

Metabolische Phänotypen peripherer CD4⁺ T-Zellen
augengesunder und an equiner rezidivierender Uveitis
erkrankter Pferde

von Claudia Barfüßer

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

Metabolische Phänotypen peripherer CD4⁺ T-Zellen
augengesunder und an equiner rezidivierender Uveitis
erkrankter Pferde

von Claudia Barfüßer
aus Donauwörth

München 2022

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: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korb

Tag der Promotion: 12. Februar 2022

Meiner Familie

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	3
2.1	Equine rezidivierende Uveitis (ERU)	3
2.1.1	Definition und Bedeutung.....	3
2.1.2	Ätiologie und Pathogenese.....	4
2.1.3	Klinik und Therapie.....	8
2.2	Immunpathogenese bei vergleichbaren Uveitisformen	11
2.2.1	Autoimmune Uveitis des Menschen.....	11
2.2.2	Tiermodelle mit induzierter autoimmuner Uveitis.....	12
2.2.3	ERU als spontanes Modell für die menschliche Erkrankung.....	16
2.3	Physiologie und Pathophysiologie des Immunsystems	17
2.3.1	Immunsystem und immunologische Toleranz.....	17
2.3.2	Das Auge als immunprivilegiertes Organ.....	20
2.3.3	Rolle der T-Zellen bei Autoimmunität.....	22
2.4	Zellmetabolismus	23
2.4.1	Stoffwechselwege eukaryotischer Immunzellen.....	23
2.4.2	Anpassungen im T-Zellmetabolismus bei Aktivierung.....	25
2.4.3	Messungen mit dem Seahorse Analyzer.....	28
3	PUBLIKATION	31
4	DISKUSSION	47
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
6	SUMMARY	63
7	LITERATURVERZEICHNIS	65
8	DANKSAGUNG	77

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

2-DG	2-Deoxy-D-Glukose
ACAID	Vordere Augenkammer-assoziierte Immunabweichung, <i>engl.</i> anterior chamber associated immune deviation
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AIRE	Autoimmun-Regulator
ATP	Adenosintriphosphat
BRB	Blut-Retina-Schranke, <i>engl.</i> blood-retinal barrier
CD4-IRF4KO	CD4 ⁺ T-Zellen ohne Interferon-Regulations-Faktor 4
CRALBP	zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein, <i>engl.</i> cellular retinaldehyde-binding protein
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
ECAR	Extrazelluläre Ansäuerungsrate, <i>engl.</i> extracellular acidification rate
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
FMNL1	<i>Engl.</i> Formin like 1
GLUT1	Glukosetransporter 1
glycoPER	Glykolytische Protonenausstromrate, <i>engl.</i> glycolytic proton efflux rate
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
IFN- γ	Interferon- γ
IL-	Interleukin
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein, <i>engl.</i> interphotoreceptor retinoid-binding protein
IRF4	Interferon-Regulations-Faktor 4
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>engl.</i> major histocompatibility complex
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate, <i>engl.</i> oxygen consumption rate
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung

Abkürzungsverzeichnis

RA	Rheumatoide Arthritis
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
Succinyl-CoA	Succinyl-Coenzym A
TCR	T-Zellrezeptor, <i>engl.</i> T cell receptor
TGF- β	<i>Engl.</i> Transforming growth factor β
Th1	T-Helferzelle 1
Th17	T-Helferzelle 17
Tregs	Regulatorische T-Zellen

1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) betrifft als häufig auftretende Erkrankung Pferde auf der ganzen Welt (Paschalis-Trela et al., 2017). Durch intermittierende intraokuläre Entzündungsschübe, von denen meist beide Augen betroffen sind, werden retinale Strukturen irreversibel zerstört, was letztendlich zur Erblindung des betroffenen Auges führt (Deeg et al., 2002a; Gerding and Gilger, 2016; McMullen Jr and Fischer, 2017). Da Ätiologie und Pathogenese der ERU noch nicht vollständig geklärt werden konnten, ist bisher nur eine symptomatische Therapie ohne Aussicht auf vollständige Heilung möglich (Gerding and Gilger, 2016; McMullen Jr and Fischer, 2017; Degroote and Deeg, 2021). Es konnten jedoch bereits autoreaktive CD4⁺ T-Zellen, die zu Beginn eines jeden Entzündungsschubs aus der Peripherie ins Auge einwandern, als die Hauptakteure in der Pathogenese der ERU identifiziert werden (Gilger et al., 1999; Deeg et al., 2002b; Deeg et al., 2006a).

Für ihre Effektorfunktionen benötigen Immunzellen Energie, die sie über verschiedene Stoffwechselwege aus Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren gewinnen können (Gaber et al., 2019). Die Erforschung des sogenannten Immunmetabolismus gewinnt immer mehr Bedeutung, vor allem im Bereich autoimmuner Erkrankungen (Teng et al., 2019). So wird ein veränderter Zellmetabolismus mittlerweile als essentieller Bestandteil in der Autoimmunität angesehen (Clayton et al., 2021). In einigen autoimmunen Erkrankungen, wie beispielweise der Rheumatoiden Arthritis, des Systemischen Lupus Erythematodes und des Diabetes Typ I, konnte bereits ein veränderter metabolischer Phänotyp beteiligter Immunzellen, wie den CD4⁺ T-Zellen, nachgewiesen werden (Stathopoulou et al., 2019). Bei der autoimmunen Uveitis wurde der Zellmetabolismus beteiligter Immunzellen jedoch bis heute nicht erforscht.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den metabolischen Phänotyp peripherer Lymphozyten und speziell der CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden zu bestimmen und zu vergleichen. Durch die Charakterisierung möglicher Abweichungen im metabolischen Phänotyp autoreaktiver peripherer CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren könnten diese Zellen bereits in der Peripherie erkannt werden, ohne dass zeitgleich ein akuter Entzündungsschub vorliegen muss. Die neu gewonnenen Erkenntnisse könnten nicht nur für die ERU von Bedeutung sein, sondern auch für die autoimmune Uveitis

des Menschen, für die die ERU das einzige spontane Tiermodell darstellt und deren Pathogenesen große Ähnlichkeiten aufweisen (Deeg et al., 2002a; Deeg et al., 2002b; Degroote and Deeg, 2021).

2 LITERATUR

2.1 Equine rezidivierende Uveitis (ERU)

2.1.1 Definition und Bedeutung

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine weltweit auftretende Erkrankung bei Pferden, bei der es zu einer intermittierenden Entzündung des uvealen Trakts kommt (McMullen Jr and Fischer, 2017; Paschalis-Trela et al., 2017). Die Prävalenz variiert zwischen 8 – 10 % in Europa und 2 - 25 % in Amerika (Spiess, 2010; Gerding and Gilger, 2016; Degroote and Deeg, 2021). In Indien zeigten 100 von 500 untersuchten Militärpferden eine ophthalmologische Veränderung, wobei 24 % dieser Tiere an ERU erkrankt waren (Thangadurai et al., 2010). In einer retrospektiven Studie in Amerika wurden Augen von insgesamt 140 Pferden, die aufgrund einer Augenerkrankung enukleiert oder euthanasiert wurden, histologisch nach der Krankheitsursache untersucht (Flores et al., 2020). Die ERU konnte als eine der häufigsten Gründe für eine okuläre Erkrankung mit nachfolgender Enukleation oder Euthanasie bestätigt werden (Flores et al., 2020). Die Geschlechter sind in etwa gleich häufig betroffen und die meisten Pferde erkranken in einem Alter von 3 – 25 Jahren (Sandmeyer et al., 2020). Jede Rasse kann eine ERU entwickeln, jedoch haben Warmblüter und Appaloosa ein erhöhtes Risiko (Kulbrock et al., 2013; Sandmeyer et al., 2020). Bei Warmblütern liegt eine genetische Prävalenz für ERU durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-I-Haplotyp Equines-Leukozyten-Antigen-A9 vor (Deeg et al., 2004a). In einer sogenannten genome-wide association study mit über 140 deutschen Warmblutpferden wurden außerdem Einzelnukleotid-Polymorphismen in der Nähe der Genloci für die Interleukine (IL-) 17A und 17F gefunden, woraus geschlossen wurde, dass es eine Verbindung zwischen diesen Genen und der Entwicklung einer ERU geben könnte (Kulbrock et al., 2013). Bei Appaloosa wurde ein signifikant erhöhtes Risiko, an ERU zu erkranken, mit dem homozygoten Genotyp des sogenannten Leopard Gens in Verbindung gebracht (Sandmeyer et al., 2020).

Die Bedeutung der ERU erschließt sich einerseits durch ihr häufiges Auftreten und andererseits durch ihre Folgen, denn selbst mit Behandlung führt die ERU häufig zu einer Erblindung des betroffenen Auges (Gerding and Gilger, 2016). Da Pferde Fluchttiere sind, spielt bei ihnen der Sehsinn eine wichtige Rolle. Durch dessen

Verlust stellen die betroffenen Pferde oft eine Gefahr für sich und ihre Umwelt dar, weshalb diese Tiere aus Gründen der Sicherheit und des Tierschutzes meist euthanasiert werden müssen, was eine emotionale und finanzielle Belastung für den Tierbesitzer oder die Tierbesitzerin bedeutet (Gerding and Gilger, 2016). Insgesamt 194 Pferdebesitzerinnen und Pferdebesitzer aus den USA wurden in einer Studie von Gerding und Gilger zum Werdegang ihres an ERU erkrankten Tieres befragt (Gerding and Gilger, 2016). Circa 30 % der Pferde konnten ihre frühere Tätigkeit nicht mehr ausüben, weil beispielweise das Reiten auf ihnen durch ihre Erblindung zu gefährlich wurde (Gerding and Gilger, 2016). Von den Tieren, die ihre Nutzungsart beibehielten, führten 25 % diese Arbeit schlechter oder viel schlechter (6 %) aus und 85 % der Besitzerinnen und Besitzer gaben an, dass der finanzielle Wert ihres Tieres durch die ERU gesunken sei (Gerding and Gilger, 2016). Somit ist die ERU für die Pferdepopulation von großer Bedeutung und stellt Besitzerinnen und Besitzer betroffener Tiere vor diverse Herausforderungen.

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die ERU ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung, bei der Abwehrzellen, vor allem CD4⁺ T-Zellen, in der Peripherie aktiviert werden und durch bisher nicht vollständig geklärte Mechanismen die Blut-Retina-Schranke (BRB) überwinden (Deeg et al., 2001; Deeg et al., 2002b; Degroote and Deeg, 2021). Im Auge angekommen lösen die Zellen eine Entzündung und Zerstörung intraokulärer Strukturen aus (Deeg et al., 2002b) (siehe auch Kapitel 2.1.3). Mit dem Abflachen der intraokulären Inflammation am Ende eines ERU-Schubs verlassen die eingewanderten Zellen das Auge und ziehen sich in die Peripherie zurück (Deeg et al., 2006a; Zipplies et al., 2009). In Versuchen mit BALB/c-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Milz als peripheres Reservoir eine zentrale Rolle spielt (Streilein and Niederkorn, 2007; Mochizuki et al., 2013). Wann es zu einer erneuten Aktivierung der autoaggressiven Zellen kommt, sodass diese ein weiteres Mal die BRB überqueren und intraokuläre Strukturen angreifen, kann bis heute nicht vorhergesagt werden, da die Ätiologie der Erkrankung noch nicht vollständig geklärt ist (Degroote and Deeg, 2021).

Die autoimmune Komponente in der ERU konnte durch die Entdeckung von Immunreaktionen gegen diverse okuläre Autoantigene bewiesen werden (Deeg et

al., 2001; Deeg et al., 2004b; Deeg et al., 2006b). Als erstes wurden die zwei retinalen Proteine Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein (IRBP) und S-Antigen als Ziele der autoaggressiven Zellen identifiziert (Deeg et al., 2001). Etwas später wurde auch das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (CRALBP), welches im retinalen Pigmentepithel und den Müllergliazellen exprimiert wird (Xue et al., 2015), als Autoantigen in der ERU bestätigt (Deeg et al., 2006b). Außerdem war es möglich, durch periphere Injektion dieser Autoantigene eine Uveitis wie die ERU bei gesunden Pferden auszulösen, was ihre Bedeutung in der Pathogenese der ERU bewies (Deeg et al., 2002b; Deeg et al., 2004b; Deeg et al., 2006b). Später wurde mit Synaptotagmin-1 ein viertes Autoantigen in der ERU identifiziert (Swadzba et al., 2012). Ein weiterer Baustein, der zur autoimmunen Pathogenese der ERU beiträgt, ist das sogenannte Epitope Spreading (Deeg et al., 2006a). Es bedeutet, dass die Lymphozyten anfangs nur ein Epitop erkennen und bekämpfen, sich das aber mit der Zeit durch Differenzierung des T- oder B-Zellrezeptors ändern kann und daraufhin auch andere, strukturell ähnliche Epitope desselben Proteins oder Gewebes erkannt werden können (Chan et al., 1998; Deeg et al., 2002b; Deeg et al., 2006a; Degroote and Deeg, 2021). Unter intramolekularem Epitope Spreading versteht man, dass ein neues Epitop des gleichen Autoantigens erkannt wird, während sich die Immunreaktion beim intermolekularen Epitope Spreading auf ein Epitop eines anderen Autoantigens ausweitet, das strukturell ähnlich ist oder in der gleichen anatomischen Umgebung liegt (Didona and Di Zenzo, 2018). Der Begriff des Epitope Spreading schließt auch den Umstand mit ein, dass durch eine erste Immunantwort mit Gewebeerstörung weitere, vorher für die Immunzellen unerreichbare Antigene freigelegt werden, was zu einem zweiten Entzündungsschub gegen diese neuen Antigene führen kann (Chan et al., 1998). In Pferden mit IRBP-induzierter Uveitis wurde Epitope Spreading hin zu S-Antigen demonstriert (Deeg et al., 2002b). Auch bei Pferden mit spontaner ERU konnte intra- und intermolekulares Epitope Spreading gezeigt werden, was eine Erklärung für die wiederkehrenden Entzündungsschübe sein könnte (Deeg et al., 2006a). Bei Warmblütern und Appaloosa wurde außerdem die Beteiligung einer genetischen Komponente vermutet (Deeg et al., 2004a; Kulbrock et al., 2013; Sandmeyer et al., 2020), wie in Kapitel 2.1.1 bereits genauer beschrieben wurde.

Obwohl schon einige Punkte des Verlaufs der Pathogenese aufgedeckt werden konnten, ist die Ätiologie noch immer umstritten (Degroote and Deeg, 2021). Ob

Leptospiren eine ERU auslösen können, wird seit längerem kontrovers diskutiert. Denn zum einen kann nicht bei jedem an ERU erkrankten Tier ein positiver Leptospirentiter nachgewiesen werden (Gerding and Gilger, 2016), und zum anderen können nicht alle Aspekte der Klinik und vor allem der Therapie durch Leptospiren erklärt werden (Deeg, 2008). 2010 konnte eine Studie von Verma et al. immunrelevante Epitope auf Leptospiren nachweisen, die in ähnlicher Weise auf intraokulären Proteinen vorkamen, woraus Verma et al. schlossen, dass kreuzreaktive Antikörper zur Leptospiren-assoziierten Pathogenese beitragen könnten (Verma et al., 2010). Allerdings konnte eine Vakzination betroffener Pferde mit verschiedenen Leptospirenservaren das Fortschreiten der Uveitis nicht signifikant verlangsamen (Rohrbach et al., 2005). Außerdem erfolgt die Behandlung der mutmaßlich durch Leptospiren ausgelösten ERU mit immunsuppressiven Medikamenten (Verma and Stevenson, 2012), was bei einer bakteriell verursachten Entzündung ohne gleichzeitige Antibiotikagabe kontraindiziert ist. Auch niedrig dosiertes Gentamicin wurde zur Behandlung von ERU intravitreal injiziert, was Fischer et al. mit der reduzierten Inflammations- und Rezidivrate im Beobachtungszeitraum von 30 Tagen bei an ERU erkrankten Pferden in Verbindung brachten (Fischer et al., 2019). Doch diese Wirkung konnte unabhängig vom Leptospirenstatus der Pferde beobachtet werden, weshalb Fischer et al. weiter spekulierten, dass Gentamicin nicht die intraokulären Leptospiren bekämpfe, sondern die immunmedierten Prozesse, die zur ERU führen, störe (Fischer et al., 2019). So solle es beispielsweise die Aktivierung autoaggressiver T-Zellen beeinträchtigen oder gar verhindern (Fischer et al., 2019). Jedoch ist auch das Einbringen von Gentamicin ins Auge strittig, da es selbst im Mikrogrammbereich neurotoxisch ist und Katarakte und retinale Degeneration auslösen kann (McMullen Jr and Fischer, 2017; Lindsey and Townes-Anderson, 2018).

