden

Expressionsanalyse von Septin 7 in equinen PBL, die auch in 3D-Migrationsversuchen eingesetzt wurden:

- Western Blot: PBL von 8 Kontrollpferden und 8 ERU-Pferden

Analyse der Stoffwechselaktivität von equinen PBL mittels des Seahorse Extracellular Flux Analyzers:

- PBL von 15 augengesunden Pferden und 7 ERU-Pferden

Untersuchung der Expression und Verteilung von ZAP70 in Pferdelymphozyten:

- Western Blot: PBL von 19 Kontrollpferden und 29 ERU-Pferden
- Immunzytochemie: PBL von drei Kontrollpferden und von drei an ERU erkrankten Pferden

Expressionsanalyse von Cdc42 in equinen PBL:

- Western Blot: PBL von 5 Kontrollpferden und 5 ERU-Pferden

3.1.1 Puffer und Lösungen zur Gewinnung und Aufbereitung von equinen PBL

Heparinlösung zur Gerinnungshemmung (2500 I.E./ml)

Heparin-Natrium ¹ (25.000 I.E./ml)	1,00 ml
RPMI 1640 Medium mit Glutamin ²	9,00 ml

Trennlösung zur Isolierung von PBL mittels Dichtegradientenzentrifugation

Pancoll Trennlösung² (Dichte 1,077g/ml), gebrauchsfertig

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

NaCl ³ (136,9 mM)	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ (1,4 mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (8,1 mM)	1,45 g

in 1000 ml Aqua dest. lösen, pH-Wert auf 7,2 einstellen.

Einfriermedium zum Einfrieren lebender Leukozyten

DMSO ⁴ (10 %)	1,00 ml
FCS ⁵ (90 %)	9,00 ml

bei -20°C lagern

Lysepuffer Western Blot

Harnstoff ⁶ (9 M)	27,00 g
Thioharnstoff ⁶ (2 M)	7,60 g
CHAPS ⁶ (4 %)	2,00 g

¹ Ratiopharm, Ulm

² Pan Biotech, Aidenbach

³ Alle nicht extra markierten Chemikalien: AppliChem, Darmstadt

⁴ Serva, Heidelberg

⁵ Biochrom, Berlin

⁶ Merck, Darmstadt

DTT⁶ (65 mM) 0,50 g
ad 50 ml Aqua bidest.

Bei Raumtemperatur (RT) mindestens fünf Stunden rühren. Anschließend zu je 1 ml aliquotieren und bei -20°C lagern. Direkt vor Gebrauch 100 µl Aqua bidest. pro 1 ml Lysepuffer zusetzen.

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

Tris (10 mM) 1,21 g
NaCl (158 mM) 8,76 g
in 1000 ml Aqua bidest. lösen.
pH auf 7,3 einstellen.

3.1.2 Gewinnung der Blutproben

Nach vorangegangener Desinfektion der Injektionsstelle im oberen Halsdrittel bei den zu beprobenden Pferden, erfolgte eine Blutentnahme von je nach Bedarf 20-200 ml Blut aus der Jugularvene. Das abgenommene Blut wurde zu jeweils 15 ml in Röhrrchen⁷ mit je 200 µl einer Heparin-Lösung (2.500 I.E./ml) abgefüllt.

3.1.3 Gewinnung von peripheren Blutleukozyten (PBL) mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Sedimentierung der roten Blutbestandteile wurden die mit Vollblut befüllten Röhrrchen 10-20 Minuten bei Raumtemperatur aufrecht aufgestellt. Mit einer sterilen serologischen Pipette⁸ konnte das überstehende, lymphozytenreiche Plasma vorsichtig aufgenommen und separat in 15 ml Röhrrchen zu gleichen Teilen auf 3 ml Pancoll⁹ Trennlösung geschichtet werden. Durch die nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation (23°C, 350 rcf, 25 Minuten, Bremse ausgeschaltet)

⁷ Sarstedt, Nümbrecht

⁸ Sarstedt, Nümbrecht

⁹ Pan Biotech, Aidenbach

konnte die zwischen Plasma und Pancoll befindliche Interphase unter minimaler Aspiration vollständig abgenommen und in kaltes PBS überführt werden. In drei nachfolgenden Waschschritten (4°C, 415 rcf, 10 Min) wurde der nach der Zentrifugation entstandene Überstand dekantiert und das gewonnene Zellpellet mit frischem PBS resuspendiert.

Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die gewonnenen PBL entweder direkt verwendet, in Zellkulturmedium gelagert oder bei -80°C eingefroren.

3.1.4 Zählung der gewonnenen Zellen

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte manuell mittels einer Neubauer-improved-Zählkammer¹⁰. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau¹¹ versetzt. Diese Mischung konnte anschließend in der Zählkammer ausgezählt werden. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wurden mindestens 100 Zellen herangezogen.

Die Gesamtzellzahl wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l Suspension} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Kammertiefe [mm]} \cdot \text{Verdünnung}}$$

3.1.5 Einfrieren von lebenden PBL

Für die spätere Verwendung lebender PBL wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Nach Einstellen der Zellzahl auf 2×10^7 Zellen pro Kryoröhrchen¹² wurden die Zellen in 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die in den Kryoröhrchen befindlichen Zellen wurden innerhalb einer geeigneten Einfrierbox, Cell Camper¹³, schonend auf -80°C heruntergekühlt. Direkt vor deren Verwendung erfolgte das Auftauen der Zellen unter vorsichtigem Resuspendieren mit eiskaltem PBS. Die zwei

¹⁰ Carl Roth, Karlsruhe

¹¹ VWR, Darmstadt

¹² Sarstedt, Nümbrecht

¹³ Neolab, Heidelberg

nachfolgenden Waschschrirte bei 4°C (415 rcf, 10 Min) dienten der Entfernung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO. Daraufhin erfolgte erneut die Bestimmung der Zellzahl für die weitere Versuchsplanung.

3.1.6 Aufbereitung der PBL für Western Blots

Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C (800 rcf, 10 Min). Der Überstand des Leukozytenpellets wurde verworfen und die Zellstrukturen der PBL durch Zugabe von 100-500 µl Lysepuffer zerstört.

3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate

3.2.1 Puffer und Lösungen zur Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz

5 x Bradford Reagenz ¹⁴	1,00 ml
Aqua bidest	4,00 ml

Bovines Serum Albumin (BSA)-Stammlösung (4 mg/ml)

BSA ¹⁵	40,00 mg
-------------------	----------

in 10 ml Aqua dest. lösen.

Zu je 1 ml aliquotieren und bei -20°C lagern.

Lysepuffer Western Blot

Lysepuffer WB (siehe Kap. 3.1.1).

HCl

Salzsäure 1 M, gebrauchsfertig.¹⁵

¹⁴ Serva, Heidelberg

¹⁵ Applichem, Darmstadt

3.2.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der im Kap. 3.1.6 beschriebenen PBL-Lysate für Western Blots erfolgte nach der von Bradford etablierten Methode (Bradford 1976). Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 bildet mit den im Lysat vorkommenden Proteinen Komplexe. Auf diese Weise verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Die Proteinmenge der Proben kann somit anhand der hierzu proportionalen Absorption bestimmt werden.

Zur Kalibrierung der Eichgerade wurde eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. In den Konzentrationen 0,125; 0,25; 0,5; 1 und 2 mg/ml wurde das Protein im verwendeten Lysepuffer gelöst und photometrisch gemessen. Zusätzlich dient der unverdünnte Lysepuffer als Leerwert. Je 5 µl jedes Standards und jeder zu bestimmenden Probe wurden in einem Doppelansatz in eine 96-Loch-Platte pipettiert und anschließend mit 250 µl der Bradford-Lösung versetzt. Nach einer zehninütigen Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem ELISA Reader (Tecan SUNRISE) photometrisch bestimmt. Die Absorption der doppelbestimmten Leerwerte wurde von jedem Mittelwert der doppelbestimmten Proben abgezogen und die Proteinkonzentration entsprechend an der Eichgerade abgelesen.

3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.3.1 Puffer und Lösungen

3.3.1.1 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Acrylamid-Lösung

Acrylamide-Bis Lösung 33 %¹⁶ , gebrauchsfertig.

¹⁶ Serva, Heidelberg

Bromphenolblau-Lösung

Eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver¹⁷
in Aqua bidest. lösen.

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung 10 %

APS¹⁷ (10 %) 0,10 g
in 1 ml Aqua bidest. lösen.

TEMED-Lösung

N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), gebrauchsfertig.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10 %

SDS (35 mM) 10,00 g
in 100 ml Aqua bidest. lösen. Lösung bei RT lagern.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 20 %

SDS (70 mM) 20,00 g
in 100 ml Aqua bidest. lösen. Lösung bei RT lagern.

Gelpuffer, pH 8,8

Tris (1,5M) 18,15 g
in 100 ml Aqua bidest. lösen und pH 8,8 auf einstellen.

Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris (0,5 M) 6,00 g
in 100 ml Aqua bidest. lösen und pH auf 6,8 einstellen.

5x Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3

Tris (124 mM) 15,00 g
Glycin¹⁸ (960 mM) 72,00 g
SDS (0,05 %) 5,00 g

¹⁷ Merck, Darmstadt

¹⁸ Serva, Heidelberg

in 1000 ml Aqua dest. lösen und pH auf 8,3 einstellen.

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

5x Laemmlipuffer (reduzierend)

1,5 M Tris-HCl ¹⁹ , pH 6,8 (250 mM)	8,33 ml
20 % SDS-Lösung (5 %)	12,50 ml
Glycerin ²⁰ , wasserfrei (50 %)	25,00 ml
500 mM 2-Mercaptoethanol ²⁰	1,75 ml

ad 50 ml Aqua bidest. und eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver hinzufügen.

Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.

Abdichtgel

Aqua bidest.	400,00 µl
33 % Acrylamid-Lösung	200,00 µl
10 % APS-Lösung	20,00 µl
TEMED-Lösung	2,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

Laufgel (10 % SDS Gel)

Aqua bidest.	4,20 ml
Gelpuffer, pH 8,8	2,50 ml
33 % Acrylamid-Lösung	3,30 ml
10 % SDS-Lösung	100,00 µl
10 % APS-Lösung	50,00 µl
TEMED-Lösung	20,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

Sammelgel (4 % SDS Gel)

Aqua bidest.	6,17 ml
Sammelgelpuffer, pH 6,8	2,50 ml
33 % Acrylamid-Lösung	1,33 ml

¹⁹ Carl Roth, Karlsruhe

²⁰ Merck, Darmstadt

10 % SDS-Lösung	100,00 µl
Bromphenolblau-Lösung	100,00 µl
10 % APS-Lösung	90,00 µl
TEMED-Lösung	30,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

2-Propanol

2-Propanol (Isopropanol), gebrauchsfertig.

3.3.1.2 Puffer und Lösungen für den Western Blot

Anodenpuffer I 0,3 M, pH 10,4

Tris	36,33 g
Methanol	200,00 ml

ad 1000 ml Aqua bidest.

Anodenpuffer II 25 mM, pH 10,4

Tris	3,03 g
Methanol	200,00 ml

ad 1000 ml Aqua bidest.

Kathodenpuffer, pH 9,4

Tris	3,03 g
ε-Aminocapronsäure	5,25 g
Methanol	200,00 ml

ad 1000 ml Aqua bidest.

Ponceau-Färbelösung

Ponceau-S (0,2 %) ²¹	0,20 g
Trichloressigsäure (3 %) ²²	3,00 g

²¹ Merck, Darmstadt

²² Serva, Heidelberg

in 100 ml Aqua bidest. lösen.

PBS-Tween Lösung (PBS-T)

Tween-20 (0,05 %) 0,50 ml

ad 1000 ml PBS.

1 % Polyvinylpyrrolidone-Tween Lösung (PVP-T), pH 7,2

Polyvinylpyrrolidone (PVP40)²³ (1 %) 1,00 g

in 100 ml PBS-T lösen.

ECL (Enhanced-Chemilumineszenz)-Lösung A

Tris (20mM) 2,42 g

Luminol²⁴ 50,00 mg

in 200 ml Aqua bidest. lösen, pH auf 8,6 einstellen.

Lagerung bei 4°C.

ECL-Lösung B

Para-Hydroxycoumarinsäure²³ 0,11 g

in 100 ml DMSO lösen.

Dunkel und bei RT lagern.

H₂O₂

H₂O₂ 30 %²³, gebrauchsfertig.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

Lösung A 1,00 ml

Lösung B 0,10 ml

30 % H₂O₂ 3,00 µl

²³ Merck, Darmstadt

²⁴ Serva, Heidelberg

3.3.2 Durchführung der 1D Gelelektrophorese

Die eindimensionale Auftrennung der Proteine in PBL-Lysaten von Kontroll- und ERU-Pferden nach ihrem Molekulargewicht, erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode durch Anlegen einer elektrischen Spannung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli 1970). Dabei laufen Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Größe entsprechend unterschiedlich weit in ein SDS-Gel ein, wobei die größeren Proteine weiter oben im Gel abgefangen werden und kleinere Proteine tiefer in das Gel einlaufen. Die verwendeten Gele wurden in einer Mini Protean Tetra System Gießkammer²⁵ in einer Größe von 8 x 7 cm und einer Dicke von 1 mm gegossen. Um ein Auslaufen der Laufgele zu verhindern, wurde am unteren Rand der Kammern vorab ein schnell aushärtendes Abdichtgel gegossen. Darauf wurde das Laufgel eingefüllt und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Laufgels wurde das Isopropanol sorgfältig abgenommen und das Sammelgel darauf geschichtet. Um die Proben später auf das Sammelgel auftragen zu können und zudem mehrere Proben in einem Gel gleichzeitig aufzutrennen, wurde ein entsprechender Kamm zur Herstellung der Probentaschen in das noch flüssige Sammelgel eingefügt. Die aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:3 mit reduzierendem Lämmli-puffer verdünnt und im Thermomixer²⁶ (750 rpm) fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Um später die Bandenhöhe ablesen zu können, wurden in eine der vorgeformten Geltaschen 4 µl einer Markerprotein-Mischung (Triple Colour Protein Standard III²⁷) gegeben und in die restlichen Geltaschen die jeweils aufzutrennenden Proben. Nach dem Überführen der ausgehärteten Gele in die Elektrophoresekammern und Befüllen mit Elektrophoresepuffer wurden die Kammern an das PowerPac Basic Power Supply²⁵ angeschlossen. Die Proben liefen bei RT mit 12,5 mA pro Gel in das Sammelgel ein, bis die Lauffront das Laufgel erreicht hatte. Dann wurde die Ampèrezahl schrittweise auf 25 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront am unteren Gelrand angekommen war.

²⁵ Bio-Rad, München

²⁶ Eppendorf, Wessling-Berzdorf

²⁷ Serva, Heidelberg

3.3.3 Durchführung des Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in einem Semi-dry-Elektroblotter (PerfectBlue Sedec™ M)²⁸ vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran²⁹ überführt. Die Blot-Papiere²⁸ und die PVDF-Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und übereinander geschichtet. Auf die anodische Platte des Elektroblotters wurden zwei in Anodenpuffer I getränkte Blot-Papiere und ein in Anodenpuffer II getränktes Blot-Papier, unter Vermeidung von Lufteinschlüssen, gelegt. Darauf wurde die zuvor in Methanol und Aqua bidest. getränkte PVDF-Membran und anschließend das SDS-Gel gelegt. Zuletzt kamen drei in Kathodenpuffer getränkte Blot-Papiere auf das Gel. Mit einer Glaspipette wurden vorsichtig sämtliche die Elektrophorese störenden Luftblasen ausgestrichen und anschließend die kathodische Platte des Elektroblotters aufgesetzt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF Membran erfolgte mit Hilfe eines peqPower 250V Power Supply³⁰ bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm² und einer Transferzeit von 40 Minuten.

3.3.4 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-Färbung

Um den Proteintransfer auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurde die Membran zehn Minuten in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Die Ponceau S-Färbung weist eine Sensitivität von 250 – 500 ng Protein auf (Salinovich and Montelaro 1986). Durch anschließendes Waschen in Aqua bidest. wurden die Proteinbanden durch Entfernen der Hintergrundfärbung sichtbar gemacht. Abschließend erfolgte die komplette Entfärbung der Membran durch Waschen in PBS-T.

²⁸ VWR, Darmstadt

²⁹ Carl Roth, Karlsruhe

³⁰ Christiansen, Planegg

3.3.5 Immunoblot

Im Anschluss an die Ponceau-Färbung wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 4 % BSA in PBS-T blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen in zehn Minuten-Intervallen mit PBS-T wurden die Membranen mit Antigen-spezifischen primären Antikörpern in passender Verdünnung inkubiert. Sollten mehrere Antikörper auf einer Membran getestet werden, wurden die Membranen entsprechend zugeschnitten. Die primären Antikörper verblieben über Nacht bei 4°C zur Inkubation auf den Membranen. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 10 min mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase (POD)-konjugierten sekundären Antikörper in PBS-T für 60 min bei RT. Überschüssiger, nicht spezifisch an den primären Antikörper gebundener sekundärer Antikörper wurde durch sechs Waschschritte in 10-Minuten-Intervallen mit PBS-T entfernt. Die POD-markierten Proteine wurden mittels Chemolumineszenz detektiert. Dafür wurden die Membranen für 2 min bei RT in einer frisch angesetzten ECL-Lösung (siehe Kapitel 3.7.1.2) inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen auf der mittleren Ebene des Amersham Imager600³¹ mit automatisch berechneter Belichtungszeit, je nach Intensität der Signale, entwickelt. Die Blotmembranen wurden zum Entfernen der ECL-Lösung in Aqua bidest. gewaschen und konnten zur Reinkubation bei 4°C in PBS-T aufbewahrt werden.

Als primäre Antikörper wurden in dieser Arbeit für den Immunoblot folgende kommerziell erhältliche Antikörper verwendet:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Human-Cdc42	Maus	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:100
Anti-Pferd-Septin 7 19A4, FITC konjugiert	Ratte	monoklonal	Dr. E. Kremmer, LMU München, München	1:100000
Anti-Human-ZAP70	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Frankfurt	1:2000

³¹ GE Healthcare, Freiburg

Anti-beta Aktin	Maus	monoklonal	Merck, Darmstadt	1:1000000
Anti-alpha Tubulin	Maus	monoklonal	Merck, Darmstadt	1:4000

Als sekundäre Antikörper fanden folgende POD-gelabelte Antikörper Verwendung:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG POD	Ziege	polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt	1:10000
Anti-Maus IgG POD	Ziege	polyklonal	Merck, Darmstadt	1:5000

3.3.6 Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurden die Western Blots zur Expressionsbestimmung von Septin 7 (vgl. Kap. 4.1.8), ZAP70 (vgl. Kap. 4.3.1) und Cdc42 (vgl. Kap. 4.3.2) in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde statistisch ausgewertet. Für die Auswertung der im Western Blot detektierten Intensitäten wurden die Schwärzungsgrade der Banden mit Hilfe der frei zugänglichen ImageJ 1.47³² Software quantifiziert. Eine intensivere Schwärzung entsprach dabei einer stärkeren Expression des detektierten Proteins in der jeweiligen Probe. Zur Normalisierung wurden die Membranen zusätzlich mit einem anti-beta-Aktin oder anti-alpha-Tubulin Antikörper inkubiert und entwickelt. Die ermittelten Werte der beta-Aktin- oder alpha-Tubulin-Expression wurden mit den Intensitäten der jeweiligen Proteinexpressionen ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurden alle ermittelten Faktoren der Kontroll-PBL und der ERU-PBL mittels eines Kolmogorov-Smirnov Tests (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung (KS: $\geq 0,05$) wurde der Student's *t*-Test zur Auswertung herangezogen. Bei nicht normalverteilten Werten (KS: $\leq 0,05$) fand der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test Verwendung. In beiden Tests wurden alle Werte mit $p \leq 0,05$ als

³² <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>

statistisch signifikant angesehen. Eine Signifikanz konnte in den Kapiteln 4.1.8, Kap. 4.3.3 und Kap. 4.4.2 festgestellt werden.

3.4 Immunzytochemie

3.4.1 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie

Waschpuffer:

TBS-Tween Lösung (TBS-T)

Tween-20 (0,05 %) 0,50 ml
ad 1000 ml PBS.

Inkubationspuffer

BSA (1%) 0,5 g
ad 50 ml TBS-T

Blockade-Puffer 1

Ziegenserum (5%) 50 µl
ad 1 ml Inkubationspuffer

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

DAPI³³, gesättigte Lösung
daraus wurde entsprechend eine 1:1000 Verdünnung hergestellt.

3.4.2 Antikörper für die Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden folgende primäre Antikörper eingesetzt:

³³ Thermo Fisher, Schwerte

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Pferd-Septin 7 19A4, FITC konjugiert	Ratte	monoklonal	Dr. E. Kremmer, LMU München, München	1:1000
Anti-Human-ZAP70	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Frankfurt	1:400

Zur Färbung der F-Aktin-Strukturen wurde Phalloidin³⁴, TRITC konjugiert (1:100 verdünnt), verwendet.

Außerdem wurde folgender sekundärer Antikörper verwendet:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	polyklonal	Thermo Fisher, Schwerte	1:500

3.4.3 FCF-Behandlung von PBL augengesunder Pferde

Eine Stunde vor der Durchführung von Lebendzellversuchen oder der Untersuchung von Proteinexpressionen mittels Immunzytologie nach der Migration auf Objektträgern wurden die Zellen mit dem synthetisch hergestellten Pflanzen-Zytokin N-(2chloro-4-pyridyl)-N9-phenylharnstoff, bekannt als Forchlorfenuron, FCF³⁴, inkubiert. FCF beeinträchtigt die Anordnung von Septinfilamenten, was zu langgestreckten und dichter gepackten Strukturen führt und die Zellmigration und –proliferation von Hefen und humanen HeLa-Zellen beeinträchtigen kann (Hu, Nelson et al. 2008). Deshalb wurden die Auswirkungen dieses Zytokinins auf das Migrationsverhalten von Pferde-PBL untersucht. Innerhalb eines sterilen Röhrchens wurden 50 µl einer Zellsuspension mit 9×10^5 PBL von Kontrollpferden für eine Stunde mit 50 µM FCF inkubiert.

³⁴ Merck, Darmstadt

Anschließend wurden 25 µl aus einer Zellsuspension mit $1,8 \times 10^7$ Zellen pro Milliliter unbehandelter bzw. FCF-behandelter Zellen auf die Mitte eines Glasobjektträgers³⁵, nahe der FCS Quelle (pur), pipettiert. Die Glasobjektträger mit den Zellen befanden sich für 10 Minuten innerhalb einer Inkubations- und Heizkammer mit CO₂-System von ibidi³⁶, die eine Umgebung bei 37°C und 5 % CO₂ gewährleistet.

Die Migrationsexperimente innerhalb einer 3D-Kollagenmatrix mit equinen PBL werden in Kapitel 3.6.2 erläutert.

3.4.4 Immunzytochemische Färbung

Um das Expressionsmuster von ZAP70 in Lymphozyten von Kontroll- und an ERU erkrankten Pferden zu analysieren, wurden je circa 4×10^5 PBL auf einen Objektträger³⁵ aufgetragen und für zehn Minuten, bei 1000 rpm, in einer Zytocentrifuge³⁷ mit geeigneten Einsätzen zentrifugiert und anschließend mit eiskaltem Aceton fixiert. Für die Analyse von F-Aktin und Septin 7 wurden unbehandelte und mit FCF behandelte, migrierte sowie nicht migrierte PBL aus Kontrolltieren untersucht. Die Fixierung der Zellen erfolgte sofort nach Abschluss der 10-minütigen Wanderungsphase. Die Objektträger wurden für zehn Minuten in eiskaltem Aceton fixiert und der Zell-dichte Bereich anschließend mittels eines Fettstiftes³⁸ markiert. Danach wurden die gut getrockneten Zellen auf den Objektträgern in TBS-T für fünfzehn Minuten rehydriert und anschließend für weitere 45 Minuten mit einer Lösung aus 1 % BSA und 5 % Ziegen Serum in TBS-T bei RT, in einer feuchten Kammer, blockiert. Die primären Antikörper ZAP70 (1:400), Septin 7 (1:1000) und Phalloidin (1:100) wurden jeweils in TBS-T mit 1 % BSA verdünnt, auf den markierten Bereich der Objektträger pipettiert und über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach Inkubation des primären Antikörpers folgten drei Waschschritten in TBS-T, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Zuvor mit ZAP70-gefärbte Zellen wurden im nächsten Schritt für 30 Minuten bei RT in der feuchten Kammer mit dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG Alexa

³⁵ Langenbrinck, Emmendingen

³⁶ ibidi, Gräfelfing

³⁷ Eppendorf, Wessling-Berzdorf

³⁸ Kisker Biotech, Steinfurt

488, 1:500, in 1 % BSA in TBS-T verdünnt, inkubiert. Da sowohl Septin 7 als auch Phalloidin direkt mit dem Fluorochrom FITC bzw. TRITC konjugiert sind, war die Inkubation mit einem sekundären Antikörper nicht notwendig. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), 1:1000 in TBS-T mit 1 % BSA verdünnt und über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer gefärbt. Nach erneutem dreimaligem Waschen konnten die Objektträger mithilfe des Fluoromount for Microscopy Mediums⁴¹ eingedeckelt werden. Die Bildaufnahmen sowie die Dokumentation und Auswertung der gefärbten PBL erfolgte mit einem Leica Dmi8 Mikroskop³⁹ und der dazugehörigen LAS-X-Software⁴⁰.

3.5 Messung der Stoffwechseleigenschaften equiner PBL

3.5.1 Puffer und Lösungen für die Stoffwechsellmessung

Poly-D-Lysin-Lösung für das Adhärenieren der Zellen in XF24-Loch-Platten

Poly-D-Lysin ⁴¹	5 mg
ad 100 ml Aqua bidest.	

XF-Kalibrierungspuffer

Seahorse XF Calibrant Solution⁴², gebrauchsfertig

Seahorse XF Medium, pH 7,4

Seahorse XF RPMI Medium (ohne Phenolrot) ⁴²	50 ml
2,5 M Glukose ⁴¹	200 µl
0,2 mM L-Glutamin solution ⁴¹	500 µl
0,1 mM Pyruvat ⁴¹	500 µl

³⁹ Leica, Wetzlar

⁴⁰ <https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/>

⁴¹ Merck, Darmstadt

⁴² Agilent Technologies, Waldbronn

Alle Lösungen mischen und den Puffer auf pH 7,4 einstellen und anschließend mittels eines Sterilfilters⁴³ mit einer Porengröße von 0,22 µm steril filtrieren.

3.5.2 Reagenzien des „Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kits⁴²“

Substanz zur Hemmung der ATP-Synthase der Atmungskette:

Oligomycin, gebrauchsfertig (63 nmol)

ad 630 µl Seahorse XF Medium (pH 7,4) für eine 100 µM Stammlösung; für die Gebrauchslösung werden 300 µl der Stammlösung mit 2700 µl Medium verdünnt

Substanz zur Entkopplung der Atmungskette durch Abbau des mitochondrialen Membranpotentials:

Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon, FCCP, gebrauchsfertig (72 nmol)

ad 720 µl Seahorse XF Medium (pH 7,4) für eine 100 µM Stammlösung; für die Gebrauchslösung werden 300 µl der Stammlösung mit 2700 µl Medium verdünnt

Substanz zur vollständigen Hemmung der ATP-Synthese:

Rotenon und Antimycin A, gebrauchsfertig (je 27 nmol)

ad 540 µl Seahorse XF Medium (pH 7,4) für eine 50 µM Stammlösung; für die Gebrauchslösung werden 300µl der Stammlösung mit 2700 µl Medium verdünnt

⁴³ Spicker, Waldmünchen

3.5.3 Prinzip der Messung des Zellmetabolismus mittels Seahorse XFe24 Analyzer

Die Messung der metabolischen Eigenschaften von Zellen mittels Seahorse XFe24 Analyzer⁴⁴ stellt eine nicht invasive Methode dar, die es ermöglicht, die Hauptenergiegewinnungswege der Zellen, die mitochondriale Atmung und die Glykolyse, in Echtzeit zu analysieren. Die Methode beruht auf der Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate; OCR) sowie der extrazellulären Ansäuerung durch freie Protonen (Extracellular Acidification Rate; ECAR) durch die in der Platte befindlichen Zellen. Dabei messen zwei voneinander unabhängige Fluorophore die Anwesenheit und Menge von Sauerstoff (O₂) und die von Protonen im XF Medium. Die Stärke des Fluoreszenzsignals für O₂ lässt somit Rückschlüsse auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen zu, da bei der oxidativen Phosphorylierung im Rahmen der mitochondrialen Respiration O₂ zu H₂O reduziert wird. Sinkt der pH-Wert des Mediums durch die erhöhte Menge freier Protonen ab, lässt dies auf die Produktion von Laktat aus glykolytischer Energiegewinnung schließen. Während der Messung befinden sich die Sensor-Platte sowie die 24-Loch-Platte mit den darin befindlichen Zellen innerhalb des Seahorse XFe Analyzers. Vor jeder Messung fährt die Sensor-Platte nach unten und bildet mit einem Abstand von 200 µm über den absedimentierten Zellen, ein kleines Volumen, in dem die Menge von O₂ und Protonen bestimmt wird. Nach jedem Messzyklus fährt die Sensorplatte wieder nach oben, um das Medium zu mischen und den Ausgangszustand wiederherzustellen. Die Sensorplatte enthält zudem vier Vertiefungen, sog. Ports, in die die Substanzen des Mito-Stress-Kits, Oligomycin, Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon (FCCP) und Rotenon und Antimycin A (Rot/AA), zur Beeinflussung der mitochondrialen Respiration gegeben werden können. Die für unsere Versuche genutzten Reagenzien des Mito-Stress-Kits wurden in die Ports A-C gegeben, die über Einstellungen der Gerätesoftware nacheinander in die Dellen der 24-Loch-Platte injiziert werden können. Port D blieb frei und musste somit auch nicht befüllt werden. Vor der Injektion der Kit-Reagenzien wird die basale Respiration der Zellen gemessen, in dem der Sauerstoffverbrauch (OCR) und die Protonenproduktion (ECAR) der Zellen in ihrem Normalzustand bestimmt werden. Die darauffolgende Injektion des ersten

⁴⁴ Agilent Technologies, Waldbronn

Reagenzes, Oligomycin, führt zu einer Hemmung der ATP-Synthase des Komplex V der Atmungskette, sodass Sauerstoff nicht mehr zu Wasser reduziert werden kann und der Sauerstoffverbrauch der Zellen abnimmt. Durch die Hemmung der mitochondrialen Atmung werden die Zellen dazu veranlasst, alternative Energiegewinnungswege zu nutzen, z.B. die Glykolyse. Durch die Konzentrationsänderung des gelösten Sauerstoffs und der freien Protonen im Medium kurz über der Zellschicht, nehmen die durch die Fluoreszenz-Sensoren weitergeleiteten Lichtwellen ab bzw. zu. Entsprechend nimmt nach Injektion des zweiten Reagenzes, FCCP, der Sauerstoffverbrauch der Zellen zu, da der in der Mitochondrienmembran herrschende Protonengradient zerstört wird und es so zu einer maximalen Respiration der Zellen kommt. Als letzte Injektion folgt Rot/AA, wodurch Komplexe I und III der Atmungskette gehemmt werden. Dadurch ist die gesamte mitochondriale Atmung samt ATP-Produktion gehemmt. Durch die Bestimmung der ATP-abhängigen Respiration nach Oligomycin-Injektion und der maximalen Respiration durch FCCP kann nach Rot/AA-Injektion die respiratorische Kapazität errechnet werden.

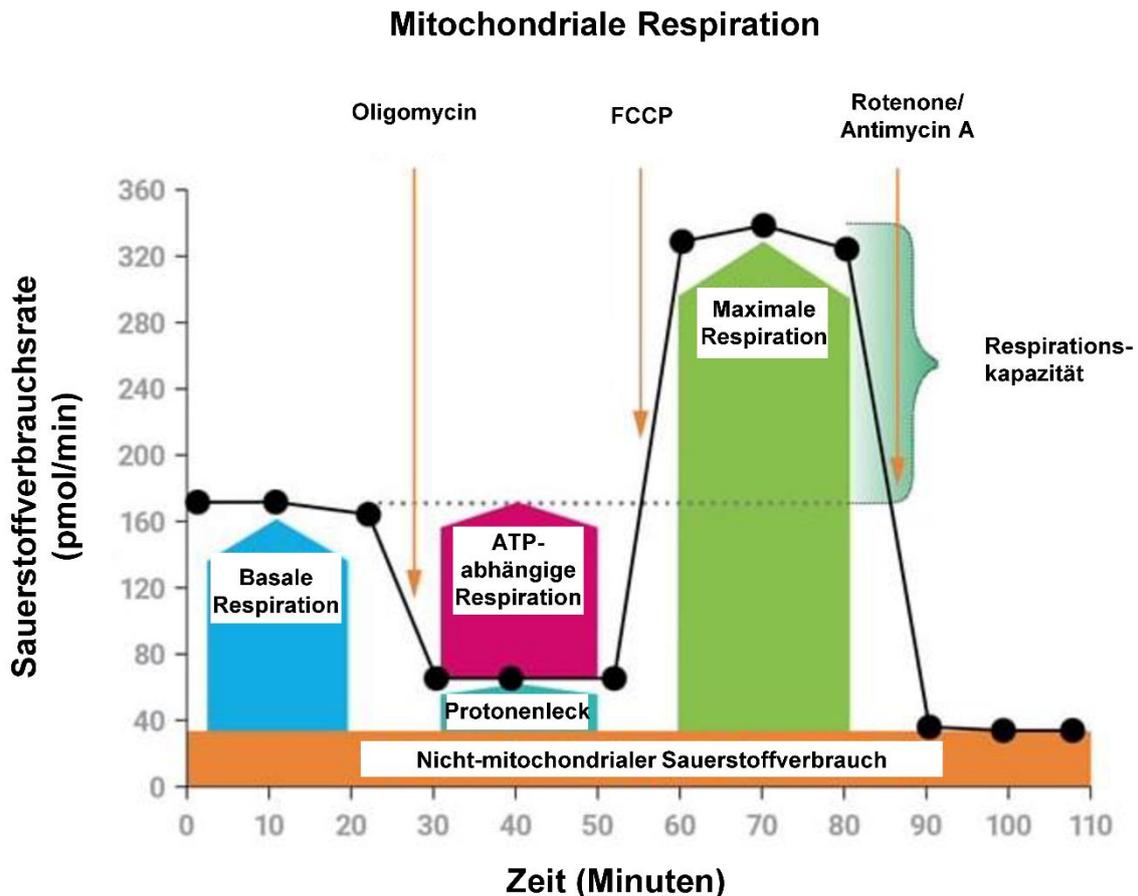


Abb. 3.1 Darstellung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) bei der Messung der mitochondrialen Respiration nach Injektionen der Reagenzien des Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kits. In der Abbildung wird die Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen sowie die Veränderungen des vorhandenen Sauerstoffs im Medium, abhängig von der Zugabe der entsprechenden Reagenzien schematisch dargestellt. Eine genauere Erläuterung ist im Text zu finden. (Diese Abbildung wurde nach Agilent Technologies, Seahorse Bioscience modifiziert).