In den letzten Jahren wurde eine Dysbiose des gastrointestinalen Mikrobioms als potenzielle Ursache für ERU postuliert, jedoch konnte diese Theorie durch eine kürzlich durchgeführte Studie entkräftet werden (Martin de Bustamante et al., 2021). In der Untersuchung des fäkalen Mikrobioms von augengesunden und an ERU erkrankten Tieren aus dem gleichen Stall waren keine Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms zu finden, woraus geschlossen wurde, dass die ERU nicht mit einer veränderten gastrointestinalen Bakterienflora einhergeht (Martin de Bustamante et al., 2021). Auch ein abnormes Verhältnis der peripheren

Lymphozyten in der ERU konnte ausgeschlossen werden (Saldinger et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass die Verteilung von CD3⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden im peripheren Blut prozentual gleich war (Saldinger et al., 2019). Jedoch konnte in CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren signifikant mehr Interferon- γ (IFN- γ) nachgewiesen werden, was für die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellsubpopulation T-Helferzellen 1 (Th1) in der ERU spricht (Saldinger et al., 2019). Mit Hilfe verschiedener Lockstoffe konnte kurz darauf in *in vitro*-Migrationsversuchen mit peripheren Lymphozyten von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden belegt werden, dass Lymphozyten von ERU-Tieren eine höhere Zellmotilität aufweisen (Wiedemann et al., 2020). Die Zellen konnten schneller und zielgerichteter, auch über längere Distanzen, durch eine dreidimensionale Kollagenmatrix wandern als Lymphozyten von Kontrollpferden (Wiedemann et al., 2020). Als Lockstoffe wurden unter anderem IFN- γ und CRALBP verwendet (Wiedemann et al., 2020). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten signifikante Unterschiede im Wanderungsverhalten zwischen peripheren Lymphozyten von ERU- und Kontrollpferden, selbst wenn die Zellen nicht im akuten Entzündungsschub untersucht wurden (Wiedemann et al., 2020). Somit waren auch zwischen den ERU-Schüben aktivierte autoreaktive Zellen im Blut von ERU-Tieren zu finden (Wiedemann et al., 2020). Darüber hinaus konnte eine Verbindung zwischen der zuvor gefundenen verminderten Septin 7-Expression in Lymphozyten von ERU-Tieren und dem veränderten Wanderungsverhalten dieser Zellen hergestellt werden (Degroote et al., 2014; Wiedemann et al., 2020). Außerdem wurde eine höhere Abundanz des Moleküls Formin like 1 (FMNL1) in CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Tieren im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen von augengesunden Pferden bewiesen (Degroote et al., 2017). In Transmigrationsversuchen mit CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden wurde durch Hemmung von FMNL1, das vor allem an der Zellmembran lokalisiert war, die Migration der aus ERU-Tieren stammenden CD4⁺ T-Zellen um das Zweifache vermindert (Degroote et al., 2017). Somit könnte FMNL1 zum dysregulierten Phänotyp und der erhöhten Zellmigration der CD4⁺ T-Zellen in ERU beitragen (Degroote et al., 2017).

CD4⁺ T-Zellen sind aber nicht die einzigen Zellen in der ERU, die die BRB überwinden können und an der intraokulären Entzündung beteiligt sind. Auch Monozyten wurden intraokulär durch die Expression von CD68 nachgewiesen

(Zipplies et al., 2010). Die intraokulären Monozyten waren außerdem positiv für C3d und Faktor Bb Neoantigen, welche Bestandteile des Komplementsystems darstellen (Zipplies et al., 2010). Das von den intraokulären Th1-Zellen produzierte IFN- γ könnte Monozyten aktivieren, welche daraufhin Komplementfaktoren produzieren und so einen Beitrag zur intraokulären Entzündung leisten könnten (Zipplies et al., 2010). Auch die Rolle der Granulozyten in der ERU wurde in den letzten Jahren intensiver erforscht. Das Molekül Talin 1 war in peripheren Granulozyten von ERU-Tieren signifikant verringert (Degroote et al., 2012). Talin 1 ist ein wichtiges Molekül in der Regulation der Integrinexpression, die bei der Aktivierung und Wanderung der Lymphozyten in der ERU eine wichtige Rolle spielt (Degroote et al., 2012). Der genaue Effekt der verminderten Talin 1-Expression in Granulozyten von ERU-Tieren konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden (Degroote et al., 2013). In einer Proteomanalyse konnte eine Aktivierung der Granulozyten von an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden, da die in ERU höher abundanten granulozytären Proteine zu den Signalwegen MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation, mitogenaktivierte Proteinkinase-Signalweg und neutrophile Degeneration clusterierten (Weigand et al., 2020). Da die untersuchten ERU-Blutproben in einer entzündungsfreien Phase und nicht während eines Inflammationsschubs gewonnen wurden, wurden die Granulozyten in ERU als latent aktiviert klassifiziert (Weigand et al., 2020). Diese Ergebnisse unterstützen den Fund aktivierter neutrophiler Granulozyten in ERU-Tieren ein Jahr zuvor (Fingerhut et al., 2019).

Zusammengefasst ist die ERU eine multifaktorielle, immunmedierte Erkrankung, die vor allem durch CD4⁺ T-Zellen angetrieben wird und deren genaue Ätiologie bis heute nicht vollständig geklärt ist (Gerding and Gilger, 2016; Degroote and Deeg, 2021).

2.1.3 Klinik und Therapie

Die ERU kann uni- oder bilateral auftreten (Flores et al., 2020) und wird klinisch in drei verschiedene Formen unterteilt: die klassische, die hintere und die schleichende Uveitis (Gilger, 2010). In der klassischen ERU wechseln sich Episoden akuter intraokulärer Entzündung, die mit jedem Schub stärker werden, mit symptomfreien Episoden ab (Gilger, 2010; Malalana et al., 2015). Die Entzündung

kann Iris, Ziliarkörper, Chorioidea, Hornhaut, Linse, vordere Augenkammer, Retina und Glaskörper betreffen (Gilger, 2010). Die betroffenen Augen sind schmerzhaft und die Pferde zeigen in diesen akuten Phasen Blepharospasmus, Epiphora und gerötete Konjunktiven (Sandmeyer et al., 2020). Weitere Symptome können Kammerwassertrübung, Miosis und Irishyperpigmentierung sein (Sandmeyer et al., 2020). Mit fortschreitender Krankheit können sich Katarakte, Enophthalmus, Irisdepigmentierung, hintere Synechien und letztendlich Blindheit entwickeln, jedoch treten nicht bei allen Pferden in jedem Schub alle Symptome auf (Gilger, 2010; Sandmeyer et al., 2020). Die hintere Uveitis betrifft vor allem die Augenbereiche Retina, Chorioidea und Glaskörper (Malalana et al., 2015). Von ERU betroffene Appaloosa zeigen meist eine schleichende Uveitis mit persistierender geringgradiger Entzündung, die äußerlich nur schwer zu erkennen ist und deshalb oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird (Malalana et al., 2015; Sandmeyer et al., 2020).

Der Vorbericht von wiederkehrenden Entzündungsschüben im Auge ohne ersichtliche Auslöser gibt Hinweise auf eine ERU (Spiess, 2010), die Diagnose erfolgt über eine gründliche Augenuntersuchung mit einer Spaltlampe, indirekter Ophthalmoskopie, Tonometrie und einem Fluoreszeintest (McMullen Jr and Fischer, 2017). In uneindeutigen Fällen können Ultraschall und Fundoskopie herangezogen werden (McMullen Jr and Fischer, 2017).

Da die Ätiologie, wie in Kapitel 2.1.2 besprochen, immer noch unbekannt ist, gibt es noch keine kausale Therapie (Gilger et al., 2006; McMullen Jr and Fischer, 2017). Das derzeitige Behandlungsziel ist deshalb, die akute Entzündung zu stoppen und neue Schübe so gut wie möglich zu verhindern (Gerding and Gilger, 2016). Die Therapie erfolgt entweder medikamentös, chirurgisch oder als Kombinationstherapie und sollte so früh wie möglich begonnen werden, um Sekundärfolgen zu vermeiden und die Sehfähigkeit zu erhalten (McMullen Jr and Fischer, 2017). Der Behandlungserfolg muss genau überprüft werden und auch geringgradige Entzündungszeichen wie eine leichte Kammerwassertrübung dürfen nicht übersehen werden, sonst besteht die Gefahr, dass die Behandlung nach vermeintlichem Erfolg zu früh gestoppt wird und die Entzündung in den folgenden Wochen wieder zurückkehrt (McMullen Jr and Fischer, 2017). Das Mydriatikum Atropin ist ein wichtiger Bestandteil der lokalen Therapie, da es Spasmen der Irismuskulatur löst, die Pupille weitert und so Synechien vorbeugt (McMullen Jr and

Fischer, 2017). Kortikosteroide wirken antiinflammatorisch und immunsuppressiv und können topisch (Dexamethason, Prednisolon), subkonjunktival (Methylprednisolon, Triamcinolon) oder systemisch (Dexamethason, Prednisolon) verabreicht werden (McMullen Jr and Fischer, 2017). Auch nichtsteroidale Antiphlogistika, die ebenfalls antiinflammatorisch wirken, stehen als lokale (Diclofenac oder Flurbiprofen) oder systemische (Flunixin Meglumine, Phenylbutazon) Behandlungsoption zur Verfügung (McMullen Jr and Fischer, 2017).

Zu den chirurgischen Therapieoptionen bei ERU gehören die Pars Plana Vitrektomie und das Setzen von suprachorioidalen Cyclosporinimplantaten (McMullen Jr and Fischer, 2017; Voelter et al., 2020). Bei der Pars Plana Vitrektomie wird der Glaskörper und darin enthaltene Entzündungsprodukte abgesaugt und durch eine isotone Kochsalzlösung ersetzt (Werry and Gerhards, 1992; Spiess, 2010; Voelter et al., 2020). Die Pars Plana Vitrektomie wird nach Abklingen eines akuten Inflammationsschubs durchgeführt und hat gute Erfolgsraten, allerdings können intra- und postoperative Komplikationen wie vitreale und/oder retinale Blutungen, vorübergehende Eiteransammlung in der vorderen Augenkammer, Katarakt und Retinaablösung auftreten (Brandes et al., 2007; Spiess, 2010; Voelter et al., 2020). Suprachorioidale Cyclosporinimplantate werden bei Pferden empfohlen, die an ERU erkrankt sind und trotz gut eingestellter medikamenteller Therapie rezidivierende Entzündungsschübe entwickeln (McMullen Jr and Fischer, 2017). Cyclosporin A beeinträchtigt über die Hemmung der IL-2-Transkription die Proliferation von Effektor-T-Zellen (Gilger et al., 2006). Durch die Implantate verringerten sich die wiederkehrenden Entzündungsschübe bei Pferden mit ERU deutlich (Gilger et al., 2006). Bei einer nachfolgenden Studie zeigte sich, dass fast 80 % der an ERU erkrankten Pferde, die mit suprachorioidalen Cyclosporinimplantaten behandelt wurden, nach über zwei Jahren noch immer sehen konnten (Gilger et al., 2010). Nach drei bis vier Jahren stieg die Häufigkeit der Erblindung durch persistierende uveitische Episoden, Glaukome und Katarakte jedoch wieder an (Gilger et al., 2010). Gilger et al. mutmaßten, dass dies mit der abnehmenden Cyclosporinkonzentration zusammenhängen könnte und empfahlen, ein neues Cyclosporinimplantat nach 48 Monaten zu setzen (Gilger et al., 2010).

2.2 Immunpathogenese bei vergleichbaren Uveitisformen

2.2.1 Autoimmune Uveitis des Menschen

Die autoimmune Uveitis des Menschen ist eine nicht-infektiöse Entzündung okulärer Strukturen (Prete et al., 2016; Zhu et al., 2021). Sie kann schon im Kindesalter auftreten (Prete et al., 2016), betrifft aber meist junge Erwachsene (Thorne et al., 2016) und verläuft chronisch oder in Schüben (Kaufmann et al., 2012). Anhand der betroffenen Augensegmente können vordere, intermediäre, hintere und Panuveitis unterschieden werden (Egwuagu et al., 2021). Die Klinik kann von einer Augenrötung und erhöhten Lichtempfindlichkeit bis zum Verlust der Sehfähigkeit gehen, die hintere Uveitis kann asymptomatisch sein (Prete et al., 2016). Als häufige Komplikationen werden Katarakte genannt, es sind aber unter anderem auch Glaukome und Retinaablösungen möglich (Prete et al., 2014).

CD4⁺ T-Helferzellen, genauer Th1- und Th17-Zellen, wandern, wie auch bei der ERU (siehe Kapitel 2.1.2), ins Auge ein und spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der autoimmunen Uveitis des Menschen (Amadi-Obi et al., 2007; Mochizuki et al., 2013). Außerdem wurde bei Uveitispatienten in der Remissionsphase eine höhere Abundanz von peripheren regulatorischen T-Zellen (Tregs) im Vergleich zu gesunden Menschen und Patienten mit aktiver Uveitis festgestellt (Gilbert et al., 2018). Es wurde die These aufgestellt, dass ein Ungleichgewicht zwischen autoreaktiven Effektor-T-Zellen und Tregs bei der Entstehung der autoimmunen Uveitis des Menschen eine Rolle spielen könnte (Fu et al., 2020). Ein Übereinstimmungspunkt zur ERU ist auch die Immunreaktion gegen die Autoantigene S-Antigen und IRBP, die schon früh in Patienten mit nicht-infektiöser Uveitis nachgewiesen werden konnte (de Smet et al., 1990). Auch das Autoantigen CRALBP, welches als erstes im Pferd nachgewiesen wurde (Deeg et al., 2006b), ist an der Pathogenese der autoimmunen Uveitis des Menschen beteiligt (Deeg et al., 2007). Aus Mausmodellen zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen des Menschen ergaben sich Hinweise, dass eine Dysbiose des gastrointestinalen Mikrobioms auch an der Entstehung der autoimmunen Uveitis beteiligt sein könnte (Nakamura et al., 2016; Fu et al., 2020), dies konnte jedoch für den Menschen noch nicht bewiesen werden (Fu et al., 2020). Da der auslösende Faktor der autoimmunen Uveitis auch beim Menschen immer noch unbekannt ist, sind die Therapieziele die Unterdrückung der

Inflammationsschübe und das Verhindern von intraokulären Folgeschäden (Dick et al., 2016). Dies wird einerseits durch eine lebenslange Gabe hochdosierter Immunsuppressiva versucht, beispielsweise mit Kortikosteroiden, Azathioprin oder Cyclophosphamiden, oder durch Tumornekrosefaktor α - oder IL-17-Antikörpertherapien (Prete et al., 2016; Rosenbaum et al., 2019). Allerdings kann die Langzeitgabe von Kortikosteroiden ebenfalls zu Glaukom oder Katarakt führen (Dick et al., 2016).