3.5.4 Vorbereitungen am Vortag des Experiments

Zur Untersuchung der Stoffwechseleigenschaften primärer Suspensionszellen wurden die Dellen der XF24-Loch-Platten am Vortag mittels einer Poly-D-Lysin-Lösung beschichtet, um eine bessere Haftung der Zellen am Boden der Platten zu erzielen. In jede Delle der 24-Loch-Platte wurden 52 μ l der verdünnten Poly-D-Lysin Lösung pipettiert und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur, unter einer Sterilwerkbank, inkubiert. Nach Trocknung, bis zur Verwendung am nächsten Tag, wurden die Platten

im Kühlschrank gelagert und am Versuchstag in einem Wärmeschrank (37°C, ohne CO₂-Begasung) erwärmt. Neben der Beschichtung der Dellen erfolgte die Vorbereitung der XFe24-Sensor-Platte. Pro Delle wurden 1000 µl des XF-Kalibrierungspuffers pipettiert und über Nacht in einer Feuchtkammer im Wärmeschrank (37°C, ohne CO₂) äquilibriert. Diese Vorbereitungen sind erforderlich, um eine genaue pH-Wert-Messung und pH-Wert-Änderung während des Experiments zu gewährleisten. Zusätzlich wurde das Gerät bereits eingeschaltet und mit der dazugehörigen Software gekoppelt, damit die erforderliche Betriebstemperatur von 37°C bis zur Messung erreicht wird.

3.5.5 Etablierung und Durchführung der Stoffwechselformung

Die optimale Zellzahl, die pro Delle einer XF-24-Loch-Platte ausgesät wird, variiert je nach Zellart und Spezies. Dabei ist entscheidend, dass am Boden einer jeden Delle, die Zellen enthält, eine durchgehend gleichmäßige Zellschicht vorhanden ist. Nach Etablierung der adäquaten Zellzahl bei der Verwendung von equinen Lymphozyten, erwies sich eine Zellzahl von 8×10^5 pro Delle als Optimum.

Das XF-Medium wurde, wie in Kapitel 3.5.1 erläutert, hergestellt, auf pH 7,4 eingestellt sowie steril filtriert. Bis zur Verwendung verblieb es in einem 37°C-warmen Wasserbad. Die Reagenzien des Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kits wurden nach Empfehlung des Herstellers verdünnt (vgl. Kapitel 3.5.1) und das entsprechende Volumen der Arbeitslösung in die Vertiefungen, den sogenannten Ports, A-C der Sensorplatte pipettiert:

Port A: Oligomycin: 56 µl; Für eine Endkonzentration von 1 µM pro Delle

Port B: FCCP: 62 µl; Für eine Endkonzentration von 1 µM pro Delle

Port C: Rot/AA: 69 µl; Für eine Endkonzentration von 0,5 µM pro Delle

Die Einstellung des Messprotokolls erfolgte vor Versuchsbeginn mittels der Agilent Wave Software. Dabei bestand die Möglichkeit die Anzahl der Messzyklen für die Basalrespiration und pro Injektion, zu bestimmen. Die Sensorplatte konnte nach erfolgter Vorbereitung in das Gerät gelegt werden, um die Kalibrierung zu starten.

Die mittels Dichtegradientenzentrifugation präparierten equinen PBL wurden gezählt, vgl. Kapitel 3.1.3 und 3.1.4, und die für das Experiment benötigte Zellzahl bestimmt. Zur Stoffwechselanalyse der equinen PBL wurden pro Delle 8×10^5 Zellen in 200 μl des XF Mediums ausgesät. Für die Bestimmung des Leerwertes verblieben vier Dellen der XF24-Loch-Platte Zell-frei und enthielten lediglich XF-Medium. Die Leerwerte wurden bei der späteren Auswertung der Messdaten miteinbezogen.

Um eine gleichmäßige Zellschicht und Anhaftung der Zellen am Boden der jeweiligen Dellen zu gewährleisten, wurde die XF24-Loch-Platte für eine Minute bei 2000 rpm, Bremsfunktion aus, abzentrifugiert. Im Anschluss wurden alle mit Zellen befüllten Dellen sowie die Dellen für die Leerwertmessung auf ein Volumen von 500 μl mit XF-Medium aufgefüllt. Bis zum Start der Messung befand sich die Platte in einem Wärmeschrank bei 37°C, ohne CO₂-Begasung.

3.5.6 Statistische Auswertung

Die Daten aus den Stoffwechselfmessungen wurden in der mit dem Gerät gekoppelten Wave Software analysiert. Die gemessenen Werte aus allen Dellen wurden normalisiert, indem alle Werte auf eine Zellzahl von insgesamt 1×10^5 Zellen angepasst wurden. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte aus den jeweiligen Messzyklen der Basalrespiration sowie nach Oligomycin-, FCCP- und Rot/AA-Injektion von PBL aus Kontrollpferden und PBL aus ERU-Pferden miteinander verglichen. Die Mittelwerte der Kontroll-PBL und der ERU-PBL wurden mittels Kolmogorov-Smirnov Test (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung (KS: $\geq 0,05$) wurde der Student's *t*-Test zur Auswertung herangezogen. Bei nicht normalverteilten Werten (KS: $\leq 0,05$) fand der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test Verwendung. In beiden Tests wurden alle Werte mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3.6 Migrationsversuche in 3D-Kollagenmatrix

3.6.1 Puffer und Lösungen für Migrationsassays mittels μ -Slides⁴⁵

Herstellung der Kollagen-Zell-Lösung

10x Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) low glucose ⁴⁶	10 μ l
NaOH ⁴⁷ , 1 M	2,5 μ l
Aqua dest.	40,5 μ l
NaHCO ₃ ⁴⁶ , 7,5 %	2 μ l
1x DMEM ⁴⁸	25 μ l
Kollagen Typ 1 (5 mg/ml) ⁴⁹	45 μ l
Zellsuspension ($1,8 \times 10^7$ /ml)	25 μ l

Alle Lösungen werden in der angegebenen Reihenfolge, auf Eis, in ein 1,5ml großes Röhrchen pipettiert und miteinander vermischt. Das schnell härtende Kollagen-Zell-Gemisch sollte innerhalb 5 Minuten in die Ports der μ -Slides injiziert werden.

Herstellung der Chemoattractants

FCS	100 μ l
ad 150 μ l DMEM	
IL-4 ⁵⁰ (0,1 μ g/ μ l)	10 μ l
ad 90 μ l DMEM	
IFN γ ⁵⁰ (0,1 μ g/ μ l)	10 μ l
ad 90 μ l DMEM	

⁴⁵ ibidi, Gräfelfing

⁴⁶ Merck, Darmstadt

⁴⁷ Applichem, Darmstadt

⁴⁸ Pan Biotech, Aidenbach

⁴⁹ ibidi, Gräfelfing

⁵⁰ Biomol, Hamburg

CRALBP⁵¹ (2 µg/µl)
ad 90 µl DMEM

10 µl

3.6.2 Durchführung der Migrationsassays

Die Durchführung der Migrationsexperimente mit lebenden equinen Lymphozyten innerhalb einer 3D-Kollagenmatrix wurden mittels Chemotaxis 3D µ-Slides und dem kompatiblen Heiz- und Inkubationssystem (Stage Top Inkubationssysteme, Multiwell-Plates, K-Frame), durchgeführt. Die µ-Slides befanden sich während der Versuchsdurchführung innerhalb der beheizten und CO₂-begasten Kammer. Mithilfe eines Leica Dmi8 Mikroskops mit automatischer Zeitrafferfunktion, konnte die Migration der Zellen in Echtzeit beobachtet werden.

Vor Durchführung des Experiments werden die benötigten Materialien, Lösungen sowie die Zellen für mindestens 8 Stunden in einen Inkubator mit 37°C und 5 % CO₂-Begasung gelagert. Diese Maßnahmen sind wichtig, um einen Gasaustausch aller Komponenten zu erreichen, damit die Qualität und der Erfolg der Migrationsversuche gewährleistet sind. Für die Herstellung einer dreidimensionalen Matrix innerhalb der Stege der µ-Slides, wurde eine endgültige Kollagenkonzentration von 1,5 mg/ml eingesetzt. Die erforderlichen Lösungen wurden auf Eis nach Anleitung des Herstellers in ein ausreichend großes Röhrchen gegeben, vgl. Kapitel 3.6.1, und gemischt. Nachdem das Kollagen und die Zellsuspension in das Röhrchen dazugegeben wurden, erfolgte ein schnelles Befüllen der Stege der µ-Slides mit je 6 µl der Suspension, da diese nach 5 Minuten bei RT erhärtet. Zur vollständigen Polymerisation der Kollagen-Zell-Suspension erfolgte eine 30-minütige Inkubation der µ-Slides in einem Zellkulturinkubator mit 37°C und 5 % CO₂.

Im Anschluss wurden beide Reservoirs der µ-Slides mit 65 µl DMEM aufgefüllt. Das Reservoir auf der rechten Seite enthielt lediglich DMEM; das Reservoir auf der linken Seite enthielt DMEM sowie das Chemoattractant, das nachträglich dazugegeben wurde. Insgesamt wurden 30 µl der verdünnten Chemoattractant-Lösung in das linke

⁵¹ eigene Herstellung, München

Reservoir pipettiert. Zuvor wurden 30 μ l DMEM aus dem linken Reservoir mit einer Pipette entnommen.

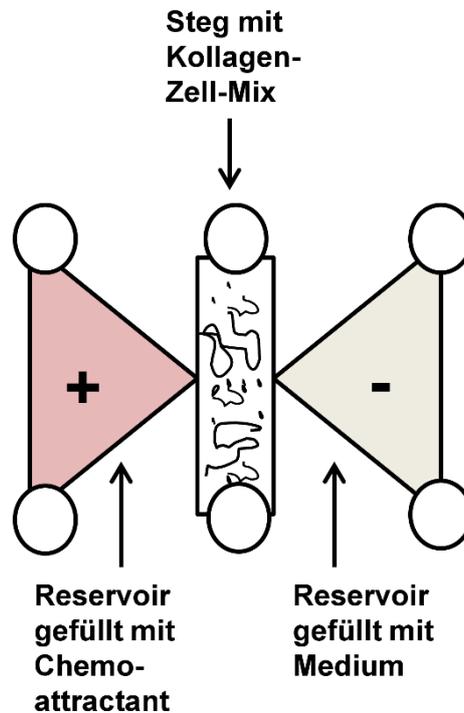


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Steges und der beiden Reservoirs der μ -Slides. Die wandernden Zellen befinden sich innerhalb des Steges in der Kollagenmatrix. Im Reservoir auf der rechten Seite befindet sich lediglich Medium, im Reservoir auf der linken Seite wurden zusätzlich 30 μ l Chemoattractant injiziert.

Die Zeitrafferaufnahme der Migration der equinen PBL erfolgte über 3 Stunden, wobei alle 60 Sekunden ein Bild der Kollagen-Zellmischung innerhalb des Steges aufgenommen wurde. Innerhalb der Experimente kamen fötales Kälberserum (FCS), equines IL-4, equines IFN γ und CRALBP (Deeg, Pompetzki et al. 2006), zum Einsatz.

3.6.3 Statistische Auswertung

Die aus den Zeitrafferaufnahmen erhaltenen Bilderstapel aller Migrationsexperimente wurden für die nachfolgenden Auswertungen als Bilddateien (.tif) exportiert. Mithilfe der frei zugänglichen Software ImageJ und dem manuellen Tracking-Plugin konnten die Lymphozyten innerhalb der 3-D-Kollagenmatrix verfolgt werden. Dabei flossen nur

die Zellen in die Auswertung mit ein, die sich innerhalb des mit Kollagen gefüllten Steges der μ -Slides bewegt haben. Nach dem Tracking von mindestens 30 Zellen pro Steg, wurde die Wanderungsrichtung, die zurückgelegte Distanz, die Zielgerichtetheit sowie die Geschwindigkeit der Zellen mit dem frei verfügbaren Chemotaxis and Migration Tool Version 1.01⁵² analysiert. Im Anschluss wurden die Daten der jeweiligen Migrationsparameter der Kontroll-PBL und der ERU-PBL mittels eines Kolmogorov-Smirnov Tests (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung (KS: $\geq 0,05$) wurde der Student's *t*-Test zur Auswertung herangezogen. Bei nicht normalverteilten Werten (KS: $\leq 0,05$) fand der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test Verwendung. In beiden Tests wurden alle Werte mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3.7 Identifikation der Interaktionspartner von Septin 7 und DOCK8

3.7.1 Immunpräzipitation und Massenspektrometrie

Die Identifikation von Septin 7-Interaktionsproteinen in equinen PBL augengesunder Pferde erfolgte mittels Immunpräzipitation unter Verwendung des anti-Septin 7-Antikörpers. Die Immunpräzipitate wurden durch den sogenannten FASP-Verdau, englisch für Filter-aided sample preparation, für die nachfolgende Massenspektrometrie aufbereitet und anschließend im Massenspektrometer analysiert. Mittels dieser Methoden konnten 20 Interaktionspartner des Proteins Septin 7 ermittelt werden. Eines dieser Proteine war Deducator of Cytokinesis 8 (DOCK8), dessen Protein-Protein-Interaktion mit Septin 7 durch eine weitere Immunpräzipitation und Analyse im Western Blot bestätigt werden konnte (Schauer et al. 2018). Des Weiteren erfolgte, für die Identifikation von interagierenden Molekülen von Septin 7 und DOCK8 in PBL von augengesunden und von an ERU erkrankten Pferden, eine Immunpräzipitation unter Verwendung des anti-Septin 7-Antikörpers und des anti-DOCK8-Antikörpers, mit anschließendem FASP-Verdau und massenspektrometrischer Analyse. Um die genauen Protokolle der Methoden und die

⁵² <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/index.html>

dabei verwendeten Materialien einzusehen, wird auf die Publikation von Schauer et al. verwiesen (Schauer et al. 2018).

3.7.1.1 Auswahl der massenspektrometrisch identifizierten Proteine nach Immunpräzipitation von PBL von an ERU erkrankten Pferden

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Proteine aus der DOCK8-Immunpräzipitation wurden bioinformatisch analysiert und aufgrund ihrer möglichen Beteiligung an und Bedeutung für die Pathogenese bei der ERU ausgewählt. Die Proteine, die in PBL von an ERU erkrankten Pferden vermehrt durch DOCK8 angereichert wurden, im Vergleich zu PBL augengesunder Pferde, wurden aufgrund der möglichen Beteiligung am Migrationsverhalten equiner PBL ausgewählt.

Aus dem Datensatz der massenspektrometrisch ermittelten Interaktionsproteine von DOCK8 in ERU-Pferden wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Proteine ausgewählt, die aufgrund ihrer möglichen funktionellen und regulatorischen Rolle in PBL von an ERU erkrankten Pferden, von Interesse waren. Anhand ihrer Identifikationsnummer wurden die Proteine ZAP70 und Cdc42 mithilfe der frei zugänglichen Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>) identifiziert:

Proteinname	Identifikationsnummer	DOCK8 IP ratio ERU/Ktr	ERU ratio DOCK-IP/ ITK
Tyrosine- protein kinase, ZAP70	ENSECAP00000009205	5,0	8,9
Cell division control protein 42, Cdc42	ENSECAP00000003324	4,7	4,4

Für diese Proteine wurde der Quotient aus der Abundanz im jeweiligen DOCK8 Präzipitat zu der entsprechenden Abundanz im Präzipitat der Isotypkontrolle berechnet (Ratio). Erst ab einer Ratio ≥ 2 wurde die Anreicherung im Präzipitat des anti-DOCK8-Antikörpers als ausreichend gewertet. Bei der Auswahl der Proteine spielte zudem das

Verhältnis der Abundanz im Immunpräzipitat von PBL an ERU erkrankten Pferden zu der Abundanz im Immunpräzipitat von Kontrolltieren zu DOCK8 (Ratio) eine Rolle.

Die Rolle dieser DOCK8-Interaktionspartner, die nach massenspektrometrischer Analyse der Immunpräzipitate von an ERU erkrankten Pferden identifiziert wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchung des Migrationsverhaltens von PBL von gesunden und von an ERU erkrankten Pferden in 3D-Kollagenmatrix

Das Hauptmerkmal der Pathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis ist die Migration autoreaktiver peripherer Blutleukozyten (PBL) in das Auge, indem sie aus noch ungeklärten Gründen die Blut-Retina-Schranke (BRB) überwinden (Degroote et al. 2017). Die in das Auge eingedrungenen PBL lösen nachfolgend Entzündungsschübe aus, die sich mit jedem Rezidiv verstärken und letztendlich zur Erblindung führen können (Gerding and Gilger 2016). Da bis heute noch nicht geklärt werden konnte, welche Mechanismen die autoreaktiven PBL dazu befähigen, aus der Peripherie über die BRB in das Auge zu wandern, wurde das Wanderungsverhalten von equinen PBL näher untersucht. Für die Versuchsdurchführung kamen μ -Slides zum Einsatz, in denen die PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde in einer 3D-Kollagenmatrix wanderten. Die Migration der Lymphozyten wurde in Echtzeit, über drei Stunden hinweg, mittels eines Inversmikroskops mit Zeitrafferfunktion, aufgenommen. Für die Versuche wurden verschiedene Lockmittel, sogenannte Chemoattractants, wie FCS, IL-4, IFN γ und das Autoantigen CRALBP eingesetzt, um eine gerichtete Wanderung, Chemotaxis, zu induzieren. Bei der Auswertung wurde die Verteilung der gewanderten Zellen, die Verlagerung des Masseschwerpunkts, die gewanderte Distanz, die Zielgerichtetheit sowie die Geschwindigkeit der migrierten Zellen berücksichtigt.

4.1.1. Zielgerichtetes und schnelleres Wanderungsverhalten von PBL von an ERU erkrankten Pferden mit FCS als Chemoattractant

Das Wanderungsverhalten von primären Blutleukozyten von augengesunden und von an ERU erkrankten Pferden in kollagendichter Umgebung wurde in Echtzeitexperimenten getestet. Einer der verwendeten Lockstoffe war fötales Kälberserum (FCS). Die im Serum enthaltenen Proteine und Hormone können positive Effekte auf die Proliferation und das Wachstum von Leukozyten haben und chemotaktische Wirkung haben (Biswenger et al. 2018). Insgesamt wurden die Wanderungseigenschaften von PBL 13 gesunder Pferde und 15 an ERU erkrankter Pferde, unter Verwendung von FCS, untersucht. Dabei fiel ein unterschiedliches Wanderungsverhalten zwischen PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde auf. So wanderte eine signifikant höhere Anzahl der PBL von ERU-Pferden in Richtung des mit FCS befüllten Reservoirs (Abbildung 4.1 A, B). Die Gesamtmasse der gewanderten Zellpopulation der ERU-Zellen, durch den Masseschwerpunkt darstellt, verlagerte sich im Vergleich zum Masseschwerpunkt der Kontrolltiere stärker auf die Seite des Lockstoffs (Abbildung 4.1 C). Darüber hinaus legten die PBL von an ERU erkrankten Pferden innerhalb der Kollagenmatrix signifikant längere Distanzen zurück (** $p \leq 0,01$) (Abbildung 4.1 D). Außerdem wanderten die PBL von ERU-Pferden zielgerichteter als die PBL der Kontrollpferde (** $p \leq 0,01$) (Abbildung 4.1 E). Die Zielgerichtetheit gibt Rückschlüsse, wie geradlinig, also direkt, die Wanderungstrecken der Zellen von ihrem Ausgangspunkt bis zu ihrem Endpunkt waren. Im Vergleich zu den PBL von Kontrollpferden wanderten die PBL von an ERU erkrankten Pferden signifikant schneller durch die kollagendichte Umgebung (* $p \leq 0,05$) (Abbildung 4.1 F).

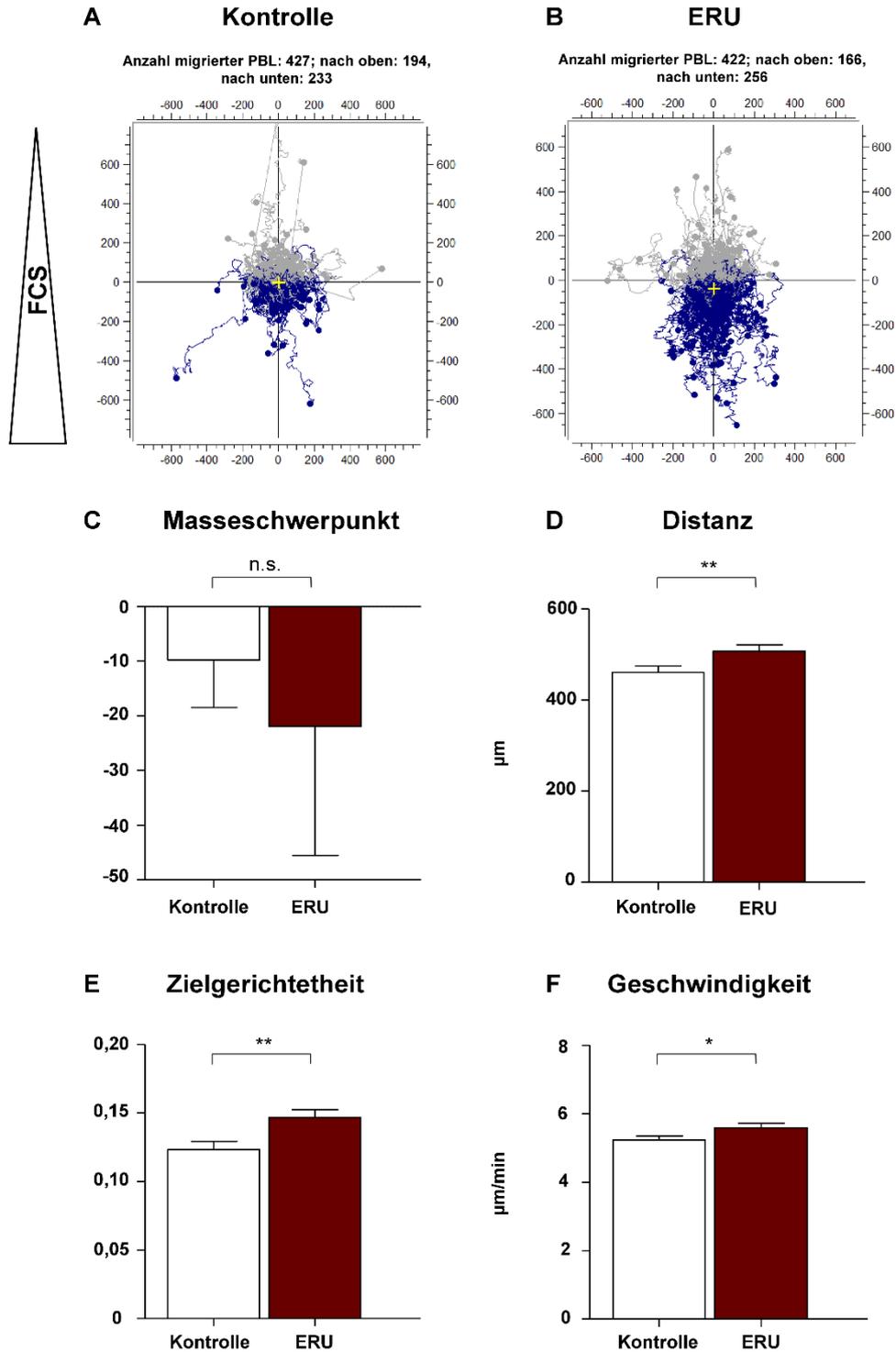


Abb. 4.1: Migrationsparameter von PBL augengesunder Pferde und PBL von an ERU erkrankten Pferden mit FCS als Lockstoff. Dargestellt sind die Migrationswege von PBL von Kontrollen (n=13) (A) und an ERU erkrankten Pferden (n=15) (B). Alle Startpunkte der gewanderten Zellen wurden in die Mitte der jeweiligen Grafik projiziert. Zellen die sich in Richtung FCS bewegten sind blau markiert; Zellen die sich in die entgegengesetzte Richtung bewegten, sind grau markiert. Der Masseschwerpunkt (C)

zeigt, dass sich die Gesamtpopulation der PBL von an ERU erkrankten Pferden weiter in Richtung der FCS-Quelle bewegt hat. Die Distanz (D) stellt die Gesamtlänge des zurückgelegten Weges der PBL dar und veranschaulicht, dass PBL von ERU-Pferden signifikant längere Strecken gewandert sind (** $p \leq 0,01$). Auch die Zielgerichtetheit der PBL von ERU-Pferden (E) während ihrer Migration war signifikant erhöht (** $p \leq 0,01$). Der Vergleich der Zellgeschwindigkeit (F), gemessen in $\mu\text{m}/\text{min}$, zeigt, dass sich die PBL von an ERU erkrankten Pferden auch signifikant schneller bewegten (* $p \leq 0,05$).

4.1.2 Ausbleibende chemotaktische Wirkung auf equine PBL mit IL-4 als Chemoattractant

Bei der Untersuchung der Migrationsparameter von PBL augengesunder Pferde und von an ERU erkrankten Pferden konnten bei der Verwendung von IL-4, Merkmal-Zytokin der Th2-T-Zellen, keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Die eindeutig unterschiedlichen Migrationsparameter zwischen PBL gesunder und von an ERU erkrankter Pferde, die bei Versuchen mit FCS nachweisbar waren, blieben bei Migrationsversuchen mit IL-4 als Chemoattractant aus. Beim Vergleich der Migrationsparameter der gewanderten PBL von Kontrollpferden und ERU-Pferden konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Verteilung, Masseschwerpunktverschiebung, Distanz, Zielgerichtetheit oder Geschwindigkeit festgestellt werden (vgl. Abbildung 4.2 A - F).

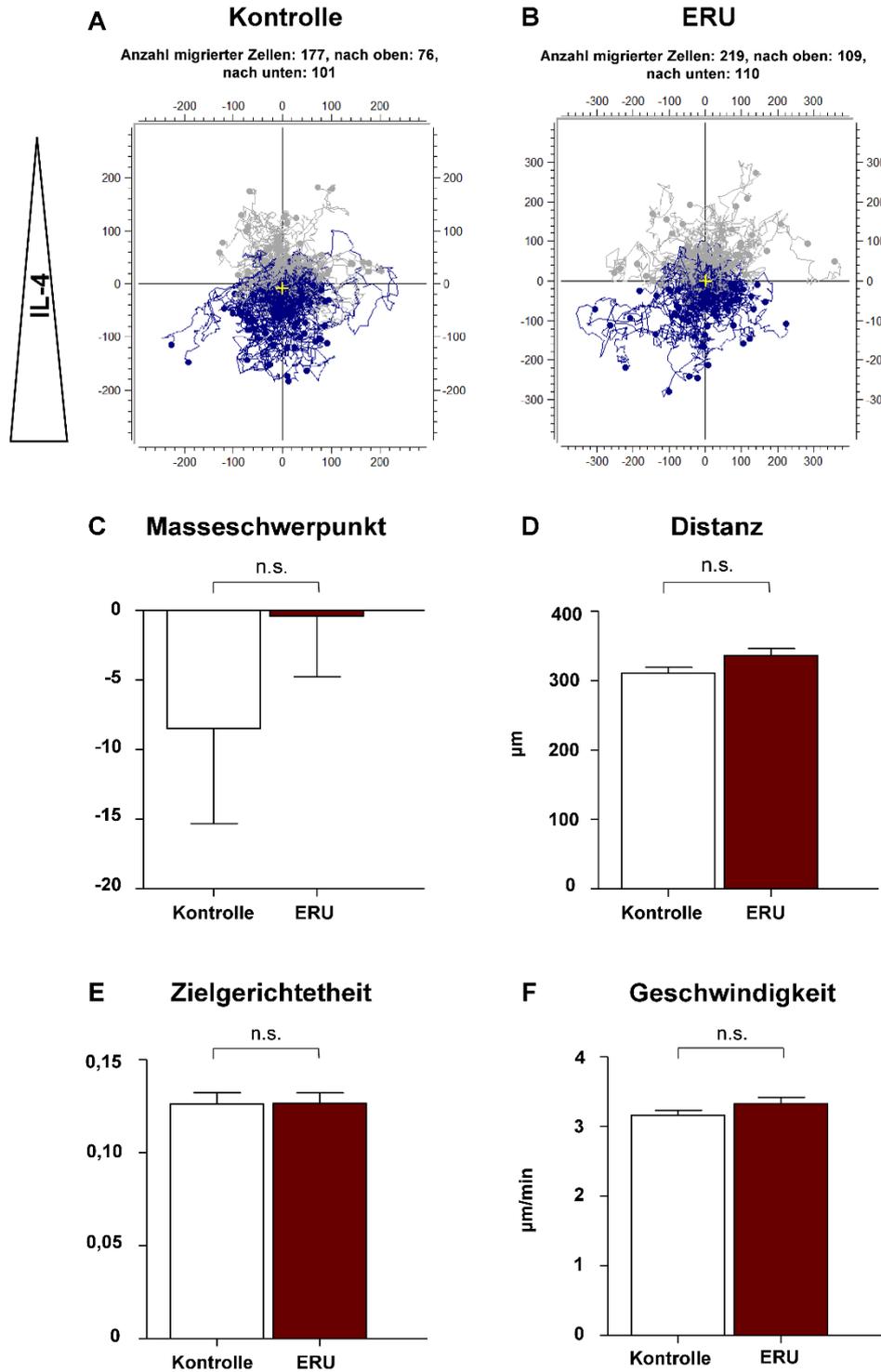


Abb. 4.2: Wanderungsverhalten von PBL augengesunder Pferde (n=4) und von an ERU erkrankten Pferden (n=4) unter Verwendung von IL-4 als Lockstoff. Zu sehen sind die Migrationswege der PBL von Kontrollpferden (A) und von an ERU erkrankten Pferden (B). Alle Startpunkte der gewanderten Zellen wurden in die Mitte der beiden Grafiken projiziert. PBL, die in

Richtung IL-4 migrierten sind blau markiert; Zellen, die in die entgegengesetzte Richtung wanderten, sind grau markiert. Die Balkendiagramme zeigen die Masseschwerpunkte (C), Distanz (D), Zielgerichtetheit (E) und Geschwindigkeit (F) der gewanderten PBL im Vergleich. Bei keinem der dargestellten Migrationsparameter zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen PBL von gesunden und von an ERU erkrankten Pferden.

4.1.3 IFN γ induziert hohe Wanderungsgeschwindigkeiten der PBL von an ERU erkrankten Pferden

Das Merkmal-Zytokin von Th1-T-Zellen, IFN γ , spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung der ERU, einer T-Zell-medierten Autoimmunerkrankung, bei der vorrangig Th1-T-Zellen beteiligt sind (Gilger and Deeg 2011). Um die Wirkung dieses Zytokins auf die Wanderungseigenschaften equiner PBL innerhalb einer kollagendichten Umgebung zu untersuchen, wurden die Migrationsparameter der PBL von Kontrollpferden und ERU-Pferden verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass zwei Drittel der migrierten PBL von Kontrollpferden in die entgegengesetzte Richtung des Chemoattractants wanderten (Abbildung 4.3 A). Die PBL von an ERU erkrankten Pferden hingegen zeigten eine deutliche Reaktion, also eine gerichtete Bewegung zur Seite des IFN γ -haltigen Reservoirs (Abbildung 4.3 B). Knapp zwei Drittel der gewanderten PBL von ERU-Pferden migrierten in die Richtung des Chemoattractants IFN γ , was durch die Verlagerung des Masseschwerpunkts der ERU-Zellen deutlich wurde (Abbildung 4.3 C). Die PBL von ERU-Pferden legten außerdem signifikant längere Distanzen innerhalb der kollagendichten Umgebung zurück als PBL gesunder Pferde (***) $p \leq 0,001$) (Abbildung 4.3 D). Der Vergleich der Zielgerichtetheit ergab keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 4.3 E). In Bezug auf die Migrationsgeschwindigkeit migrierten die PBL von an ERU erkrankten Pferden signifikant schneller, mit durchschnittlich 3,4 $\mu\text{m}/\text{min}$, im Gegensatz zu den PBL von Kontrollpferden mit 2,6 $\mu\text{m}/\text{min}$ (***) $p \leq 0,001$) (Abbildung 4.3 F).

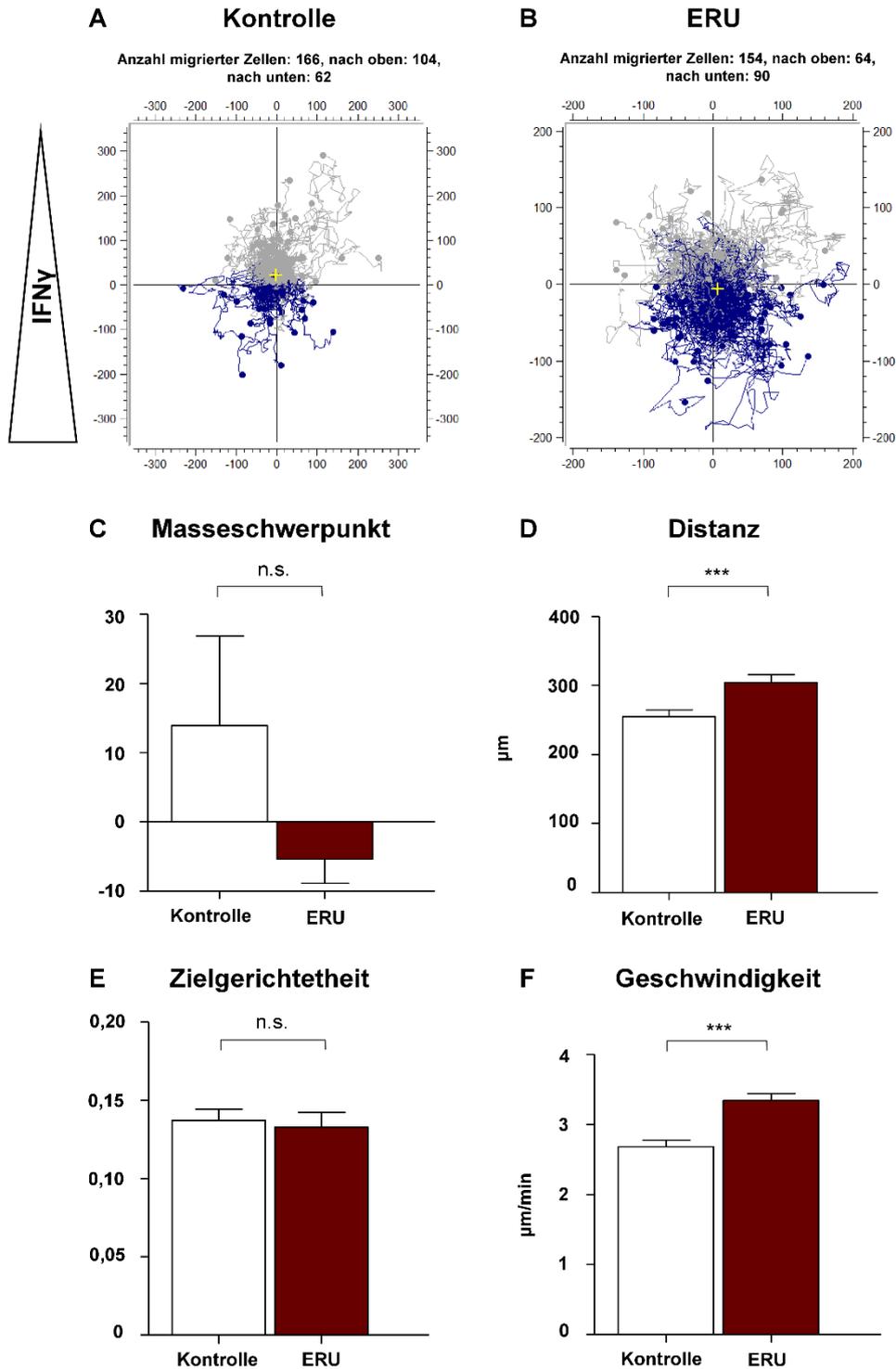


Abb. 4.3: PBL von Kontrollpferden (n=4) und von ERU-Pferden (n=4) wurden auf ihr Wanderungsverhalten unter Verwendung von IFN γ untersucht. Die Wanderungswege der PBL werden durch die ersten beiden Plots dargestellt (A) und (B). PBL die sich in Richtung IFN γ bewegten sind blau markiert; Zellen die in die entgegengesetzte Richtung wanderten, sind grau markiert.