Obwohl die autoimmune Uveitis allgemein eine niedrige Prävalenz hat, stellt sie aufgrund der schmerzhaften Entzündung, der Persistenz, den möglichen Komplikationen und der anhaltenden Behandlung eine hohe Belastung für betroffene Patienten dar (Durrani et al., 2004; Barisani-Asenbauer et al., 2012; Thorne et al., 2016). Da es noch keine kausale Therapie gibt, welche die Erkrankung vollständig heilen kann (Dick et al., 2016; Zhu et al., 2021), sind neue Erkenntnisse zur Ätiologie und Pathogenese erforderlich. Wegen der großen Ähnlichkeit in Klinik und Pathogenese der autoimmunen Uveitis des Menschen und der ERU beim Pferd eignet sich letztere gut als Modell zur Erforschung der humanen Erkrankung (Deeg et al., 2002b; Degroote and Deeg, 2021).

2.2.2 Tiermodelle mit induzierter autoimmuner Uveitis

Tiermodelle liefern wichtige Erkenntnisse in der Erforschung humaner Pathologien, die *in vitro* nicht getreu ihrer Komplexität dargestellt werden können, weil unter anderem der Bezug zum Gesamtorganismus fehlt. Für die autoimmune Uveitis des Menschen zum Beispiel wurden Tiermodelle mit Mäusen und Ratten etabliert, die eine experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) entwickeln und mit deren Hilfe viel über die Pathogenese der Erkrankung im Menschen gelernt werden konnte.

Schon seit langem wurden Informationen zu immunpathogenen Mechanismen autoimmuner Krankheiten in adoptiven Transferexperimenten gesammelt, bei denen die Krankheit durch Serum oder lymphoide Zellen von immunisierten Spendern auf gesunde Individuen übertragen wird (Mochizuki et al., 1985). Solche adoptiven Transferexperimente an Lewis-Ratten mit EAU zeigten früh, dass periphere T-Zellen, die autoaggressiv gegen das retinale Protein S-Antigen reagierten, auch in gesunden Empfängertieren eine Uveitis auslösten, selbst wenn sie peripher gespritzt wurden (Caspi et al., 1986). Diese Experimente bewiesen

nicht nur, dass die autoimmune Uveitis von der Peripherie ausgeht, sondern auch, dass nur 5×10^6 – 10×10^6 autoaggressive T-Zellen ausreichen, um die Erkrankung in gesunden Empfängertieren zu initiieren (Caspi et al., 1986). Die Empfängerratten entwickelten sechs bis acht Tage nach der peripheren Injektion eine meist unilaterale Uveitis (Caspi et al., 1986), deren Pathologie der entsprach, die bei aktiv mit Autoantigen immunisierten Ratten zu sehen war (Caspi et al., 1986). Außerdem wurde mit adoptiven Transferexperimenten an Lewis-Ratten die Verteilung der intraperitoneal injizierten S-Antigen-spezifischen Lymphozyten in den Empfängern untersucht, indem diese Zellen mit Indium-111-oxin, einem gamma-Strahler, markiert wurden (Palestine et al., 1986). Hierbei wurde die Tatsache beleuchtet, dass der Großteil der transferierten T-Zellen in der Peripherie blieb, genauer gesagt in Leber, Milz, Thymus und Hoden und dass sich dies auch nach 48 Stunden nicht mehr änderte (Palestine et al., 1986). Da nur ein kleiner Teil der transferierten Zellen ins Auge wanderte und die Inflammation zeitversetzt zur Injektion eintrat, wurde vermutet, dass die ins Auge gewanderten autoantigenspezifischen T-Zellen zusätzliche empfängereigene und nicht antigenspezifische Abwehrzellen rekrutierten, um die intraokuläre Entzündung auszulösen (Palestine et al., 1986). Diese These wurde in späteren Experimenten mit Lewis-Ratten bewiesen (Caspi et al., 1993). Außerdem gaben Versuche mit Lewis-Ratten Aufschlüsse zur Beteiligung des Komplementsystems bei der EAU (Jha et al., 2006). So werden komplementregulierende Proteine im Auge exprimiert, die zum Ende der intraokulären Inflammation bei der EAU beitragen (Jha et al., 2006). Wie in Kapitel 2.1.2 erläutert, wurde auch bei der ERU eine Beteiligung des Komplementsystems bewiesen (Zipplies et al., 2010). Bei einer genaueren Untersuchung der Zytokinexpression intraokulärer Zellen in der EAU bei Ratten konnte die Relevanz von IFN- γ und IL-17 genauer beleuchtet werden (Kaufmann et al., 2012). IL-17 wurde von Th17-Zellen produziert und war vor allem in der ersten Entzündungsphase der EAU wichtig, während IFN- γ von Th1-Zellen vor allem bei den wiederkehrenden Entzündungsschüben von Bedeutung war (Kaufmann et al., 2012).

In Amerika wurden außerdem Mausmodelle mit EAU zur Erforschung der autoimmunen Uveitis des Menschen entwickelt (Caspi et al., 1988). Den Mäusen wurde entweder IRBP oder S-Antigen gespritzt, worauf sie eine Uveitis ähnlich der des Menschen entwickelten, die später startete, länger dauerte und einen weniger

akuten Verlauf zeigte als die der Ratten (Caspi et al., 1988). Der eher chronische Verlauf und die auftretenden fokalen Retinaveränderungen ließen darauf schließen, dass sich die murine EAU besser als Modell für die Erkrankung des Menschen eignet als andere Nagermodele (Caspi et al., 1988). Die Beteiligung des Komplementsystems an der EAU-Pathogenese konnte auch im murinen Modell der Erkrankung gezeigt werden, da die Komplementrezeptoren C3aR und C5aR für die Entwicklung einer EAU wichtig waren (Zhang et al., 2016). So wiesen Mäuse, die keine C3a- und C5a-Rezeptoren hatten, einen viel leichteren Verlauf der EAU auf als Mäuse mit den Rezeptoren (Zhang et al., 2016). Die Bedeutung der CD4⁺ T-Zellsubtypen in der Pathogenese wurde ebenfalls genauer beleuchtet, denn in einem Mausmodell mit IRBP-induzierter Uveitis konnten signifikant mehr Th1-, Th17- und Th17/Th1-Zellen in der uveitischen Retina nachgewiesen werden als in Kontrolltieren ohne Uveitis, wohingegen das Verhältnis der Th17/Th1-Zellen im Blut dem der Kontrolltiere glich (Chen et al., 2020). Darauf aufbauend wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Mikroumgebung die Plastizität der CD4⁺ T-Zellen beeinflusste (Chen et al., 2020). Eine Behandlung der Mäuse mit Dexamethason konnte zwar die Stärke der EAU durch Reduktion der Th1-Zellen vermindern, die Zahl der intraokulären Th17- und Th17/Th1-Zellen wurde aber nicht beeinflusst, denn diese Zellen waren auch noch nach der Dexamethasontherapie in der Retina zu finden (Chen et al., 2020). Chen et al. schlossen aus diesen Ergebnissen, dass die okuläre Entzündung aufgrund des Verbleibs von Th17- und Th17/Th1-Zellen in der Retina nicht vollständig therapiert werden konnte und dass die Reduktion der retinalen Th1-Zellen mit deren Umwandlung zu Th17/Th1-Zellen zusammenhängen könnte (Chen et al., 2020). Außerdem wurde die Bedeutung von Tregs bei der Beendigung und dem Schutz vor einer intraokulären Inflammation in verschiedenen murinen EAU-Modellen aufgezeigt (McPherson et al., 2009; McPherson et al., 2014; Silver et al., 2015; Liu et al., 2020). Die 2009 aufgestellte Hypothese, dass endogene regulatorische Mechanismen und die periphere Induktion von Tregs zum Schutz vor EAU dienen könnten (McPherson et al., 2009), konnte wenige Jahre später bestätigt werden, denn die lokale Verarmung an Tregs verschlimmerte die okuläre Entzündung von transgenen Mäusen mit EAU (McPherson et al., 2014). In *in vitro*-Versuchen konnten Tregs, die aus uveitischen Augen isoliert wurden, sowohl die Aktivierung als auch die Zytokinproduktion von IRBP-spezifischen murinen Effektor-T-Zellen hemmen (Silver et al., 2015). Außerdem konnte in

weiteren Experimenten der Studie der Nachweis erbracht werden, dass murine Tregs auch bei der Aufrechterhaltung der Remission beteiligt sind, da EAU-Mäuse, deren Tregs durch Injektion des Diphtherietoxins dezimiert wurden, sofort einen erneuten intraokulären Inflammationsschub entwickelten (Silver et al., 2015). Außerdem wurde in einer neueren EAU-Studie das Konzept der dualen immunologischen Toleranz vorgestellt (Liu et al., 2020). So soll die EAU durch ein Zusammentreffen von zwei Faktoren möglich werden: Erstens das Versagen einer Treg-Induktion und zweitens durch ein zahlenmäßiges Ungleichgewicht zwischen regulatorischen und Effektor-T-Zellen (Liu et al., 2020). Liu et al. stützten diese Hypothese auf die Beobachtungen, dass sich eine EAU entwickelte, wenn Mäuse nur wenige Lymphozyten und vor allem wenige Tregs hatten und eine lymphopenia-assoziierte spontane EAU durch den adoptiven Transfer einer antigenerfahrenen CD4⁺ T-Zellpopulation, die auch Tregs enthielt, in transgenen Mäusen verhindert werden konnte (Liu et al., 2020).

Es ist wichtig zu wissen, dass die murinen EAU-Modelle, abhängig von ihrem Auslöser, unterschiedliche Pathogenesen und Kliniken aufweisen (Chen et al., 2013). So zeigten zum Beispiel Mäuse, die mit IRBP immunisiert wurden, monophasische Formen hinterer Uveitis und vorübergehende vordere Uveitis mit diffusen Veränderungen in der Retina, und manche Mäuse entwickelten eine chronische Form der Uveitis (Chen et al., 2013). Die transgene Veränderung des T-Zellrezeptors (TCR) von R161H-Mäuse, sodass er eine kurze Sequenz des IRBP-Proteins erkennt, führte zu einer sogenannten spontanen Uveitis in der fünften bis sechsten Lebenswoche (Chen et al., 2013; Horai et al., 2013). Die vordere Augenkammer war in diesem Modell nur minimal betroffen, das klinische Bild zeigte eine chronische hintere Uveitis mit fokalen Läsionen an der Retina (Chen et al., 2013). Mäuse können aber auch genetisch so verändert werden, dass ihnen das Gen für den Transkriptionsfaktor Autoimmun-Regulator (AIRE) fehlt, welches dafür verantwortlich ist, dass im Thymus autoaggressive T-Zellen aussortiert werden (Chen et al., 2013) (siehe Kapitel 2.3.1). Bei diesen Mäusen entstand eine multiorganische Autoimmunität, die sich im Auge als chronische Inflammation der hinteren Augenabschnitte manifestierte (Chen et al., 2013). Die vordere Augenkammer war hierbei nicht betroffen und es wurden insgesamt auch weniger intraokuläre Zellen gefunden (Chen et al., 2013). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass jedes EAU-Modell andere Teile der Pathogenese der autoimmunen

Uveitis des Menschen widerspiegelt, diese aber bis jetzt nicht durch ein einziges EAU-Modell in ihrer Gesamtheit und Komplexität dargestellt werden kann (Chen et al., 2013; Prete et al., 2016; Liu et al., 2020).

2.2.3 ERU als spontanes Modell für die menschliche Erkrankung

EAU-Modelle können wichtige Erkenntnisse zur Pathogenese der autoimmunen Uveitis liefern, nicht zuletzt da sie standardisiert und wiederholbar unter Laborbedingungen durchgeführt werden. Die Modelltiere stammen aus Inzuchtstämmen und haben den gleichen genetischen Hintergrund, weshalb adoptive Transferexperimente möglich sind (Caspi et al., 1986). Außerdem kann zum Beispiel durch Knock-Out eines bestimmten Proteins dessen Wirkung im Organismus bis ins Detail untersucht werden (Kang et al., 2021). In diesen Vorteilen liegen aber gleichzeitig auch die Nachteile der EAU-Modelle. Zum einen ist der auslösende Faktor genau bekannt, da keines der in Kapitel 2.2.2 genannten Tiere spontan eine autoimmune Uveitis ohne menschliches Zutun entwickelt (Chen et al., 2013; Horai et al., 2013; Diedrichs-Möhring et al., 2018; Muhammad et al., 2020; Chen et al., 2021). Zum anderen werden die Tiere unter Laborbedingungen gehalten, wodurch alle potenziellen Umwelteinflüsse außer Acht gelassen werden. Die Inzuchtstämme spiegeln nicht die komplexen Varianten wider, die in der Natur und jedem Patienten vorkommen (Chen et al., 2013; Prete et al., 2016).

Das Pferd hingegen ist das einzige spontane Uveitismodell für den Menschen, mit sehr ähnlicher Pathogenese und Klinik (Deeg et al., 2002a; Diedrichs-Möhring et al., 2018; Degroote and Deeg, 2021). Die betroffenen Pferde, die in der vorliegenden Arbeit beprobt wurden, werden darüber hinaus nicht im Labor gehalten, sondern in verschiedenen privaten Ställen, wodurch diverse Umweltfaktoren in die Untersuchung miteinfließen und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belastbar und realitätsnah machen. Wie am Beispiel des Autoantigens CRALBP gezeigt, ist die ERU ein wichtiges Modell für die menschliche Erkrankung: CRALBP wurde als erstes in Pferden mit ERU gefunden (Deeg et al., 2006b) und später auch beim Menschen als wichtiges Autoantigen in autoimmuner Uveitis (Deeg et al., 2007), autoimmuner Retinopathie (Neutzner et al., 2011) und juveniler idiopathischer Arthritis-assoziiierter Uveitis (Busch et al., 2019) bestätigt. Das Pferd hat weiterhin aufgrund seiner Größe ein viel größeres Blutvolumen als

Mäuse oder Ratten, was die Gewinnung von peripheren Blutzellen und eine Mehrfachbeprobung vereinfacht (Karagianni et al., 2020). Außerdem hat sich das Immunsystem von Pferden ähnlich dem des Menschen entwickelt, im Gegensatz zu nachtaktiven Mäusen und Ratten (Karagianni et al., 2020). In einer aktuellen Studie konnte mittels Einzelzell-Ribonukleinsäure-Sequenzierung die große Ähnlichkeit zwischen den peripheren Immunzellsubpopulationen von Pferd und Mensch bestätigt werden (Patel et al., 2021). Zusammengefasst liefern EAU-Modelle wichtige Erkenntnisse zur Funktion bestimmter Gene oder Zellproteine, das Pferd mit ERU spiegelt jedoch die Vielschichtigkeit der Erkrankung im Menschen besser wider. Durch Forschung mit an ERU erkrankten Pferden können insbesondere Kenntnisse zur spontanen Ätiologie und Pathogenese der autoimmunen Uveitis gewonnen werden, die sowohl für die Veterinär-, als auch für die Humanmedizin von Bedeutung sind.