Die Verschiebung der Masseschwerpunkte beider Gesamtpopulationen (C) veranschaulicht, dass sich die Gesamtmasse der gewanderten PBL von an ERU erkrankten Pferden deutlich in Richtung IFN γ verlagert hat. Die signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und ERU-Pferden bei der gewanderten Distanz werden im Balkendiagramm (D) deutlich (** $p \leq 0,001$). Es ist kein signifikanter Unterschied bei der Zielgerichtetheit zu sehen (E) (n.s., $p > 0,05$). Die Geschwindigkeit (F) zeigt, dass die PBL von an ERU erkrankten Pferden signifikant schneller migrierten als die PBL von Kontrolltieren (** $p \leq 0,001$).

4.1.4 PBL von an ERU erkrankten Pferden zeigen deutliches Wanderungsverhalten auf das Autoantigen CRALBP

Das Autoantigen CRALBP wurde als autoimmunspezifisches Reagenz für die Untersuchung des Wanderungsverhaltens von PBL von gesunden und von an ERU erkrankten Pferden eingesetzt. CRALBP, das sich als Autoantigen bei der ERU erwiesen hat, spielt auch bei der autoimmunen Uveitis des Menschen eine Rolle (Deeg, Pompetzki, et al. 2006; Deeg et al. 2007). PBL von gesunden Pferden zeigten im Gegensatz zu PBL von an ERU erkrankten Pferden keine deutliche Wanderungsrichtung zum mit CRALBP-gefüllten Reservoir (Abbildung 4.4 A, B). Eine deutlich höhere Anzahl der migrierten Zellpopulation von ERU-Pferden bewegte sich in Richtung des Reservoirs mit CRALBP, verdeutlicht durch die unterschiedliche Verlagerung des Masseschwerpunktes der PBL (Abbildung 4.4 C). PBL von ERU-Pferden legten zudem längere Wanderungsstrecken innerhalb der Kollagenmatrix zurück (** $p \leq 0,01$) (Abbildung 4.4 D). Zusätzlich zeigten sie eine deutlich zielgerichtete Migration (** $p \leq 0,001$) (Abbildung 4.4 E) und bewegten sich darüber hinaus deutlich schneller, mit durchschnittlich 3,3 $\mu\text{m}/\text{min}$, im Gegensatz zu PBL gesunder Pferde mit 2,3 $\mu\text{m}/\text{min}$ (** $p \leq 0,001$), (Abbildung 4.4 F). Diese Ergebnisse verdeutlichen die hoch signifikante und spezifische Reaktionsfähigkeit der PBL von an ERU erkrankten Pferden auf CRALBP.

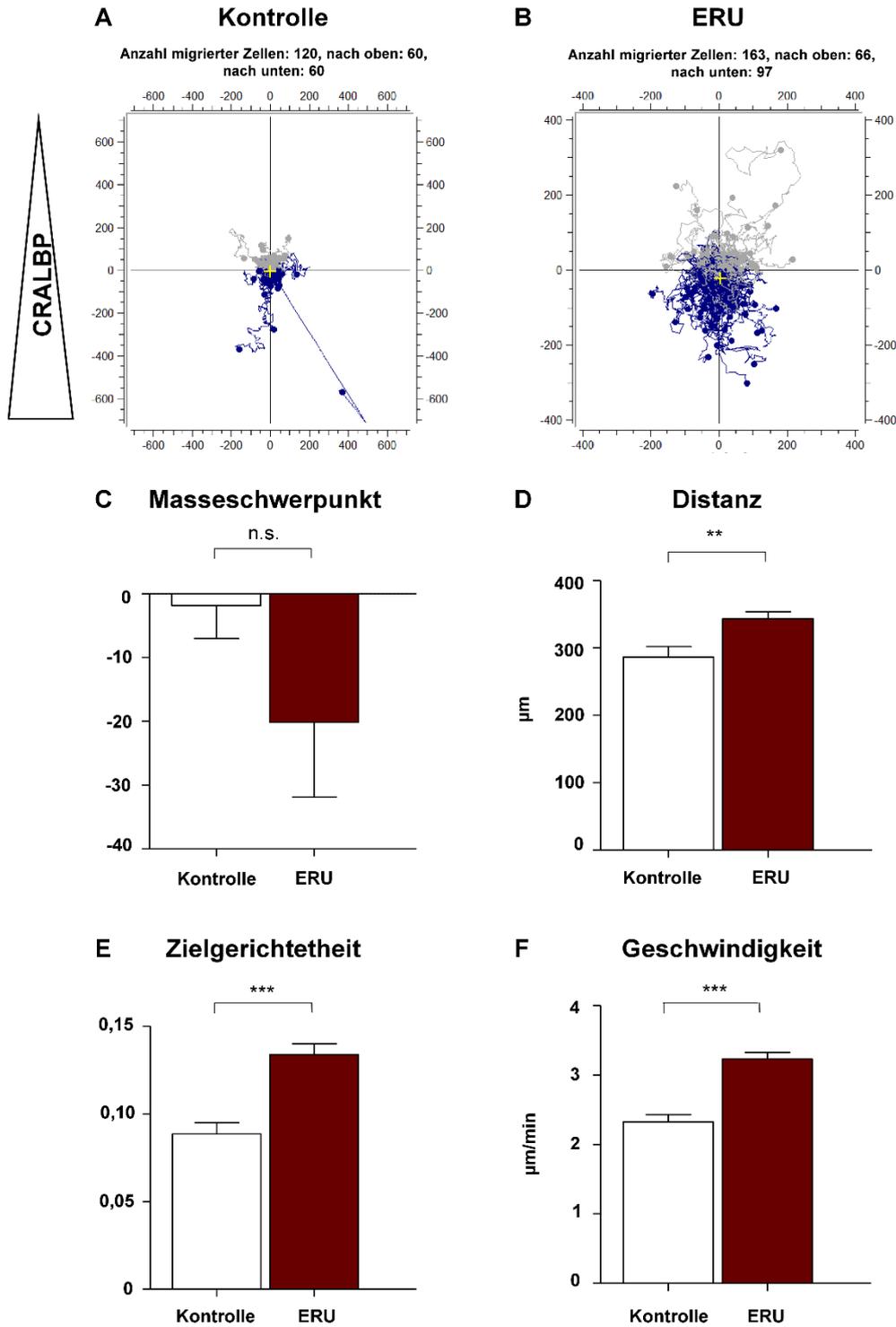


Abb. 4.4: Wanderungsverhalten und Migrationsparameter von PBL augengesunder und von an ERU erkrankter Pferde auf CRALBP. Darstellung der Zellwanderung von PBL augengesunder Kontrolltiere (n=4) (A) und von an ERU erkrankten Pferden (n=4) (B). Die Startpunkte der gewanderten Zellen wurden jeweils in die Mitte der beiden Grafiken projiziert. Zellen die sich in Richtung CRALBP bewegten, sind blau markiert; Zellen die sich in die entgegengesetzte Richtung bewegten, sind grau

markiert. Die Verschiebung des Masseschwerpunktes (C) zeigt, dass sich die gesamte Zellpopulation der PBL von an ERU erkrankten Pferden weiter in Richtung CRALBP verlagerte. Signifikante Unterschiede sind anhand der Wanderungsdistanz (D) (** $p \leq 0,01$) und anhand der Zielgerichtetheit (E) (***) ($p \leq 0,001$) zu erkennen. Der Vergleich der Zellgeschwindigkeit (F) zeigt zusätzlich, dass sich die PBL von an ERU erkrankten Pferden signifikant schneller bewegten als die Zellen gesunder Kontrollpferde (***) ($p \leq 0,001$).

4.1.5 Beeinträchtigung des Septin 7-Gerüsts durch FCF verändert das Migrationsverhalten der Lymphozyten von gesunden Pferden

Anhand der generierten Wanderungsdaten konnten die verschiedenen Migrationsparameter von PBL von gesunden Pferden und von an ERU erkrankten Pferden analysiert und miteinander verglichen werden. In welchem Zusammenhang die unterschiedliche hohe Expression des Proteins Septin 7 in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde mit dem veränderten Migrationsverhalten steht, wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Um mehr über funktionelle Mechanismen herauszufinden, die zu dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten der PBL von an ERU erkrankten Pferden führten, wurde die Funktion und Beteiligung der Proteine Septin 7 und F-Aktin untersucht. Die Interaktion von Septinen, einer Familie zytoskelettaler GTPasen und dem Aktin-Zytoskelett, spielt bei der Migration und der Motilität von Lymphozyten eine wichtige Rolle (Lam and Calvo 2019; Schmidt and Nichols 2004). Aus vorangegangenen Untersuchungen equiner PBL ist bekannt, dass PBL von an ERU erkrankten Pferden eine geringere Septin 7-Expression aufweisen als PBL von Kontrolltieren (Degroote et al. 2014). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine verminderte Septin 7 Expression in ERU-Zellen ein Grund dafür sein könnte zielgerichteter und schneller durch kollagendichtes Gewebe zu migrieren. Für die funktionelle und spezifische Untersuchung des Septin-Zytoskeletts gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Reagenzien. Forchlorfenuron (FCF) ist ein synthetisch hergestelltes Pflanzenzytokinin, ein Pflanzenhormon mit multiplen Wirkungen auf das Pflanzenwachstum, das in der Landwirtschaft genutzt wird (Fahima et al. 2019). Untersuchungen zu FCF ergaben, dass es das Septin-Zytoskelett in Hefen und in Säugerzellen kurzzeitig und reversibel beeinflussen kann (DeMay et al. 2010; Hu,

Nelson and Spiliotis 2008; Iwase et al. 2004). Um die Beeinträchtigung der Septin 7-Strukturen durch FCF auf das Migrationsverhalten von equinen PBL zu untersuchen, wurden weitere Migrationsversuche in 3D-Kollagenmatrix durchgeführt. Dabei wurden unbehandelte PBL von augengesunden Pferden mit FCF-behandelten PBL anhand der Migrationsparameter, verglichen. Der Vergleich der Migrationsparameter von PBL aus beiden Versuchsgruppen ergab nur bei einem Parameter, der Zielgerichtetheit, einen signifikanten Unterschied. Die FCF-behandelten PBL wanderten zielgerichteter durch die kollagendichte Umgebung als die unbehandelten PBL (** $p \leq 0,01$) (Abbildung 4.5 E).

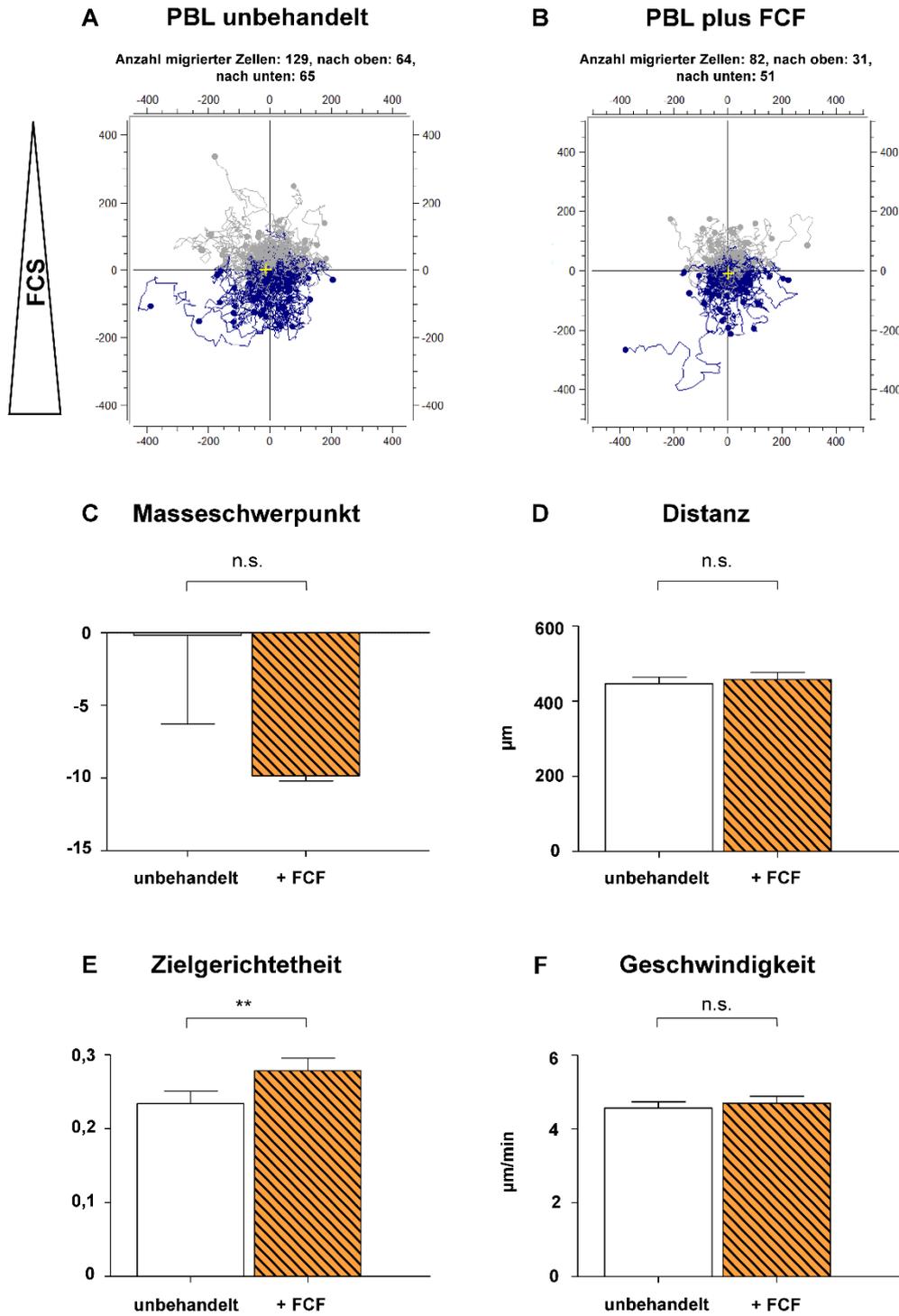


Abb. 4.5: Vergleichende Darstellung der Migrationsparameter unbehandelter PBL und FCF-behandelter PBL von augengesunden Pferden. Die Migrationswege unbehandelter PBL (A) sowie FCF-behandelter PBL (B) in Richtung des Lockmittels sind durch blaue Linien gekennzeichnet; graue Pfade zeigen die Migration in die entgegengesetzte Richtung.

Bei der Verlagerung der Masseschwerpunkte (C) und der Distanz (D) sind keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und FCF-behandelten PBL zu erkennen. Der Vergleich der

Zielgerichtetheit (E) veranschaulicht, dass sich FCF-behandelte PBL signifikant zielgerichteter fortbewegt haben als unbehandelte PBL (** $p \leq 0,01$). Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit (F).

4.1.6 Die Expression der Proteine Septin 7 und F-Aktin steht in Zusammenhang mit dem Migrationsverhalten equiner Lymphozyten

Wie aus den vorherigen Experimenten zu Wanderungseigenschaften von equinen PBL hervorgeht, zeigten FCF-behandelte PBL im Vergleich zu unbehandelten PBL eine erhöhte zielgerichtete Bewegung während der Migration durch die 3D-Matrix. Da die gesteigerte Zielgerichtetheit ein Merkmal der Wanderungseigenschaften von PBL von ERU-Pferden widerspiegelte, war die Expression von Septin 7 und F-Aktin und deren intrazelluläre Verteilung in gewanderten, zu nicht gewanderten PBL, von großem Interesse. Zur Untersuchung der Expressionsstärke von Septin 7 und F-Aktin in unbehandelten und FCF-behandelten PBL gesunder Pferde wurden die Proteine immunzytochemisch angefärbt. Die mittleren Intensitätswerte der Fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen Septin 7 und F-Aktin, von mindestens 35 angefärbten Zellen pro Zustand, wurden analysiert. Die Septin 7-Expression in unbehandelten, migrierten PBL ergab eine 2-fach geringere Expression von Septin 7 als in nicht migrierten PBL (***) $p \leq 0,001$) (Abbildung 4.6 A). FCF-behandelte, migrierte PBL exprimierten nur ein Drittel des Septin 7-Signals im Vergleich zu FCF-behandelten, nicht migrierenden Zellen (***) $p \leq 0,001$) (Abbildung 4.6 A, orangefarbene Balken). Neben Septin 7 war auch die Expression von F-Aktin in migrierten Zellen stark reduziert (***) $p \leq 0,001$) (Abbildung 4.6 B). Migrierte, FCF-behandelte PBL exprimierten weniger F-Aktin als nicht migrierte PBL (** $p \leq 0,01$) (Abbildung 6 B, orangefarbene Balken). Insgesamt zeigten die migrierten PBL signifikant reduzierte Expressionen beider Proteine, Septin 7 und F-Aktin, im Vergleich zu den nicht migrierten Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine geringere Expression von Septin 7, wie in PBL von ERU Tieren nachgewiesen wurde (Degroote et al. 2014), deutliche Auswirkungen auf die Migrationsfähigkeit von equinen Lymphozyten hat.

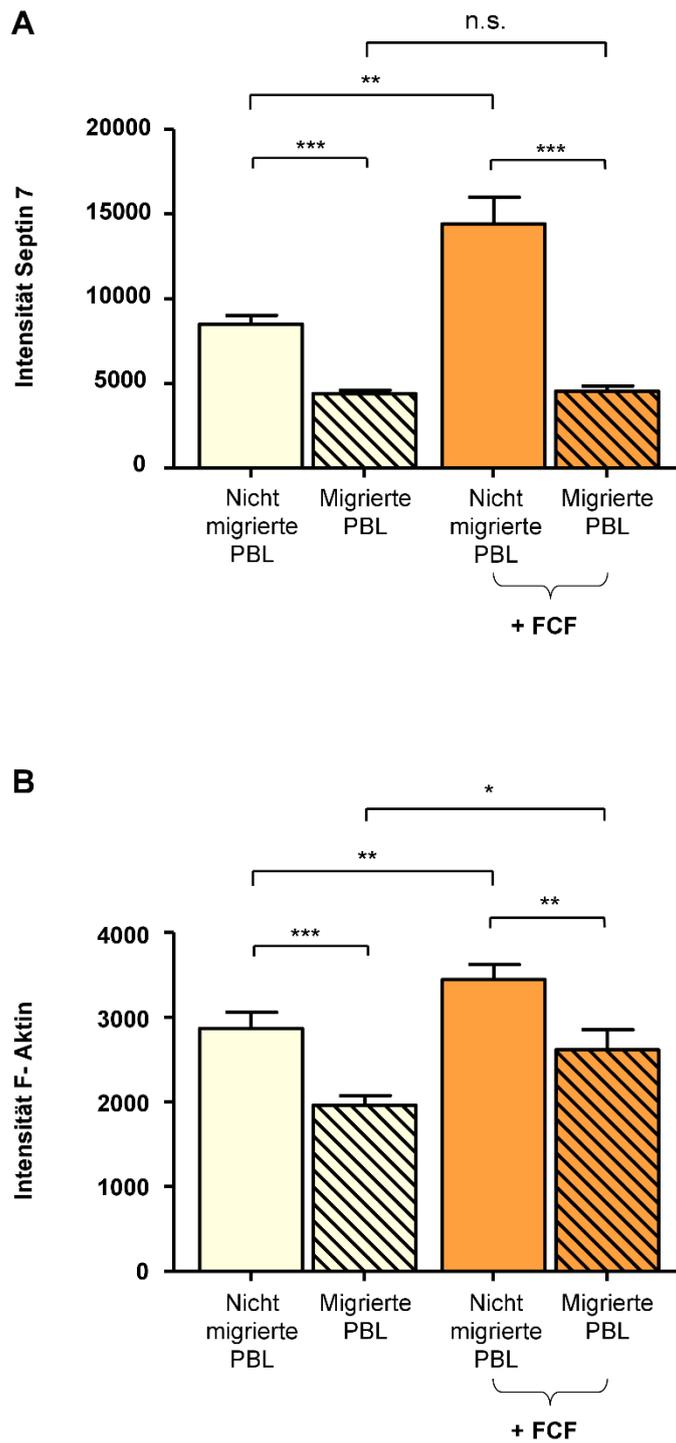


Abb. 4.6: Quantitative Analyse der Septin 7 und F-Aktin Expression nicht migrierter und migrierter PBL. Die Darstellung zeigt die quantitativ ermittelte Expression von Septin 7 (A) und F-Aktin (B) in unbehandelten und FCF-behandelten, nicht migrierten sowie migrierten Zellen gesunder Pferde. Migrierte PBL sind jeweils durch diagonale Linien gekennzeichnet; FCF-behandelte PBL durch orangefarbene Balken. Unbehandelte, migrierte PBL zeigten eine signifikant geringere Septin 7

Expression im Vergleich zu nicht migrierten PBL (A) (** $p \leq 0,001$). Dies war auch beim Vergleich von migrierten, FCF-behandelten PBL zu nicht migrierten, FCF-behandelten PBL zu sehen (** $p \leq 0,001$). Die Expression von F-Aktin war in migrierten, unbehandelten Zellen stark reduziert (B) (** $p \leq 0,001$). In FCF-behandelten, migrierten PBL war die F-Aktin-Expression im Vergleich zu nicht migrierten, FCF-behandelten PBL etwa um ein Viertel reduziert (** $p \leq 0,01$). Insgesamt zeigten gewanderte PBL eine deutlich geringere Septin 7- und F-Aktin Expression als nicht gewanderte PBL.

4.1.7 Veränderte Verteilung und Expression von Septin 7 und F-Aktin in gewanderten PBL von gesunden Pferden

Neben den Expressionsintensitäten von Septin 7 und F-Aktin in PBL gesunder Pferde kann die intrazelluläre Lokalisation und Zusammensetzung der jeweiligen Proteine auch einen großen Einfluss auf das Zellverhalten, hinsichtlich der Anpassung von Zellform und –bewegung, haben (Hagiwara et al. 2011; Koyama-Honda et al. 2005). Durch die Gerüstfunktion innerhalb der Zellen werden Septinen auch Funktionen bei der Regulation der Plasmamembran sowie bei der Signalweiterleitung zugeschrieben (Lam and Calvo 2019; McQuilken et al. 2017). Die Proteinverteilung von unbehandelten und FCF-behandelten PBL sowie nicht migrierten und migrierten PBL, wurde mittels differentieller Interferenzkontrastmikroskopie untersucht (Abbildung 4.7 A, E). Nicht migrierte, unbehandelte Lymphozyten zeigten dicht gepackte Septin 7- und F-Aktin-Strukturen (Abbildung 4.7 B, C). Diese Strukturen waren hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert. Die Überlagerung beider Kanäle zeigte die naheliegende Lokalisation beider Strukturen (Abbildung 4.7 D). Im Gegensatz zu nicht migrierten PBL zeigten migrierte PBL weitaus feinere Septin 7- und F-Aktin-Strukturen (Abbildung 4.7 F, G). Die Verteilung der jeweiligen Proteine reichte von der Plasmamembran bis in Kern nahe Bereiche.

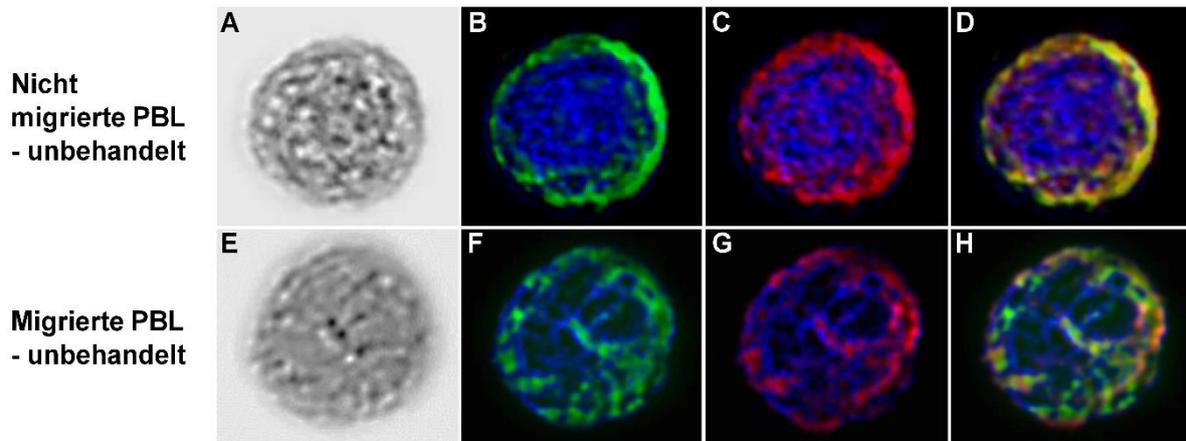


Abb. 4.7: Repräsentative Darstellung der Septin 7 und F-Aktin Expressionen von unbehandelten, nicht migrierten sowie migrierten Lymphozyten gesunder Pferde. Die differentielle Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) zeigt repräsentativ nicht migrierte Lymphozyten (A) sowie migrierte Lymphozyten (E) eines gesunden Pferdes. Nicht gewanderte PBL zeigen dicht gebündelte Septin 7- (grün) und F-Aktin-Strukturen (rot) entlang der Plasmamembran (B, C). Die Ko-Lokalisation beider Strukturen wurde im Overlay gezeigt (D, H). Die Septin 7- sowie F-Aktin-Expression der migrierten Zellen ist reduziert (F, G). Die Strukturen sind feiner und verteilen sich von der Plasmamembran bis in perinukleäre Bereiche (F, G). Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blau) angefärbt.

Um den Vergleich zwischen unbehandelten, nicht migrierten sowie migrierten Lymphozyten und FCF-behandelten PBL zu ziehen, wurde das Expressions- und Verteilungsmuster von Septin 7 und F-Aktin in FCF-behandelten PBL nicht migrierter (Abbildung 4.8 A) sowie migrierter Lymphozyten (Abbildung 4.8 E) untersucht. Nicht migrierte PBL zeigten dickere, dicht gepackte Septin 7- und F-Aktin-Strukturen (Abbildung 4.8 B, C). Die Strukturen waren weitestgehend in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert, zeigten aber auch eine Verteilung in kernnahen Bereichen (Abbildung 4.8 B, C, D). FCF-behandelte, migrierte Zellen zeigten im Vergleich zu nicht migrierten PBL weniger dichte, lang gezogene Septin 7- und F-Aktin-Strukturen sowie eine weitaus diffusere Verteilung der Proteine (Abbildung 4.8 F, G, H).

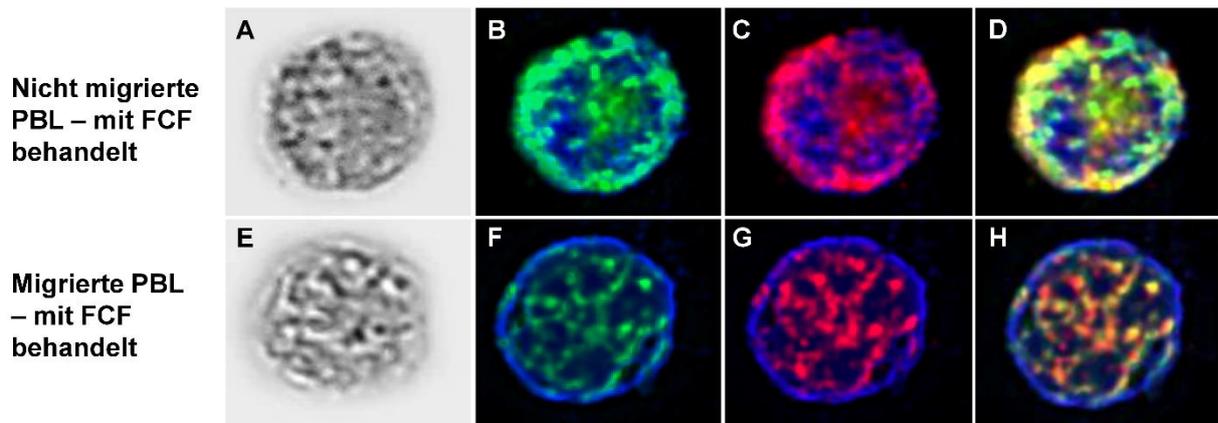


Abb. 4.8: Repräsentative Darstellung der Septin 7 und F-Aktin Expressionen von FCF-behandelten, nicht migrierten sowie migrierten Lymphozyten gesunder Pferde. Die differentielle Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) zeigt repräsentativ nicht migrierte, FCF-behandelte Lymphozyten (A) sowie migrierte, FCF-behandelte Lymphozyten (E) eines gesunden Pferdes. Septin 7 ist grün dargestellt; F-Aktin ist rot dargestellt. Nicht migrierte, FCF-behandelte Zellen zeigen dicht gepackte Septin 7- und F-Aktin-Strukturen im Bereich der Plasmamembran und des Zellkerns (B, C; Overlay D). Migrierte, FCF-behandelte Lymphozyten zeigen feinere Septin7- und F-Aktin-Strukturen. Die Strukturen sind weniger an der Plasmamembran lokalisiert und diffuser verteilt (F, G; Overlay H). Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blau) angefärbt.

4.1.8 Verminderte Expression von Septin 7 in gewanderten PBL von an ERU erkrankten Pferden

Um die Bedeutung der geringeren Expressionsstärke von Septin 7 auf die gesteigerte Migrationsfähigkeit von PBL aus ERU erkrankter Pferde zu untersuchen, wurde die Expressionsstärke von Septin 7 in PBL, die zuvor in 3D-Migrationsexperimenten eingesetzt wurden, analysiert. Es wurden PBL-Proben von 8 gesunden Pferden sowie 8 PBL-Proben von an ERU erkrankten Pferden im Western Blot untersucht. Hierbei konnte eine signifikant reduzierte Expressionsstärke von Septin 7 in den PBL von an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden. PBL von ERU-Pferden exprimierten demnach 30 % weniger Septin 7 als PBL gesunder Pferde (vgl. Abb. 4.9).

Basierend auf diesen Ergebnissen könnte geschlossen werden, dass sich eine geringere Septin 7 Expression, wie in PBL von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen wurde, positiv auf die Migrationsfähigkeiten der Zellen innerhalb einer kollagendichten Matrix auswirken könnte.

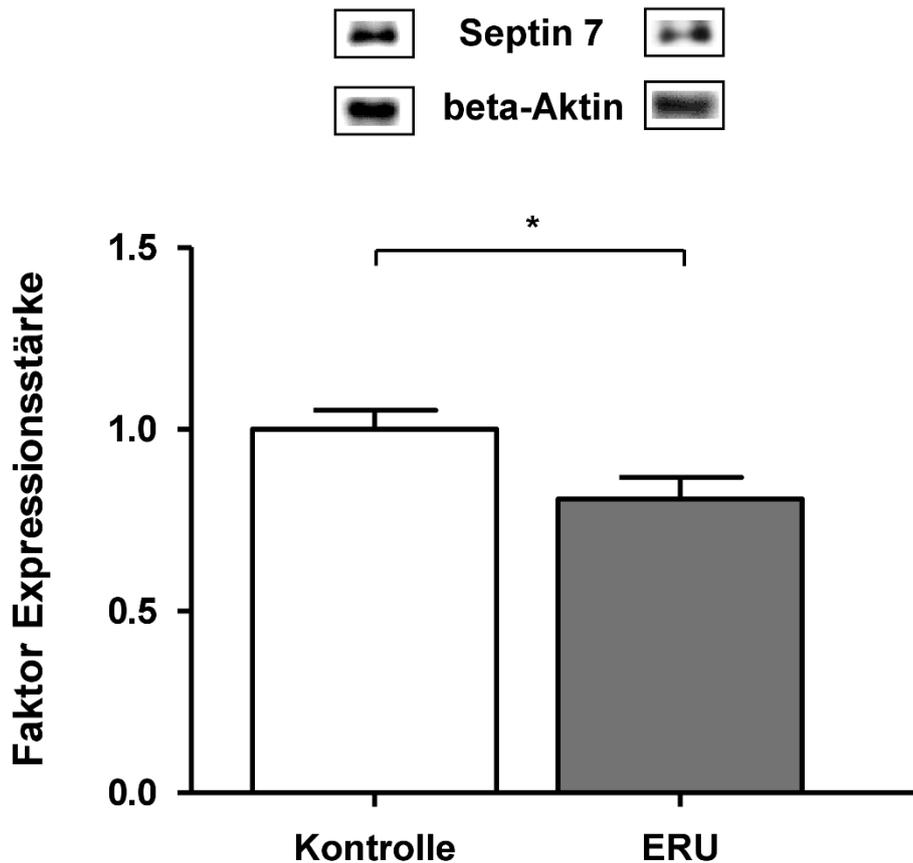


Abb. 4.9: Expression von Septin 7 in PBL von augengesunden und von an ERU erkrankten Pferden im Western Blot. Die Expression von Septin 7 wurde im Western Blot untersucht und nach Normalisierung auf beta-Aktin quantifiziert. Die Expressionsstärke von Septin 7 in PBL gesunder (n=8) und PBL von an ERU erkrankter Pferde (n=8) unterscheidet sich signifikant (* $p \leq 0,05$). Die Expressionsstärke von Septin 7 war in PBL von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu Kontrollpferden um mehr als ein Viertel reduziert.