2.3 Physiologie und Pathophysiologie des Immunsystems

2.3.1 Immunsystem und immunologische Toleranz

Das Immunsystem soll den Körper vor Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten schützen (Miles and Calder, 2021). Unkontrolliert können Immunzellen jedoch auch Krankheiten, wie beispielsweise eine Autoimmunität, auslösen (Buck et al., 2017; Miles and Calder, 2021). Das Immunsystem hat vier große Aufgabenbereiche: Es fungiert zum einen als Barriere, um Mikroorganismen am Eindringen in den Körper zu hindern (Miles and Calder, 2021). Beispiele hierfür sind die Haut und die Mukosa von Gastrointestinal- und Respirationstrakt, aber auch die antimikrobiellen Proteine in Tränen und Speichel und der saure pH im Magen (Miles and Calder, 2021). Auf's Auge bezogen sind diese Barrieren die Augenlider, der Tränenfluss und antimikrobielle und antiinflammatorische Proteine wie Lysozyme, Laktoferrin und Komplement im Tränenfilm (Plummer, 2017). Zum anderen unterscheidet das Immunsystem zwischen pathogenen und unschädlichen Mikroorganismen (Miles and Calder, 2021). Dies geschieht durch generelle Strukturbestandteile, sogenannte Mikrobe-assoziierte molekulare Muster wie beispielsweise Lipopolysaccharide in der Zellwand von gram-negativen Bakterien, oder durch Mikrobe-spezifische Antigene (Miles and Calder, 2021). Der dritte

Aufgabenbereich des Immunsystems ist das Eliminieren der als schädlich identifizierten Mikroorganismen (Miles and Calder, 2021). Dafür können sich Immunzellen von ruhenden zu pathogenbekämpfenden Zellen differenzieren, klonal expandieren, in verschiedene Gewebe migrieren, die Expression von Oberflächenmolekülen verändern, Effektormoleküle sezernieren und benachbarte Zellen kontrollieren (Buck et al., 2017). Diese Funktionen sind eng miteinander verbunden und hängen von dynamischen Anpassungen im Zellmetabolismus ab (Buck et al., 2017). Der vierte Aufgabenbereich des Immunsystems ist die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, mit dessen Hilfe ein erneuter Kontakt mit einem zuvor bekämpften Mikroorganismus zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort führt (Miles and Calder, 2021). Zellen dieses vierten Aufgabenbereichs sind langlebige T- und B-Gedächtniszellen (Miles and Calder, 2021).

Häufig wird zwischen angeborenem und erworbenem (adaptivem) Immunsystem unterschieden, jedoch sind diese zwei Untergruppen durch zahlreiche Interaktionen miteinander verbunden (Miles and Calder, 2021). Die angeborene Immunität umfasst neben den oben genannten Barrierefunktionen die Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (Miles and Calder, 2021). Diese Zellen besitzen Rezeptoren, die Mikroben-assoziierte molekulare Muster erkennen und binden können, was meist zur Phagozytose des Mikroorganismus führt (Miles and Calder, 2021). Dendritische Zellen und Makrophagen werden auch antigenpräsentierende Zellen genannt, da sie Bestandteile der phagozytierten Mikroorganismen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren können (Mochizuki et al., 2013; Miles and Calder, 2021). Auf der Augenoberfläche sind vor allem Langerhans Zellen als antigenpräsentierende Zellen anzutreffen (Plummer, 2017). Die so präsentierten Strukturen werden von antigenspezifischen T-Helferzellen ($CD4^+$ T-Zellen) erkannt, wodurch das erworbene Immunsystem in den Abwehrprozess involviert wird (Boehm and Swann, 2014; Miles and Calder, 2021). Das adaptive Immunsystem umfasst neben $CD4^+$ T-Zellen die zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$ T-Zellen), welche virusinfizierte Zellen zerstören können und B-Zellen, deren Aufgabe die Produktion neutralisierender Antikörper ist (Boehm and Swann, 2014; Miles and Calder, 2021). Der TCR interagiert mit immunogenen Peptiden, sogenannten Epitopen, die an MHC-Moleküle gebunden sind, was die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion der T-Zellen vermittelt (Weber et al., 2021). Epitope, die von

MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden wurden, aktivieren CD8⁺ T-Zellen, während CD4⁺ T-Zellen Epitope erkennen, die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden (Boehm and Swann, 2014). Für einen möglichst breitgefächerten Schutz gegen Pathogene wird eine große Diversität an T-Zellrezeptoren mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten benötigt (Weber et al., 2021). Aktivierte T-Zellen produzieren Zytokine, die wiederum die Aktivität des angeborenen Immunsystems regulieren können (Miles and Calder, 2021). Nach einer erfolgreichen Eliminierung der Erreger können die spezialisierten Abwehrzellen ins ruhende Stadium zurückkehren, sich zu einer Gedächtniszelle differenzieren oder sterben (Buck et al., 2017; Miles and Calder, 2021).

Das Immunsystem ist nicht nur bei der Abwehr von Pathogenen relevant, sondern auch beim Aufbau und Erhalt der sogenannten immunologischen Toleranz gegenüber harmlosen Mikroorganismen, Nahrungsbestandteilen und körpereigenen Strukturen (Gery and Caspi, 2018; Miles and Calder, 2021). Die Toleranz körpereigener Antigene wird durch die Zusammenarbeit von zentraler und peripherer Toleranz erreicht (Gery and Caspi, 2018). Wenn einer dieser beiden Mechanismen nicht mehr perfekt arbeitet, kann das Krankheitsbild einer Autoimmunität entstehen (Gery and Caspi, 2018). Zentrale Toleranz wird durch positive und negative Selektion unreifer T-Zellen, genannt Thymozyten, im Thymus erreicht (Klein et al., 2009). Die Selbsttoleranz körpereigener Epitope wird durch den Transkriptionsfaktor AIRE kontrolliert, der für die Expression gewebespezifischer Autoantigene im Thymus verantwortlich ist (Mochizuki et al., 2013) (siehe auch Kapitel 2.2.2). Die positive Selektion lässt Thymozyten, deren Rezeptoren körpereigene MHC-Strukturen erkennen und moderat binden, überleben, während alle anderen in die Apoptose eintreten (Klein et al., 2009). Die negative Selektion beschreibt den Vorgang, dass die unreifen T-Zellen im Thymus auf ihre Bindungsstärke zu körpereigenen Antigenen (außer MHC-Molekülen) getestet werden (Mochizuki et al., 2013). Thymozyten, die eine starke Bindung zu körpereigenen Antigenen eingehen, werden eliminiert, wohingegen sich die Zellen mit moderater Affinität zu Autoantigenen zu natürlichen regulatorischen T-Zellen entwickeln können (Mochizuki et al., 2013; Gery and Caspi, 2018).

Nach diesen Regeln ist es möglich, dass Thymozyten mit niedriger Affinität zu Autoantigenen die positive und negative Selektion überleben und als reife, naive T-Zellen in die Peripherie gelangen (Mochizuki et al., 2013). Um eine Autoimmunität

zu verhindern, müssen diese autoreaktiven Zellen in der Peripherie unterdrückt werden, was die Aufgabe der peripheren Toleranz ist (EITanbouly and Noelle, 2021). So gibt es beispielsweise den Mechanismus der klonalen Anergie, der ausgelöst wird, wenn T-Zellen in der Peripherie Antigene ohne passende Kostimulation binden (EITanbouly and Noelle, 2021). Hierbei wird die Zytokinproduktion der autoimmunen Effektorzelle durch epigenetische und posttranskriptionale Mechanismen unterdrückt und so das Auslösen einer autoimmunen Antwort verhindert (EITanbouly and Noelle, 2021). Außerdem haben Tregs in der peripheren Toleranz eine Bedeutung (Mochizuki et al., 2013; EITanbouly and Noelle, 2021). Aufgrund der gleichen Selektionsbedingungen im Thymus weisen natürliche Tregs gleiche Antigenspezifitäten wie Effektor-T-Zellen auf und können zur peripheren Toleranz beitragen, indem sie ebenfalls Autoantigene erkennen und eine Immunantwort auf diese unterdrücken (Sakaguchi and Sakaguchi, 2005; Mochizuki et al., 2013).

2.3.2 Das Auge als immunprivilegiertes Organ

Okuläre Gewebe haben nur eine geringe bis keine Kapazität zur Regeneration, weshalb eine Schädigung durch starke Inflammation zur Erblindung führen kann und somit vermieden werden muss (Plummer, 2017; Hori et al., 2019).

Medawar publizierte 1948 ein Paper, das den Begriff des Immunprivilegs weitreichend geprägt hat (Stein-Streilein and Streilein, 2002; Egwuagu et al., 2021). In Transplantationsexperimenten zeigte er, dass Hauttransplantate, die in die vordere Augenkammer zuvor immunisierter Empfängerkaninchen eingesetzt wurden, nicht sofort abgestoßen wurden, im Gegensatz zu in die Haut eingesetzten Transplantaten (Medawar, 1948). Medawar stellte die Hypothese auf, dass die Transplantatabstoßung eine systemische Grundlage hatte, sie durch Blutplasma oder Blutzellen vermittelt wurde und dass Blut- und Lymphgefäße dabei eine wichtige Rolle spielten (Medawar, 1948). Diese Behauptungen stützte er auf seine Beobachtung, dass nicht vaskularisierte okuläre Hauttransplantate toleriert wurden und okuläre Implantate, bei denen sich eine Vaskularisation entwickelte, später als dermale Implantate bekämpft wurden (Medawar, 1948). Seine Beschreibung des okulären Immunprivilegs als passives System war jedoch nicht ganz akkurat, denn es existieren auch mehrere aktive Mechanismen, die das Immunprivileg des Auges

ermöglichen (Stein-Streilein and Streilein, 2002; Plummer, 2017). Ein Beispiel ist die Blut-Retina-Schranke, die normalerweise nicht von Pathogenen und großen Molekülen überquert werden kann (Stein-Streilein and Streilein, 2002; Awwad et al., 2017). Zellen des retinalen Pigmentepithels formen durch Tight Junctions die äußere BRB, während die innere BRB durch Tight Junctions zwischen den Endothelzellen der retinalen Arteriolen gebildet wird (Awwad et al., 2017). Die periphere Toleranz okulärer Antigene und die Regulation der intraokulären Immunantwort durch eine antiinflammatorische Mikroumgebung sind ebenfalls von Bedeutung (Streilein, 2003; Caspi, 2006; Taylor, 2016).

Der Begriff Vordere Augenkammer-assoziierte Immunabweichung (ACAID) beschreibt die systemische Toleranz von okulären und in die vordere Augenkammer injizierten Antigenen (Stein-Streilein and Streilein, 2002; Hori et al., 2019). ACAID verhindert eine antigenspezifische Immunantwort durch Herunterregulation der T-Helferzellen 1 und 2, sowie durch Induktion regulatorischer T-Zellen in lymphoiden Geweben, was in Mausmodellen gezeigt werden konnte (Stein-Streilein and Streilein, 2002; Hori et al., 2019). Außerdem wurden periphere Effektor-T-Zellen während ihrem Übertritt ins Auge zu Tregs umprogrammiert (Streilein, 2003). An diesem Prozess waren das CD86-exprimierende Pigmentepithel beteiligt sowie lösliche Faktoren im Kammerwasser, beispielweise das Zytokin Transforming growth factor β 2 (TGF- β 2) und das α -Melanozyten-stimulierende Hormon (Streilein, 2003; Hori et al., 2019). Wie im Mausmodell nachgewiesen wurde, banden CD86-exprimierende Pigmentepithelzellen einwandernde T-Zellen und hinderten diese an Proliferation und IFN- γ -Produktion, bevor die Effektor-T-Zellen zu Tregs umgewandelt wurden, die IL-4, IL-10 und TGF- β produzierten (Yoshida et al., 2000; Hori et al., 2019). Moleküle der B7-Familie, die in okulären Geweben exprimiert werden, sind ebenfalls Bestandteil des okulären Immunprivilegs (Hori et al., 2006; Hori et al., 2019). Die Signalmoleküle Programmed Death Ligand-1 und Inducible Costimulatory Molecule Ligand verhinderten die Effektorfunktionen eingewanderter okulärer T-Zellen, während das Molekül B7-Homolog-3 Toleranz wie ACAID induzierte, was in verschiedenen Versuchen mit Mäusen gezeigt werden konnte (Kunishige et al., 2016; Taniguchi et al., 2017; Hori et al., 2019). Im equinen Uvealtrakt befanden sich im physiologischen Zustand zahlreiche MHC-Klasse-II⁺-Zellen, die im Ziliarkörper mit der größten Dichte zu finden waren (Sano et al., 2016). Sano et al. stellten in der genannten Studie die Hypothese auf, dass die uvealen

MHC-Klasse-II⁺-Zellen an der Aufrechterhaltung des okulären Immunprivilegs beteiligt sein könnten (Sano et al., 2016). Diese Schlussfolgerung widerspricht allerdings einer früheren Studie, die in Augen von ERU-Tieren signifikant mehr MHC-Klasse-II⁺-Zellen als in Augen gesunder Pferde nachweisen konnte (Romeike et al., 1998).

2.3.3 Rolle der T-Zellen bei Autoimmunität

Sind die in Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 beschriebenen Mechanismen der Selbsttoleranz aus verschiedenen Gründen nicht mehr in der Lage, autoreaktive T-Zellen im Thymus auszusortieren beziehungsweise die autoreaktiven Zellen in der Peripherie in Schach zu halten, können autoimmune Erkrankungen entstehen.

Es konnte schon früh gezeigt werden, dass T-Zellen in der Pathogenese der EAU eine tragende Rolle spielen (Caspi et al., 1986). Auch in der ERU und der autoimmunen Uveitis des Menschen konnten CD4⁺ T-Zellen, genauer Th1- und Th17-Zellen, als die Hauptakteure der autoreaktiven Immunantwort identifiziert werden (Gilger et al., 1999; Deeg et al., 2001; Regan et al., 2012; Zou et al., 2014). Der Nachweis für die autoimmune Komponente der okulären Inflammation im Morbus Behçet des Menschen wurde ebenfalls früh durch die Identifikation autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen erbracht (Yanamoto et al., 1993). So konnte in Experimenten mit humanen peripheren Lymphozyten die autoimmune Reaktion gegen IRBP und S-Antigen durch monoklonale Antikörper gegen CD4- und MHC-Klasse-II-Moleküle verhindert werden (Yanamoto et al., 1993). Auch in der juvenilen idiopathischen Arthritis, einer Gruppe autoimmuner rheumatischer Erkrankungen bei Kindern, deren Klinik auch Augenentzündungen beinhalten kann, nehmen CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese ein (Kalinina Ayuso et al., 2014; Clarke et al., 2016; Busch et al., 2019). Analog zur juvenilen idiopathischen Arthritis bei Kindern existiert bei Erwachsenen die sogenannte Rheumatoide Arthritis (RA), die ebenso einen autoimmunen Charakter hat (Qiu et al., 2021). Dabei verlieren T-Zellen zuerst ihre Selbsttoleranz und helfen autoreaktiven B-Zellen bei der Produktion autoaggressiver Antikörper (Qiu et al., 2021). Später wandern die T-Zellen ins Gelenk ein und lösen dort eine persistierende und klinisch relevante Arthritis aus, die mit Beteiligung des angeborenen Immunsystems letztendlich so verstärkt wird, dass Knochen und Knorpel im Gelenk zerstört werden (Qiu et al.,

2021). Im Krankheitsbild des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE), einer chronischen Autoimmunerkrankung multipler Organe, und dessen murinem Tiermodell waren Th17-Zellen und deren Zytokin IL-17 im Blut, im Keimzentrum und in entzündlichen Infiltraten im Vergleich zu jeweiligen Kontrollen erhöht (Crispin et al., 2010; Takeshima et al., 2019). Die zentrale Beteiligung der CD4⁺ T-Zellen bei der Auslösung eines autoimmunen Uveitisschubs konnte mit Hilfe von adoptiven Transferexperimenten, wie in Kapitel 2.2.2 genauer erklärt, gezeigt werden (Caspi et al., 1986; Caspi et al., 1993). Zusammengefasst spielen autoaggressive periphere CD4⁺ T-Zellen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der autoimmunen Uveitis eine tragende Rolle, weshalb in der vorliegenden Arbeit zur equinen rezidivierenden Uveitis das Hauptaugenmerk auf diese Zellen gelegt wird.

2.4 Zellmetabolismus

2.4.1 Stoffwechselwege eukaryotischer Immunzellen

Eukaryotische Immunzellen benötigen Energie, um ihre Zellhomöostase aufrecht zu erhalten und spezifischen Zellfunktionen nachkommen zu können (Stathopoulou et al., 2019). Dabei spielt der Abbau von Glukose eine zentrale Rolle (Stathopoulou et al., 2019). Im Zytoplasma der Zelle wird Glukose durch Glykolyse zu Pyruvat abgebaut (Stathopoulou et al., 2019). In den Mitochondrien wird Pyruvat weiter zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) abgebaut und in den Citratzyklus eingespeist (Freitag et al., 2016; Quinn et al., 2019). Dieser liefert unter anderem die Reduktionsäquivalente Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂), welche energiereiche Elektronen an die Atmungskette übermitteln (Covarrubias et al., 2021). Damit wird über die Elektronentransportkette der Atmungskette unter Sauerstoffverbrauch energiereiches Adenosintriphosphat (ATP) generiert (Palmer et al., 2015; Muri and Kopf, 2021). Als Nebenprodukte entstehen Wasser und Kohlenstoffdioxid (Qiu et al., 2021). Dieser Stoffwechselweg, bei dem Sauerstoff verbraucht und 36 ATP-Moleküle pro eingespeistem Glukosemolekül gewonnen werden, wird oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) genannt und stellt einen der zwei wichtigsten ATP-liefernden Stoffwechselwege einer Immunzelle dar (Palmer et al., 2015; Stathopoulou et al., 2019; Qiu et al., 2021).

Der zweite wichtige Weg, über den Immunzellen durch Glukoseabbau ATP generieren können, ist die anaerobe Glykolyse, die ohne Sauerstoff abläuft und in deren Mittelpunkt Substratkettenphosphorylierungen stehen (Brooks, 2018; Stathopoulou et al., 2019). Sie findet im Zytoplasma der Zelle statt, Endprodukte sind zwei ATP-Moleküle und Laktat (Brooks, 2018; Stathopoulou et al., 2019). NADH wird hierbei reoxidiert und fließt zurück in die Glykolyse (Orang et al., 2019). Laktat nimmt in der Zelle eine bedeutende Rolle ein, denn es ist nicht nur eine Energiequelle, sondern auch ein Signalmolekül und ein Vorläufer in der Glukoneogenese (Bergmann et al., 2000; Hashimoto et al., 2007; Brooks, 2018). Über die β -Oxidation werden in der mitochondrialen Matrix Fettsäuren abgebaut (Gaber et al., 2019). Hierbei entsteht einerseits Acetyl-CoA, welches wie das aus Pyruvat entstandene Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust werden kann, sowie NADH und FADH₂, mit deren Hilfe energiereiche Elektronen an die oxidative Phosphorylierung weitergeleitet werden können (Gaber et al., 2019; Muri and Kopf, 2021). NAD⁺ und FAD nehmen somit also nicht nur Elektronen aus dem Citratzyklus auf, sondern transportieren auch energiereiche Elektronen aus der Glykolyse und der β -Oxidation für die ATP-Generation zur mitochondrialen Atmungskette (Covarrubias et al., 2021).

Die Aminosäure Glutamin wird in den Mitochondrien zu Glutamat und Stickstoff abgebaut, wobei Glutamat weiter zu α -Ketoglutarat umgebaut wird und als solches in den Citratzyklus fließt (Spinelli and Haigis, 2018). Die Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin können durch den Abbau zu Acetyl-CoA und Succinyl-Coenzym A (Succinyl-CoA) Energie für die Zelle liefern (Spinelli and Haigis, 2018).

Immunzellen betreiben jedoch nicht nur Katabolismus, sondern auch Anabolismus (Muri and Kopf, 2021). Im Pentose-Phosphat-Weg kann Glukose-6-Phosphat aus der Glykolyse verwendet werden, um Ribosen für Nukleotide und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat für Fettsäuresynthese und Redoxhomöostase herzustellen (Muri and Kopf, 2021). Die im Citratzyklus entstehenden Metabolite Citrat, α -Ketoglutarat, Succinyl-CoA und Oxalacetat können wiederum für die Biosynthese von Stoffen genutzt werden und so zur Zellhomöostase beitragen (Spinelli and Haigis, 2018; Quinn et al., 2019; Martinez-Reyes and Chandel, 2020; Hoel et al., 2021). Citrat beispielsweise kann für die Fettsäuresynthese im Zytoplasma verwendet werden (Quinn et al., 2019) und Oxalacetat kann zu Aspartat transaminiert werden (Hoel et al., 2021). Außerdem kontrollieren die Metabolite des

Citratzyklus Chromatinmodifikationen, Methylierung der Desoxyribonukleinsäure und posttranslationale Proteinmodifizierungen (Martinez-Reyes and Chandel, 2020). Die Mitochondrien sind auch Drehpunkt in der Synthese der Aminosäuren Glutamin, Alanin, Prolin und Aspartat (Spinelli and Haigis, 2018). Die verschiedenen Stoffwechselwege einer Immunzelle sind also eng miteinander verwoben. Sie sind einerseits essentiell für die Herstellung von ATP, andererseits liefern sie wichtige Metabolite für die Erhaltung der Zellhomöostase und -funktion.

2.4.2 Anpassungen im T-Zellmetabolismus bei Aktivierung

Ruhende, naive T-Zellen decken ihren eher niedrigen Energie- und Molekülbedarf vor allem über die OXPHOS, die durch den Abbau von Glukose, Aminosäuren und Fettsäuren gespeist wird (Quinn et al., 2019), wie in Kapitel 2.4.1 genauer beleuchtet wurde. Durch Antigenkontakt ändert sich der Aktivierungszustand naiver T-Zellen hin zu Effektor-T-Zellen mit schneller Teilungsrate (Domblides et al., 2018). Diese aktivierten T-Zellen nutzen zusätzlich zur OXPHOS vor allem die aerobe Glykolyse, um schnell ATP und verschiedene Metabolite herzustellen und so ihren steigenden Energie- und Molekülbedarf für Proliferation und verschiedene Effektorfunktionen zu decken (Pålsson-McDermott and O'Neill, 2020). In diesem Zusammenhang soll die Zweideutigkeit des Begriffs „aerobe Glykolyse“ kurz erläutert werden. Im Kontext mit aktivierten Immunzellen beschreibt der Ausdruck „aerobe Glykolyse“ die unter sauerstoffreichen Bedingungen durchgeführte Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, welches weiter in den Citratzyklus fließt (Vander Heiden et al., 2009). Im Zusammenhang mit Tumorzellen jedoch steht der Begriff „aerobe Glykolyse“ für deren Fähigkeit, unter aeroben Bedingungen Pyruvat zu Laktat umzuwandeln (Warburg, 1956; Vander Heiden et al., 2009; Pålsson-McDermott and O'Neill, 2020). Dies wird auch Warburg Effekt genannt, eine Bezeichnung, die auf den Erstbeschreiber des Mechanismus in Tumorzellen zurückgeht (Koppenol et al., 2011).

Die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und deren folgende phänotypische Veränderung in verschiedene Effektorstadien geht ebenfalls mit unterschiedlichen metabolischen Anpassungen einher (Miller et al., 2017). Die Subtypen Th1, Th2 und Th17 zählen zur Gruppe der Effektor-T-Zellen und decken ihren Energiebedarf bevorzugt durch aerobe Glykolyse (Klein Geltink et al., 2018; Angiari et al., 2020). Regulatorische T-

Zellen jedoch, wie auch schon naive CD4⁺ T-Zellen, gewinnen die benötigte Energie vor allem über OXPHOS, mit der β -Oxidation als Elektronenlieferant (Klein Geltink et al., 2018; Angiari et al., 2020). In C57BL/6-Mäusen, der am häufigsten für menschliche Krankheiten herangezogene murine Laborstamm, konnte gezeigt werden, dass sowohl die OXPHOS, als auch die aerobe Glykolyse für proliferierende T-Zellen wichtig sind, aber nur durch letztere der Status einer voll funktionsfähigen Effektorzelle erreicht werden kann (Chang et al., 2013). So ermöglichte die Aktivierung der aeroben Glykolyse die bevorzugte Translation von IFN- γ -messenger-Ribonukleinsäuren in CD4⁺ T-Zellen (Chang et al., 2013). Außerdem konnte die Wichtigkeit des Glukosetransporters 1 (GLUT1) in der CD4⁺ T-Zellaktivierung und deren Expansion zu Effektor-T-Zellen in *in vitro*- und *in vivo*-Studien gezeigt werden (Macintyre et al., 2014). Aktivierte humane und murine CD4⁺ T-Zellen exprimierten mehr GLUT1 auf ihrer Oberfläche als ruhende CD4⁺ T-Zellen, wodurch die aktivierten Immunzellen mehr Glukose aufnehmen konnten (Macintyre et al., 2014). GLUT1-defiziente murine CD4⁺ Effektor-T-Zellen produzierten *in vivo* weniger proinflammatorische Zytokine (IFN- γ und IL-17) und waren nicht in der Lage eine tödliche Graft-versus-Host-Krankheit auszulösen (Macintyre et al., 2014). Auch eine inflammatorische Kolitis konnte im murinen Modell mit GLUT1-defizienten CD4⁺ T-Zellen verhindert werden, was durch einen ausbleibenden Gewichtsverlust dieser Mäuse kontrolliert wurde (Macintyre et al., 2014). Es wurde geschlussfolgert, dass GLUT1 im T-Zellmetabolismus für Wachstum, Proliferation und beim Auslösen inflammatorischer Erkrankungen relevant sei (Macintyre et al., 2014). Ruhende und regulatorische CD4⁺ T-Zellen jedoch waren für ihre Funktion nicht auf GLUT1 angewiesen, wie im gleichen Experiment gezeigt werden konnte (Macintyre et al., 2014).

In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Erforschung des sogenannten Immunmetabolismus und dessen Zusammenhang mit Autoimmunität und dem Aktivierungszustand der Zelle an Bedeutung gewonnen (Teng et al., 2019). Ein veränderter Zellmetabolismus wird heutzutage als ein Kernelement in der Autoimmunität angesehen (Clayton et al., 2021), wobei die metabolischen Veränderungen zum autoaggressiven und inflammatorischen Phänotyp der beteiligten Immunzellen beitragen sollen (Stathopoulou et al., 2019). Wie genau der veränderte Immunmetabolismus an der Entwicklung und Erhaltung pathogener T-Zellen in Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt

werden (Bantug et al., 2018). Es ist jedoch bekannt, dass CD4⁺ T-Zellen von Lupus-empfindlichen Mäusen, welche ein Modell für die Autoimmunerkrankung SLE des Menschen darstellen, erhöhte OXPHOS- und Glykolyseraten im Vergleich zu nicht autoimmunen Kontrollen hatten (Yin et al., 2015). Durch eine kombinierte Behandlung der SLE-Mäuse mit 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG), das den Glukosestoffwechsel inhibiert, und Metformin, welches die mitochondriale Atmung verhindert, wurde der Metabolismus ihrer CD4⁺ T-Zellen wieder normalisiert und Symptome wie Splenomegalie und Produktion von Autoantikörpern signifikant reduziert (Yin et al., 2015).

In der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell für die Multiple Sklerose des Menschen, mit einer Th17-dominierten Pathogenese (Dang et al., 2011), konnte demonstriert werden, dass Th17-Zellen, im Gegensatz zu Tregs, mehr Glykolyse betrieben und den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor 1 α (HIF1 α) selektiv angeschaltet hatten (Shi et al., 2011). HIF1 α war im Umkehrschluss wichtig für die Vermittlung der glykolytischen Aktivität in Th17-Zellen und trug zur bevorzugten Differenzierung in Richtung Th17 bei (Shi et al., 2011). Vermindertes HIF1 α resultierte in weniger Th17 und mehr Tregs, einem Zustand, der die autoimmune Neuroinflammation in EAE-Mäusen verhindern konnte (Shi et al., 2011). Auch in einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass HIF1 α *in vitro* und *in vivo* das Th17/Treg-Gleichgewicht regulierte und EAE-Mäuse mit HIF1 α -defizienten T-Zellen mehr Tregs aufwiesen und resistent gegenüber der EAE waren (Dang et al., 2011).

In verschiedenen Studien zur Rheumatoiden Arthritis des Menschen konnte ein veränderter metabolischer Phänotyp der beteiligten CD4⁺ T-Zellen bestätigt werden (Qiu et al., 2021). Naive CD4⁺ T-Zellen von RA-Patienten nutzten Glukose vor allem im Pentose-Phosphat-Weg und Effektor-T-Zellen hatten eine gesteigerte glykolytische Aktivität bei gleichzeitig verminderter ATP-Gewinnung aufgrund mitochondrialer Dysfunktion (Qiu et al., 2021).

Studien zur autoimmunen Uveitis konzentrierten sich in den letzten Jahren vor allem auf Unterschiede in der Proteinexpression (Degroote et al., 2017; Hauck et al., 2017; Schauer et al., 2018; Saldinger et al., 2019; Weigand et al., 2020; Lorenz et al., 2021). Es wurde zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression der integrin-linked kinase und einer verminderten Apoptoserate in Lymphozyten von ERU-Tieren aufgezeigt (Schauer et al., 2018). Die Nekroserate

war zwischen Kontroll- und ERU-Pferden in diesem Experiment unverändert (Schauer et al., 2018). Mesenchymale Stammzellen konnten durch Koinkubation den proinflammatorischen Phänotyp aktivierter CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren *in vitro* reduzieren, was durch eine reduzierte Expression von unter anderem CD25 und IFN- γ , beides Moleküle von aktivierten CD4⁺ T-Zellen, zu Tage trat (Saldinger et al., 2019).

Obwohl die Bedeutung des metabolischen Phänotyps in autoimmunen Erkrankungen aus den oben genannten Studien ersichtlich ist, wurde dieser in der spontanen autoimmunen Uveitis von Mensch und Pferd bis heute nicht untersucht (Stand der Pubmed-Literaturrecherche 31.08.2021). Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit, den metabolischen Phänotyp von equinen Lymphozyten und speziell der CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden zu charakterisieren und eventuelle metabolische Abweichungen im erkrankten Zustand festzustellen. Dies könnte helfen, autoaggressive Zellen schon in der Peripherie zu identifizieren und sie möglicherweise in der Zukunft therapeutisch zu erfassen, bevor sie ins Auge einwandern und retinale Strukturen angreifen können.