4.2 Identifikation metabolischer Eigenschaften von PBL gesunder Pferde und an ERU erkrankter Pferde

Zwischen der Aktivierung von T-Zellen und der Anpassung ihres Energiestoffwechsels besteht ein direkter Zusammenhang (Galgani, De Rosa and Matarese 2015). So haben ruhende T-Zellen einen geringen Energiebedarf und sind in der Lage, diesen über oxidative Stoffwechselwege mittels verschiedener Substrate wie Glukose, Fett- oder Aminosäuren zu decken (Gaber et al. 2019).

Hingegen haben aktivierte T-Zellen, die proliferieren, an Größe zunehmen oder sich von naiven T-Zellen zu Effektor-T-Zellen differenzieren, einen hohen Energie- und Substratbedarf (Maclver, Michalek and Rathmell 2013). Dabei spielt vor allem der glykolytische Stoffwechselweg der Zelle eine große Rolle, der die notwendige Energie für die Neubildung von Proteinen, Fett- und Aminosäuren bereitstellt (Bantug et al. 2017). Der Nachweis möglicher metabolischer Unterschiede von PBL von an ERU erkrankten Pferden war daher von großem Interesse. Die Messung der metabolischen Aktivität der Pferde-PBL beruhte auf der Analyse von zwei Hauptenergiegewinnungswegen eukaryotischer Zellen. Zum einen wurde die mitochondriale Respiration und die damit verbundene, sauerstoffabhängige ATP-Synthese gemessen und zum anderen die durch die Glykolyse produzierten Protonen. Dabei konnte die Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate (OCR)) der PBL in Abhängigkeit der injizierten Reagenzien wie Oligomycin, FCCP sowie Rotenon und Antimycin A, die bestimmte Komplexe innerhalb der Atmungskette hemmen, gemessen werden. Durch die Messung der extrazellulären Ansäuerung des XF-Mediums (Extracellular Acidification Rate (ECAR)) konnte die Wirkung der jeweiligen Reagenzien anhand der Protonenproduktion der Zellen analysiert werden (van der Windt, Chang and Pearce 2016).

4.2.1 Messung der Stoffwechseleigenschaften von PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde anhand des OCR

Mithilfe des Mito-Stress-Kits wurde die mitochondriale Respiration der PBL von augengesunden Pferden (n=15) und von an ERU erkrankten Pferden (n=7) untersucht. Bei der Bestimmung des OCR wurde der Sauerstoffverbrauch der Zellen aus dem umliegenden Medium gemessen. Die ersten drei Messungen bestimmen den Basalwert des Sauerstoffverbrauchs der Zellen, auch Basalrespiration genannt. Die Basalrespiration lag bei Zellen von an ERU erkrankten Pferden durchschnittlich höher als bei den Kontrollen (* $p \leq 0,05$). Oligomycin war das erste Reagenz, das nach Messung der Basalrespiration zu den PBL injiziert wurde. Die damit verbundene Hemmung der ATP-Synthase führte zu einem Rückgang des OCR und ließ somit auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen während der ATP-Produktion schließen. Nach Injektion von Oligomycin war die Sauerstoffverbrauchsrate der PBL von an ERU erkrankten Pferden signifikant höher als die der Kontrollpferde (* $p \leq 0,05$). Nach Injektion von FCCP zeigten die PBL von an ERU erkrankten Pferden einen signifikant reduzierten Sauerstoffverbrauch. Im Gegensatz dazu konnte ein signifikanter Anstieg des Sauerstoffverbrauchs der PBL von Kontrollpferden festgestellt werden (* $p \leq 0,05$). Die maximale Respirationkapazität und die respiratorische Reservekapazität der PBL von Kontrollpferden waren höher als die der PBL von ERU-Pferden. Durch die letzte Injektion, von Rotenon und Antimycin A, wurden die Komplexe I und III der Elektronentransportkette gehemmt. Die dadurch erhaltenen Werte des Sauerstoffverbrauchs durch nicht-mitochondriale Respiration ergaben keinen Unterschied zwischen PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde (n.s., $p > 0,05$), (vgl. Abb. 4.10).

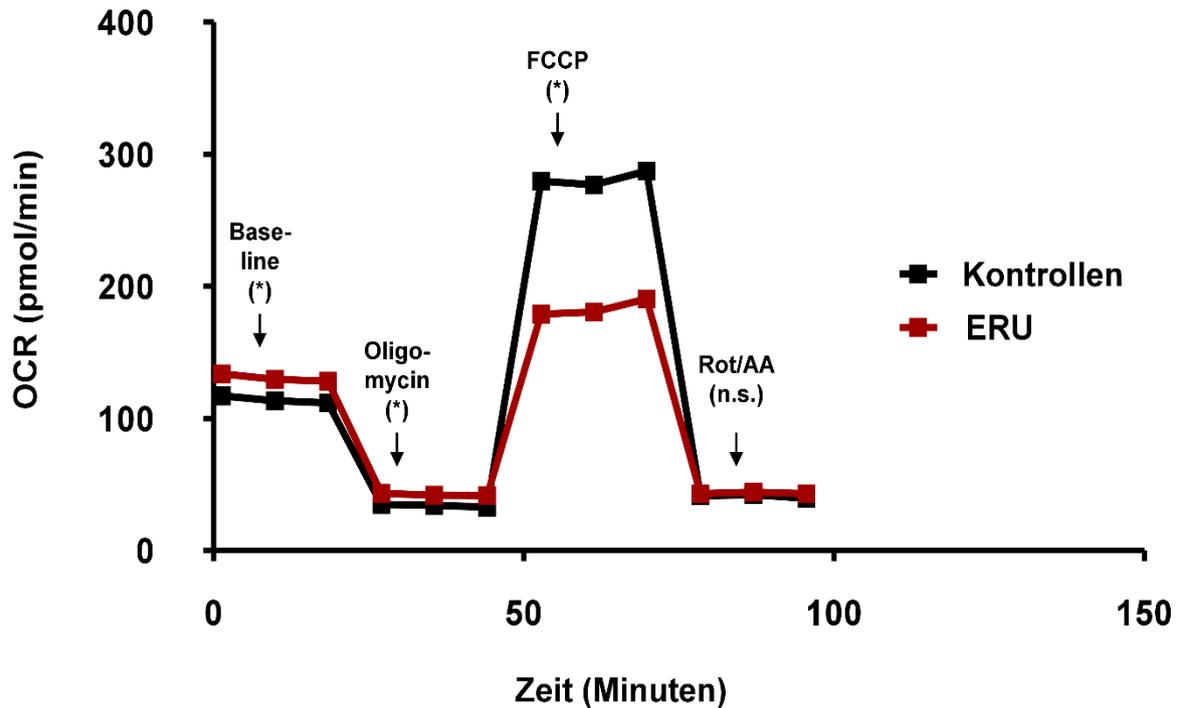


Abb. 4.10: Messung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Die Darstellung stellt vergleichend die Sauerstoffverbrauchsrate von PBL von Kontrollpferden (n=15) (schwarz) und von ERU-Pferden (n=7) (rot) dar. Die ersten drei Messpunkte zeigen die Basalrespiration. Nachfolgend sind die Injektionen von Oligomycin, FCCP und Rot/AA zu sehen. PBL von ERU-Pferden zeigten eine gesteigerte Basalrespiration (* $p \leq 0,05$). Nach Injektion von Oligomycin war der Sauerstoffverbrauch der PBL von an ERU erkrankten Pferden signifikant höher (* $p \leq 0,05$). Die Messung der maximalen Respirationskapazität nach FCCP-Injektion zeigt einen deutlich reduzierten Sauerstoffverbrauch der PBL von an ERU erkrankten Pferden (* $p \leq 0,05$). Nach vollständiger Hemmung der mitochondrialen Respiration durch Rot/AA waren keine signifikanten Unterschiede des Sauerstoffverbrauchs zwischen den PBL von ERU-Pferden und Kontrollpferden zu erkennen (n.s., $p > 0,05$).

4.2.2 Messung der Stoffwechseleigenschaften von PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde anhand des ECAR

Die Basalwerte der Protonenproduktion und der damit verbundenen Ansäuerung des Mediums, gemessen in mpH/min, der PBL von Kontrollpferden und von ERU-Pferden, waren nahezu identisch. Der Anstieg der Protonenproduktion nach Injektion von Oligomycin war bei PBL von an ERU erkrankten Pferden signifikant höher (* $p \leq 0,05$). Die signifikant höhere Protonenproduktion der PBL von an ERU erkrankten Pferden zeigte, dass diese Zellen nach Hemmung der sauerstoffabhängigen ATP-Produktion vermehrt Energie über glykolytische Stoffwechselwege generieren konnten. Durch die im Zytoplasma stattfindende Laktatbildung kommt es zur Produktion von Protonen, wodurch die Aufrechterhaltung der Glykolyse gewährleistet wird. Die FCCP-Injektion löst eine Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette aus. Der Vergleich der ECAR-Werte ergab keinen signifikanten Unterschied bei der maximalen Respirationskapazität der PBL von ERU-Pferden und Kontrollen. Auch nach Zugabe von Rotenon und Antimycin A und der daraus resultierenden gesamten Hemmung der Atmungskette konnten keine Unterschiede bei der extrazellulären Ansäuerung des Mediums zwischen PBL von ERU-Pferden und Kontrollpferden festgestellt werden (vgl. Abb. 4.11).

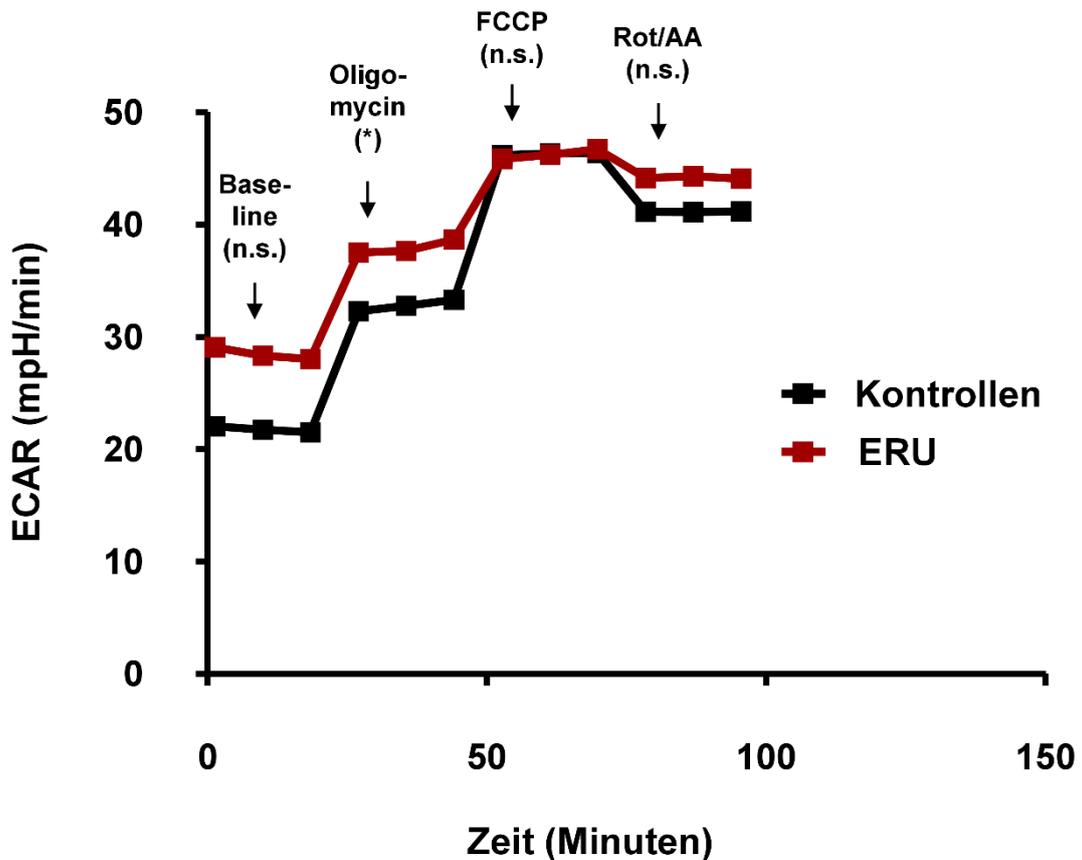


Abb. 4.11: Messung der Protonenproduktion und der damit verbundenen Ansäuerung des Mediums von PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Die Darstellung stellt die extrazelluläre Ansäuerungsrate, gemessen in mpH/min, von PBL gesunder Pferde (n=15) (schwarz) und von an ERU erkrankter Pferde (n=7) (rot) dar. Zwischen der basalen Protonenproduktion der PBL von an ERU erkrankten Pferden und von Kontrollpferden gab es keinen signifikanten Unterschied. Nach Injektion von Oligomycin erhöhte sich die H⁺-Produktion der PBL von ERU-Pferden signifikant (* p ≤ 0,05). Nach FCCP-Injektion waren die ECAR-Werte der PBL von ERU-Pferden und Kontrollpferden nahezu identisch. Nach vollständiger Hemmung der Atmungskette durch Rot/AA war kein signifikanter Unterschied zwischen der Protonenproduktion der PBL von gesunden Pferden und ERU-Pferden zu erkennen.

4.3 Untersuchungen der Proteine ZAP70 und Cdc42 in PBL von gesunden und von an ERU erkrankten Pferden

Mitarbeiter der Arbeitsgruppe befassten sich in früheren Studien mit der proteomischen Untersuchung equiner peripherer Lymphozyten und der Identifizierung sowie Charakterisierung von Protein-Interaktionsmolekülen des Proteins Septin 7 (Schauer et al. 2018). Bei der Identifikation von Septin 7-Interaktionspartnern in PBL augengesunder und an ERU erkrankter Pferde, mittels Immunpräzipitation (IP) und anschließender Massenspektrometrie (LC-MS/MS), konnten bislang unbekannte Interaktionsproteine von Septin 7 detektiert werden (Schauer et al. 2018). Darunter wurde unter anderem das Protein Deducator of cytokinesis 8 (DOCK8) zur näheren Charakterisierung und Untersuchung ausgewählt. Die Untersuchung der Expressionsstärke von DOCK8 ergab eine signifikante Reduktion des Proteins in PBL von an ERU erkrankten Pferden (Schauer et al. 2018). Daraufhin erfolgte die Identifikation von Interaktionspartnern des Proteins DOCK8 mittels IP und LC-MS/MS von PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Aus dem Datensatz der DOCK8-Interaktionsmoleküle wurden gezielt Proteine ausgewählt, die eine mögliche Rolle bei der Signaltransduktion nach T-Zell-Aktivierung sowie bei der Migration von peripheren Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden spielen könnten. Zu den DOCK8-Interaktionsproteinen zählten ZAP70 und Cdc42, die zur näheren Charakterisierung und Untersuchung ausgewählt wurden.

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Nummer ^C	DOCK8 IP ratio ERU/Ktr ^D	ERU ratio DOCK-IP/ITK ^E
1	Tyrosine- protein kinase ZAP70	ENSECAP00000009205	5,0	8,9
2	Cell division control protein 42	ENSECAP00000003324	4,7	4,4

Tab. 4.1: Mit DOCK8 interagierende Proteine in PBL von an ERU erkrankten Pferden. Eine Auswahl zweier Interaktionspartner von DOCK8, aus insgesamt 305 identifizierten Interaktionspartnern mit einer Ratio > 4, in PBL von an ERU erkrankten Pferden. A: Fortlaufende Nummer; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus Ensembl-Datenbank

(<http://www.ensembl.org/index.html>); D: Verhältnis der Abundanzen zu DOCK8 im Immunpräzipitat von an ERU erkrankten Pferden durch die Abundanzen zu DOCK8 im Immunpräzipitat von Kontrolltieren (Ratio); E: Verhältnis der Abundanzen im Immunpräzipitat des anti-DOCK8-Antikörpers zu denen im Präzipitat der Isotypkontrolle rabbit IgG (Ratio).

Da die DOCK8-Interaktionspartner ZAP70 und Cdc42 bei der Pathogenese der ERU für die Aktivierung sowie Migration von PBL von an ERU erkrankten Pferden eine wichtige Rolle spielen könnten, wurden diese Proteine in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde näher charakterisiert.

4.3.1 Vergleichbare Expression von ZAP70 in PBL von gesunden und von an ERU erkrankten Pferden

ZAP70 ist ein beim Mensch und der Maus identifiziertes, zytoplasmatisch gelegenes Protein, das hauptsächlich in T-Zellen exprimiert wird (Wang et al. 2010). Das als Tyrosinkinase wirkende Protein bindet direkt an die CD3-Zeta-Domäne des T-Zell-Rezeptors (TZR) und sorgt nach Phosphorylierung, also Aktivierung, für die Weiterleitung aktivierender Signale (Lo et al. 2018). ZAP70 spielt auch bei der Migration von T-Zellen eine wichtige Rolle, wie in Experimenten mit T-Zelllinien des Menschen gezeigt werden konnte (Wu et al. 2017).

Um zu untersuchen, ob ZAP70 möglicherweise auch in Pferde-Lymphozyten eine Bedeutung bei der Signalweiterleitung hat und das Migrationsverhalten der Zellen beeinflusst, wurde die Expression von ZAP70 in PBL von 19 Kontrollpferden und von 29 an ERU erkrankten Pferden mittels Western Blot analysiert. Die Expression des Proteins in den PBL von Kontrolltieren und von an ERU erkrankten Pferden war nahezu identisch und zeigte keinen signifikanten Unterschied (vgl. Abb. 4.12).

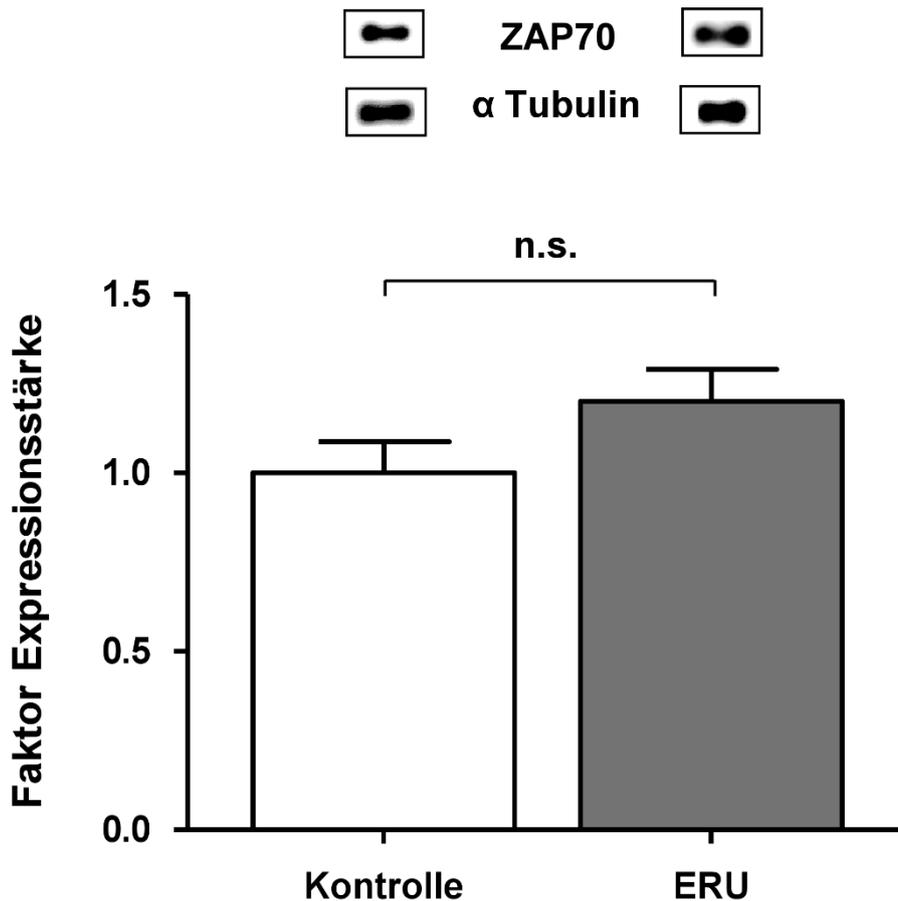


Abb. 4.12: Expression von ZAP70 in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde im Western Blot. Die Expression von ZAP70 wurde im Western Blot untersucht und nach Normalisierung auf alpha-Tubulin quantifiziert. Die Expressionsstärke von ZAP70 in PBL von Kontrollpferden (n=19) und von an ERU erkrankten Pferden (n=29) war nahezu gleich. Dargestellt sind die auf den Faktor 1 normierten Daten der Kontrollgruppe (weiße Säule) und die darauf bezogenen Werte der an ERU erkrankten Pferde (graue Säule).

4.3.1.1 Unterschiedliches Verteilungsmuster von ZAP70 in equinen Lymphozyten

Mittels Immunzytochemie erfolgte die Untersuchung der Verteilung von ZAP70 in PBL von gesunden und von an ERU erkrankten Pferden. Repräsentativ sind in der immunzytochemischen Darstellung Lymphozyten eines augengesunden und eines an ERU erkrankten Pferdes dargestellt (vgl. Abb. 4.13). Darin kann in direktem Vergleich

sowohl die Expressionsstärke, als auch das Verteilungsmuster von ZAP70 betrachtet werden. Da durch die Quantifizierung des Proteins mittels Western Blot eine nahezu identische Expression in PBL von Kontrollpferden und von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen wurde, war die qualitative Analyse der Zellen von großem Interesse. Die Intensität der Expression von ZAP70 im Lymphozyten des augengesunden Pferdes war im Vergleich zur Expression im Lymphozyten des ERU-Pferdes augenscheinlich gleich. Das Verteilungsmuster von ZAP70 zeigte jedoch deutliche Unterschiede. ZAP70 war im Lymphozyten des gesunden Pferdes hauptsächlich randständig, im Bereich der Plasmamembran verteilt. Das Verteilungsmuster von ZAP70 im Lymphozyten des ERU-Pferdes war hingegen diffuser. ZAP70 war im Lymphozyten des an ERU erkrankten Pferdes randständig und auch im Bereich des Zellkerns lokalisiert (vgl. Abbildung 4.13).

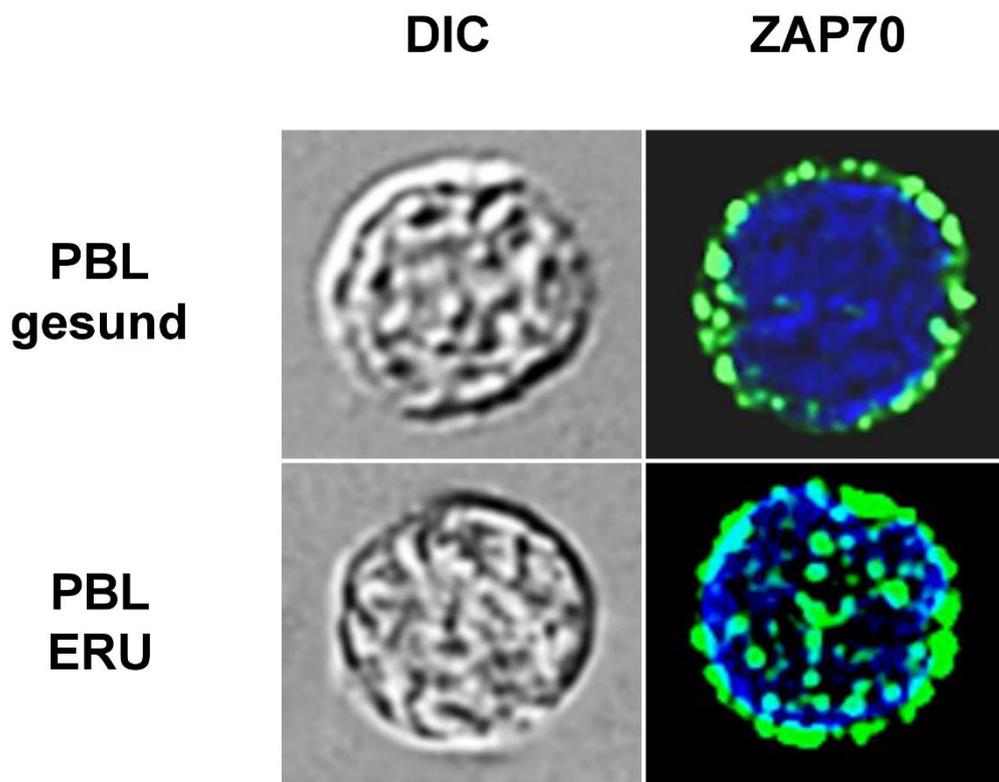


Abb. 4.13: Repräsentative Darstellung der ZAP70 Expression und Verteilung in den Lymphozyten eines gesunden und eines an ERU erkrankten Pferdes. Dargestellt ist die differenzielle Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) des Lymphozyten eines gesunden Pferdes (obere Reihe) und eines an ERU erkrankten Pferdes (untere Reihe).

Die Expression von ZAP70 (grün) im Lymphozyten des gesunden Pferdes ist vergleichbar mit der Proteinexpression der ERU-Zelle. ZAP70 ist im Lymphozyten des Kontrollpferdes hauptsächlich randständig verteilt. Im Vergleich dazu erkennt man ein deutlich unterschiedliches Verteilungsmuster von ZAP70 im Lymphozyten des an ERU erkrankten Pferdes, in dem ZAP70 diffuser verteilt ist und vermehrt in kernnahen Bereichen zu finden ist. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blau) angefärbt.

4.3.2 Die Expression von Cdc42 ist in PBL von an ERU erkrankten Pferden deutlich erhöht

Aus Studien mit humanen peripheren Leukozyten ist bekannt, dass Cdc42 zu der Familie der kleinen Rho GTPasen gehört und von DOCK8 als Guanosin-Nukleotid-Exchange Faktor (GEF) direkt aktiviert wird (Shiraishi et al. 2017). Die Aktivierung dieser GTPase führt zu einem Umbau des Aktin-Zytoskeletts in der Zelle; wodurch Cdc42 entscheidend an der Umstrukturierung des Zytoskeletts an der Zellfront beteiligt ist, welche für die Zellmigration große Bedeutung hat (Harada et al. 2012; Nishikimi et al. 2013). Die Rolle und Bedeutung von Cdc42 in equinen Lymphozyten ist nicht bekannt. Da dieses Protein jedoch eine wichtige Rolle bei der Migration von equinen PBL spielt und zur Aufklärung der veränderten Migration von PBL ERU-Pferden dienen könnte, wurde die Expression von Cdc42 in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde untersucht. Die Expression des Proteins in PBL von Kontrollpferden (n= 5) und von ERU-Pferden (n=5) wurden im Western Blot analysiert. Die Expression von Cdc42 war in den PBL von an ERU erkrankten Pferden um das 1,9-fache höher als in den PBL von Kontrollpferden (vgl. Abb. 4.14). Der Unterschied war signifikant (* $p \leq 0,05$).

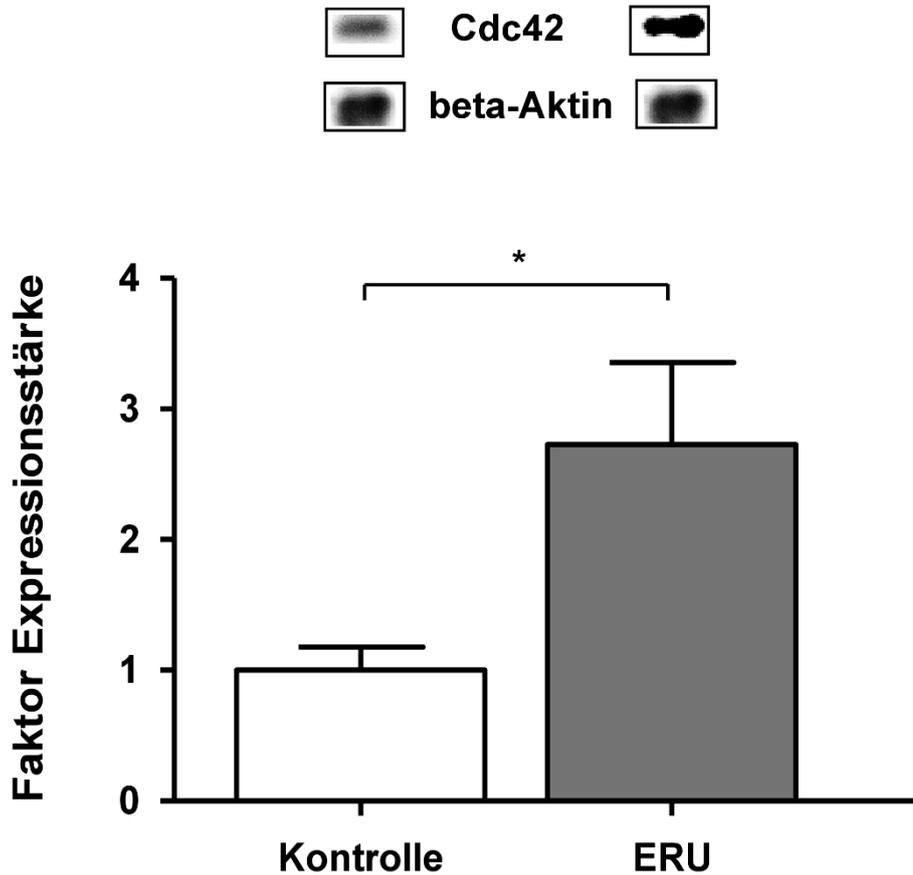


Abb. 4.14: Untersuchung der Expression von Cdc42 in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde im Western Blot. Die Expression von Cdc42 wurde im Western Blot untersucht und nach Normalisierung auf beta-Aktin quantifiziert. Die Expressionsstärke von Cdc42 war in PBL von an ERU erkrankten Pferden (n=5) um das 1,9-fache höher als in PBL von gesunden Kontrollpferden (n=5). Dargestellt sind die auf den Faktor 1 normierten Daten der Kontrollgruppe (weiße Säule) und die darauf bezogenen Werte der an ERU erkrankten Pferde (graue Säule). Der Unterschied war signifikant (* $p \leq 0,05$).

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden periphere Blutlymphozyten (PBL) von augengesunden und an equiner rezidivierender Uveitis (ERU) erkrankten Pferden näher untersucht. Die equinen PBL wurden vor allem auf ihre Migrationsfähigkeit und auf die Expression von an der Zellmigration beteiligten Proteinen untersucht, sowie anhand ihres Energie- und Stoffwechsels näher charakterisiert. Bei der ERU handelt es sich um eine weltweit vorkommende, hochprävalente immunmedierte Erkrankung der Augen, bei der autoreaktive T-Zellen über die Blut-Retina-Schranke migrieren und das Auge infiltrieren (Degroote et al. 2017; Paschalis-Trela et al. 2017). Die Augenerkrankung zeichnet sich durch spontane, wiederkehrende Entzündungsschübe aus, deren progressiver Verlauf zu irreversiblen Schäden von intraokularem Gewebe führt und die häufigste Ursache für die Erblindung bei Pferden darstellt (Gerding and Gilger 2016; Gilger and Deeg 2011). Die ERU dient als geeignetes Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen (HAU), da sich beide Erkrankungen aufgrund der immunmedierten Ätiologie, dem spontanen und rezidivierenden Charakter und der klinischen Symptome sehr ähneln (Deeg et al. 2008). Ein Hauptmerkmal der Pathogenese, sowohl bei der ERU als auch bei der HAU, ist die Migration von autoreaktiven T-Lymphozyten aus der Peripherie über die Blut-Retina-Schranke (BRB) mit Infiltration des Auges (Degroote et al. 2017). Die regulatorischen bzw. auslösenden Mechanismen, die die autoreaktiven Lymphozyten dazu befähigen, die physiologische und sonst unüberwindbare Barriere der BRB zu überqueren, sind nicht bekannt (Crane and Liversidge 2008; Degroote et al. 2014). Das Auge ist unter physiologischen Bedingungen vor Reaktionen des Immunsystems geschützt und erhält durch die Kombination aus anatomischen, physiologischen und immuno-regulatorischen Mechanismen den Status eines immunprivilegierten Organs (Streilein et al. 2002; Taylor 2016). Dennoch kann es, wie im Falle der ERU, zu einer Inflammation der intraokularen Strukturen kommen, bei der es zu Veränderungen der endothelialen Zellstrukturen der BRB und zu Veränderungen in den migrierenden PBL selbst kommt (Crane et al. 2006; Schauer et al. 2018). Über das unterschiedliche Migrationsverhalten von PBL von an ERU erkrankten Pferden war bislang noch nichts bekannt und sollte daher näher charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit

wurden die Migrationseigenschaften und -fähigkeiten von equinen PBL aus augengesunden Pferden mit PBL aus an ERU erkrankten Pferden verglichen. Die Migration der Lymphozyten wurde in Echtzeit, innerhalb einer dreidimensionalen Kollagenmatrix, anhand von mehreren Parametern bestimmt und gegenübergestellt (vgl. Kap. 4.1). Dabei wurden die Parameter des Masseschwerpunktes, der Distanz, der Zielgerichtetheit sowie der Geschwindigkeit der migrierten Zellen analysiert und die jeweiligen Ergebnisse von Kontroll- und ERU-Pferden miteinander verglichen. Um die Zellmigration durch den Effekt chemotaktischer Stoffe zu beeinflussen und mögliche Unterschiede zwischen PBL von augengesunden Pferden und ERU-Pferden aufzudecken, wurden bestimmte Chemoattractants eingesetzt.

Der Vergleich der Zellgeschwindigkeit während der Migration durch die dreidimensionale kollagendichte Matrix ließ deutlich erkennen, dass die PBL von ERU-Pferden unter Verwendung von FCS, IFN γ sowie dem retinalen Autoantigen CRALBP signifikant schneller migrierten als PBL von Kontrollpferden (vgl. Kap. 4.1.1, 4.1.3, 4.1.4). Der Nachweis einer schnelleren Migration von PBL von an ERU erkrankten Pferden ist neu und zeigt erstmals, dass PBL von ERU-Pferden veränderte Migrationsfähigkeiten besitzen. Die molekularen und regulatorischen Mechanismen, die in PBL von an ERU erkrankten Pferden für die gesteigerte Wanderungsgeschwindigkeit verantwortlich sind, sind nicht bekannt. Weder im Rahmen der autoimmunen Uveitis der Pferde noch bei der Uveitis des Menschen wurde die Rolle bestimmter Migrationsparameter der Zellen untersucht und mit der Pathogenese der Erkrankung assoziiert (Stand der Literaturrecherche: September 2019). Vergleiche zur Wanderungsgeschwindigkeit beruhen daher aus Studien mit primären Leukozyten und T-Zelllinien aus Maus oder Mensch (Katakai and Kinashi 2016; Reichardt, Gunzer and Gunzer 2007; Renkawitz et al. 2009). Die Migrationsgeschwindigkeit equiner PBL entsprach den Angaben aus Studien mit murinen Leukozyten, die sich innerhalb einer dreidimensionalen Matrix zwischen 4 und 8 μm pro Minute fortbewegten (Lämmermann et al. 2008). Lymphozyten gelten als schnell-migrierende Zellen, die in dreidimensionaler Umgebung eine adhäsionsfreie, amöboide Art mit hoher Plastizität während der Migration zeigen (Lämmermann and Germain 2014; Renkawitz et al. 2019). Um ihren Effektorfunktionen nachzukommen, ist eine schnelle und effiziente Migration der T-Zellen ausschlaggebend. Daher ist die Zellaktivierung die Komponente, die darüber entscheidet, wie die Zellmigration abläuft

(Gaylo, Overstreet and Fowell 2016). Deshalb kann eine erhöhte Zellgeschwindigkeit von der Antwort auf inflammatorische Signale und dem Aktivierungsstatus der Zellen abhängen, wie bei murinen T-Zellen bei der Migration durch lymphatisches Gewebe gezeigt werden konnte (Katakai, Habiro and Kinashi 2013). Echtzeit-Aufnahmen von T-Zellen des Menschen in unterschiedlichen Tumorgeweben haben zudem gezeigt, dass schnell migrierende T-Zellen auch zielgerichteter migrierten (Bougherara et al. 2015). Dieser Nachweis konnte auch bei PBL von an ERU erkrankten Pferden erstmals erbracht werden, da die PBL ebenfalls eine erhöhte Zielgerichtetheit zeigten und längere Distanzen während der Migration durch kollagendichtes Gewebe zurücklegten (vgl. Kap. 4.1.1, 4.1.3, 4.1.4). Dass der Aktivierungsstatus der Zellen entscheidend für eine effiziente Migration zu sein scheint bestätigte auch eine Studie im Mausmodell des Typ1 Diabetes mellitus des Menschen, da das Fehlen von CD11c+ APZ die Wanderung autoreaktiver T-Zellen zu β -Zellen des Pankreas in NOD-Mäusen einschränkte (Sandor et al. 2019). Bei der ERU wird angenommen, dass T-Zellen mit den APZ, die retinale Antigene präsentieren, in der Milz interagieren und dort aktiviert werden (Deeg, Pompetzki, et al. 2006). Um die Aktivierung equiner T-Zellen gezielt beeinflussen zu können, müsste zuvor in Erfahrung gebracht werden, welche APZ für die Präsentation retinaler Autoantigene verantwortlich sind und wo diese Antigenpräsentation genau stattfindet. Mit diesem Wissen könnte eine Aktivierung und die nachfolgende Migration autoreaktiver Zellen zum Auge beeinflusst oder sogar verhindert werden. Auch in Bezug auf die abweichenden Migrationsfähigkeiten der PBL von ERU-Pferden, die bei den durchgeführten Migrationsassays festgestellt wurden, könnte eine gesteigerte Aktivierung zugrunde liegen. Das eingesetzte Chemoattractant IFN γ , Merkmal-Zytokin der Th1-Immunantwort, konnte im Gegensatz zu IL-4, dem Merkmal-Zytokin der Th2-Immunantwort, eine signifikant schnellere Wanderungsgeschwindigkeit der PBL der ERU-Pferde hervorrufen (vgl. Kap. 4.1.2, 4.1.3).

Das Vorliegen einer Th1-mediierten Immunantwort bei der ERU konnte durch den Nachweis von CD4 $^+$ T-Zellen in Zellinfiltraten der Augenpräparate von an ERU erkrankten Pferden bestätigt werden (Deeg et al. 2001; Gilger et al. 1999). Die im Zellinfiltrat vorkommenden CD4 $^+$ T-Zellen sekretierten die Zytokine IFN γ und IL-2, die für eine proinflammatorische Th1-Immunantwort charakteristisch sind (Gilger et al. 1999). Zudem konnte im Ratten-Tiermodell der autoimmunen Uveitis des Menschen

gezeigt werden, dass das Zytokin IFN γ hauptsächlich für die wiederkehrenden Entzündungsschübe im Auge verantwortlich war (Kaufmann, Diedrichs-Möhning and Wildner 2012). Durch die zugrundeliegende Th1-Immunantwort bei der ERU kann in der Zellpopulation der migrierten PBL von an ERU erkrankten Pferden ein höherer Anteil proinflammatorischer Zellen vorgelegen haben, wodurch die erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit und Zielgerichtetheit mit der gesteigerten Aktivierung der Lymphozyten erklärt werden könnte. Um zu prüfen, ob eine gesteigerte Aktivierung für die veränderten Migrationseigenschaften der PBL von an ERU erkrankten Pferden ausschlaggebend war, müssten die noch unbekanntes beteiligten Mechanismen der Aktivierungskaskade equiner PBL untersucht werden. Der Nachweis entscheidender Aktivierungsproteine in PBL von an ERU erkrankten Pferden würde zu einem besseren Verständnis der veränderten Mechanismen während der Migration verhelfen und die Möglichkeit ergeben, diese Mechanismen beeinflussen zu können. Aus Studien zu T-Zellen des Menschen ist bekannt, dass eine Aktivierung von T-Zellen über den TZR oder durch Ligandenbindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) eine Signalkaskade auslöst, die mittels regulatorischer Moleküle eine Umstrukturierung des Zytoskeletts zur Folge hat (Petrie, Doyle and Yamada 2009). Bei der kontrollierten Organisation des Zytoskeletts, die die nachfolgende Zellmigration ermöglicht, spielen die Proteine der Familie der kleinen Guanosintriphosphat bindenden Proteine (GTPasen), zu denen unter anderem Rac und Cdc42 zählen, eine entscheidende Rolle, indem sie die direkte Ausbildung der Protrusionen am vorderen Zellpol regulieren (Ridley 2001; Ridley 2015). Aus vorangegangenen proteomischen Untersuchungen equiner PBL ist bekannt, dass Cdc42 in PBL von ERU-Pferden als Interaktionspartner von Septin 7 und DOCK8 identifiziert werden konnte (Schauer et al. 2018). Eine nähere Charakterisierung des Proteins fand nicht statt, sodass bislang nicht sicher war, ob die kleine GTPase Cdc42 in Zusammenhang mit der Zellmigration equiner PBL gebracht werden kann. Die aktuelle Literaturrecherche ergab, dass es auch keine Untersuchungen zu Cdc42 in murinen T-Zellen im EAU-Mausmodell oder in T-Zellen des Menschen in Bezug auf die Migrationseigenschaften aktivierter Zellen im Rahmen der autoimmunen Uveitis gibt (Stand der Literaturrecherche: September 2019). Im Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), das für die Forschung der autoimmunen Erkrankung der Multiplen Sklerose (MS) des Menschen eingesetzt wird, wurde hervorgehoben, dass eine gesteigerte

Migrationsgeschwindigkeit muriner CD4⁺ T-Zellen durch das Gewebe des zentralen Nervensystems an die regulatorische kleine GTPase Rho gekoppelt ist (Manresa-Arraut et al. 2018). Die Pathogenese der Multiplen Sklerose zeigt gewisse Ähnlichkeiten mit der Pathogenese der ERU. Sie kennzeichnet sich dadurch, dass autoreaktive CD4⁺ T-Zellen das Gewebe des zentralen Nervensystems infiltrieren, indem sie die physiologische Barriere der Blut-Hirn-Schranke aus noch ungeklärten Gründen überqueren und die Myelinschicht der Nervenfasern zerstören (Dargahi et al. 2017). Aufgrund der nachgewiesenen höheren Anreicherung von Cdc42 an DOCK8 in PBL von an ERU erkrankten Pferden (Schauer et al. 2018) wurde untersucht, ob diese Interaktion in PBL von ERU-Pferden mit einer gesteigerten Expression einhergeht. Die Expression von Cdc42 in PBL augengesunder und an ERU erkrankter Pferde wurde mittels Western Blot untersucht. Die Untersuchung ergab, dass das Protein in PBL von an ERU erkrankten Pferden signifikant höher exprimiert wurde (vgl. Kap. 4.3.2). Eine erhöhte Expression des Proteins Cdc42 wurde in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden zuvor nicht nachgewiesen. Welche Funktion eine erhöhte Proteinexpression von Cdc42 in equinen Lymphozyten hat, ist nicht bekannt. Anhand der festgestellten Migrationseigenschaften der PBL von an ERU erkrankten Pferden könnte ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression und der schnelleren Migration der Zellen hergestellt werden, da aus Studien mit Tumorzellen bekannt ist, dass Cdc42 die Aktin-Polymerisation und -Extension von Aktin-Strukturen einleitet und eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellpolarität spielt, wodurch eine direkte und anhaltende Migration der Zelle gewährleistet wird (Ridley 2015). Die Abwesenheit von Cdc42 führte auch in T-Zellen des Menschen zu einer eingeschränkten Chemokin abhängigen, transendothelialen Migration (TEM), da die Ausbildung von Aktin haltigen Filopodien, die die Zellen bei der Transmigration durch das Endothel leiten, beeinträchtigt wurde (Manes and Pober 2013).

Anhand dieser Studienergebnisse wurde ersichtlich, dass die Expression und Aktivierung von Cdc42 eine entscheidende Rolle spielt und sich auf das Migrationsverhalten der Zellen auswirken kann. Um zu überprüfen, inwiefern die Wanderungseigenschaften der equinen PBL von der Expression des Proteins abhängig sind, könnte getestet werden, ob die Hemmung des Proteins in PBL von an ERU erkrankten Pferden zu einer reduzierten Migrationsgeschwindigkeit und

Zielgerichtetheit führt. Wie bei metastasierenden Brustkrebszellen gezeigt, führte die Hemmung der kleinen GTPase Cdc42 durch den Inhibitor MQB-167, der die Aktivierung des Downstream-Proteins der p21-aktivierten Kinasen hemmte, zu einem Rückgang der Migration und Vitalität metastasierender Tumorzellen (Humphries-Bickley et al. 2017). Durch die fehlende Spezifität dieser Inhibitoren werden meist weitere Mitglieder der kleinen GTPasen wie Rho und Rac zusätzlich gehemmt (Hong et al. 2013). Da sich die Studienergebnisse fast ausschließlich auf die Hemmung von Cdc42 in Tumorzellen beziehen, ist es fraglich, ob der Einsatz dieser Inhibitoren in equinen PBL Wirkung zeigt. Weitere Aufschlüsse über die Funktion und Wirkung von Cdc42 in equinen PBL könnte die Untersuchung von Proteinen erbringen, die von Cdc42 in der Signalkaskade aktiviert und beeinflusst werden. Eine gesteigerte Aktivierung von Cdc42 in PBL von an ERU erkrankten Pferden könnte somit an eine höhere Expression oder Interaktion beteiligter Moleküle der Aktivierungskaskade gekoppelt sein, die mittels Immunpräzipitation und Western Blot ermittelt werden könnten. Es wäre zudem interessant zu sehen, ob diese neuen, spannenden Erkenntnisse zu den Migrationseigenschaften aktivierter PBL von an ERU erkrankten Pferden und die Beteiligung des Proteins Cdc42 auf das Migrationsverhalten von T-Zellen des Menschen im Rahmen der autoimmunen Uveitis übertragen und nachgewiesen werden können. Durch die Untersuchung der Migrationsparameter Geschwindigkeit, Distanz und Zielgerichtetheit konnte ein verändertes Migrationsverhalten der PBL von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen werden. Bezogen auf die Pathogenese assoziierten Mechanismen bei der ERU können diese Parameter ein Merkmal für die Entstehung auto-inflammatorischer Prozesse darstellen.

Für die Aktivierung der kleinen GTPasen sind GTPase aktivierende Proteine, sogenannte GTP-Austauschfaktoren (Guanosine triphosphate Exchange Factor, (GEF)) notwendig, die mittels ihrer katalytischen Domäne für den Austausch von GDP zu GTP am G-Protein sorgen und zu denen Proteine der DOCK-Familie gehören (Gadea and Blangy 2014). Die DOCK-Familie besteht aus 11 DOCK-Proteinen, der unterschiedliche zelluläre Funktionen wie die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, Zelladhäsion und Migration zugeschrieben werden (Gadea and Blangy 2014; Schauer et al. 2018). Das Protein Deducator of Cytokinesis (DOCK8) fungiert in Leukozyten beim Menschen als Cdc42-spezifischer, aktivierender GEF (Harada et al. 2012;

Janssen et al. 2016). Durch die Identifizierung von DOCK8 als GEF von Cdc42 wurde DOCK8 eine wichtige Rolle als regulatorisches Protein für die Organisation und Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und der Beteiligung an der Zellmigration zugeschrieben (Xu et al. 2017; Zhang et al. 2014). Ob und inwiefern die Aktivierung von Cdc42 in equinen PBL von DOCK8 abhängig ist und die Migrationseigenschaften beeinflusst, könnte untersucht werden indem DOCK8 beispielweise durch Hemmung der Proteintranskription mittels DOCK8-siRNA temporär ausgeschaltet wird, was zu einem sogenannten Protein-Knock-Down führen würde. Da die Funktion der kleinen GTPasen an die Aktivierung der Zelle gekoppelt ist war es interessant zu sehen, dass ZAP70 in PBL von an ERU erkrankten Pferden stärker an DOCK8 angereichert wurde als an DOCK8 in PBL augengesunder Kontrollpferde (Schauer et al. 2018). Diesen Nachweis erbrachten vorangegangene, proteomische Analysen equiner PBL nach Immunpräzipitation und Massenspektrometrie (Schauer et al. 2018). Durch die nähere Charakterisierung von ZAP70 in equinen PBL könnte eine mögliche Beteiligung des Proteins an den veränderten Migrationseigenschaften von PBL von an ERU erkrankten Pferden aufgedeckt werden. ZAP70 ist ein zytoplasmatisch gelegenes Protein, das bei Mensch und Maus hauptsächlich von T-Zellen exprimiert wird (Wang et al. 2010). ZAP70, das zur Syk-Familie der Protein-Tyrosin-Kinasen zählt, bindet direkt an die intrazelluläre CD3-Zeta-Domäne des T-Zell-Rezeptors (TZR) und wird nach TZR-Aktivierung durch die Src-Kinase Lck phosphoryliert, also aktiviert (Lo et al. 2018). Aus Versuchen mit T-Zellen des Menschen hat sich erwiesen, dass ZAP70 neben der entscheidenden Aktivierungsfunktion von T-Zellen Einfluss auf die Zell-Motilität hat (Evans et al. 2011; García-Bernal et al. 2009). Durch die Vielzahl an Studien, die zur Pathogenese der equinen autoimmunen Uveitis durchgeführt wurden ist bekannt, dass es sich um eine Th1-T-Zell-medierte Immunantwort handelt, bei der aktivierte, vorrangig CD4+ T-Zellen die BRB überqueren und das Auge infiltrieren (Degroote et al. 2017; Horai et al. 2013). Welche molekularen Mechanismen für den vorliegenden, aktivierten Zell-Phänotyp verantwortlich sind, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Aus diesem Grund wurde ZAP70, das auch bei der TZR-abhängigen Aktivierung equiner T-Zellen als regulatorisches Protein beteiligt sein könnte, untersucht. Die Expressionsstärke von ZAP70, die mittels Western Blot ermittelt wurde, war in PBL von Kontrollpferden und ERU-Pferden nahezu identisch (vgl. Kap. 4.3.1). Die

Erkenntnis einer nahezu gleichen Expression des Proteins in PBL von Kontrollpferden und ERU-Pferden, ist neu.

Abgesehen von dem Nachweis, dass ZAP70 in equinen PBL exprimiert wird ist nicht bekannt, ob ZAP70 in equinen T-Zellen ähnliche oder gleiche Funktionen einnimmt wie sie in T-Zellen von Maus und Mensch beschrieben wurden (Alsadeq et al. 2017; Lo et al. 2018). Auch wenn in der Zellpopulation der PBL von an ERU erkrankten Pferden eine höhere Anzahl an aktivierten Zellen vorgelegen haben könnte, muss die gesteigerte Aktivierung nicht direkt an eine höhere Proteinexpression gekoppelt sein. Somit lässt sich nicht ausschließen, dass ZAP70 in PBL von an ERU erkrankten Pferden in aktivierter Form, also phosphoryliert, vorlag. Um festzustellen, ob die T-Zell-Aktivierung bei der ERU über ZAP70 geregelt wird, müsste dessen Aktivierung nachgewiesen werden. Als naheliegende Möglichkeit könnte eine TZR-Aktivierung in equinen PBL durch die Detektion des phosphorylierten ZAP70 (pZAP70) ermittelt werden. Das setzt jedoch voraus, dass für diesen Nachweis ein passender Antikörper zur Verfügung steht, der an das Epitop des equinen pZAP70 bindet. Des Weiteren könnte die Src-Kinase Lck untersucht werden, die in T-Zellen von Maus und Mensch für die vollständige Phosphorylierung von ZAP70 sorgt (Chiang and Hodes 2015). Als weitere, vielversprechende Variante könnten die Proteine identifiziert werden, die von aktiviertem ZAP70 in der nachfolgenden, ausgelösten Signalkaskade aktiviert wurden. Mit dem Nachweis einer erhöhten Aktivierung dieser sogenannten Downstream-Proteine könnte rückwirkend auf einen aktivierten Zustand von ZAP70 geschlossen werden. Interessanterweise zählt Cdc42 zu einem von ZAP70 aktivierten Downstream-Protein der Signalkaskade, die für die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts entscheidend ist und in T-Zellen des Menschen nachgewiesen wurde (Manes and Pober 2013). ZAP70 aktiviert das Protein Vav, das wiederum WASP aktiviert, das als GEF für die kleinen GTPasen Rac und Cdc42 fungiert und in CD4+ T-Zellen des Menschen nachgewiesen werden konnte (Manes and Pober 2013). Da im Rahmen dieser Arbeit belegt wurde, dass Cdc42 in PBL von an ERU erkrankten Pferden höher exprimiert wird als in PBL augengesunder Pferde (vgl. Kap. 4.3.2), spricht dieses Ergebnis dafür, dass ZAP70 sowohl bei der TZR-Aktivierung als auch der Migration der equinen PBL eine wichtige Rolle spielen könnte. Ein funktioneller Nachweis der ZAP70-Aktivierung könnte geliefert werden, indem entweder ZAP70 in PBL von an ERU erkrankten Pferden inhibiert wird oder T-Zellen von augengesunden Pferden

durch T-Zell-Stimulation aktiviert werden und das Migrationsverhalten der inhibierten oder stimulierten Zellen innerhalb der kollagendichten Umgebung untersucht wird. Neben dem Nachweis von ZAP70 in equinen PBL wurde das Protein in vorangegangenen Studien am Entzündungsherd, in Augenpräparaten von an ERU erkrankten Pferden, nachgewiesen (Kleinwort et al. 2016). In Paraffin eingebettete Augenpräparate wurden immunhistochemisch angefärbt, wodurch Zellinfiltrate im Bereich der Iris, des Ziliarkörpers und der Retina nachgewiesen wurden (Kleinwort et al. 2016). Innerhalb dieser sogenannten tertiären Lymphorgane, die in keinem der Augenpräparate augengesunder Kontrollpferde zu finden waren, wurden unabhängig von ihrer Lokalisation, vorrangig CD4+ T-Zellen identifiziert, die unter anderem ZAP70 exprimierten (Kleinwort et al. 2016). Da die ERU eine Th1-medierte, proinflammatorische Erkrankung darstellt (Gilger and Deeg 2011) könnte ZAP70 auch in PBL von an ERU erkrankten Pferden eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung dieser inflammatorischen Immunantwort einnehmen, jedoch ist das bei equinen Zellen noch nicht bekannt. Wie durch adoptiven Transfer in Studien am EAU-Mausmodell gezeigt werden konnte, ist der aktivierte T-Zell-Phänotyp für die Passage über die BRB und die Infiltration in das Auge ausschlaggebend (Horai et al. 2013; Luger et al. 2008). Die Voraussetzung ist, dass diese T-Zellen durch vorherigen Antigenkontakt aktiviert wurden und im Gegensatz zu naiven T-Zellen in der Lage sind, die BRB zu überqueren (Horai et al. 2013; Luger et al. 2008). Als Bestätigung der Annahme, dass eine gesteigerte Aktivierung durch ZAP70 mit dem Migrationsverhalten korreliert, müsste der Vergleich von migrierten zu nicht migrierten PBL ergeben, dass entweder ZAP70 in phosphorylierter Form höher exprimiert wird oder aktivierte Downstream-Kinasen in migrierten PBL von an ERU erkrankten Pferden vorliegen. Da die Untersuchung von ZAP70 zunächst keine Unterschiede in PBL von Kontroll- und ERU-Pferden ergab, wurde die intrazelluläre Verteilung des Proteins in den PBL untersucht. Durch die immunozytochemische Färbung des Proteins konnte eine unterschiedliche Verteilung in PBL von an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (vgl. Kap. 4.3.1.1). ZAP70 war in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden nicht nur im Bereich der Plasmamembran, sondern auch im Bereich des Zellkerns lokalisiert (vgl. Kap. 4.3.1.1). Über die Verteilung des Proteins in equinen PBL und der möglichen Bedeutung der Lokalisation ist nichts bekannt. Eine Aktivierung des Proteins führte, bei *in vitro* Experimenten von Jurkat T-Zelllinien, zu einer veränderten intrazellulären

Translokalisierung und Verteilung nach Aktivierung des TZR (Sloan-Lancaster et al. 1997).

Die intrazelluläre Verteilung von ZAP70 in T-Zelllinien wurde nach Markierung des Proteins durch einen grün fluoreszierenden Farbstoff (GFP) sichtbar gemacht und legte dar, dass das Protein nach Aktivierung an der Plasmamembran rekrutiert wurde, jedoch mehr als die Hälfte der ZAP70-Expression in perinukleären Bereichen detektiert wurde (Sloan-Lancaster et al. 1997). Zudem wurde nachgewiesen, dass die nukleäre Distribution nicht mit der Gesamtproteinexpression korrelierte (Sloan-Lancaster et al. 1997), wodurch die Lokalisation von ZAP70 den entscheidenden Faktor bei der Aktivierung der Zelle und nachfolgender Signalkaskaden bestimmen könnte, unabhängig von der Expressionsstärke. In PBL von an ERU erkrankten Pferden war ZAP70 im Gegensatz zu PBL von Kontrolltieren diffuser verteilt und neben der Lokalisation an der Plasmamembran auch im Bereich des Zellkerns lokalisiert. Diese Verteilung könnte sich auf die zelluläre Signalübertragung und die Aktivierung weiterer Moleküle bestimmter, noch unbekannter, Signalkaskaden und somit auf die immunologischen Prozesse auswirken. Die Lokalisation von ZAP70 in PBL von an ERU erkrankten Pferden könnte ausschlaggebend für die Aktivierung von Proteinen sein, die bei der Signalweiterleitung in den Zellkern eine bedeutende Rolle spielen. Dadurch könnte die Transkription aktivierender Moleküle eingeleitet werden, die für die abweichende Immunantwort der Zellen ausschlaggebend ist. Da die Untersuchung zur Lokalisation und Verteilung von ZAP70 in equinen PBL mittels eines Invers-Fluoreszenzmikroskops ausgeführt wurde ist fraglich, inwieweit die Lokalisation und Verteilung von ZAP70 mit dieser Technik zweifelsfrei bestimmt werden kann. Die Beurteilung einer genauen Lokalisation von Molekülen im perinukleären Bereich des Proteins erfordert eine hochauflösende Mikroskopie Technik die es ermöglicht auch tiefgelegene, kernnahe Strukturen darzustellen und in zukünftigen Studien beansprucht werden müsste. In weiteren Studien an T-Zellen des Menschen konnte belegt werden, dass ZAP70 auch bei der transendothelialen Migration (TEM) eine entscheidende Rolle einnimmt, indem es die Umstrukturierung des Zytoskeletts reguliert (Evans et al. 2011; García-Bernal et al. 2009). Deshalb wurden auch zytoskelettale Strukturen equiner PBL untersucht und deren Rolle bei der Migration näher ermittelt. Durch die im Rahmen dieser Arbeit erstmals aufgezeichneten und

untersuchten Migrationseigenschaften equiner PBL war die Rolle der zytoskelettalen Strukturen bei der Migration equiner PBL von großem Interesse.

Ziel war es, mögliche molekulare und regulatorische Mechanismen aufzudecken, die an der abweichenden Migration der PBL von ERU-Pferden beteiligt oder ursächlich sein könnten. Damit sich Lymphozyten innerhalb des Organismus in unterschiedlichen Geweben fortbewegen und eine erfolgreiche Immunantwort erzielen können, bedarf es einer aktiven Umstrukturierung des Zytoskeletts, wobei die De- und Polymerisation von Aktin ausschlaggebend ist (Dupré et al. 2015). Zu den Strukturen des Zytoskeletts von Säugerzellen werden Intermediär- und Aktinfilamente, Mikrotubuli (Svitkina 2018) sowie neuerdings auch Septin-Strukturen gezählt, die als vierte Komponente des Zytoskeletts bezeichnet werden (Abbey, Gaestel and Menon 2019; Mostowy and Cossart 2012). Die erste Beschreibung zu Septinen wurde in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* gemacht, deren Strukturen bei der Zellteilung eine entscheidende Rolle gespielt haben sollen (Hartwell 1971). Durch Forschungsarbeiten an Zelllinien der Maus und des Menschen konnten neue Erkenntnisse zur Rolle und Funktion von Septinen bei der Zellmigration gewonnen werden (Tooley et al. 2009; Zhang et al. 2016). Septine sind an der Zellmigration beteiligt, interagieren mit der Plasmamembran und binden an Strukturen des Aktin-Zytoskeletts, wie in T- und Brustkrebszelllinien demonstriert wurde (Tooley et al. 2009; Zhang et al. 2016). Sie sind durch ihre kortikale Lokalisation an der Zellspannung und -rigidität, sowie an der effizienten Migration humaner T-Zelllinien beteiligt (Tooley et al. 2009). Zur Familie der Septine, der zytoskelettalen GTPasen, zählen 13 Mitglieder, die neben der Zellteilung und strukturgebenden zytoskelettalen Funktionen auch an der Membraninteraktion und Migration beteiligt sind (Abbey et al. 2016; Spiliotis 2018). Die Mitglieder der Septine werden in vier Untergruppen eingeteilt, die untereinander Komplexe bilden und sich somit gegenseitig beeinflussen (Neubauer and Zieger 2017).

Septin 7 spielt eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle anderer Septine und kann diese schützen und stabilisieren, wie durch Studien an Brustkrebszellen des Menschen gezeigt wurde (Zhang et al. 2016). Nachdem Brustkrebszellen mit Forchlorfenuron (FCF) behandelt wurden, konnte die Proliferation, Migration und Invasion der Zellen gehemmt und die Beteiligung der Septine an der Ausbildung maligner Tumorzellen bestätigt werden (Zhang et al. 2016). FCF ist ein Pflanzen-Zytokin, das Septin-Strukturen von Hefen und Jurkat T-Zelllinien nachweislich beeinträchtigen konnte,

indem dichtere, stabilere und langgestreckte Septin-Strukturen ausgebildet wurden (Hu, Nelson and Spiliotis 2008; Iwase et al. 2004).

In Studien mit Gliomzelllinien des Menschen wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Expression von Septin 7 die Zellproliferation und Migrationsfähigkeit der Zellen hemmte und deren Apoptose induzierte (Jia et al. 2010). Interessanterweise war Septin 7, das im Rahmen proteomischer Untersuchungen von equinen Lymphozyten identifiziert wurde, in PBL von an ERU erkrankten Pferden signifikant schwächer exprimiert als in PBL von Kontrollpferden (Degroote et al. 2014).

Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine verminderte Septin 7-Expression an der schnelleren und zielgerichteten Migrationsfähigkeit der PBL von an ERU erkrankten Pferden beteiligt ist. Um die Bedeutung der geringeren Septin 7-Expression an den veränderten Migrationsfähigkeiten der PBL von an ERU erkrankten Pferden nachzuweisen, wurde die Expressionsstärke von Septin 7 in PBL von Kontroll- und ERU-Pferden ermittelt, die zuvor in 3D-Migrationsexperimenten eingesetzt und deren Migrationseigenschaften analysiert wurden. Der Vergleich der Proteinexpression zeigte, dass Septin 7 in PBL von an ERU erkrankten Pferden, die während der Migrationsversuche in kollagendichter Umgebung schneller, weiter und zielgerichteter migrierten, signifikant reduziert war (vgl. Kap. 4.1.8). Die Korrelation zwischen der verminderten Expression von Septin 7 und dem veränderten Migrationsverhalten von PBL von an ERU erkrankten Pferden in der Pathogenese der ERU konnte somit bestätigt werden. Die Untersuchung Septin 7-defizienter muriner T-Zellen ergab, dass diese im Vergleich zur Kontrollgruppe längere und gebogene hintere Zellpole, Uropoden, sowie übermäßige Ausstülpungen (Protrusionen) am vorderen Zellpol ausbildeten (Tooley et al. 2009). Durch die fehlende stabilisierende Funktion von Septin 7 im Bereich des Zellkortexes waren KD-Zellen in der Lage durch Poren hindurch zu migrieren, die wesentlich kleiner waren als ihr kleinster Zelldurchmesser (Tooley et al. 2009). Im Gegensatz zu den migrierten PBL von an ERU erkrankten Pferden, die nachweislich weniger Septin 7 exprimierten (vgl. Kap. 4.1.8), zeigten murine Septin 7-KD-Zellen geringere Migrationsgeschwindigkeiten als Zellen der Kontrollgruppe (Tooley et al. 2009). Die verminderte Migrationsgeschwindigkeit der KD-Zellen kann jedoch durch die Vielzahl unerwünschter und nicht vollständig bekannter Wechselwirkungen der siRNA-Transfektion hervorgerufen werden, wodurch

unspezifische Proteine, die gegebenenfalls an der Migration beteiligt sind, zusätzlich ausgeschaltet werden können (Kamola et al. 2015).

Die Ergebnisse aus der Studie mit Septin 7-KD-Zellen bekräftigen die Hypothese, dass eine Reduktion der Septin 7-Expression in T-Zellen ausschlaggebend für eine bessere Verformbarkeit und geringere Rigidität ist und so den Zellen ermöglicht, durch kleinere Poren zu migrieren. Bezogen auf autoreaktive T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden würde das bedeuten, dass diese Zellen durch die geringe Expression von Septin 7 in der Lage sind über die BRB zu migrieren.

Um die Abhängigkeit der Expression von Septin 7 und deren möglichen Beteiligung an der veränderten Migration näher zu untersuchen, wurde Septin 7 mittels Forchlorfenuron (FCF) in PBL von augengesunden Pferden gehemmt (vgl. Kap. 4.1.5). Die Veränderungen der Septin-Strukturen konnten nach Entfernung von FCF, durch Auswaschen rückgängig gemacht werden (Hu, Nelson and Spiliotis 2008). Um die Effekte der FCF-Behandlung an primären, equinen PBL zu untersuchen, wurden die Zellen für eine Stunde mit 50 μ M FCF inkubiert und die Zellmigrationsparameter der FCF-behandelten und unbehandelten PBL der Kontrollgruppe miteinander verglichen. Das Experiment sollte zeigen, ob Septin-gehemmte PBL eine schnellere und zielgerichtete Migration durch kollagendichtes Gewebe zeigen würden. Der Vergleich der unbehandelten und FCF-behandelten PBL augengesunder Pferde ergab, dass sich die Zellen in ihrem Migrationsverhalten innerhalb der dreidimensionalen Kollagenmatrix in einem Parameter unterscheiden haben. Die FCF-behandelten Zellen, mit FCS als Chemoattractant, migrierten innerhalb der Kollagenmatrix signifikant zielgerichteter (vgl. Kap. 4.1.5). Die Zielgerichtetheit der FCF-behandelten PBL innerhalb der dreidimensionalen Matrix spiegelt das Migrationsverhalten der PBL von an ERU erkrankten Pferden wider (vgl. Kap. 4.1.1, 4.1.4). Eine zielgerichtete Zellbewegung kann mit dem Aktivierungszustand der Zelle zusammenhängen, wobei ZAP70 Moleküle bestimmter Signalkaskaden aktivieren kann, zu denen Cdc42 zählen könnte (Manes and Pober 2013).

Die Hemmung der Septin-Strukturen durch FCF in PBL von Kontrolltieren zeigte, dass durch die hervorgerufenen Veränderungen der zytoskelettalen Strukturen eine zielgerichtete Migration durch die kollagendichte Matrix ermöglicht wurde. Da keine vergleichenden Ergebnisse zu Migrationseigenschaften von FCF-behandelten, primären Säugerzellen vorliegen, gilt es herauszufinden, welche zellulären und

regulatorischen Strukturen an der Migration FCF-behandelter PBL beteiligt und verändert sein könnten.

Weshalb sich die FCF-Behandlung der PBL nicht auf die anderen Migrationseigenschaften der Zellen auswirkte, ist fraglich. Dass neben der zielgerichteten Migration nicht auch die Zellgeschwindigkeit beeinflusst wurde, ist überraschend. Ob und inwiefern sich die FCF-Behandlung der PBL, neben der Änderung der Expression von Septin 7 und F-Aktin auch auf die Proteinexpression weiterer regulatorischer Proteine wie der kleinen GTPase Cdc42 auswirkte, müsste in zukünftigen Experimenten näher untersucht werden. Die Expression der potenziell beteiligten Proteine könnte durch den Vergleich nicht migrierter und migrierter PBL nach FCF-Behandlung mittels Western Blot untersucht werden. Somit könnte überprüft werden, ob und wie sich die Expression regulatorischer Proteine von FCF-behandelten PBL ändert und ob diese Proteinexpressionen mit den von an ERU erkrankten PBL übereinstimmen. Insgesamt muss kritisch beurteilt werden, ob und inwiefern sich die Rolle von Septin 7 allein auf die Migrationsparameter der PBL auswirken könnte.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Studie überprüft, welche Unterschiede in der Expression und Verteilung von Septin 7 nach FCF-Behandlung der migrierenden PBL zu sehen waren und ob interagierende Strukturen des Aktin-Zytoskeletts mit beeinflusst wurden. Die Proteine Septin 7 und F-Aktin sowie die Zellkerne der PBL wurden nach erfolgten Migrationsversuchen immunzytochemisch angefärbt und mikroskopisch analysiert (vgl. Kap. 4.1.6, 4.1.7, 4.1.8). Migrierte PBL zeigten im Vergleich zu nicht-migrierten PBL eine signifikant reduzierte Expression der Proteine Septin 7 und F-Aktin, was auch nach der FCF-Behandlung festgestellt werden konnte (vgl. Kap. 4.1.6). Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der PBL mittels FCF eine Reduktion der Septin 7-Expression hervorrufen könnte, die für die Migration der PBL ausschlaggebend ist, wie an den Migrationseigenschaften der FCF-behandelten PBL von augengesunden Pferden demonstriert werden konnte. Die Analyse der Expression und der Verteilung von F-Aktin ergab, dass die zytoskelettalen Strukturen in migrierten, FCF-behandelten PBL geringer exprimiert wurden und wesentlich feinere F-Aktin-Strukturen aufwiesen, die sich weniger im Bereich der Plasmamembran verteilten, sondern diffus im Zytoplasma der Zelle, bis in perinukleäre Bereiche lokalisiert waren (vgl. Kap. 4.1.7). Die Beeinflussung der F-Aktin-Strukturen durch die Behandlung der equinen PBL mit FCF

war eine interessante, neue Erkenntnis, die in primären Zellen noch nicht beschrieben wurde.