2.4.3 Messungen mit dem Seahorse Analyzer

Der Seahorse XF24e Analyzer von Agilent Technologies ist ein abgeschlossenes System, über dessen plattenbasierte Experimente mit lebenden Zellen bestimmte Stoffwechselfparameter in Echtzeit dargestellt werden können (van der Windt et al., 2016; Espinosa et al., 2021). Durch die Bestimmung von Sauerstoffkonzentration und pH-Wert des Zellmediums kann der aktive Stoffwechsel der analysierten Zellen ermittelt werden (van der Windt et al., 2016). Die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) korreliert direkt mit der Aktivität der Atmungskette der Zellen und beschreibt somit die Rate der oxidativen Phosphorylierung der untersuchten Zellen (Buck et al., 2016; van der Windt et al., 2016). Die gleichzeitig zur OCR gemessene extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR) wird über den pH-Wert des Mediums festgestellt, der vor allem durch die glykolytische Tätigkeit der Zellen mit folgender Laktatbildung zustande kommt (Buck et al., 2016; van der Windt et al., 2016; Espinosa et al., 2021) (siehe Kapitel 2.4.1). Die ECAR umfasst jedoch auch die atmungsbedingte Ansäuerung des Zellmediums, denn das im Zuge der zellulären Atmung produzierte Kohlenstoffdioxid bildet im Zellmedium eine schwache

Kohlensäure, die wiederum in Hydrogencarbonat und ein Proton dissoziiert, wobei letzteres den pH-Wert des Zellmediums beeinflusst und somit auch zur ECAR beiträgt (Espinosa et al., 2021). Um allein die glykolytische Aktivität der Zellen beurteilen zu können wird der Parameter glykolytische Protonenausstromrate (glycoPER) berechnet (Espinosa et al., 2021).

3 PUBLIKATION

Titel

Altered Metabolic Phenotype of Immune Cells in a Spontaneous Autoimmune Uveitis Model

Autoren

Claudia Barfüßer, Carmen Wiedemann, Anne L. C. Hoffmann, Sieglinde Hirmer, Cornelia A. Deeg

Journal

Frontiers in Immunology

Status

Published.
Front Immunol. 2021 Jul 27;12:601619.
doi: 10.3389/fimmu.2021.601619. eCollection2021.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.601619>



Altered Metabolic Phenotype of Immune Cells in a Spontaneous Autoimmune Uveitis Model

Claudia Barfüßer, Carmen Wiedemann, Anne L. C. Hoffmann, Sieglinde Hirmer and Cornelia A. Deeg*

Chair of Physiology, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) Munich, Martinsried, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Manfred Karl Zierhut,
University of Tübingen, Germany

Reviewed by:

Marius Ueffing,
University of Tübingen, Germany
Falko Steinbach,
University of Surrey, United Kingdom

*Correspondence:

Cornelia A. Deeg
Cornelia.Deeg@lmu.de

Specialty section:

This article was submitted to
Autoimmune and
Autoinflammatory Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 01 September 2020

Accepted: 12 July 2021

Published: 27 July 2021

Citation:

Barfüßer C, Wiedemann C,
Hoffmann ALC, Hirmer S and Deeg CA
(2021) Altered Metabolic Phenotype of
Immune Cells in a Spontaneous
Autoimmune Uveitis Model.
Front. Immunol. 12:601619.
doi: 10.3389/fimmu.2021.601619

As one of the leading causes of blindness worldwide, uveitis is an important disease. The exact pathogenesis of autoimmune uveitis is not entirely elucidated to date. Equine recurrent uveitis (ERU) represents the only spontaneous animal model for autoimmune uveitis in humans. As the metabolism of immune cells is an emerging field in research and gains more and more significance to take part in the pathogenesis of various diseases, we conducted experiments to investigate the metabolism of immune cells of ERU cases and healthy controls. To our knowledge, the link between a deviant immunometabolism and the pathogenesis of autoimmune uveitis was not investigated so far. We showed that PBMC of ERU cases had a more active metabolic phenotype in basal state by upregulating both the oxidative phosphorylation and the glycolytic pathway. We further revealed an increased compensatory glycolytic rate of PBMC and CD4⁺ T cells of ERU cases under mitochondrial stress conditions. These findings are in line with metabolic alterations of immune cells in other autoimmune diseases and basic research, where it was shown that activated immune cells have an increased need of energy and molecule demand for their effector function. We demonstrated a clear difference in the metabolic phenotypes of PBMC and, more specifically, CD4⁺ T cells of ERU cases and controls. These findings are another important step in understanding the pathogenesis of ERU and figuratively, human autoimmune uveitis.

Keywords: immunometabolism, PBMC, CD4⁺ T cell, OXPHOS, glycolysis, mitochondria, autoimmunity, equine recurrent uveitis (ERU)

INTRODUCTION

Equine recurrent uveitis (ERU) is an important disease in horses worldwide (1, 2), which, being untreated, eventually leads to loss of vision in the affected eyes (3). It is characterized by recurrent and painful episodes of inflammation, which are mainly caused by autoaggressive CD4⁺ T cells that migrate from the peripheral blood through the blood retinal barrier into the eye to attack and destroy retinal structures (1). Few monocytes can be observed among these infiltrating CD4⁺ T cells, but the driving force during an uveitic attack are the CD4⁺ T cells (4, 5). Like in other autoimmune diseases, the pathogenesis of ERU is still not fully elucidated (1, 6). ERU represents the only spontaneous animal model for human autoimmune uveitis (HAU), a sight-threatening disease with a similar

pathogenesis as ERU (1, 7–9). Thus, new findings concerning the underlying pathogenesis of ERU are of great value for both, veterinary and human medicine. For example, our group identified CRALBP as autoantigen in horses with ERU (10). Later on, CRALBP was also verified as important autoantigen in human autoimmune uveitis (11), autoimmune retinopathy (12) and juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis (JIAU) (13). Patients with autoimmune uveitis receive long-term treatment with immune suppressants like high-dosed corticosteroids, cyclophosphamides or azathioprine or they are treated with antibodies against TNF α or IL-17 [reviewed in (14)]. Unlike these human patients, horses affected by ERU are only treated for a few days when they experience an acute inflammatory episode and not in the quiescent stage of the disease (5, 15, 16), therefore it is possible to examine immune reactions in the quiescent stage unaffected by long-term treatment.

The area of immune cell metabolism has gained more and more interest in the last decades. Immune cells produce ATP and other metabolites through metabolic pathways, which are closely connected with each other. The two major pathways for an immune cell to obtain ATP are oxygen-consuming oxidative phosphorylation (OXPHOS) and glycolysis, in which ATP is generated *via* oxygen independent substrate-level phosphorylation reactions [reviewed in (17, 18)]. Changes in metabolism are interdependent with oxidation-reduction (redox) reactions, for example electrons derived in glycolysis and the tricarboxylic acid (TCA) cycle are necessary to generate reducing equivalents contained in NADH. The NAD⁺/FAD coenzymes can be seen as the main oxidizing agents in cellular catabolism (19, 20). They are needed to transfer electrons from glucose (glycolysis), fatty acids (β -oxidation) and activated acetic acid (TCA cycle) to the mitochondrial respiratory chain for ATP generation [reviewed in (21)]. Most cells can quickly adapt to environmental changes and varying energy sources by switching between the dominantly used energy-delivering pathways (22). The interrelation between immune cell metabolism and the cell's activation status was revealed through research in the last two decades (23). Naïve CD4⁺ T cells primarily rely on OXPHOS to generate ATP, for which the TCA cycle delivers electrons stored in NADH and FADH₂ (21, 24). Upon activation, CD4⁺ T cells raise glycolysis not only for ATP production, but also to generate metabolic intermediates such as pyruvate, which are crucial for synthesizing amino acids and fatty acids to cover the demand for proliferation and effector function [reviewed in (21)]. Furthermore, different metabolic pathways dominate in CD4⁺ T cell subsets. For example, memory T cells rely primarily on catabolic pathways such as OXPHOS (including fatty acid oxidation as electron source) to cover their metabolic needs, while effector T cells (Th1, Th2 and Th17) exhibit a glycolysis-dominated metabolism (25, 26).

A first approach to identifying changes in metabolism of healthy and degenerated cells was taken over 60 years ago, as tumor cells were shown to shift from oxidative phosphorylation to the glycolytic pathway, more precisely to aerobic glycolysis (27–29). This showed that healthy and cancer cells, which have the same origin, can be distinguished upon their different metabolism. The microenvironment also affects cell metabolism, as it was

shown in human T cell subsets in healthy and cancerous tissue (30). The CD4⁺ T cells in tumorous environment displayed decreased mitochondrial enzyme activity and reduced aerobic glycolysis compared to CD4⁺ T cells in a healthy microenvironment (30). Thus, cells with the same protein profile can be differentiated by their distinct metabolism in a healthy or tumorous microenvironment (30). Interestingly, the meaning behind the term “aerobic glycolysis” differs upon context. In cancerous cells, aerobic glycolysis, also known as the Warburg effect, describes their ability to convert pyruvate to lactate in the presence of oxygen (30, 31). In healthy cells, this reaction re-oxidizes NADH for continuing glycolysis under anaerobic conditions (32). Concerning biochemistry and activated immune cells, the term “aerobic glycolysis” mainly describes the conversion of pyruvate to Acetyl-CoA, which fuels the tricarboxylic acid cycle, in the presence of oxygen (27). To sum it up, cells in health and disease exert a distinct metabolic phenotype despite expressing the same protein profile.

Furthermore, metabolic aberrations of immune cells in autoimmune diseases are implicated to contribute to their autoaggressive and inflammatory phenotype (17). For example, systemic lupus erythematosus (SLE) CD4⁺ T cells of lupus-prone mice had enriched OXPHOS and glycolytic pathways and combined treatment with 2-DG and metformin *in vivo* could normalize metabolism of these CD4⁺ T cells and reverse biomarkers of the disease (33). This underlines the importance of not only investigating metabolic features of healthy immune cells, but to uncover possible differences in metabolism of immune cells of diseased individuals. However, over the last years, studies on spontaneous autoimmune uveitis mostly concentrated on different protein expressions in healthy and autoimmune cells. For example, our group previously demonstrated a correlation of higher integrin-linked kinase expression and a lower apoptosis rate of ERU lymphocytes, whereas necrosis rates were not significantly different, compared to cells of eye-healthy horses (6). To our knowledge, studies to distinguish autoaggressive immune cells from normal immune cells upon their metabolic phenotype were not yet performed in context of spontaneous autoimmune uveitis in humans or horses, although immunometabolism is considered to play a tremendous role in autoimmune diseases (29). Thus, the goal of the study was to characterize the metabolic features of equine PBMC and CD4⁺ T cells in health and ERU to detect possible alterations in the uveitic phenotype. This could contribute to identify and possibly even target the autoaggressive cells therapeutically in the peripheral blood before they migrate into the eye and attack retinal tissue.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells and Ethics Approval for Animal Research

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 25 healthy and 29 ERU cases were used in this study. Horses were regarded as eye-healthy, when no previous ocular inflammation was reported

by the owner and the standard clinical routine examination did not indicate pathophysiological changes in the eye. These eye-healthy horses are referred to as controls in the following parts of the manuscript. Horses with ERU were diagnosed by experienced clinicians of the Equine Hospital of LMU Munich based on typical clinical signs of uveitis along with a documented history of multiple episodes of inflammation in the affected eye (34). All ERU blood samples were obtained in the quiescent stage of the disease. Equine whole blood samples of controls and ERU cases were taken from the *vena jugularis* in tubes with heparin sodium (50 I.U. per ml blood; Ratiopharm, Ulm, Germany). After sedimentation of blood components, the leukocyte-rich plasma was isolated by density gradient centrifugation (room temperature, 350 x g, 25 min, low acceleration, low break) using Pancoll separation solution (PanBiotect, Aidenbach, Germany). PBMC were extracted from the intermediate phase, washed in phosphate buffered saline (PBS) three times (4°C, 500 x g, 10 min) and counted with trypan blue solution (VWR Life Science, Darmstadt, Germany). Cells were either used the same day or stored in RPMI 1640 medium (PanBiotect, Aidenbach, Germany), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (both Biochrom, part of Merck, Darmstadt, Germany) overnight at 4°C, until further processing. Some horses' cells were tested in multiple assays. No experimental animals were used in this study. Collection of blood was permitted by the local authority, Regierung von Oberbayern (Permit number: ROB-55.2Vet-2532.Vet_03-17-88).

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) of CD4⁺ T Cells Using LS Columns

1 x 10⁸ PBMC were washed (4°C, 500 x g, 10 min) and then resuspended in 10 ml MACS buffer (phosphate-buffered saline (pH 7.2), supplemented with 2 mM EDTA (AppliChem, Darmstadt, Germany) and 0.5% bovine serum albumin (Serva, Heidelberg, Germany)). After another washing step, cells were incubated at 4°C with 1 ml mouse anti horse CD4 antibody (clone MCA 1078, Biorad, Feldkirchen, Germany, 1:2000) per 1x10⁷ cells. After 20 minutes, 5 ml MACS buffer were added for washing (4°C, 500 x g, 10 min). Cells were resuspended with 80 µl buffer per 10⁷ cells before adding 20 µl anti-mouse IgG1 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) per 10⁷ cells. After incubation for 15 minutes at 4°C, another washing step (4°C, 300 x g, 10 min) was performed and cells were resuspended in 500 µl MACS buffer for cell sorting. Magnetic separation was performed using LS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Magnetically labelled CD4⁺ T cells were retained in the magnetic field, while unlabeled CD4⁻ cells were washed through the columns by three washing steps (3 x 3 ml MACS buffer). The CD4⁺ T cell fraction was eluted by removing the column from the magnetic field and rinsing with 5 ml MACS buffer. Purity of CD4⁺ fraction was tested *via* flow cytometry, by staining with 30 µl mouse anti horse CD4 FITC labelled antibody (clone MCA1078F, Biorad, Feldkirchen, Germany, 1:10) and 30 µl mouse anti horse CD8 FITC labelled antibody (clone MCA1080F, Biorad, Feldkirchen, Germany, 1:10) (**Supplementary Figure 1**, ≥ 96% purity of the CD4⁺ fraction).

Cell Proliferation Assay

PBMC, CD4⁺ and CD4⁻ cells of controls and ERU cases were stimulated with three different mitogens to assess their proliferative response. 1 x 10⁵ cells in 200 µl RPMI 1640 medium (PanBiotect, Aidenbach, Germany) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (both Biochrom, part of Merck, Darmstadt, Germany) were seeded per well in 96-well plates. Triplicates (technical replicates) of the cells were either stimulated with pokeweed mitogen (PWM; 5 µg/mL), concanavalin A (ConA; 5 µg/mL) or phytohemagglutinin (PHA-L; 5 µg/mL) (all three Merck, Darmstadt, Germany). One triplicate of each cell type was left unstimulated as a medium control. After incubating for 32 hours (37°C, 5% CO₂), H³-thymidine (Perkin Elmer, Germany) was added to each well (1 µCi/well) for radioactive labelling. After another 16 hours of incubation (37°C, 5% CO₂), the cells were harvested onto a glass fiber filter and the H³-thymidine incorporation was quantified as radioactivity by liquid scintillation in a beta counter (MicroBeta, Perkin Elmer, Germany). Counts per minute were measured for each well and means of triplicates were calculated. To determine the proliferation rate, the mean value of the stimulated cells was divided by the mean value of the medium control, separately for each mitogen. No significant differences in the proliferation capacity of PBMC, CD4⁺ T cells and CD4⁻ cells of ERU cases compared to controls upon polyclonal stimulation were detected (**Supplementary Figures 2A–C**).

Measurement of Equine Cell Metabolism Through Seahorse XFe Analyzer

Metabolic features of equine PBMC, CD4⁺ T cells and CD4⁻ cells were measured by characterizing oxygen consumption rates (OCR), extracellular acidification rates (ECAR) and glycolytic rates (glycoPER) of respective cells using a Seahorse XFe Analyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Following the manufacturer's instructions, 24-well plates were coated with 52 µl Poly-D-Lysin (Merck, Darmstadt, Germany) one day prior to the assay. 8 x 10⁵ cells were seeded per well, suspended in 200 µl XF medium (Seahorse XF RPMI Medium (pH 7.4), Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), which was supplemented with 100 mM Pyruvate, 2.5 mM Glucose and 200 mM L-Glutamine (all three Merck, Darmstadt, Germany) prior. Experiments were performed with at least two technical replicates per horse. Four wells on each 24-well plate were filled with medium and served as background correction. To ensure an evenly distributed cell layer on the bottom of each well, the plate was centrifuged for 1 minute at 2000 rpm with low acceleration and low break. All wells of the 24-well plate were filled up with XF medium to reach a total volume of 500 µl. The plate was put into a CO₂-free incubator for 20 minutes before starting the experiment. The calibration plate was also prepared as described in the user guides of the manufacturer for each assay. OCR and ECAR rates were determined using the mito stress test (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). GlycoPER rates were measured with glycolytic rate assay kits (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Data analysis and interpretation was

done using WAVE 2.6 software according to the manufacturer's manual (both Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Ratios were determined after normalizing each measurement against the baseline mean. To perform statistical analysis, data from three time-points per measurement were used.

Western Blot

CD4⁺ T cells were lysed in lysis buffer (9 M Urea, 2 M Thiourea, 65 mM Dithioerythritol, 4% CHAPS) and protein concentration was determined *via* Bradford assay. A 12% gel was loaded with 5 µg protein/slot. Three slots were functioning as blanks. Serva Triple Color Protein Standard III (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany) was used as marker. Proteins were separated by SDS-PAGE and blotted semidry onto 8.5 × 6 cm PVDF membranes (GE Healthcare, Freiburg, Germany). To prevent unspecific binding, the membrane was blocked with 4% BSA for one hour at room temperature. After three washing steps with phosphate buffered saline supplemented with 0.05% Tween (PBS-T) at room temperature for 10 minutes, it was incubated with the primary antibodies mouse anti ATP5β (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, 1:100) and anti GAPDH (Merck, Darmstadt, 1:500) overnight at 4°C. This was followed by another three washing steps in PBS-T and subsequent incubation with POD-conjugated goat anti mouse IgG (Merck, Darmstadt, Germany, 1:5000) as secondary antibody for one hour at room temperature. After 1 hour, 6 washing steps with PBS-T were performed before re-incubation with primary antibody rabbit anti β-actin (Cell Signaling, Frankfurt am Main, Germany, 1:40000) for 3 hours at room temperature. After washing the membrane 3 × 10 minutes with PBS-T, it was incubated with POD-conjugated goat anti rabbit IgG (Life Technologies, Darmstadt, Germany, 1:10000) for one hour at room temperature. Afterwards, the membrane was washed 6 × 10 minutes with PBS-T before detection of the signals by enhanced chemiluminescence (Amersham Imager680, Analysis2.0, GE Healthcare, Freiburg, Germany). The signal intensity of ATP5β was normalized to β-actin for each horse before statistical evaluation of the differences in signal intensity between controls and ERU cases.

Detection of Mitochondria *via* Immunocytochemical Staining

2 × 10⁵ CD4⁺ T cells of ERU cases and controls were stained with 100 µl prewarmed (37°C) MitoTracker Deep Red (ThermoFisher Scientific, Ulm, Germany, 200 nM) at 37°C and 5% CO₂ for 30 minutes. 100 µl prewarmed (37°C) PBS were added and cells were washed (room temperature, 810 × g, 1 min), resuspended with 200 µl prewarmed PBS and washed again (room temperature, 810 × g, 1 min) before fixation in prewarmed PBS supplemented with 1% paraformaldehyde (PFA; Merck, Darmstadt, Germany) for 20 min at 37°C, 5% CO₂. Cell nuclei were stained with 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; Invitrogen, Karlsruhe, Germany, 1:100). 1 × 10⁵ cells were transferred to microscope slides and centrifuged (300 × g, 10 min) before coverslips were applied using fluoromount medium (Serva, Heidelberg, Germany). Visualization was

performed using a Leica Dmi8 microscope with associated LAS-X-software, version 3.4.2 (both Leica, Wetzlar, Germany).

Statistical Analysis

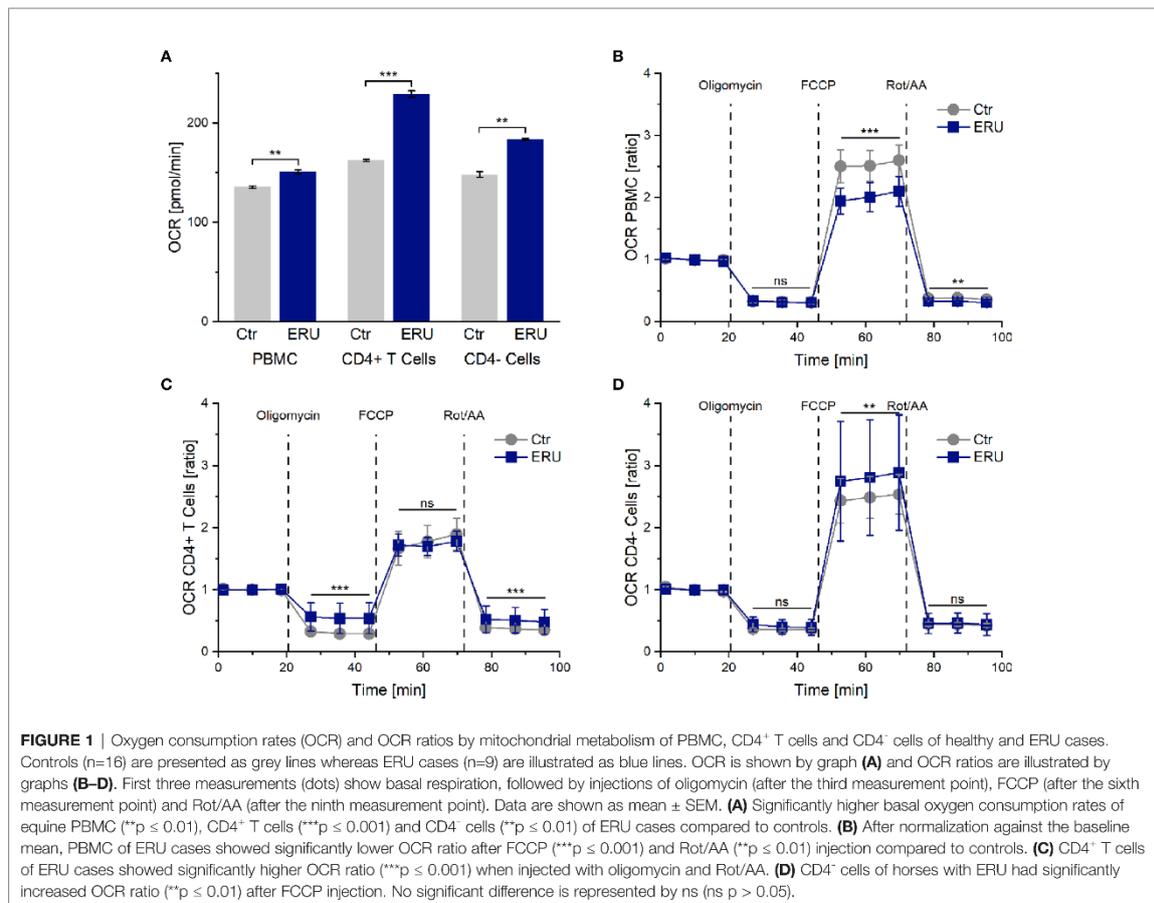
Kolmogorov-Smirnov (KS) test was used for determination of Gaussian distribution. If KS test was significant ($p < 0.05$; no normal distribution), Mann-Whitney test was used for statistical analysis. If KS test was not significant ($p > 0.05$; normal distribution), statistics were performed using student's t-test. In both tests, statistical probabilities were considered not significant (ns) at $p > 0.05$ and significant at $p \leq 0.05$. Significances are indicated by asterisks with * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$. OriginPro2020 software, version 9.7 (Additive, Friedrichsdorf, Germany) was used for statistical analysis and graph creation.

RESULTS

PBMC and CD4⁺ T Cells Display Increased Basal Oxygen Consumption Rate (OCR) in ERU

We analyzed metabolic features of PBMC, CD4⁺ T cells and CD4⁻ cells of ERU cases and controls with a Seahorse XFe analyzer, which detects concentrations of oxygen and protons within the cell-surrounding medium. Therefore, higher oxygen consumption rates positively correlate to higher mitochondrial activity and respective oxidative phosphorylation (OXPHOS). By blocking mitochondrial respiration with rotenone/antimycin A (Rot/AA), the remaining OCR resembles the non-mitochondrial oxygen consumption, which is likely caused by the activity of oxidoreductases and other enzymes and which remains as background in all other measurements addressed in the following. Oligomycin and FCCP were used to access and influence only parts of the oxidative chain: Oligomycin inhibits the ATP synthase (complex V) of the respiratory chain reaction, which means that the decrease in OCR following oligomycin injection resembles the oxygen level used by ATP-linked respiration. Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) is used as an uncoupling substance for mitochondrial respiration, thus the level of OCR after injection of FCCP shows the maximum respiration capacity of the cells.

PBMC and CD4⁺ cells of ERU cases consumed significantly more oxygen (** $p \leq 0.01$) in basal state through their mitochondria, represented through a higher OCR level compared to controls. Likewise, CD4⁺ T cells of ERU cases showed significantly increased basal oxidative phosphorylation (***) $p \leq 0.001$ compared to control CD4⁺ T cells (**Figure 1A**). Furthermore, all three tested subsets of immune cells showed differing OCRs between ERU cases and controls after injection of the reagents oligomycin, FCCP and Rot/AA (data not shown). To ensure that these differing reactions to the injected reagents were independent of the different basal oxygen consumption rates between controls and ERU cases, we then normalized all measurements against the baseline mean and compared



respective OCR ratios as reaction to the injected substances between the two tested groups.

Maximum Respiration Capacity and Non-Mitochondrial Oxygen Consumption Is Lower in PBMC of ERU Cases

After adding oligomycin, no significant difference in the ATP-linked respiration was measured between PBMC of healthy and diseased groups (ns p > 0.05). However, PBMC of ERU cases had significantly decreased maximum respiration capacity (**p < 0.001) after uncoupling the mitochondria with FCCP. Non-mitochondrial oxygen consumption was also lower in PBMC of ERU cases (**p < 0.01) compared to controls (Figure 1B).

CD4⁺ T Cells of ERU Horses Display Decreased ATP-Linked Respiration but Similar Maximum Respiration Capacity Compared to Controls

OCR ratios of CD4⁺ T cells of ERU cases were significantly higher (**p < 0.001) compared to controls after oligomycin and Rot/AA injection. These results point to a significantly decreased

ATP-linked respiration and to an increased non-mitochondrial oxygen consumption in ERU CD4⁺ T cells. CD4⁺ T cells of controls and ERU cases had similar maximum respiration capacities (ns p > 0.05) after uncoupling the mitochondria with FCCP (Figure 1C). In contrast, the maximum respiration capacity of CD4⁻ cells of ERU cases was significantly increased (**p < 0.01) compared to controls (Figure 1D).

The Extracellular Acidification Rate (ECAR) Is Basal Higher in PBMC and CD4⁻ Cells of ERU Cases

Simultaneously to the measurement of the oxygen consumption rate in the mito stress test assay, the seahorse analyzer measures the pH change of the cell culture medium and provides this information as extracellular acidification rate (ECAR). ECAR mainly resembles the glycolytic activity of the cells, in the course of which lactate is produced and excreted. However, the extracellular acidification rate may also be influenced to a smaller amount by respiration linked acidification. This means that CO₂, produced in the cause of respiration, is forming a weak acid (H₂CO₃) in the cell-surrounding medium, which then

dissociates into a proton and hydrogen carbonate. PBMC of ERU cases had a significantly higher basal ECAR rates ($*** p \leq 0.001$) than control PBMC. This only applied to the $CD4^+$ cells of ERU cases, whereas $CD4^+$ T cells of controls and ERU cases had no significant difference ($ns p > 0.05$) in the basal extracellular acidification rate (Figure 2A). To further analyze the effects of oligomycin, FCCP and Rot/AA unaffected by differing baseline values of ERU cases and controls, all following measurements were then normalized to the baseline mean value.

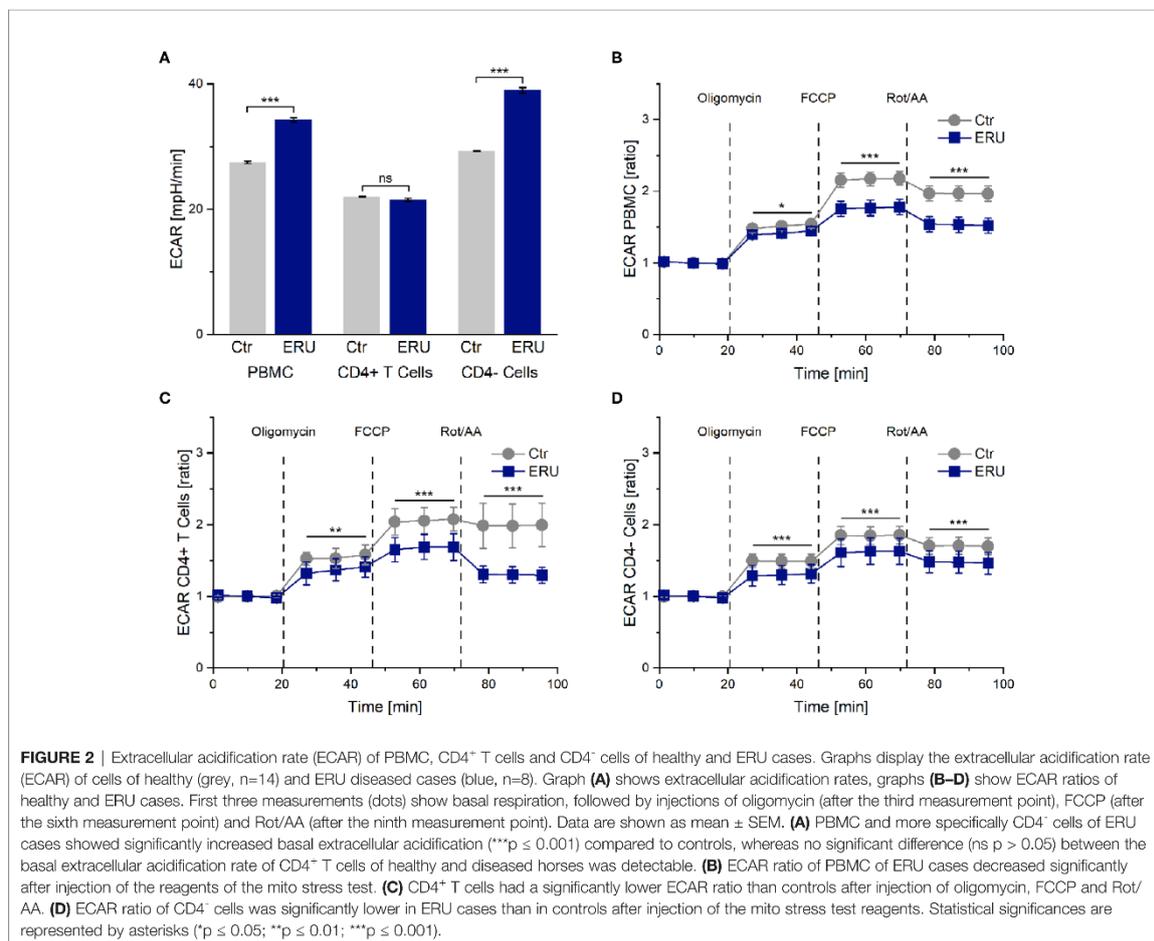
ECAR of Tested Cell Subsets of ERU Cases Decreases After Blocking and Uncoupling the Respiratory Chain

PBMC, $CD4^+$ T cells and $CD4^-$ cells of horses with ERU had lower extracellular acidification rates than controls after inhibiting the ATP synthase with oligomycin (PBMC $* p \leq 0.05$; Figure 2B. $CD4^+$ T cells $** p \leq 0.01$; Figure 2C. $CD4^-$ cells $*** p \leq 0.001$; Figure 2D). Furthermore, all tested cell subsets of ERU cases showed lower extracellular acidification than controls

after uncoupling the oxidative chain reaction with FCCP ($*** p \leq 0.001$) and after blocking the mitochondrial respiratory chain through Rot/AA ($*** p \leq 0.001$; Figures 2B–D).