Der Einsatz von FCF beschränkte sich in bisherigen Studien vor allem auf Hefezellen und menschliche Zelllinien, in denen FCF neben Septin-Strukturen unter anderem das mitochondriale Membranpotential und die Zellproliferationsrate beeinflusste (Heasley, Garcia and McMurray 2014). Dadurch, dass es zur Wirkung von FCF in primären, equinen Leukozyten noch keine vergleichbaren Daten gibt und Kenntnisse über mögliche und effiziente Knock-Down-Effekte von Septin 7 fehlen, wäre ein Vergleich der Septin 7-Expression nach siRNA-Transfektion in equinen PBL angebracht. Durch die Transfektion kurzer RNA-Moleküle, specific small interfering RNAs (siRNA), können bestimmte Gene gezielt kurzzeitig ausgeschaltet werden, was als Knock-Down (KD) bezeichnet wird (Dana et al. 2017). Somit müsste die Verwendung von Septin 7-siRNA bei equinen PBL als Kontrolle eingesetzt werden, um zu prüfen ob mittels FCF ein ähnlicher oder gleicher Knock-Down-Effekt von Septin 7 erzielt wurde, wie es mittels Transfektion von Septin 7-siRNA zu erwarten wäre. Dabei sollte beachtet werden, dass es sich bei den zu untersuchenden Zellen um primäre PBL handelt, deren Vitalität durch die oftmals zytotoxische Wirkung der Reagenzien der siRNA-Transfektion (Jackson et al. 2006) beeinträchtigt werden könnte, wodurch wiederum das Migrationsverhalten der Zellen beeinflusst wäre, da dieses von der Vitalität der Zellen abhängt. Durch die weitere Analyse der immunzytochemischen Aufnahmen konnte die veränderte Lokalisation und Verteilung der Septin- und F-Aktin-Strukturen in migrierten, FCF-behandelten PBL dargelegt werden (vgl. Kap. 4.1.8). Die Septin 7- und F-Aktin-Strukturen von migrierten Lymphozyten waren weitaus feiner und lagen weniger dicht gebündelt im Bereich der Plasmamembran, sowie in der Nähe des Zellkerns vor. Die Präsenz dieser feinen zytoskelettalen Strukturen in perinukleären Bereichen der migrierenden Zellen könnte für eine bessere Anpassungsfähigkeit und Flexibilität der Zelle in dichtem Gewebe sprechen. Die Interaktion der Septin- und Aktinfilamente in equinen PBL könnte zudem mit mechanotransduktorisches Mechanismen zusammenhängen, die es den Zellen ermöglichen ihre extrazelluläre Umgebung besser wahrzunehmen und eine adäquate Anpassung der Zellform an die extrazellulären Gegebenheiten hervorrufen. Die Funktion, die extrazelluläre Umgebung wahrzunehmen und diese Informationen in die Zelle weiterzuleiten, um die zytoskelettalen Strukturen aktiv zu verändern wurde ebenfalls den Septinen

zugeschrieben (Lam and Calvo 2019). Diese Signalweiterleitung, die für die Migration der Zellen entscheidend ist, muss von der äußeren Plasmamembran der Zelle bis zum Zellkern reichen (Davidson et al. 2014). Aus Untersuchungen zur Ultrastruktur von Aktin-Strukturen und interagierenden Strukturen des Zellkerns ist bekannt, dass Aktin an Lamin A/C bindet, wodurch die Rigidität des Zellkerns beeinflusst wird (Davidson et al. 2014; McGregor, Hsia and Lammerding 2016). Untersuchungen an Fibroblasten veranschaulichten, dass Lamin A/C für die Rigidität des Zellkerns verantwortlich war und die Zellen mit einer geringeren Expression des Proteins schneller durch enge Poren migrieren konnten (Davidson et al. 2014). Ob PBL von an ERU erkrankten Pferden oder FCF-behandelte PBL eine geringere Expression von Lamin aufweisen, müsste daher untersucht werden. Die enge Interaktion von Septin 7 mit den Strukturen des Zytoskeletts und der höheren Flexibilität des Zellkerns würde vor allem bei der Transmigration equiner autoreaktiver T-Zellen über die BRB Vorteile bringen und eine Erklärung für die Infiltration in das Auge sein. Die Bedeutung des Zellkerns bei der Migration equiner T-Zellen und beteiligte Mechanismen, die bei der Pathogenese der ERU vonstattengehen, sind nicht bekannt. Wie von Lymphozyten des Menschen bekannt ist, ist bei der amöboiden Migration die aktive Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, an der auch Septine beteiligt sind, die treibende Kraft für die Fortbewegung der Zellen (Palander, El-Zeiry and Trimble 2017). Die Lokalisation der Septin- und F-Aktin-Strukturen der migrierenden Zellen im perinukleären Bereich kann für die zytoskelettal-nukleäre Interaktion von großer Bedeutung sein (Spiliotis 2018). Die Interaktion zwischen Zellkern und zytoskelettalen Strukturen spielt besonders bei der Migration von Leukozyten eine wichtige Rolle und trägt dazu bei, dass sich Zellen in dichtem Gewebe und durch enge Poren bewegen können (Calero-Cuenca, Janota and Gomes 2018). Da der Zellkern bei der Migration von Leukozyten den limitierenden Faktor darstellt und für die Zellgröße und Zellrigidität verantwortlich ist, wird bei der amöboiden Migration von Lymphozyten der Nukleus an den vorderen Zellpol der migrierenden Zelle geschoben und ist mit den dynamischen, zytoskelettalen Strukturen verbunden (Calero-Cuenca, Janota and Gomes 2018). Infolgedessen kommt es bei zytoskelettaler Umstrukturierung der Zelle an der Zellfront gleichzeitig zu einer Formveränderung des Zellkerns (Khan, Newby and Gladfelter 2018). Für die exakte Beschreibung der intrazellulären Lokalisation von Septin 7 und F-Aktin sowie der Interaktion mit den Membran-nahen Strukturen des Zellkerns, müssten

hochauflösende Bildgebungsmethoden herangezogen werden, die selbst tiefe Schichten der Zelle im perinukleären Bereich visualisieren können.

Um die Interaktion und Beteiligung von Septin- und F-Aktin-Strukturen bei der Migration equiner Lymphozyten weiter zu bestätigen, könnten nachweislich effiziente und spezifische Inhibitoren der zytoskelettalen Aktin-Strukturen, eingesetzt werden. Der Inhibitor Latrunculin B hemmt die Polymerisation von Aktin und schränkt somit die Aktin-abhängige Fortbewegung der Lymphozyten, wie bei der transendothelialen Migration muriner T-Zellen, ein (Yan et al. 2019). Es wäre interessant zu sehen, ob Septin 7-Strukturen nach der gezielten Hemmung der F-Aktin-Filamente auch beeinträchtigt werden und nach Behandlung mit Latrunculin B ein ähnlicher Phänotyp wie nach FCF-Behandlung vorliegen würde. Die Analyse und der Vergleich der Migrationsparameter von unbehandelten und Latrunculin-behandelten equinen PBL würde Aufschluss über die Abhängigkeit der Interaktion von Septin 7 und F-Aktin geben und die Bedeutung der Strukturen während der Migration hervorheben.

Neben den Migrationseigenschaften equiner PBL innerhalb einer kollagendichten, dreidimensionalen Umgebung sowie den Expressionsunterschieden und Verteilungsmustern regulierender Proteine, wurden die PBL augengesunder und an ERU erkrankter Pferde zusätzlich anhand ihrer metabolischen Eigenschaften näher charakterisiert. Die Beteiligung und Bedeutung des Zellmetabolismus bei Inflammationen und Autoimmunerkrankungen erlangten in der Forschung der Immunologie zunehmend Aufmerksamkeit. So wird der zelluläre, metabolische Status von T-Zellen mit der T-Zell-Differenzierung und ihren Effektorfunktionen in Zusammenhang gebracht und mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen assoziiert (Abboud et al. 2018; Takeshima et al. 2019). Eine adäquate Immunantwort hängt davon ab, wie schnell und effizient die Anpassungsfähigkeit des Zellstoffwechsels von T-Zellen ist, die nach Antigenpräsentation über ihren TZR aktiviert wurden und sich an Zellwachstum, Proliferation und Effektorfunktion anpassen müssen (Chapman, Boothby and Chi 2019; Desdín-Micó, Soto-Heredero and Mittelbrunn 2018). Diese Anpassung wird als metabolische Flexibilität bezeichnet (Smith et al. 2018; Tareen et al. 2019). Weicht jedoch der Zellmetabolismus bestimmter Immunzellen, unabhängig von der Aktivierung und der Oberflächenproteine ab, können inflammatorische und autoimmune Immunreaktionen die Folge sein (Teng et al. 2019). Bei der ERU, der autoimmunen Uveitis des

Menschen und den experimentellen Tiermodellen blieb nach aktueller Literaturrecherche (Stand: September 2019) die Untersuchung der Rolle und Bedeutung des Zellmetabolismus im Zusammenhang mit der Pathogenese bislang unerforscht. In Anbetracht dessen war es Ziel dieser Arbeit, erste Informationen und Erkenntnisse über die Stoffwechseleigenschaften von PBL augengesunder und an ERU erkrankter Pferde zu erhalten (vgl. Kap. 4.2). Deshalb wurde die mitochondriale Stoffwechselaktivität von PBL augengesunder und von an ERU erkrankten Pferden untersucht und verglichen. Durch die gezielte Hemmung bestimmter Komplexe der Elektronentransportkette innerhalb des mitochondrialen Intermembranraums wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) (vgl. Kap. 4.2.1) und die Protonenproduktion (ECAR) der equinen PBL untersucht (vgl. Kap. 4.2.2). PBL von an ERU erkrankten Pferden zeigten im Vergleich zu PBL augengesunder Pferde eine signifikant höhere basale Respiration, die durch eine höhere Sauerstoffverbrauchsrate gemessen werden konnte (vgl. Kap. 4.2.1). Die simultane Messung der pH-Wert-Änderung, die durch die Protonenkonzentration der im Zellkulturmedium befindlichen H⁺-Ionen bestimmt wurde, zeigte, dass die basale Protonenproduktion von PBL von an ERU erkrankten Pferden erhöht war (jedoch nicht signifikant) (vgl. Kap. 4.2.2). Der Nachweis einer gesteigerten basalen Respiration von PBL von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu PBL augengesunder Pferde ist eine neue Erkenntnis und wurde noch nicht in Zusammenhang mit dem vorliegenden Zell-Phänotyp und der Pathogenese assoziierten Mechanismen der ERU gebracht. Der Grund für eine gesteigerte basale Respiration, also der sauerstoffabhängigen Energiegewinnung der PBL von an ERU erkrankten Pferden, ist daher unbekannt.

Diese gesteigerte basale Respiration könnte mit einem höheren mitochondrialen Membranpotenzial zusammenhängen, wie in T-Gedächtniszellen bei Mäusen gezeigt werden konnte, die sich im Gegensatz zu naiven T-Zellen und T-Effektorzellen durch eine erhöhte mitochondriale Masse und eine gesteigerte Sauerstoffaufnahme sowie einer vermehrten respiratorischen Reservekapazität (SRC) auszeichneten (van der Windt et al. 2012). Die mitochondriale Respirationsreservekapazität wird damit begründet, dass T-Gedächtniszellen bei erneutem Antigenkontakt, auch unter vermehrtem oxidativen Stress während Inflammationen, rasch Energie für die nachfolgende Immunantwort bereitstellen müssen (van der Windt et al. 2012). Eine Untersuchung der mitochondrialen Masse equiner PBL, die im Rahmen dieser Arbeit

nicht bestimmt wurde, könnte immunzytochemisch mit der Anfärbung der Mitochondrien mit einem Mitotracker erfolgen, wie es bei T-Zellen der Maus durchgeführt wurde (van der Windt et al. 2012).

Interessanterweise zeigten die PBL von an ERU erkrankten Pferden nach Injektion von Oligomycin auch signifikant höhere OCR-Werte (vgl. Kap. 4.2.1), was für eine Energiegewinnung durch nicht-mitochondriale aerobe Stoffwechselwege spricht. Anhand der generierten ECAR-Werte konnte zudem gezeigt werden, dass PBL von an ERU erkrankten Pferden nach Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthase durch Oligomycin signifikant mehr Protonen produzierten als PBL augengesunder Pferde (vgl. Kap. 4.2.2). Die Ansäuerung des Zellkulturmediums lässt auf die Produktion von Protonen durch den glykolytischen Abbau von Glukose zu Laktat und H⁺ schließen (Au-Mookerjee and Au-Brand 2015; Mookerjee et al. 2015). Eine signifikant höhere Protonenproduktion verdeutlichte die Anpassung der PBL von an ERU erkrankten Pferden an eine Glykolyse-abhängige Energiegewinnung, nachdem die mitochondriale ATP-Generierung gehemmt wurde. Die Nutzung überwiegend glykolytischer Stoffwechselwege von aktivierten T-Effektorzellen, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen, konnte durch eine Vielzahl an Studien an T-Zellen der Maus und des Menschen belegt werden. T-Zellen von SLE Patienten, einer systemischen Autoimmunerkrankung, sowie murine CD4⁺ T-Zellen im SLE-Mausmodell zeigten neben einer erhöhten Laktatproduktion auch eine gesteigerte Sauerstoffaufnahme (Yin et al. 2015). Diese Ergebnisse sprechen für einen hypermetabolischen Status der beteiligten Effektorzellen bei autoimmunen Erkrankungen (Yin et al. 2015). Dies zeigt, dass sowohl der glykolytische als auch der mitochondriale Stoffwechsel eine entscheidende Rolle spielen und die Energiegewinnung nicht nur von einem bestimmten Stoffwechselweg abhängig zu sein scheint (Yin et al. 2015).

Da der Zellmetabolismus nicht allein von einer Aktivierung der Zellen abhängt und beeinflusst wird, sondern charakteristisch für funktionell differenzierte Zellen sein kann, die die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen können, erlangte das Verständnis des Zellmetabolismus erkrankter Immunzellen große Bedeutung in der Forschung (McKinney and Smith 2018). Durch den Nachweis der unterschiedlichen metabolischen Anforderungen bestimmter Immunzellen konnten T-Zellen des Menschen in CD4⁺ -Subpopulationen eingeteilt werden, die sich durch den Bedarf bestimmter Substrate kennzeichnen (Cluxton et al. 2019). Daher könnte der Nachweis

metabolisch und funktionell unterschiedlicher Zellen dazu dienen, pathologische Mechanismen besser zu verstehen und gegebenenfalls eine passende Strategie zu finden um die Entwicklung der devianten Zellen zu beeinflussen.

Bei Autoimmunerkrankungen wird oftmals die Dysbalance aus fehlenden Tregs und vermehrt proinflammatorischer Zellen als Grund für die Entstehung autoinflammatorischer Reaktionen angesehen (Cluxton et al. 2019).

Inflammatorische Th1- und Th17-Zellen des Menschen konnten nachweislich einem glykolytischen Stoffwechsellyp zugeordnet werden (Cluxton et al. 2019). Tregs wiederum zeigten neben der Glykolyse eine vermehrte mitochondriale Respiration sowie Fettsäureoxidation (Cluxton et al. 2019). Beim Pferd müssten die Stoffwechsellypen zuvor noch den bestimmten T-Zellphänotypen zugeordnet werden. Dabei wäre vor allem eine nähere Charakterisierung des Stoffwechsels equiner Th1-T-Zellen interessant, weil die Th1-Immunantwort bei der Pathogenese der ERU eine Schlüsselrolle spielt (Gilger and Deeg 2011) und Unterschiede in der Stoffwechselaktivität dieser Zellen ausschlaggebend sein könnten. In Bezug auf die Migration und Invasion von autoreaktiven CD4+ T-Zellen in okulares Gewebe, ist eine Anpassung des Zellmetabolismus essentiell, da zum einen für die Migration und der damit verbundenen Umstrukturierung des Zytoskeletts Energie benötigt wird und zum anderen die Verfügbarkeit von Sauerstoff in endogenen Geweben limitiert ist (Dimeloe et al. 2016). Für zukünftige Versuche wäre es deshalb interessant zu sehen, inwiefern sich die OCR- und ECAR-Werte der equinen Zellen ändern, wenn diese unter sauerstoffarmen Bedingungen kultiviert würden, um Rückschlüsse auf die Fähigkeit der Energiegewinnung unter Sauerstoff-restriktiver Umgebung zu ziehen. Die Bedeutung des Glukose-abhängigen Metabolismus bei Autoimmunerkrankungen wurde durch die Abhängigkeit der Expression des Glukosetransporters Glut-1 in humanen und murinen CD4+ T-Zellen verdeutlicht (Macintyre et al. 2014; Yin et al. 2015). Durch weitere Studien an T-Zellen der Maus und des Menschen wurde festgestellt, dass aktivierte T-Zellen, vorrangig CD4+ Effektorzellen, nach Aktivierung des TZR vermehrt Glukosetransporter wie Glut-1 an der Oberfläche exprimierten (Cretenet et al. 2016). Die Expression von Glut-1 war unter hypoxischen Bedingungen höher als unter normoxischen, was für einen Glukose-abhängigen Stoffwechsel der aktivierten CD4+ -Zellen sprach (Cretenet et al. 2016), der vor allem in Geweben mit limitierter Sauerstoffverfügbarkeit entscheidend wäre. Ob eine höhere Expression von

Glukosetransportern wie Glut-1 in equinen PBL für eine Glukose-abhängige Energiegewinnung CD4+ T-Zellen steht und ein Merkmal für aktivierte, proinflammatorische T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden sein könnte, ist nicht bekannt. In Anbetracht der pathologischen Prozesse bei der ERU wäre die Fähigkeit aktivierter Effektorzellen entscheidend, Energie auch unter hypoxischen Bedingungen zu generieren. Untersuchungen der Retina augengesunder Pferde ergaben, dass die Retina zu etwa 95 % avaskulär ist und nur in einem kleinen Bereich um den *Nervus opticus* Blutgefäße vorhanden sind (Ehrenhofer et al. 2002). Die Versorgung mit Sauerstoff durch Diffusion nimmt im entzündeten Auge zunehmend ab, was mit einer Anpassung der infiltrierten Zellen an die hypoxischen Bedingungen gekoppelt sein muss (Ehrenhofer et al. 2002). Wie autoreaktive equine CD4+ T-Zellen in der Lage sind ihre Energie in einer sauerstoffarmen Umgebung des Auges zu gewinnen, bleibt offen. Eine Charakterisierung des Zellmetabolismus intravitrealer Zellen, die durch Vitrektomie der Augen von an ERU erkrankten Pferden gewonnen werden, könnte weitere Aufschlüsse bringen. Zudem wäre der direkte Vergleich des Zellmetabolismus peripherer Blutleukozyten und vitrealer Zellen eines von an ERU erkrankten Pferdes interessant und könnte für zukünftige Experimente in Erwägung gezogen werden. Das Ziel zukünftiger Experimente ist zu bestätigen, dass durch die bisherigen Ergebnisse eine Zell-Subpopulation identifiziert werden konnte, die sich nicht durch unterschiedliche Oberflächenproteine, sondern durch zelluläre Stoffwechselunterschiede auszeichnet.

Neben der Rolle des hyperproliferativen Zellmetabolismus autoreaktiver Immunzellen wird zunehmend die Beteiligung von Darmbakterien und deren Produktion kurzkettiger Fettsäuren mit Autoimmunerkrankungen assoziiert, wie im Modell der experimentellen autoimmunen Uveitis demonstriert wurde (Nakamura et al. 2017). Durch die orale Gabe der kurzkettigen Fettsäure (Propansäure) vor und nach Induktion von EAU in Mäusen, konnte die Produktion von Th1- und Th17-Zellen gemindert und die Migration von Th1-Zellen aus dem Kolon zur Milz reduziert werden (Nakamura et al. 2017). Zudem zeigten die Mäuse eine vermehrte Ausbildung regulatorischer T-Zellen, die die progressive Inflammation der Augen verhinderte (Nakamura et al. 2017). Die Analyse des Darmmikrobioms bei Pferden und die Produktion kurzkettiger Fettsäuren könnten somit bereits vor Entstehung der Erkrankung, Hinweise auf eine Prädisposition für die Ausbildung der ERU geben. Eine Dysbiose des Darmmilieus könnte somit die

Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen, wie anhand von Darmbakterien im Fäzes bei an Multipler Sklerose erkrankten Patienten festgestellt werden konnte (Berer et al. 2011; Chen et al. 2016). Studien von EAU-Mausmodellen zeigten, dass Darmmikroben Retina-spezifische autoreaktive T-Zellen aktivieren können, indem sie retinale Antigene nachahmen, wodurch die Wirtseigene Immunantwort verstärkt und eine Inflammation begünstigt werden konnte (Horai and Caspi 2019; Horai et al. 2015). Da bei der ERU davon ausgegangen wird, dass autoreaktive T-Zellen in peripheren sekundären lymphatischen Organen aktiviert werden, bringt die Beteiligung des Mikrobioms bei der Entstehung der ERU neue und interessante Aspekte mit sich. Die Assoziation zwischen Darmbakterien und equiner rezidivierender Uveitis stellt eine neue, spannende Hypothese zur Pathogenese der ERU dar, die noch weiterer Forschung bedarf.

Zusammenfassend wurden in dieser Studie neue Informationen über das bislang unbekanntes Migrationsverhalten von equinen PBL im Rahmen der Pathogenese der ERU gewonnen. Es konnte nachgewiesen werden, dass PBL von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu PBL augengesunder Pferde veränderte Migrationseigenschaften besitzen, wodurch sie schneller, weiter und zielgerichteter innerhalb einer kollagendichten Matrix migrieren konnten. Dabei wurde die Rolle von Septin 7, ein in PBL von an ERU erkrankten Pferden geringer exprimiertes Protein (Degroote et al. 2014), bei der Migration der Zellen näher analysiert. Zusätzlich wurde die Interaktion und Beeinflussung von weiteren Strukturen des Zytoskeletts ermittelt. Septin 7 und F-Aktin wurden in migrierten PBL augengesunder Pferde signifikant geringer exprimiert und zeichneten sich durch feinere Septin- und F-Aktin-Filamente aus, die im Bereich der Plasmamembran und des Zellkerns lokalisiert waren. Zusätzlich war der Nachweis einer erhöhten Expression der kleinen GTPase Cdc42 in PBL von an ERU erkrankten Pferden neu. Die identifizierte höhere Expression des Proteins könnte mit dem Migrationsverhalten der PBL von an ERU erkrankten Pferden assoziiert werden. Des Weiteren wurde ZAP70 in PBL augengesunder und an ERU erkrankter Pferde näher charakterisiert, wobei eine nahezu gleiche Expression des Proteins in den equinen PBL festgestellt wurde. PBL von ERU-Pferden zeigten jedoch eine unterschiedliche zelluläre Verteilung und Lokalisation des Proteins auf. Möglicherweise kann die abweichende intrazelluläre Verteilung mit einem aktivierten

Zell-Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Interessanterweise wies Cdc42, das als Downstream-Protein von aktiviertem ZAP70 in Zusammenhang steht eine höhere Expression in PBL von an ERU erkrankten Pferden auf, wodurch die Annahme einer ZAP70-abhängigen Aktivierung der T-Zellen bekräftigt wurde. Durch die Charakterisierung der Stoffwechsel- und Energiegewinnungswege von PBL augengesunder und von an ERU erkrankten Pferden konnten die immunoregulatorischen Mechanismen bei der ERU unter einem neuen Aspekt beleuchtet werden. Der Vergleich der Reaktionen von equinen PBL nach Beeinflussung mitochondrialer Komplexe der Atmungskette zeigte, dass PBL von an ERU erkrankten Pferden einen höheren basalen Sauerstoffbedarf sowie eine höhere basale glykolytische Stoffwechsellage besitzen. Somit konnte veranschaulicht werden, dass PBL von an ERU erkrankten Pferden durch veränderte Migrationseigenschaften, differentiell exprimierte, regulatorische Proteine sowie einem abweichenden Zellmetabolismus von PBL augengesunder Pferde unterschieden werden können. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, Pathogenese assoziierte Mechanismen der ERU besser verstehen zu können. Diese Informationen sind auch für die immunologische Forschung der autoimmunen Uveitis des Menschen von großer Bedeutung und könnten bei der Entwicklung möglicher Therapieansätze einbezogen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis ist eine hochprävalente autoimmune Augenerkrankung bei Pferden, die sich durch wiederkehrende Entzündungsschübe auszeichnet, welche meist mit dem Verlust der Sehfähigkeit der betroffenen Augen einhergehen. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen ist auch bei der ERU die zugrundeliegende Pathogenese unbekannt.

Da die ERU das einzig spontane Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen darstellt, sind neue Erkenntnisse zu Pathogenese assoziierten Mechanismen der ERU nicht nur für die Veterinärmedizin, sondern auch für die Humanmedizin von großem Interesse. Charakteristisch für die ERU ist die Migration autoreaktiver T-Zellen über die Blut-Retina-Schranke und die Infiltration des inneren Auges mit anschließender Zerstörung retinaler Strukturen. Da nicht bekannt ist, welche zugrundeliegenden Mechanismen es den T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden ermöglichen über die Blut-Retina-Schranke zu migrieren, wurden die Migrationsfähigkeiten equiner Zellen erstmals untersucht. Dabei wurden die Migrationseigenschaften peripherer Blutleukozyten von augengesunden und von an ERU erkrankten Pferden innerhalb einer dreidimensionalen Kollagenmatrix ermittelt und miteinander verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass PBL von an ERU erkrankten Pferden innerhalb der dreidimensionalen Umgebung deutlich schneller, weiter und zielgerichteter migrierten. Da die molekularen Mechanismen nicht bekannt sind, die zu den veränderten Migrationsfähigkeiten der PBL von an ERU erkrankten Pferden führten, wurde die Rolle potentiell beteiligter Proteine näher untersucht. Dabei wurde die zytoskelettale GTPase Septin 7 näher untersucht, da sie durch die signifikant reduzierte Expression in PBL von ERU-Pferden und der Beteiligung an der Organisation zytoskelettaler Strukturen ein möglicher Grund für die abweichenden Migrationsfähigkeiten der PBL von an ERU erkrankten Pferden, darstellen könnte. Um die Rolle von Septin 7 bei der Migration der Zellen aufzudecken, wurden PBL aus Kontrollpferden mit Forchlorfenuron, dem chemischen reversiblen Inhibitor von Septin-Strukturen, inkubiert. FCF-behandelte PBL zeigten im Vergleich zu unbehandelten PBL eine gesteigerte, zielgerichtete Migration durch kollagendichtes Gewebe. Die Expression der Septin 7-Strukturen sowie interagierender F-Aktin-Strukturen war in FCF-behandelten, migrierten PBL reduziert und vermehrt in perinukleären Bereichen zu

finden. Da die kleine GTPase Cdc42 in aktivierten T-Zellen des Menschen an der Ausbildung Aktin-haltiger Protrusionen migrierender Zellen beteiligt ist, war es interessant zu sehen, dass Cdc42 in PBL von an ERU erkrankten Pferden höher exprimiert wurde als in PBL augengesunder Pferde. Für die Aktivierung von Cdc42 und weiteren Molekülen, die an der Aktin-abhängigen Migration beteiligt sind, ist die Aktivierung der Zelle entscheidend. ZAP70 ist in T-Zellen der Maus und des Menschen für die T-Zell-Aktivierung essentiell und löst bestimmte Signalkaskaden aus, wobei auch Cdc42 aktiviert wird. Deshalb könnte die hier festgestellte, abweichende intrazelluläre Lokalisation von ZAP70 in PBL von an ERU erkrankten Pferden eine erhöhte Aktivierung bedeuten. In zukünftigen Versuchen ist zu klären, welche Auswirkung die Verteilung des Proteins auf die Aktivierung equiner T-Zellen haben könnte. Diese neuen Erkenntnisse könnten eine Erklärung für die abweichenden Migrationseigenschaften der PBL von an ERU erkrankter Pferde sein.

Die Rolle des Zellmetabolismus erlangt bei Autoimmunerkrankungen des Menschen, wie der Multiplen Sklerose, zunehmend Bedeutung. Neben dem Migrationsverhalten könnte daher auch der Zellmetabolismus equiner PBL weitere Hinweise zu Pathogenese assoziierten Mechanismen der ERU liefern. Die Untersuchung des Zellmetabolismus equiner PBL ergab, dass PBL von an ERU erkrankten Pferden eine erhöhte basale, mitochondriale Respiration und eine gesteigerte glykolytische Stoffwechselaktivität nach Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthase zeigten. Da der Zellmetabolismus einen entscheidenden Einfluss bei der Entstehung autoimmuner Erkrankungen haben kann, gilt es diesen weiter zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Studie wurden neue Erkenntnisse über das Migrationsverhalten equiner PBL durch eine kollagendichte Matrix gewonnen und mögliche funktionelle und regulatorische Proteine nachgewiesen, die an Pathogenese assoziierten Mechanismen der ERU beteiligt sind. Zudem konnten die equinen PBL anhand ihrer Energie- und Stoffwechseleigenschaften näher charakterisiert werden, was Aufschlüsse über die Abhängigkeit mitochondrialer oder glykolytischer Stoffwechselwege erbrachte.

7 SUMMARY

Equine recurrent uveitis is a highly prevalent autoimmune eye disease in horses characterized by recurrent episodes of inflammation, associated with loss of vision in the affected eyes. As with other autoimmune diseases, the underlying pathogenesis of ERU is unknown. Since ERU is the only spontaneous animal model for human autoimmune uveitis, new findings on pathogenesis-associated mechanisms are of great interest, not only for veterinary medicine but also for human medicine. A characteristic feature of ERU is the migration of autoreactive T cells across the blood retina barrier and the infiltration of the inner eye with subsequent destruction of retinal structures. Since the underlying mechanisms that enable autoreactive T cells of horses suffering from ERU to migrate across the blood retina barrier still need to be unveiled, the migration capabilities of equine cells were investigated for the first time. The migratory behavior of peripheral blood leukocytes from healthy and ERU horses were determined and compared within a three-dimensional collagen matrix. The analysis of migration parameters showed that PBL of horses suffering from ERU migrated significantly faster, further and straighter within the three-dimensional environment. Since the molecular mechanisms leading to altered migration abilities of PBL from ERU horses are unknown, the role of potentially involved proteins was examined more closely. Since the cytoskeletal GTPase septin 7 could be a possible reason for aberrant migratory abilities of PBL from ERU horses, due to the significantly lower expression in PBL of ERU horses and its participation in the organization of cytoskeletal structures, the role of this protein was further investigated. To reveal the role of septin 7 in cell migration, PBL from healthy horses were incubated with forchlorfenuron, a reversible chemical inhibitor of septin structures. FCF-treated PBL showed more directed migration through collagen-tight tissue compared to untreated PBL. The expression of septin 7 and interacting F-actin structures was reduced in FCF-treated, migrated PBL and showed aberrant distribution in perinuclear regions. Since the small GTPase Cdc42 is involved in the formation of actin-containing protrusions of migrating cells in activated human T cells, it was interesting to reveal that the expression of Cdc42 was increased in PBL of ERU horses compared to PBL of healthy horses.

Cell activation is crucial for Cdc42 and other molecules involved in actin-dependent migration to function. ZAP70 is essential for T cell activation in murine and human T cells and triggers certain signalling cascades, including Cdc42 activation. Therefore, the aberrant intracellular localization of ZAP70 in PBL of ERU horses might be due to increased activation. The findings of deviant distribution of ZAP70 and its effects on the activation of equine T cells needs to be clarified in future experiments. These new findings elucidate different migration properties of PBL in horses suffering from ERU. The role and investigation of cell metabolism in human autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, has recently gained attention. In addition to migratory behavior, cell metabolism of equine PBL could also provide further conclusions on pathogenesis-associated mechanisms of ERU. The investigation of equine cell metabolism showed that the PBL of ERU diseased horses had increased basal mitochondrial respiration and increased glycolytic metabolic activity after inhibition of mitochondrial ATP synthase. Since deviant cell metabolism can affect the development of autoimmune diseases, it is important to further characterize metabolic pathways. In this study, we gained new insights about the migratory behavior of equine PBL through collagen-dense matrix and about possible functional and regulatory proteins involved in pathogenesis-associated mechanisms of ERU. Additionally, equine PBL were characterized by their energetic and metabolic properties, which provided information on the dependence of mitochondrial or glycolytic metabolic pathways.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbey M.; Gaestel M. and Menon M.B. (2019). "Septins: Active GTPases or just GTP-binding proteins?". *Cytoskeleton* 76 (1):55-62. <https://doi.org/10.1002/cm.21451>
- Abbey M.; Hakim C.; Anand R.; Lafera J.; Schambach A.; Kispert A.; Taft M.H.; Kaefer V.; Kotlyarov A.; Gaestel M. and Menon M.B. (2016). "GTPase domain driven dimerization of SEPT7 is dispensable for the critical role of septins in fibroblast cytokinesis." *Scientific Reports* 6:20007. <https://doi.org/10.1038/srep20007>
- Abboud G.; Choi S.-C.; Kanda N.; Zeumer-Spataro L.; Roopenian D.C. and Morel L. (2018). "Inhibition of Glycolysis Reduces Disease Severity in an Autoimmune Model of Rheumatoid Arthritis." *Frontiers in Immunology* 9 (1973). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01973>
- Almeida L.; Lochner M.; Berod L. and Sparwasser T. (2016). "Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation." *Seminars in Immunology* 28 (5):514-24. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.009>
- Alsadeq A.; Fedders H.; Vokuhl C.; Belau N.M.; Zimmermann M.; Wirbelauer T.; Spielberg S.; Vossen-Gajcy M.; Cario G.; Schrappe M. and Schewe D.M. (2017). "The role of ZAP70 kinase in acute lymphoblastic leukemia infiltration into the central nervous system." *Haematologica* 102 (2):346-55. doi: 10.3324/haematol.2016.147744
- Anaya J.-M.; Ramirez-Santana C.; Alzate M.A.; Molano-Gonzalez N. and Rojas-Villarraga A. (2016). "The Autoimmune Ecology." *Frontiers in Immunology* 7:139. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00139>
- Au-Mookerjee S.A. and Au-Brand M.D. (2015). "Measurement and Analysis of Extracellular Acid Production to Determine Glycolytic Rate." *Journal of Visualized Experiments* (106):e53464. doi: 10.3791/53464
- Bantug G.R.; Galluzzi L.; Kroemer G. and Hess C. (2017). "The spectrum of T cell metabolism in health and disease." *Nature Reviews Immunology* 18:19. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.99>
- Baptista A.P.; Gola A.; Huang Y.; Milanez-Almeida P.; Torabi-Parizi P.; Urban J.F.; Shapiro V.S.; Gerner M.Y. and Germain R.N. (2019). "The Chemoattractant Receptor Ebi2 Drives Intranodal Naive CD4+ T Cell Peripheralization to Promote Effective Adaptive Immunity." *Immunity* Volume 50 (5):1188-201.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.001>
- Bayersdorf R.; Fruscalzo A. and Catania F. (2018). "Linking autoimmunity to the origin of the adaptive immune system." *Evolution, Medicine, and Public Health* 2018 (1):2-12. <https://doi.org/10.1093/emph/eoy001>

- Beber A.; Taveneau C.; Nania M.; Tsai F.-C.; Di Cicco A.; Bassereau P.; Lévy D.; Cabral J.T.; Isambert H.; Mangenot S. and Bertin A. (2019). "Membrane reshaping by micrometric curvature sensitive septin filaments." *Nature Communications* 10 (1):420. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08344-5>
- Berer K.; Mues M.; Koutrolou M.; Rasbi Z.A.; Boziki M.; Johner C.; Wekerle H. and Krishnamoorthy G. (2011). "Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination." *Nature* 479 (7374):538-41. <https://doi.org/10.1038/nature10554>
- Bergström B.; Lundqvist C.; Vasileiadis G.K.; Carlsten H.; Ekwall O. and Ekwall A.-K.H. (2019). "The Rheumatoid Arthritis Risk Gene AIRE Is Induced by Cytokines in Fibroblast-Like Synoviocytes and Augments the Pro-inflammatory Response." *Frontiers in Immunology* 10 (1384). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01384>
- Bing S.J.; Shemesh I.; Chong W.P.; Horai R.; Jittayasothorn Y.; Silver P.B.; Sredni B. and Caspi R.R. (2019). "AS101 ameliorates experimental autoimmune uveitis by regulating Th1 and Th17 responses and inducing Treg cells." *Journal of Autoimmunity* 100:52-61. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.02.006>
- Biswenger V.; Baumann N.; Jürschick J.; Häckl M.; Battle C.; Schwarz J.; Horn E. and Zantl R. (2018). "Characterization of EGF-guided MDA-MB-231 cell chemotaxis in vitro using a physiological and highly sensitive assay system." *PLoS One* 13 (9):e0203040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203040>
- Blanchoin L.; Boujemaa-Paterski R.; Sykes C. and Plastino J. (2014). "Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility." *Physiological Reviews* 94 (1):235-63. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- Boehm T. and Swann J.B. (2014). "Origin and evolution of adaptive immunity." *Annual Review of Animal Biosciences* 2:259-83. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114201>
- Boldison J.; Khera T.K.; Copland D.A.; Stimpson M.L.; Crawford G.L.; Dick A.D. and Nicholson L.B. (2015). "A novel pathogenic RBP-3 peptide reveals epitope spreading in persistent experimental autoimmune uveoretinitis." *The Journal of Immunology* 146 (2):301-11. <https://doi.org/10.1111/imm.12503>
- Bougherara H.; Mansuet-Lupo A.; Alifano M.; Ngô C.; Damotte D.; Le Frère-Belda M.-A.; Donnadieu E. and Peranzoni E. (2015). "Real-Time Imaging of Resident T Cells in Human Lung and Ovarian Carcinomas Reveals How Different Tumor Microenvironments Control T Lymphocyte Migration." *Frontiers in Immunology* 6 (500). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00500>
- Bradford M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* 72 (1-2):248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Brandes K.; Wollanke B.; Niedermaier G.; Brem S. and Gerhards H. (2007). "Recurrent Uveitis in Horses: Vitreal Examinations with Ultrastructural Detection of Leptospire." *Journal of Veterinary Medicine Series A* 54 (5):270-5. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2007.00921.x>
- Brewerton D.A.; Caffrey M.; Nicholls A.; Walters D. and James D.C. (1973). "Acute anterior uveitis and HL-A 27." *The Lancet* 302 (7836):994-6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)91090-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)91090-8)
- Busch M.; Wefelmeyer K.L.; Walscheid K.; Rothaus K.; Bauer D.; Deeg C.A.; Degroote R.L.; Ackermann D.; König S.; Thanos S.; Kasper M. and Heiligenhaus A. (2019). "Identification of Ocular Autoantigens Associated With Juvenile Idiopathic Arthritis-Associated Uveitis." *Frontiers in Immunology* 10 (1793). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01793>
- Calero-Cuenca F.J.; Janota C.S. and Gomes E.R. (2018). "Dealing with the nucleus during cell migration." *Current Opinion in Cell Biology* 50:35-41. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.01.014>
- Capone A.; Bianco M.; Ruocco G.; De Bardi M.; Battistini L.; Ruggieri S.; Gasperini C.; Centonze D.; Sette C. and Volpe E. (2019). "Distinct Expression of Inflammatory Features in T Helper 17 Cells from Multiple Sclerosis Patients." *Cells* 8 (6). <https://doi.org/10.3390/cells8060533>
- Caspi R.R.; Roberge F.G.; Chan C.C.; Wiggert B.; Chader G.J.; Rozenszajn L.A.; Lando Z. and Nussenblatt R.B. (1988). "A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens." *The Journal of Immunology* 140 (5):1490-5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3346541>
- Caspi R.R.; Silver P.B.; Luger D.; Tang J.; Cortes L.M.; Pennesi G.; Mattapallil M.J. and Chan C.-C. (2008). "Mouse models of experimental autoimmune uveitis." *Ophthalmic Research* 40 (3-4):169-74. <https://doi.org/10.1159/000119871>
- Cassaniti I.; Cavagna L.; Calarota S.A.; Adzasehoun K.M.G.; Comolli G.; Montecucco C. and Baldanti F. (2019). "Evaluation of EBV- and HCMV-Specific T Cell Responses in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Patients Using a Normalized Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) Assay." *Journal of Immunology Research* 2019:4236503. <https://doi.org/10.1155/2019/4236503>
- Caswell P.T. and Zech T. (2018). "Actin-Based Cell Protrusion in a 3D Matrix." *Trends in Cell Biology* 28 (10):823-34. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.003>
- Chapman N.M.; Boothby M.R. and Chi H. (2019). "Metabolic coordination of T cell quiescence and activation." *Nature Reviews Immunology* 20:55-70. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0203-y>

- Chen J.; Chernatynskaya A.V.; Li J.W.; Kimbrell M.R.; Cassidy R.J.; Perry D.J.; Muir A.B.; Atkinson M.A.; Brusko T.M. and Mathews C.E. (2017). "T cells display mitochondria hyperpolarization in human type 1 diabetes." *Scientific Reports* 7 (1):10835. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11056-9>
- Chen J.; Chia N.; Kalari K.R.; Yao J.Z.; Novotna M.; Paz Soldan M.M.; Luckey D.H.; Marietta E.V.; Jeraldo P.R.; Chen X.; Weinshenker B.G.; Rodriguez M.; Kantarci O.H.; Nelson H.; Murray J.A. and Mangalam A.K. (2016). "Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls." *Scientific Reports* 6:28484. <https://doi.org/10.1038/srep28484>
- Chen J.; Qian H.; Horai R.; Chan C.C.; Falick Y. and Caspi R.R. (2013). "Comparative analysis of induced vs. spontaneous models of autoimmune uveitis targeting the interphotoreceptor retinoid binding protein." *PLoS One* 8 (8):e72161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072161>
- Chen M.; Luo C.; Zhao J.; Devarajan G. and Xu H. (2019). "Immune regulation in the aging retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 69:159-72. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.10.003>
- Chen Y.; Colello J.; Jarjour W. and Zheng S.G. (2019). "Cellular Metabolic Regulation in the Differentiation and Function of Regulatory T Cells." *Cells* 8 (2). <https://doi.org/10.3390/cells8020188>
- Chiang Y.J. and Hodes R.J. (2015). "Regulation of T cell development by c-Cbl: essential role of Lck." *International Immunology* 27 (5):245-51. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu105>
- Cluxton D.; Petrasca A.; Moran B. and Fletcher J.M. (2019). "Differential Regulation of Human Treg and Th17 Cells by Fatty Acid Synthesis and Glycolysis." *Frontiers in Immunology* 10:115. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00115>
- Crane I.J. and Liversidge J. (2008). "Mechanisms of leukocyte migration across the blood–retina barrier." *Seminars in Immunopathology* 30 (2):165-77. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0106-7>
- Crane I.J.; Xu H.; Wallace C.; Manivannan A.; Mack M.; Liversidge J.; Marquez G.; Sharp P.F. and Forrester J.V. (2006). "Involvement of CCR5 in the passage of Th1-type cells across the blood-retina barrier in experimental autoimmune uveitis." *Journal of Leukocyte Biology* 79 (3):435-43. <https://doi.org/10.1189/jlb.0305130>
- Cretenet G.; Clerc I.; Matias M.; Loisel S.; Craveiro M.; Oburoglu L.; Kinet S.; Mongellaz C.; Dardalhon V. and Taylor N. (2016). "Cell surface Glut1 levels distinguish human CD4 and CD8 T lymphocyte subsets with distinct effector functions." *Scientific Reports* 6:24129. <https://doi.org/10.1038/srep24129>

- Dana H.; Chalbatani G.M.; Mahmoodzadeh H.; Karimloo R.; Rezaiean O.; Moradzadeh A.; Mehmandoost N.; Moazzen F.; Mazraeh A.; Marmari V.; Ebrahimi M.; Rashno M.M.; Abadi S.J. and Gharagouzlo E. (2017). "Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA." *International Journal of Biomedical Science* 13 (2):48-57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5542916/>
- Dargahi N; Katsara M.; Tselios T.; Androutsou M.-E.; De Courten M.; Matsoukas J. and Apostolopoulos V. (2017). "Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update." *Brain Sciences* 7(7). <https://doi.org/10.3390/brainsci7070078>
- Davidson P.M.; Denais C.; Bakshi M.C. and Lammerding J. (2014). "Nuclear deformability constitutes a rate-limiting step during cell migration in 3-D environments." *Cellular and Molecular Bioengineering* 7 (3):293-306. <https://doi.org/10.1007/s12195-014-0342-y>
- de Andrade F.A.; Fiorot S.H.S.; Benchimol E.I.; Provenzano J.; Martins V.J. and Levy R.A. (2016). "The autoimmune diseases of the eyes." *Autoimmunity Reviews* 15 (3):258-71. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.12.001>
- Deeg C.A. (2008). "Ocular immunology in equine recurrent uveitis." *Veterinary Ophthalmology* 11 Suppl 1:61-5. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2008.00625.x>
- Deeg C.A.; Amann B.; Raith A. and Kaspers B. (2006). "Inter- and Intramolecular Epitope Spreading in Equine Recurrent Uveitis." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47 (2):652-6. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0789>
- Deeg C.A.; Hauck S.M.; Amann B.; Pompetzki D.; Altmann F.; Raith A.; Schmalzl T.; Stangassinger M. and Ueffing M. (2008). "Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis." *Ophthalmic Research* 40 (3-4):151-3. <https://doi.org/10.1159/000119867>
- Deeg C.A.; Kaspers B.; Gerhards H.; Thurau S.R.; Wollanke B. and Wildner G. (2001). "Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (2):393-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11157872>
- Deeg C.A.; Marti E.; Gaillard C. and Kaspers B. (2004). "Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9." *Equine Veterinary Journal* 36 (1):73-5. <https://doi.org/10.2746/0425164044864651>
- 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." *Molecular & Cellular Proteomics* 5 (8):1462-70. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500352-MCP200>

- Deeg C.A.; Raith A.J.; Amann B.; Crabb J.W.; Thurau S.R.; Hauck S.M.; Ueffing M.; Wildner G. and Stangassinger M. (2007). "CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis." *Clinical and Developmental Immunology* 2007:39245. <https://doi.org/10.1155/2007/39245>
- Deeg C.A.; Reese S.; Gerhards H.; Wildner G. and Kaspers B. (2004). "The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45 (7):2286-92. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1226>
- Deeg C.A.; Thurau S.R.; Gerhards H.; Ehrenhofer M.; Wildner G. and Kaspers B. (2002). "Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease." *European Journal of Immunology* 32 (9):2598-606. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12207344>
- Degroote R.L.; Hauck S.M.; Amann B.; Hirmer S.; Ueffing M. and Deeg C.A. (2014). "Unraveling the equine lymphocyte proteome: differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis." *PLoS One* 9 (3):e91684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091684>
- Degroote R.L.; Uhl P.B.; Amann B.; Krackhardt A.M.; Ueffing M.; Hauck S.M. and Deeg C.A. (2017). "Formin like 1 expression is increased on CD4+ T lymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis." *Journal of Proteomics* 154:102-8. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.12.015>
- DeMay B.S.; Meseroll R.A.; Occhipinti P. and Gladfelter A.S. (2010). "Cellular requirements for the small molecule forchlorfenuron to stabilize the septin cytoskeleton." *Cytoskeleton* 67 (6):383-99. <https://doi.org/10.1002/cm.20452>
- Desdín-Micó G.; Soto-Heredero G. and Mittelbrunn M. (2018). "Mitochondrial activity in T cells." *Mitochondrion* 41:51-7. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.10.006>
- DeVoss J.; Hou Y.; Johannes K.; Lu W.; Liou G.I.; Rinn J.; Chang H.; Caspi R.R.; Fong L. and Anderson M.S. (2006). "Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen." *Journal of Experimental Medicine* 203 (12):2727-35. <https://doi.org/10.1084/jem.20061864>
- Dick A.D.; Rosenbaum J.T.; Al-Dhibi H.A.; Belfort R.; Brézin A.P.; Chee S.P.; Davis J.L.; Ramanan A.V.; Sonoda K.-H.; Carreño E.; Nascimento H.; Salah S.; Salek S.; Siak J.; Steeples L.; Accorinti M.; Acharya N.; Adan A.; Agrawal R.; Akkoc N.; Al Ghamdi S.; Al Ghamdi T.; Al Saati A.; Alsabaani N.; Al-Shamarani M.; Bachta A.; Barisani-Asenbauer T.; Beare N.; Porto F.B.O.; Blanco R.; Yee A.C.S.; Chandran V.; Chiquet C.; Chng H.H.; Cimbaldas A.; Cimino L.; Cordero-Coma M.; Cristobal C.; Cuevas M.; Eurico da Fonseca J.; de Boer J.; de la Torre A.; De Schryver I.; Derzko-Dzulynsky L.; Diaz-Valle D.; Merino C.E.D.; Facsko A.; Figueira L.; Fonollosa A.; Fortin E.; Gale R.; Galeazzi M.; Garcia S.; Garcia Ruiz de Morales J.M.; Gašperšič N.; Goldstein D.; Guedes M.; Guex-Crosier Y.; Gul A.; Hamam R.; Haroon M.; Hasegawa K.; Heiligenhaus A.; Hooper C.; Hwang Y.-S.; Hwang D.-K.; Juanola X.; Kaburaki T.; Kadayifcilar S.; Kempen J.; Kezuka T.; Kherani A.; Kirsimäe M.; Kotaniemi K.; Kraut A.; Kubicka-Trzaska

- A.; Kuffova L.; Lightman S.; Lim L.; Lim W.K.; McCluskey P.; McGuire M.; Mirabelli P.; Misericocchi E.; Misiuk-Hojło M.; Muccioli C.; Muñoz S.; Murphy C.; Murray P.I.; Nagy Z.; Namba K.; Neri P.; Nguyen Q.; O'Gradaigh D.; Omair M.; Otsa K.; Ozyazgan Y.; Pablo F.; Paroli M.P.; Pleyer U.; Poór G.; Proença R.; Rabinovitch T.; Read R.; Rebrov M.; Recillas-Gispert C.; Rothova A.; Schwartzman S.; Seve P.; Sharma S.; Sims J.; Sohár N.; Suhler E.; Szántó S.; Szepessy Z.; Tappeiner C.; Thorne J.; Tugal Tutkun I.; Turno-Kręćicka A.; Van Calster J.; van der Horst-Bruinsma I.; Vidovič Valentinčič N.; Vitale A.; Voorduin Ramos S.; Vukojevic N.; Wakefield D.; Willermain F.; Yalcindag N.; Yamamoto J.H.; Yeh S.; Zemaitiene R. and Ziouzina O. (2018). "Guidance on Noncorticosteroid Systemic Immunomodulatory Therapy in Noninfectious Uveitis: Fundamentals Of Care for Uveitis (FOCUS) Initiative." *Ophthalmology* 125 (5):757-73. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.11.017>
- Dick A.D.; Tundia N.; Sorg R.; Zhao C.; Chao J.; Joshi A. and Skup M. (2016). "Risk of Ocular Complications in Patients with Noninfectious Intermediate Uveitis, Posterior Uveitis, or Panuveitis." *Ophthalmology* 123 (3):655-62. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2015.10.028>
- Dimeloe S.; Mehling M.; Frick C.; Loeliger J.; Bantug G.R.; Sauder U.; Fischer M.; Belle R.; Develioglu L.; Tay S.; Langenkamp A. and Hess C. (2016). "The Immune-Metabolic Basis of Effector Memory CD4+ T Cell Function under Hypoxic Conditions." *The Journal of Immunology* 196 (1):106-14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501766>
- Dolat L.; Hunyara J.L.; Bowen J.R.; Karasmanis E.P.; Elgawly M.; Galkin V.E. and Spiliotis E.T. (2014). "Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility." *The Journal of Cell Biology* 207 (2):225-35. <https://doi.org/10.1083/jcb.201405050>
- Dominguez G.A.; Anderson N.R. and Hammer D.A. (2015). "The direction of migration of T-lymphocytes under flow depends upon which adhesion receptors are engaged." *Integrative Biology : quantitative biosciences from nano to macro* 7 (3):345-55. <https://doi.org/10.1039/c4ib00201f>
- Dupré L.; Houmadi R.; Tang C. and Rey-Barroso J. (2015). "T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors." *Frontiers in Immunology* 6 (586). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00586>
- Eagar T.N. and Miller S.D. (2019). "Helper T-Cell Subsets and Control of the Inflammatory Response." In *Clinical Immunology (Fifth Edition)*, edited by Rich, Robert R.; Fleisher, Thomas A.; Shearer, William T.; Schroeder, Harry W.; Frew, Anthony J. and Weyand, Cornelia M., 235-45.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00016-8>
- Egwuagu C.E.; Sztejn J.; Mahdi R.M.; Li W.; Chao-Chan C.; Smith J.A.; Charukamnoetkanok P. and Chepelinsky A.B. (1999). "IFN-gamma increases the severity and accelerates the onset of experimental autoimmune uveitis in transgenic rats." *The Journal of Immunology* 162 (1):510-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9886427>

- Ehrenhofer M.C.; Deeg C.A.; Reese S.; Liebich H.G.; Stangassinger M. and Kaspers B. (2002). "Normal structure and age-related changes of the equine retina." *Veterinary Ophthalmology* 5 (1):39-47. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.2002.00210.x>
- Eisenfeld A.J.; Bunt-Milam A.H. and Saari J.C. (1987). "Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein." *Experimental Eye Research* 44 (3):425-38. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(87\)80176-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(87)80176-8)
- Evans R.; Lellouch A.C.; Svensson L.; McDowall A. and Hogg N. (2011). "The integrin LFA-1 signals through ZAP-70 to regulate expression of high-affinity LFA-1 on T lymphocytes." *Blood* 117 (12):3331-42. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-289140>
- Fahima A.; Levinkron S.; Maytal Y.; Hugger A.; Lax I.; Huang X.; Eyal Y.; Lichter A.; Goren M.; Stern R.A. and Harpaz-Saad S. (2019). "Cytokinin treatment modifies litchi fruit pericarp anatomy leading to reduced susceptibility to post-harvest pericarp browning." *Plant Science* 283:41-50. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.02.006>
- Fernandez-Borja M.; van Buul J.D. and Hordijk P.L. (2010). "The regulation of leucocyte transendothelial migration by endothelial signalling events." *Cardiovascular Research* 86 (2):202-10. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq003>
- Fischer B.M.; McMullen R.J., Jr.; Reese S. and Brehm W. (2019). "Intravitreal injection of low-dose gentamicin for the treatment of recurrent or persistent uveitis in horses: Preliminary results." *BMC Veterinary Research* 15 (1):29. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1722-7>
- Franz K.M. and Kagan J.C. (2017). "Innate Immune Receptors as Competitive Determinants of Cell Fate." *Molecular Cell* 66 (6):750-60. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.009>
- Freer H.; Hillegas J.M.; Wimer C.; Baldwin C.; LaBresh J. and Wagner B. (2017). "A monoclonal antibody for detection of intracellular and secreted interleukin-2 in horses." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 191:30-5. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.07.011>
- Friedl P.; Zänker K.S. and Bröcker E.-B. (1998). "Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: Differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function." *Microscopy Research and Technique* 43 (5):369-78. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19981201\)43:5<369::AID-JEMT3>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981201)43:5<369::AID-JEMT3>3.0.CO;2-6)
- Frühauf B.; Ohnesorge B.; Deegen E. and Boevé M. (1998). "Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy." *Veterinary Ophthalmology* 1 (2-3):137-51. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.1998.00030.x>

- Gaber T.; Chen Y.; Krauß P.L. and Buttgereit F. (2019). "Metabolism of T Lymphocytes in Health and Disease." *International Review of Cell Molecular Biology* 342:95-148. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.06.002>
- Gadea G. and Blangy A. (2014). "Dock-family exchange factors in cell migration and disease." *European Journal of Cell Biology* 93 (10-12):466-77. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.06.003>
- Galgani M.; De Rosa V. and Matarese G. (2015). "T cell metabolism and susceptibility to autoimmune diseases." *Molecular Immunology* 68 (2, Part C):558-63. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.035>.
- García-Bernal D.; Parmo-Cabañas M.; Dios-Esponera A.; Samaniego R.; de la Ossa D.H.-P. and Teixidó J. (2009). "Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion." *Immunity* 31 (6):953-64. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.021>
- Garçon F. and Okkenhaug K. (2016). "PI3K δ promotes CD4+ T-cell interactions with antigen-presenting cells by increasing LFA-1 binding to ICAM-1." *Immunology & Cell Biology* 94 (5):486-95. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.1>
- Gaylo A.; Overstreet M.G. and Fowell D.J. (2016). "Imaging CD4 T Cell Interstitial Migration in the Inflamed Dermis." *Journal of Visualized Experiments* (109):e53585. doi:10.3791/53585
- Gerding J.C. and Gilger B.C. (2016). "Prognosis and impact of equine recurrent uveitis." *Equine Veterinary Journal* 48 (3):290-8. <https://doi.org/10.1111/evj.12451>
- Gerhards H. and Winterberg A. (1997). "Langzeitergebnisse der Pars-plana-Vitrektomie bei equiner rezidivierender Uveitis." *Pferdeheilkunde* 13 (4): 377-83. doi: 10.21836/PEM19970409
- Gery I. and Caspi R.R. (2018). "Tolerance Induction in Relation to the Eye." *Frontiers in Immunology* 9:2304. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02304>
- Gery I.; Wiggert B.; Redmond T.M.; Kuwabara T.; Crawford M.A.; Vistica B.P. and Chader G.J. (1986). "Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 27 (8):1296-300. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3488297>
- Gilger B.C. and Deeg C. (2011). "Equine Recurrent Uveitis." In *Equine Ophthalmology (Second Edition)*, edited by Gilger, B.C., Saint-Louis: W.B. Saunders: 317-49.
- Gilger B.C.; Malok E.; Cutter K.V.; Stewart T.; Horohov D.W. and Allen J.B. (1999). "Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 71 (1):17-28. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00082-3)

- Gilger B.C. and Michau T.M. (2004). "Equine recurrent uveitis: new methods of management." *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 20 (2):417-27. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2004.04.010>
- Gilger B.C.; Salmon J.H.; Wilkie D.A.; Cruysberg L.P.; Kim J.; Hayat M.; Kim H.; Kim S.; Yuan P.; Lee S.S.; Harrington S.M.; Murray P.R.; Edelhauser H.F.; Csaky K.G. and Robinson M.R. (2006). "A novel bioerodible deep scleral lamellar cyclosporine implant for uveitis." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47 (6):2596-605. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1540>
- Gilger B.C. and Stoppini R. (2011). "Equine Ocular Examination: Routine and Advanced Diagnostic Techniques." In *Equine Ophthalmology (Second Edition)*, edited by Gilger, B.C., Saint Louis: W.B. Saunders: 1-51. <https://www.elsevier.com/books/equine-ophthalmology/9781437708462>
- Gilger B.C.; Wilkie D.A.; Clode A.B.; McMullen Jr R.J.; Utter M.E.; Komaromy A.M.; Brooks D.E. and Salmon J.H. (2010). "Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis." *Veterinary Ophthalmology* 13 (5):294-300. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2010.00807.x>
- Girard J.P.; Moussion C. and Forster R. (2012). "HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes." *Nature Reviews Immunology* 12 (11):762-73. <https://doi.org/10.1038/nri3298>
- Griffith J.W.; Sokol C.L. and Luster A.D. (2014). "Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity." *Annual Review of Immunology* 32 (1):659-702. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>
- Hagiwara A.; Tanaka Y.; Hikawa R.; Morone N.; Kusumi A.; Kimura H. and Kinoshita M. (2011). "Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton." *Cytoskeleton* 68 (9):512-25. <https://doi.org/10.1002/cm.20528>
- Harada Y.; Tanaka Y.; Terasawa M.; Pieczyk M.; Habiro K.; Katakai T.; Hanawa-Suetsugu K.; Kukimoto-Niino M.; Nishizaki T.; Shirouzu M.; Duan X.; Uruno T.; Nishikimi A.; Sanematsu F.; Yokoyama S.; Stein J.V.; Kinashi T. and Fukui Y. (2012). "DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses." *Blood* 119 (19):4451-61. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-407098>
- Hartwell L.H. (1971). "Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis." *Experimental Cell Research* 69 (2):265-76. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90223-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90223-0)
- Haston W.S.; Shields J.M. and Wilkinson P.C. (1982). "Lymphocyte locomotion and attachment on two-dimensional surfaces and in three-dimensional matrices." *The Journal of Cell Biology* 92 (3):747-52. <https://doi.org/10.1083/jcb.92.3.747>

- Heasley L.R.; Garcia G., 3rd and McMurray M.A. (2014). "Off-target effects of the septin drug forchlorfenuron on nonplant eukaryotes." *Eukaryotic Cell* 13 (11):1411-20. doi: 10.1128/EC.00191-14
- Henriquez C.; Perez B.; Morales N.; Sarmiento J.; Carrasco C.; Moran G. and Folch H. (2014). "Participation of T regulatory cells in equine recurrent airway obstruction." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 158 (3-4):128-34. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.12.005>
- HoHsieh A.; Wang C.M.; Wu Y.-J.J.; Chen A.; Chang M.-I. and Chen J.-Y. (2017). "B cell epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein 65 (HCMV pp65) induced anti-dsDNA antibody in BALB/c mice." *Arthritis Research & Therapy* 19 (1):65. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1268-2>
- Hong L.; Kenney S.R.; Phillips G.K.; Simpson D.; Schroeder C.E.; Noth J.; Romero E.; Swanson S.; Waller A.; Strouse J.J.; Carter M.; Chigaev A.; Ursu O.; Oprea T.; Hjelle B.; Golden J.E.; Aube J.; Hudson L.G.; Buranda T.; Sklar L.A. and Wandinger-Ness A. (2013). "Characterization of a Cdc42 protein inhibitor and its use as a molecular probe." *Journal of Biological Chemistry* 288 (12):8531-43. doi: 10.1074/jbc.M112.435941
- Horai R. and Caspi R.R. (2019). "Microbiome and Autoimmune Uveitis." *Frontiers in Immunology* 10 (232). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00232>
- Horai R.; Silver P.B.; Chen J.; Agarwal R.K.; Chong W.P.; Jittayasothorn Y.; Mattapallil M.J.; Nguyen S.; Natarajan K.; Villasmil R.; Wang P.; Karabekian Z.; Lytton S.D.; Chan C.C. and Caspi R.R. (2013). "Breakdown of immune privilege and spontaneous autoimmunity in mice expressing a transgenic T cell receptor specific for a retinal autoantigen." *Journal of Autoimmunity* 44:21-33. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.003>
- Horai R.; Zárate-Bladés Carlos R.; Dillenburg-Pilla P.; Chen J.; Kielczewski Jennifer L.; Silver Phyllis B.; Jittayasothorn Y.; Chan C.-C.; Yamane H.; Honda K. and Caspi Rachel R. (2015). "Microbiota-Dependent Activation of an Autoreactive T Cell Receptor Provokes Autoimmunity in an Immunologically Privileged Site." *Immunity* 43 (2):343-53. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.014>
- Hu Q.; Nelson W.J. and Spiliotis E.T. (2008). "Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics." *Journal of Biological Chemistry* 283 (43):29563-71. doi: 10.1074/jbc.M804962200
- Humphries-Bickley T.; Castillo-Pichardo L.; Hernandez-O'Farrill E.; Borrero-Garcia L.D.; Forestier-Roman I.; Gerena Y.; Blanco M.; Rivera-Robles M.J.; Rodriguez-Medina J.R.; Cubano L.A.; Vlaar C.P. and Dharmawardhane S. (2017). "Characterization of a Dual Rac/Cdc42 Inhibitor MBQ-167 in Metastatic Cancer." *Molecular Cancer Therapeutics* 16 (5):805-18. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0442

- Issekutz A.C.; Quinn P.J.; Lang B.; Ramsey S.; Huber A.M.; Rowter D.; Karkada M. and Issekutz T.B. (2011). "Coexpression of chemokine receptors CCR5, CXCR3, and CCR4 and ligands for P- and E-selectin on T lymphocytes of patients with juvenile idiopathic arthritis." *Arthritis & Rheumatism* 63 (11):3467-76. <https://doi.org/10.1002/art.30521>
- Iwase M.; Okada S.; Oguchi T. and Toh-e A. (2004). "Forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin, disturbs septin organization in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes & Genetic Systems* 79 (4):199-206. <https://doi.org/10.1266/ggs.79.199>
- Jabs D.A.; Nussenblatt R.B. and Rosenbaum J.T. (2005). "Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop." *American Journal of Ophthalmology* 140 (3):509-16. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.03.057>
- Jackson A.L.; Burchard J.; Schelter J.; Chau B.N.; Cleary M.; Lim L. and Linsley P.S. (2006). "Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity." *RNA Society* 12 (7):1179-87. doi: 10.1261/rna.25706
- Janeway C.A. and Medzhitov R. (2002). "Innate Immune Recognition." *Annual Review of Immunology* 20 (1):197-216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Janssen E.; Tohme M.; Hedayat M.; Leick M.; Kumari S.; Ramesh N.; Massaad M.J.; Ullas S.; Azcutia V.; Goodnow C.C.; Randall K.L.; Qiao Q.; Wu H.; Al-Herz W.; Cox D.; Hartwig J.; Irvine D.J.; Luscinskas F.W. and Geha R.S. (2016). "A DOCK8-WIP-WASp complex links T cell receptors to the actin cytoskeleton." *Journal of Clinical Investigations* 126 (10):3837-51. <https://doi.org/10.1172/JCI85774>
- Jia Z.-f.; Huang Q.; Kang C.-s.; Yang W.-d.; Wang G.-x.; Yu S.-z.; Jiang H. and Pu P.-y. (2010). "Overexpression of septin 7 suppresses glioma cell growth." *Journal of Neuro-Oncology* 98 (3):329-40. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-0092-1>
- Kamola P.J.; Nakano Y.; Takahashi T.; Wilson P.A. and Ui-Tei K. (2015). "The siRNA Non-seed Region and Its Target Sequences Are Auxiliary Determinants of Off-Target Effects." *PLoS Computational Biology* 11 (12):e1004656. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004656>
- Katakai T.; Habiro K. and Kinashi T. (2013). "Dendritic Cells Regulate High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node via LFA-1/ICAM-1." *The Journal of Immunology* 191 (3):1188-99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300739>
- Katakai T. and Kinashi T. (2016). "Microenvironmental Control of High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node." *Frontiers in Immunology* 7 (194). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00194>

- Kaufmann U.; Diedrichs-Möhring M. and Wildner G. (2012). "Dynamics of intraocular IFN- γ , IL-17 and IL-10-producing cell populations during relapsing and monophasic rat experimental autoimmune uveitis." *PLoS One* 7 (11):e49008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049008>
- Khan A.; Newby J. and Gladfelter A.S. (2018). "Control of septin filament flexibility and bundling by subunit composition and nucleotide interactions." *Molecular Biology of the Cell* 29 (6):702-12. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-10-0608>
- Kleinwort K.J.; Amann B.; Hauck S.M.; Feederle R.; Sekundo W. and Deeg C.A. (2016). "Immunological Characterization of Intraocular Lymphoid Follicles in a Spontaneous Recurrent Uveitis Model." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57 (10):4504-11. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19787>
- Kodati S. and Weng C.Y. (2019). "Current and Emerging Pharmaceutical Therapies for Noninfectious Uveitis." *International Ophthalmology Clinics* 59 (1):111-26. doi: 10.1097/iio.0000000000000253
- Koenderman L.; Buurman W. and Daha M.R. (2014). "The innate immune response." *Immunology Letters* 162 (2, Part B):95-102. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.010>
- Koyama-Honda I.; Ritchie K.; Fujiwara T.; Iino R.; Murakoshi H.; Kasai R.S. and Kusumi A. (2005). "Fluorescence imaging for monitoring the colocalization of two single molecules in living cells." *Biophysical Journal* 88 (3):2126-36. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048967>
- Kubach J.; Lutter P.; Bopp T.; Stoll S.; Becker C.; Huter E.; Richter C.; Weingarten P.; Warger T.; Knop J.; Mullner S.; Wijdenes J.; Schild H.; Schmitt E. and Jonuleit H. (2007). "Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function." *Blood* 110 (5):1550-8. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-069229>
- Kubelkova K. and Macela A. (2019). "Innate Immune Recognition: An Issue More Complex Than Expected." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9 (241). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00241>
- Kulbrock M.; Lehner S.; Metzger J.; Ohnesorge B. and Distl O. (2013). "A Genome-Wide Association Study Identifies Risk Loci to Equine Recurrent Uveitis in German Warmblood Horses." *PLoS One* 8 (8):e71619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071619>
- Laemmli U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259):680-5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lam M. and Calvo F. (2019). "Regulation of mechanotransduction: Emerging roles for septins." *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 76 (1):115-22. <https://doi.org/10.1002/cm.21485>

- Lämmermann T.; Bader B.L.; Monkley S.J.; Worbs T.; Wedlich-Söldner R.; Hirsch K.; Keller M.; Förster R.; Critchley D.R.; Fässler R. and Sixt M. (2008). "Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing." *Nature* 453:51-55. <https://doi.org/10.1038/nature06887>
- Lämmermann T. and Germain R.N. (2014). "The multiple faces of leukocyte interstitial migration." *Seminars in Immunopathology* 36 (2):227-51. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0418-8>
- Lämmermann T. and Sixt M. (2009). "Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration." *Current Opinion in Cell Biology* 21 (5):636-44. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.05.003>
- Launois T.; González Hilarión L.M.; Barbe F.; Leurquin C.; Bihin B.; Hontoir F.; Dugdale A. and Vandeweerd J.M. (2019). "Use of Intravitreal Injection of Gentamicin in 71 Horses With Equine Recurrent Uveitis." *Journal of Equine Veterinary Science* 77:93-7. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.02.018>
- Lazarski C.A.; Ford J.; Katzman S.D.; Rosenberg A.F. and Fowell D.J. (2013). "IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance." *PLoS One* 8 (8):e71949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071949>
- Lee R.W.; Nicholson L.B.; Sen H.N.; Chan C.-C.; Wei L.; Nussenblatt R.B. and Dick A.D. (2014). "Autoimmune and autoinflammatory mechanisms in uveitis." *Seminars in Immunopathology* 36 (5):581-94. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0433-9>
- Lehmann P.V.; Forsthuber T.; Miller A. and Sercarz E.E. (1992). "Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen." *Nature* 358 (6382):155-7. <https://doi.org/10.1038/358155a0>
- Li X.; Liang D.; Shao H.; Born W.K.; Kaplan H.J. and Sun D. (2019). "Adenosine receptor activation in the Th17 autoimmune responses of experimental autoimmune uveitis." *Cellular Immunology* 339:24-28. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.09.004>
- Lindsey A.E. and Townes-Anderson E. (2018). "Antibiotics Reduce Retinal Cell Survival In Vitro." *Neurotoxicity Research* 33 (4):781-9. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9826-6>
- Lo W.-L.; Shah N.H.; Ahsan N.; Horkova V.; Stepanek O.; Salomon A.R.; Kuriyan J. and Weiss A. (2018). "Lck promotes Zap70-dependent LAT phosphorylation by bridging Zap70 to LAT." *Nature Immunology* 19 (7):733-41. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0131-1>
- Lu L.; Barbi J. and Pan F. (2017). "The regulation of immune tolerance by FOXP3." *Nature Reviews Immunology* 17 (11):703-17. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.75>

- Luger D.; Silver P.B.; Tang J.; Cua D.; Chen Z.; Iwakura Y.; Bowman E.P.; Sgambellone N.M.; Chan C.C. and Caspi R.R. (2008). "Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category." *Journal of Experimental Medicine* 205 (4):799-810. <https://doi.org/10.1084/jem.20071258>
- Macintyre A.N.; Gerriets V.A.; Nichols A.G.; Michalek R.D.; Rudolph M.C.; Deoliveira D.; Anderson S.M.; Abel E.D.; Chen B.J.; Hale L.P. and Rathmell J.C. (2014). "The Glucose Transporter Glut1 Is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function." *Cell Metabolism* 20 (1):61-72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.004>
- MacIver N.J.; Michalek R.D. and Rathmell J.C. (2013). "Metabolic regulation of T lymphocytes." *Annual Review of Immunology* 31:259-83. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>
- Majri S.S.; Fritz J.M.; Villarino A.V.; Zheng L.; Kanellopoulou C.; Chaigne-Delalande B.; Gronholm J.; Niemela J.E.; Afzali B.; Biancalana M.; Pittaluga S.; Sun A.; Cohen J.L.; Holland S.M.; O'Shea J.J.; Uzel G. and Lenardo M.J. (2018). "STAT5B: A Differential Regulator of the Life and Death of CD4(+) Effector Memory T Cells." *The Journal of Immunology* 200 (1):110-8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701133>
- Malalana F.; Stylianides A. and McGowan C. (2015). "Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives." *The Veterinary Journal* 206 (1):22-9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.017>
- Manes T.D. and Pober J.S. (2013). "TCR-driven transendothelial migration of human effector memory CD4 T cells involves Vav, Rac, and myosin IIA." *The Journal of Immunology* 190 (7):3079-88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201817>
- Manresa-Arraut A.; Johansen F.F.; Brakebusch C.; Issazadeh-Navikas S. and Hasseldam H. (2018). "RhoA Drives T-Cell Activation and Encephalitogenic Potential in an Animal Model of Multiple Sclerosis." *Frontiers in Immunology* 9 (1235). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01235>
- Marelli-Berg F.M. and Jangani M. (2018). "Metabolic regulation of leukocyte motility and migration." *Journal of Leukocyte Biology* 104 (2):285-93. <https://doi.org/10.1002/JLB.1MR1117-472R>
- McClain M.T.; Heinlen L.D.; Dennis G.J.; Roebuck J.; Harley J.B. and James J.A. (2005). "Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry." *Nature Medicine* 11 (1):85-9. <https://doi.org/10.1038/nm1167>
- McGregor A.L.; Hsia C.-R. and Lammerding J. (2016). "Squish and squeeze-the nucleus as a physical barrier during migration in confined environments." *Current Opinion in Cell Biology* 40:32-40. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.011>

- McKinney E.F.; Lee J.C.; Jayne D.R.; Lyons P.A. and Smith K.G. (2015). "T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection." *Nature* 523 (7562):612-6. <https://doi.org/10.1038/nature14468>
- McKinney E.F. and Smith K.G.C. (2018). "Metabolic exhaustion in infection, cancer and autoimmunity." *Nature Immunology* 19 (3):213-21. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0045-y>
- McMullen R.J. and Fischer B.M. (2017). "Medical and Surgical Management of Equine Recurrent Uveitis." *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 33 (3):465-81. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2017.07.003>
- McQuilken M.; Jentsch M.S.; Verma A.; Mehta S.B.; Oldenbourg R. and Gladfelter A.S. (2017). "Analysis of Septin Reorganization at Cytokinesis Using Polarized Fluorescence Microscopy." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5 (42). <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00042>
- McRae B.L.; Vanderlugt C.L.; Dal Canto M.C. and Miller S.D. (1995). "Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Journal of Experimental Medicine* 182 (1):75-85. <https://doi.org/10.1084/jem.182.1.75>
- Medawar P.B. (1948). "Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye." *British Journal of Experimental Pathology* 29 (1):58-69. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18865105>
- Meredith M.; Zemmour D.; Mathis D. and Benoist C. (2015). "Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity." *Nature Immunology* 16 (9):942-9. <https://doi.org/10.1038/ni.3247>
- Michalek R.D.; Gerriets V.A.; Jacobs S.R.; Macintyre A.N.; MacIver N.J.; Mason E.F.; Sullivan S.A.; Nichols A.G. and Rathmell J.C. (2011). "Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4+ T Cell Subsets." *The Journal of Immunology* 186 (6):3299-303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>
- Mikhail M. and Sallam A. (2013). "Novel Intraocular Therapy in Non-infectious Uveitis of the Posterior Segment of the Eye." *Medical Hypothesis, Discovery & Innovation Ophthalmology Journal* 2 (4):113-20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24822232>
- Miller D.; Tallmadge R.L.; Binns M.; Zhu B.; Mohamoud Y.A.; Ahmed A.; Brooks S.A. and Antczak D.F. (2017). "Polymorphism at expressed DQ and DR loci in five common equine MHC haplotypes." *Immunogenetics* 69 (3):145-56. <https://doi.org/10.1007/s00251-016-0964-4>
- Miyasaka M. and Tanaka T. (2004). "Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas." *Nature Reviews Immunology* 4 (5):360-70. <https://doi.org/10.1038/nri1354>

- Mookerjee S.A.; Goncalves R.L.S.; Gerencser A.A.; Nicholls D.G. and Brand M.D. (2015). "The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847 (2):171-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.10.005>
- Mostowy S. and Cossart P. (2012). "Septins: the fourth component of the cytoskeleton." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (3):183-94. <https://doi.org/10.1038/nrm3284>
- Muller W.A. (2016). "Transendothelial migration: unifying principles from the endothelial perspective." *Immunological Reviews* 273 (1):61-75. <https://doi.org/10.1111/imr.12443>
- Nakamura Y.K.; Janowitz C.; Metea C.; Asquith M.; Karstens L.; Rosenbaum J.T. and Lin P. (2017). "Short chain fatty acids ameliorate immune-mediated uveitis partially by altering migration of lymphocytes from the intestine." *Scientific Reports* 7 (1):11745. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12163-3>
- Nemazee D. (2006). "Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance." *Nature Reviews Immunology* 6 (10):728-40. <https://doi.org/10.1038/nri1939>
- Neo J.Y.J.; Wee S.Y.K.; Bonne I.; Tay S.H.; Raida M.; Jovanovic V.; Fairhurst A.-M.; Lu J.; Hanson B.J. and MacAry P.A. (2019). "Characterisation of a human antibody that potentially links cytomegalovirus infection with systemic lupus erythematosus." *Scientific Reports* 9 (1):9998. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46329-y>
- Neubauer K. and Zieger B. (2017). "The Mammalian Septin Interactome." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5 (3). <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00003>
- Nishikimi A.; Kukimoto-Niino M.; Yokoyama S. and Fukui Y. (2013). "Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease." *Experimental Cell Research* 319 (15):2343-9. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.07.024>
- Nourshargh S. and Alon R. (2014). "Leukocyte Migration into Inflamed Tissues." *Immunity* 41 (5):694-707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
- Oftedal B.E.; Hellesen A.; Erichsen M.M.; Bratland E.; Vardi A.; Perheentupa J.; Kemp E.H.; Fiskerstrand T.; Viken M.K.; Weetman A.P.; Fleishman S.J.; Banka S.; Newman W.G.; Sewell W.A.C.; Sozaeva L.S.; Zayats T.; Haugarvoll K.; Orlova E.M.; Haavik J.; Johansson S.; Knappskog P.M.; Løvås K.; Wolff A.S.B.; Abramson J. and Husebye E.S. (2015). "Dominant Mutations in the Autoimmune Regulator AIRE Are Associated with Common Organ-Specific Autoimmune Diseases." *Immunity* 42 (6):1185-96. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.021>
- Oldstone M.B. (1998). "Molecular mimicry and immune-mediated diseases." *The FASEB Journal* 12 (13):1255-65. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.13.1255>

- Pacheco Y.; Acosta-Ampudia Y.; Monsalve D.M.; Chang C.; Gershwin M.E. and Anaya J.-M. (2019). "Bystander activation and autoimmunity." *Journal of Autoimmunity* 103:102301. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.06.012>
- Palander O.; El-Zeiry M. and Trimble W.S. (2017). "Uncovering the Roles of Septins in Cilia." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5 (36). <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00036>
- Park C.; Hwang I.Y. and Kehrl J.H. (2016). "Intravital Two-Photon Imaging of Lymphocytes Crossing High Endothelial Venules and Cortical Lymphatics in the Inguinal Lymph Node." *Methods in Molecular Biology* 1407:195-206. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3480-5_15
- Paschalis-Trela K.; Cywinska A.; Trela J.; Czopowicz M.; Kita J. and Witkowski L. (2017). "The prevalence of ocular diseases in polish Arabian horses." *BMC Veterinary Research* 13 (1):319. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1252-8>
- Patel C.H. and Powell J.D. (2017). "Targeting T cell metabolism to regulate T cell activation, differentiation and function in disease." *Current Opinion in Immunology* 46:82-8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.04.006>
- Pearce E.J. and Pearce E.L. (2017). "Driving immunity: all roads lead to metabolism." *Nature Reviews Immunology* 18 (2):81-82. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.139>
- Peng Y.; Han G.; Shao H.; Wang Y.; Kaplan H.J. and Sun D. (2007). "Characterization of IL-17+ Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein-Specific T Cells in Experimental Autoimmune Uveitis." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (9):4153-61. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0251>
- Peterson E.J. and Maltzman J.S. (2019). "T-Cell Activation and Tolerance." In *Clinical Immunology (Fifth Edition)*, edited by Rich, Robert R.; Fleisher, Thomas A.; Shearer, William T.; Schroeder, Harry W.; Frew, Anthony J. and Weyand, Cornelia M., 183-96.e1. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702068966000120>
- Petrie Aronin C.E.; Zhao Y.M.; Yoon J.S.; Morgan N.Y.; Prüstel T.; Germain R.N. and Meier-Schellersheim M. (2017). "Migrating Myeloid Cells Sense Temporal Dynamics of Chemoattractant Concentrations." *Immunity* 47 (5):862-74.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.020>
- Petrie R.J.; Doyle A.D. and Yamada K.M. (2009). "Random versus directionally persistent cell migration." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (8):538-49. <https://doi.org/10.1038/nrm2729>
- Plummer C.E. (2015). "Examination of the Eye." In *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine (Seventh Edition)*, edited by Sprayberry, Kim A. and Robinson, N. Edward, St. Louis: W.B. Saunders: 593-598. <https://www.elsevier.com/books/current-therapy-in-equine-medicine/robinson/978-1-4557-3593-8>

- Poincloux R.; Collin O.; Lizárraga F.; Romao M.; Debray M.; Piel M. and Chavrier P. (2011). "Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (5):1943-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010396108>
- Prete M.; Dammacco R.; Fatone M.C. and Racanelli V. (2016). "Autoimmune uveitis: clinical, pathogenetic, and therapeutic features." *Clinical and Experimental Medicine* 16 (2):125-36. <https://doi.org/10.1007/s10238-015-0345-6>
- Qi H.; Kastenmüller W. and Germain R.N. (2014). "Spatiotemporal Basis of Innate and Adaptive Immunity in Secondary Lymphoid Tissue." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (1):141-67. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013254>
- Regan D.P.; Aarnio M.C.; Davis W.S.; Carmichael K.P.; Vandenplas M.L.; Lauderdale J.D. and Moore P.A. (2012). "Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis." *Veterinary Ophthalmology* 15 (3):145-52. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2011.00951.x>
- Reichardt P.; Gunzer F. and Gunzer M. (2007). "Analyzing the physiodynamics of immune cells in a three-dimensional collagen matrix." In Fairchild P.J. *Immunological Tolerance. Methods in Molecular Biology* 380:253-69. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-395-0_15
- Renkawitz J.; Kopf A.; Stopp J.; de Vries I.; Driscoll M.K.; Merrin J.; Hauschild R.; Welf E.S.; Danuser G.; Fiolka R. and Sixt M. (2019). "Nuclear positioning facilitates amoeboid migration along the path of least resistance." *Nature* 568 (7753):546-550. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1087-5>
- Renkawitz J.; Schumann K.; Weber M.; Lammermann T.; Pflücke H.; Piel M.; Polleux J.; Spatz J.P. and Sixt M. (2009). "Adaptive force transmission in amoeboid cell migration." *Nature Cell Biology* 11 (12):1438-43. <https://doi.org/10.1038/ncb1992>
- Rhoads J.P.; Major A.S. and Rathmell J.C. (2017). "Fine tuning of immunometabolism for the treatment of rheumatic diseases." *Nature Reviews. Rheumatology* 13 (5):313-20. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.54>
- Ridley A.J. (2001). "Rho GTPases and cell migration." *Journal of Cell Science* 114 (15):2713-22. <https://jcs.biologists.org/content/114/15/2713.long>
- Ridley A.J. (2015). "Rho GTPase signalling in cell migration." *Current Opinion in Cell Biology* 36:103-12. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005>
- Robbin M.G.; Wagner B.; Noronha L.E.; Antczak D.F. and de Mestre A.M. (2011). "Subpopulations of equine blood lymphocytes expressing regulatory T cell markers." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 140 (1-2):90-101. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.11.020>

- Rommerswinkel N.; Niggemann B.; Keil S.; Zänker K.S. and Dittmar T. (2014). "Analysis of cell migration within a three-dimensional collagen matrix." *Journal of Visualized Experiments* (92):e51963-e. doi: 10.3791/51963
- Rosenbaum J.T.; Lin P. and Asquith M. (2016). "The microbiome, HLA, and the pathogenesis of uveitis." *Japanese Journal of Ophthalmology* 60 (1):1-6. <https://doi.org/10.1007/s10384-015-0416-y>
- Saadoun D.; Wechsler B.; Terrada C.; Hajage D.; Le Thi Huong D.; Resche-Rigon M.; Cassoux N.; Le Hoang P.; Amoura Z.; Bodaghi B. and Cacoub P. (2010). "Azathioprine in severe uveitis of Behçet's disease." *Arthritis Care & Research* 62 (12):1733-8. <https://doi.org/10.1002/acr.20308>
- Saldinger L.K.; Nelson S.G.; Bellone R.R.; Lassaline M.; Mack M.; Walker N.J. and Borjesson D.L. (2019). "Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells in vitro." *Veterinary Ophthalmology* 23 (1):160-70. <https://doi.org/10.1111/vop.12704>
- Salinovich O. and Montelaro R.C. (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 156 (2):341-7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90263-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90263-0)
- Sandmeyer L.S.; Bauer B.S.; Feng C.X. and Grahn B.H. (2017). "Equine recurrent uveitis in western Canadian prairie provinces: A retrospective study (2002-2015)." *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* 58 (7):717-22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28698690>
- Sandor A.M.; Lindsay R.S.; Dyjack N.; Whitesell J.C.; Rios C.; Bradley B.J.; Haskins K.; Serreze D.V.; Geurts A.M.; Chen Y.-G.; Seibold M.A.; Jacobelli J. and Friedman R.S. (2019). "CD11c(+) Cells Are Gatekeepers for Lymphocyte Trafficking to Infiltrated Islets During Type 1 Diabetes." *Frontiers in Immunology* 10:99. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00099>
- Sauvage A.C.; Monclin S.J.; Elansary M.; Hansen P. and Grauwels M.F. (2019). "Detection of intraocular *Leptospira* spp. by real-time polymerase chain reaction in horses with recurrent uveitis in Belgium." *Equine Veterinary Journal* 51 (3):299-303. <https://doi.org/10.1111/evj.13012>
- Schauer M.; Kleinwort K.J.H.; Degroote R.L.; Wiedemann C.; Kremmer E.; Hauck S.M. and Deeg C.A. (2018). "Interaction of septin 7 and DOCK8 in equine lymphocytes reveals novel insights into signaling pathways associated with autoimmunity." *Scientific Reports* 8 (1):12332. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30753-7>
- Schimmel L.; Heemskerk N. and van Buul J.D. (2017). "Leukocyte transendothelial migration: A local affair." *Small GTPases* 8 (1):1-15. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1197872>

- Schmidt K. and Nichols B.J. (2004). "Functional interdependence between septin and actin cytoskeleton." *BMC Molecular and Cell Biology* 5 (1):43. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-5-43>
- Selmi C. (2014). "Diagnosis and classification of autoimmune uveitis." *Autoimmunity Reviews* 13 (4-5):591-594. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.006>
- Sena L.A.; Li S.; Jairaman A.; Prakriya M.; Ezponda T.; Hildeman D.A.; Wang C.R.; Schumacker P.T.; Licht J.D.; Perlman H.; Bryce P.J. and Chandel N.S. (2013). "Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling." *Immunity* 38 (2):225-36. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.020>
- Shiraishi A.; Uruno T.; Sanematsu F.; Ushijima M.; Sakata D.; Hara T. and Fukui Y. (2017). "DOCK8 Protein Regulates Macrophage Migration through Cdc42 Protein Activation and LRAP35a Protein Interaction." *Journal of Biological Chemistry* 292 (6):2191-2202. doi: 10.1074/jbc.M116.736306
- Silver P.B.; Horai R.; Chen J.; Jittayasothorn Y.; Chan C.C.; Villasmil R.; Kesen M.R. and Caspi R.R. (2015). "Retina-specific T regulatory cells bring about resolution and maintain remission of autoimmune uveitis." *The Journal of Immunology* 194 (7):3011-9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402650>
- Simeonova G.P.; Krastev S.Z. and Simeonov R.S. (2016). "Immunological and pathological investigations in equine experimental uveitis." *Veterinary Research Communications* 40 (3-4):107-15. <https://doi.org/10.1007/s11259-016-9659-4>
- Sirisinha S. (2014). "Evolutionary insights into the origin of innate and adaptive immune systems: different shades of grey." *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 32 (1):3-15. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24641285>
- Sloan-Lancaster J.; Zhang W.; Presley J.; Williams B.L.; Abraham R.T.; Lippincott-Schwartz J. and Samelson L.E. (1997). "Regulation of ZAP-70 intracellular localization: visualization with the green fluorescent protein." *Journal of Experimental Medicine* 186 (10):1713-24. <https://doi.org/10.1084/jem.186.10.1713>
- Smith R.L.; Soeters M.R.; Wüst R.C.I. and Houtkooper R.H. (2018). "Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease." *Endocrine Reviews* 39 (4):489-517. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00211>
- Spieß B.M. (2010). "Equine recurrent uveitis: the European viewpoint." *Equine Veterinary Journal* 42 (37):50-6. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.tb05635.x>
- Spiliotis E.T. (2018). "Spatial effects - site-specific regulation of actin and microtubule organization by septin GTPases." *Journal of Cell Science* 131 (1):jcs207555. <http://jcs.biologists.org/content/131/1/jcs207555.full>

- Stathopoulou C.; Nikoleri D. and Bertias G. (2019). "Immunometabolism: an overview and therapeutic prospects in autoimmune diseases." *Immunotherapy* 11 (9):813-29. <https://doi.org/10.2217/imt-2019-0002>
- Stein-Streilein J. (2008). "Immune regulation and the eye." *Trends in Immunology* 29 (11):548-54. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.08.002>
- Streilein J.W.; Ma N.; Wenkel H.; Fong Ng T. and Zamiri P. (2002). "Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants." *Vision Research* 42 (4):487-95. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(01\)00185-7](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(01)00185-7)
- Strobel B.W.; Wilkie D.A. and Gilger B.C. (2007). "Retinal detachment in horses: 40 cases (1998-2005)." *Veterinary Ophthalmology* 10 (6):380-5. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2007.00574.x>
- Sun M.; Yang P.; Du L.; Zhou H.; Ren X. and Kijlstra A. (2010). "Contribution of CD4+CD25+ T cells to the regression phase of experimental autoimmune uveoretinitis." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (1):383-9. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3514>
- Svitkina T.M. (2018). "Ultrastructure of the actin cytoskeleton." *Current Opinion in Cell Biology* 54:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.02.007>
- Takekuma Y.; Iwasaki Y.; Fujio K. and Yamamoto K. (2019). "Metabolism as a key regulator in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus." *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 48 (6):1142-45. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.04.006>
- Tareen S.H.; Kutmon M.; Arts I.C.; de Kok T.M.; Evelo C.T. and Adriaens M.E. (2019). "Logical modelling reveals the PDC-PDK interaction as the regulatory switch driving metabolic flexibility at the cellular level." *Genes & Nutrition* 14:27. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0647-5>
- Taylor A.W. (2007). "Ocular immunosuppressive microenvironment." *Chemical Immunology and Allergy* 92:71-85. <https://doi.org/10.1159/000099255>
- Taylor A.W. (2016). "Ocular Immune Privilege and Transplantation." *Frontiers in Immunology* 7:37. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00037>
- Teng X.; Li W.; Cornaby C. and Morel L. (2019). "Immune cell metabolism in autoimmunity." *Clinical & Experimental Immunology* 197 (2):181-92. <https://doi.org/10.1111/cei.13277>
- Tesavibul N.; Boonsopon S.; Choopong P. and Tanterdtham S. (2018). "Uveitis in Siriraj Hospital: pattern differences between immune-related uveitis and infectious uveitis in a university-based tertiary care hospital." *International Ophthalmology* 38 (2):673-8. <https://doi.org/10.1007/s10792-017-0515-5>

- Thangadurai R.; Sharma S.; Bali D.; Rana B.P.; Mahajan V.; Samanta I. and Hazra S. (2010). "Prevalence of Ocular Disorders in an Indian Population of Horses." *Journal of Equine Veterinary Science* 30 (6):326-9. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2010.05.001>
- Thorne J.E.; Suhler E.; Skup M.; Tari S.; Macaulay D.; Chao J. and Ganguli A. (2016). "Prevalence of Noninfectious Uveitis in the United States: A Claims-Based Analysis." *JAMA Ophthalmology* 134 (11):1237-45. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.3229
- Tomasova L.; Guttenberg Z.; Hoffmann B. and Merkel R. (2019). "Advanced 2D/3D cell migration assay for faster evaluation of chemotaxis of slow-moving cells." *PLoS One* 14 (7):e0219708-e. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219708>
- Tong B.; Liu X.; Xiao J. and Su G. (2019). "Immunopathogenesis of Behcet's Disease." *Frontiers in Immunology* 10 (665). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00665>
- Tooley A.J.; Gilden J.; Jacobelli J.; Beemiller P.; Trimble W.S.; Kinoshita M. and Krummel M.F. (2009). "Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility." *Nature Cell Biology* 11 (1):17-26. <https://doi.org/10.1038/ncb1808>
- Torcellan T.; Stolp J. and Chtanova T. (2017). "In Vivo Imaging Sheds Light on Immune Cell Migration and Function in Cancer." *Frontiers in Immunology* 8 (309). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00309>
- Uchimura T.; Oyama Y.; Deng M.; Guo H.; Wilson J.E.; Rampanelli E.; Cook K.D.; Misumi I.; Tan X.; Chen L.; Johnson B.; Tam J.; Chou W.C.; Brickey W.J.; Petrucelli A.; Whitmire J.K. and Ting J.P.Y. (2018). "The Innate Immune Sensor NLRC3 Acts as a Rheostat that Fine-Tunes T Cell Responses in Infection and Autoimmunity." *Immunity* 49 (6):1049-61.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.008>
- van Aalst S.; Ludwig I.S.; van der Zee R.; van Eden W. and Broere F. (2017). "Bystander activation of irrelevant CD4+ T cells following antigen-specific vaccination occurs in the presence and absence of adjuvant." *PLoS One* 12 (5):e0177365-e. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177365>
- van der Windt G.J.; Chang C.H. and Pearce E.L. (2016). "Measuring Bioenergetics in T Cells Using a Seahorse Extracellular Flux Analyzer." *Current Protocols in Immunology* 113 (1):3.16B.1-3.B.4. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0316bs113>
- van der Windt G.J.; Everts B.; Chang C.H.; Curtis J.D.; Freitas T.C.; Amiel E.; Pearce E.J. and Pearce E.L. (2012). "Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development." *Immunity* 36 (1):68-78. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.007>

- Vander Heiden M.G.; Cantley L.C. and Thompson C.B. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* 324 (5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809
- Vendomèle J.; Dehmani S.; Khebizi Q.; Galy A. and Fisson S. (2018). "Subretinal Injection of HY Peptides Induces Systemic Antigen-Specific Inhibition of Effector CD4+ and CD8+ T-Cell Responses." *Frontiers in Immunology* 9 (504). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00504>
- Viljuma A.; Mikko S.; Hahn D.; Skow L.; Andersson G. and Bergström T.F. (2017). "Genomic structure of the horse major histocompatibility complex class II region resolved using PacBio long-read sequencing technology." *Scientific Reports* 7:45518. <https://doi.org/10.1038/srep45518>
- Wagner B.; Burton A. and Ainsworth D. (2010). "Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals." *Veterinary Research* 41 (4):47. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010019>
- Wang H.; Kadlecsek T.A.; Au-Yeung B.B.; Goodfellow H.E.S.; Hsu L.-Y.; Freedman T.S. and Weiss A. (2010). "ZAP-70: An Essential Kinase in T-cell Signaling." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5):a002279. doi: 10.1101/cshperspect.a002279
- Wang X.; Qiu L.; Li Z.; Wang X.-Y. and Yi H. (2018). "Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases." *Frontiers in Immunology* 9 (2456). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02456>
- Warner H.; Wilson B.J. and Caswell P.T. (2019). "Control of adhesion and protrusion in cell migration by Rho GTPases." *Current Opinion in Cell Biology* 56:64-70. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.09.003>
- Weinberg S.E.; Sena L.A. and Chandel N.S. (2015). "Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity." *Immunity* 42 (3):406-17. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.002>
- Weninger W.; Biro M. and Jain R. (2014). "Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs." *Nature Reviews Immunology* 14 (4):232-46. <https://doi.org/10.1038/nri3641>
- Werry H. and Gerhards H. (1992). "The surgical therapy of equine recurrent uveitis." *Tierärztliche Praxis* 20 (2):178-86. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1609401>
- Williams J.W.; Ferreira C.M.; Blaine K.M.; Rayon C.; Velázquez F.; Tong J.; Peter M.E. and Sperling A.I. (2018). "Non-apoptotic Fas (CD95) Signaling on T Cells Regulates the Resolution of Th2-Mediated Inflammation." *Frontiers in Immunology* 9 (2521). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02521>

- Wing J.B. and Sakaguchi S. (2019). "Regulatory Immune Cells." In *Clinical Immunology (Fifth Edition)*, edited by Rich, Robert R.; Fleisher, Thomas A.; Shearer, William T.; Schroeder, Harry W.; Frew, Anthony J. and Weyand, Cornelia M., 261-71.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00018-1>
- Witkowski L.; Cywinska A.; Paschalis-Trela K.; Crisman M. and Kita J. (2016). "Multiple etiologies of equine recurrent uveitis – A natural model for human autoimmune uveitis: A brief review." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 44:14-20. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.11.004>
- Wong H.S. and Germain R.N. (2018). "Robust control of the adaptive immune system." *Seminars in Immunology* 36:17-27. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.009>
- Wu C.-Y.; Tsai Y.-Y.; Chen S.-Y.; Lin Y.-P.; Shin J.-W.; Wu C.-C. and Yang B.-C. (2017). "Interaction of Zap70 and CXCR4 receptor at lamellipodia that determines the directionality during Jurkat T cells chemotaxis." *Molecular Immunology* 90:245-54. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.08.005>
- Xu X.; Han L.; Zhao G.; Xue S.; Gao Y.; Xiao J.; Zhang S.; Chen P.; Wu Z.Y.; Ding J.; Hu R.; Wei B. and Wang H. (2017). "LRCH1 interferes with DOCK8-Cdc42-induced T cell migration and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis." *Journal of Experimental Medicine* 214 (1):209-26. <https://doi.org/10.1084/jem.20160068>
- Yam A.O. and Chtanova T. (2019). "Imaging the neutrophil: Intravital microscopy provides a dynamic view of neutrophil functions in host immunity." *Cellular Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.003>
- Yan S.L.S.; Hwang I.-Y.; Kamenyeva O. and Kehrl J.H. (2019). "In Vivo F-Actin Filament Organization during Lymphocyte Transendothelial and Interstitial Migration Revealed by Intravital Microscopy." *iScience* 16:283-97. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.040>
- Yin Y.; Choi S.-C.; Xu Z.; Perry D.J.; Seay H.; Croker B.P.; Sobel E.S.; Brusko T.M. and Morel L. (2015). "Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus." *Science Translational Medicine* 7 (274):274ra18-ra18. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0835
- Zhang N.; Liu L.; Fan N.; Zhang Q.; Wang W.; Zheng M.; Ma L.; Li Y. and Shi L. (2016). "The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation." *Oncotarget* 7 (38):61587-600. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11402>
- Zhang Q.; Dove C.G.; Hor J.L.; Murdock H.M.; Strauss-Albee D.M.; Garcia J.A.; Mandl J.N.; Grodick R.A.; Jing H.; Chandler-Brown D.B.; Lenardo T.E.; Crawford G.; Matthews H.F.; Freeman A.F.; Cornell R.J.; Germain R.N.; Mueller S.N. and Su H.C. (2014). "DOCK8 regulates lymphocyte shape integrity for skin antiviral immunity." *Journal of Experimental Medicine* 211 (13):2549-66. <https://doi.org/10.1084/jem.20141307>

- Zhao C.-N.; Xu Z.; Wu G.-C.; Mao Y.-M.; Liu L.-N.; Qian W.; Dan Y.-L.; Tao S.-S.; Zhang Q.; Sam N.B.; Fan Y.-G.; Zou Y.-F.; Ye D.-Q. and Pan H.-F. (2019). "Emerging role of air pollution in autoimmune diseases." *Autoimmunity Reviews* 18 (6):607-14. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.12.010>
- Zhao L.; Sun L.; Wang H.; Ma H.; Liu G. and Zhao Y. (2007). "Changes of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in aged Balb/c mice." *Journal of Leukocyte Biology* 81 (6):1386-94. <https://doi.org/10.1189/jlb.0506364>

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Deeg bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, meine wissenschaftliche Arbeit unter ihrer Leitung anzufertigen. Für die Überlassung des spannenden Forschungsthemas, ihre tatkräftige Unterstützung und das außerordentliche Engagement bin ich sehr dankbar. Ihre fachliche Kompetenz und ihre anregenden Vorschläge haben mir stets weitergeholfen. Die Zeit, die sie sich zwischen all den Terminen und Verpflichtungen genommen hat, um die wissenschaftlichen Arbeiten zu korrigieren, finde ich bemerkenswert. Vielen Dank auch für die zahlreichen, schönen Unternehmungen die wir mit der gesamten Arbeitsgruppe erlebt haben.

Herrn Prof. Dr. Göhring und Herrn Prof. Dr. Gerhards sowie Frau PD Dr. Bettina Wollanke danke ich herzlich für die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten Blutproben. Vielen Dank auch an alle Tierpfleger und an die Tierärzte Tobias Geiger, Lisa Madlener, Kerstin Ackermann und Dr. Jessica Waldner, die für mich die Proben entnommen haben. Mein besonderer Dank geht auch an Frau Dr. Tanja Witte und Dr. Kirsten Hahn, die mir die Blutprobeentnahmen bei den Institutspferden, auch spontan zwischen Trächtigkeitsuntersuchung und Führenanlage, ermöglicht haben.

Vielen Dank auch an Barbara Amann, Claudia Guggenmos, Florian Gosselin und Sieglinde Hirmer. Durch eure Hilfe habt ihr mir an hektischen Tagen Arbeit abnehmen können und mich tatkräftig unterstützt. Dankeschön Bärbl, für die Stunden, die du mit mir oder für mich am Mikroskop verbracht hast. Das Wort Deconvolution werde ich wohl nie mehr vergessen.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Arbeitskollegen Claudia Barfüßer, Dr. Roxanne Degroote, Isabella Giese, Bernhard Hobmaier, Lea Lorenz, Franziska Stetter und Maria Weigand. Die gemeinsamen Momente mit euch in den Pausen, im Labor, auf Ausflügen und auch außerhalb der Arbeit, haben diese Zeit zu einer besonderen gemacht.

Durch euch wurde mir bewusst wie schön es ist, von solch tollen Kollegen umgeben zu sein. Es war eine schöne Zeit mit euch, die ich nicht missen möchte.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Eltern, die mich während des Studiums und der Zeit der Doktorarbeit motiviert, unterstützt und vorgebracht haben. Ihr habt immer an mich geglaubt und mir gezeigt, dass man auf seine Erfolge durchaus stolz sein kann. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank auch an meinen Bruder Sven, der es stets geschafft hat mich aufzubauen und mich mit seinen Witzen zum Lachen brachte. Auch meiner lieben Oma Emma danke ich für ihre stets aufmunternde und verständnisvolle Art. All meinen lieben Freunden aus München und aus der Heimat möchte ich ganz herzlich für ihre Unterstützung danken. Ich bin froh, euch haben zu dürfen.

Überaus dankbar bin ich für die Unterstützung durch meinen Freund Max. Du warst in der gesamten Zeit eine große Stütze und hast es immer geschafft, mich vom Stress zu befreien und zu erden, wenn ich abgehoben bin. Danke für die vielen Einkäufe, die leckeren Abendessen und entspannten Stunden zu Zweit. Auch für die schönen gemeinsamen Urlaube bin ich sehr dankbar und machen die Zeit mit dir unvergesslich.