The Basal Glycolytic Proton Efflux Rate (glycoPER) Is Increased in PBMC of ERU Cases, but Decreased in $CD4^+$ T Cells of ERU Cases

Since ECAR measurement in the mito stress test represents the proton production of glycolysis indirectly, we next analyzed PBMC and $CD4$ sorted cells of controls and ERU cases with the glycolytic rate assay. Our goal was to determine whether resting equine immune cells also generate energy through the glycolytic pathway and whether the rate of glycolysis varied with autoimmunity. PBMC of ERU cases had significantly increased basal glycolysis ($*** p \leq 0.001$) compared to controls, whereas $CD4^+$ T cells of ERU cases had significantly lower basal glycolysis ($* p \leq 0.05$). Furthermore, our data show that $CD4^-$ cells of ERU cases caused significantly higher basal glycolytic rates ($*** p \leq$



0.001) compared to controls (**Figure 3A**). As before, we normalized the measurements against the baseline mean to see whether the effects reached by injections of the two reagents of the glycolytic rate assay kit were independent of the significantly different basal glycolytic rates of ERU cases and controls.

The Compensatory Glycolysis of PBMC and CD4⁺ T Cells Is Increased in ERU

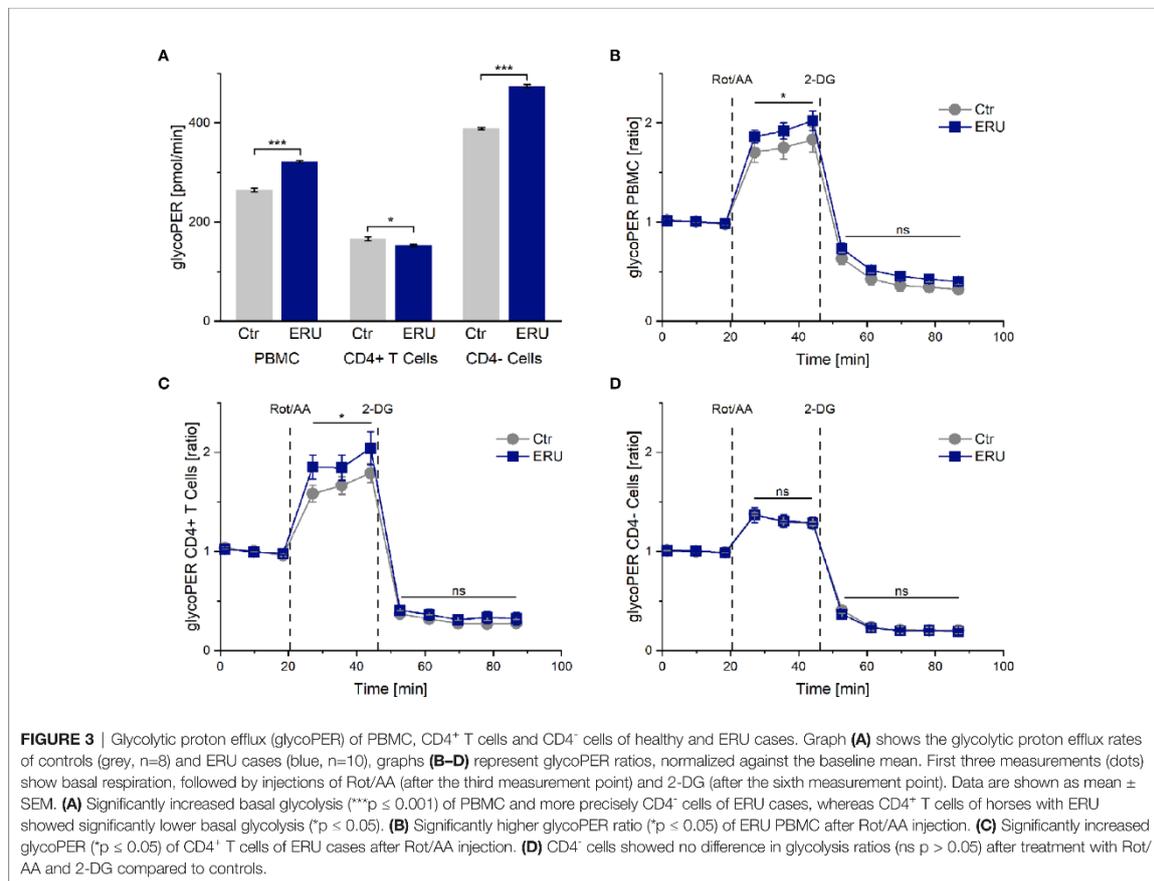
Injection of Rot/AA inhibits the mitochondrial chain reaction and therefore mitochondrial respiration. Thus, a rise in glycoPER after Rot/AA injection resembles compensatory glycolysis. Blocking glycolysis through competitive binding of glucose hexokinase with the glucose analog 2-deoxy-D-glucose (2-DG) should lead to a decrease of glycoPER, which would confirm that the protons measured before were primarily generated through glycolysis.

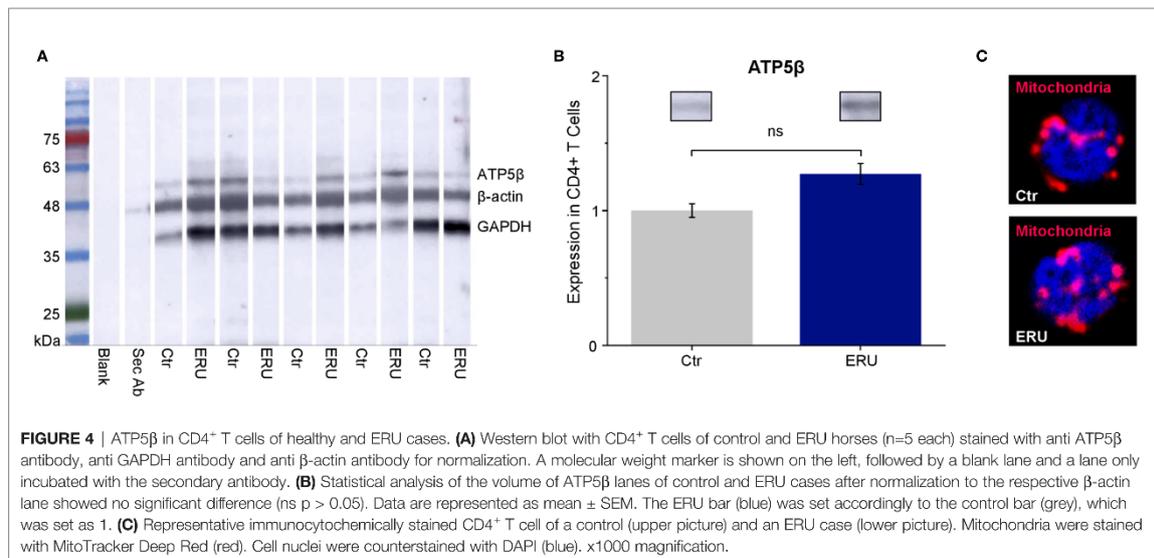
Our experiments revealed a significant increase in compensatory glycolysis (* p ≤ 0.05) of PBMC of ERU cases compared to controls (**Figure 3B**). CD4 cell sorting showed that isolated CD4⁺ T cells of ERU cases caused the significantly increased levels of compensatory

glycolysis (* p ≤ 0.05; **Figure 3C**), whereas CD4⁻ cells had a similar proton production as controls (ns p > 0.05; **Figure 3D**). Furthermore, there was no significant difference in glycoPER ratio (ns p > 0.05) after 2-DG injection of the tested cell subsets compared to the control group (**Figures 3B–D**). This means that the measured protons were similarly generated through glycolysis in control and ERU cases.

CD4⁺ T Cells of ERU Cases Do Not Have Significant Difference in the Amount of Mitochondria

To elucidate if the higher basal oxygen consumption rate of CD4⁺ T cells in ERU was due to more mitochondria per cell, we performed western blot analysis using the mitochondrial marker ATP5β (**Figure 4A**). CD4⁺ T cells of ERU cases and controls revealed no significant differences in ATP5β abundances, thus the total amount of mitochondria (ns p > 0.05; **Figure 4B**). Immunocytochemical staining of CD4⁺ T cells of a representative control and ERU case with the mitochondrial marker MitoTracker Deep Red illustrates this finding (**Figure 4C**).





DISCUSSION

Research on immunometabolism is an emerging field and new insight can help to understand pathogenesis of diseases, including autoimmune diseases, and searching for adequate therapy (27, 29, 35). To our knowledge, the link between immunometabolism and the pathogenesis of spontaneous autoimmune uveitis was not investigated so far. In this study, we therefore aimed to elucidate the metabolic phenotype and to identify metabolic alterations of leukocytes of ERU cases, which could lead to a better understanding of the autoimmune nature of the cells, the pathogenesis of uveitis and provide a basis to identify the autoreactive cells in the periphery before they can harm the eye. We showed that the metabolic phenotype of immune cells of ERU cases significantly differed in 9 of 11 tested parameters in PBMC and in 8 of 11 tested parameters in CD4⁺ T cells compared to controls, although the amount of mitochondria was unaffected by the disease. Peripheral lymphocytes are the most promising cell type to investigate ERU pathogenesis since every uveitic episode starts in the periphery, where autoaggressive T cells are activated in the spleen to migrate into the eye and destroy retinal tissue (1, 36). Caspi and colleagues further demonstrated in adoptive transfer experiments with Lewis rats that peripheral T cells specific to retinal proteins induce EAU in healthy recipient rats upon peripheral injection (37).

Since PBMC of horses with induced autoimmune uveitis had different protein expressions even in the quiescent stage of the disease compared to lymphocytes of eye-healthy horses (38), we were interested whether lymphocytes of uveitic horses also had a deviant metabolism than controls. Indeed, PBMC of ERU cases displayed a different energetic phenotype than PBMC of eye-healthy horses, namely higher basal OCR, ECAR and glycoPER rates

(Figures 1A, 2A, 3A). Thus, one could conclude that the mitochondrial respiration and glycolysis pathways were both more active in PBMC of horses with ERU than in control cells. To our knowledge, this is a novel finding in the context of spontaneous uveitis, thus we do not know the functional meaning of increased basal mitochondrial respiration and glycolytic rates in uveitic pathogenesis so far. Increased basal mitochondrial respiration and glycolysis were also described in PBMC of a transgenic pig model for diabetes compared to the wild-type littermates (39). Interestingly, these findings correlate with the findings in our study concerning PBMC in recurrent autoimmune uveitis. Since the authors indicated a link between the metabolic alterations at the early stage of the disease and the inflammatory character of CD4⁺ T cells in this diabetic pig model (39), one might conclude that the increased basal mitochondrial respiration and glycolysis of PBMC of ERU cases, revealed in the present study, might also contribute to the augmented effector functions and therefore autoimmune character of these cells. A similar metabolic phenotype was seen in autoreactive lymphocytes of KBN mice, which are a spontaneous autoimmune arthritis model and were tested at an early stage of the disease (40). More precisely, CD4⁺ T cells of these KBN mice were shown to have increased basal mitochondrial and glycolytic rates compared to control mice and B cells also revealed a higher glycolytic rate than controls (40). The researchers linked the higher metabolism to the enhanced effector functions of CD4⁺ T cells and B cells of KBN mice compared to controls (40). Furthermore, they strengthened their theory by inhibiting glycolysis of KBN lymphocytes with 2-DG, which stopped the development and, when treatment was carried out early and continuous, decreased the severity of joint inflammation (40). Thus, the study managed to link the high glycolytic rates of lymphocytes in an autoimmune disease model with the disease's severity.

PBMC are a heterogeneous cell population comprised of T cells, B cells, monocytes, dendritic cells and natural killer cells (41), thus it was unclear for us which cell types caused the observed changes in metabolism in the ERU group. By testing and comparing the metabolic reactions of CD4⁺ and CD4⁻ cells with the collective PBMC fraction, we could clarify some parameters. While discussing these results, it is important to keep in mind that the CD4⁻ cell fraction is comprised of the cell subsets in the PBMC population remaining after density gradient centrifugation and CD4 sorting, namely CD8⁺ T cells, $\gamma\delta$ T cells, B cells, monocytes, dendritic cells and natural killer cells (41). Both CD4⁺ T cells and CD4⁻ cells caused the higher basal OCR level in PBMC of ERU cases (**Figure 1A**), whereas the highly upregulated basal glycolysis in PBMC of ERU cases was caused only by CD4⁻ cells (**Figures 2A, 3A**). To our knowledge, we are the first to describe these differences in a direct comparison between PBMC and CD4 sorted subpopulations. Since CD4⁺ T cells are the major players in HAU, ERU and the induced uveitis models (1, 42, 43), we subsequently focused on the metabolic phenotype of this specific cell subset. We could demonstrate that CD4⁺ T cells of ERU cases utilized the oxidative phosphorylation pathway in basal state to a significantly higher amount than control cells (**Figure 1A**). Furthermore, CD4⁺ T cells of horses with ERU were engaged to a lower level in the glycolytic pathway in their basal energy state than control CD4⁺ T cells (**Figure 3A**). We therefore demonstrated that CD4⁺ T cells of ERU cases and controls had different basal metabolic phenotypes. The higher OCR level in ERU might be caused by higher mitochondrial respiration rates. To our knowledge, we are the first to describe this altered metabolic phenotype in CD4⁺ T cells of cases affected by spontaneous autoimmune uveitis. Still, these results are mostly in line with the findings of altered T cell metabolism in mouse models of other autoimmune diseases like rheumatoid arthritis or SLE (33, 40). In SLE, an autoimmune disease mainly driven by autoreactive CD4⁺ T cells and B cells (44), studies revealed an increased level of glycolysis and mitochondrial activity of CD4⁺ T cells of lupus patients and the lupus-prone mouse model (33, 44). The authors suggested that this altered T cell metabolism could cause SLE (33). With this in mind, we hypothesize that the altered T cell metabolism of ERU cases revealed in the present study might also play an important part in the pathogenesis of this disease. Functional studies are necessary to further research this interesting topic in the future, like it was recently done in a study on murine interferon regulatory factor-4 (IRF4) depleted CD4⁺ T cells of an experimental autoimmune uveitis model (EAU) (45). Here, a connection between knockout of IRF4 and lower mitochondrial respiration in basal state in CD4⁺ T cells and suppressed autoimmune uveitis could be shown (45). Unfortunately, this study did not include CD4⁺ T cells of eye-healthy control mice, thus is it uncertain whether IRF4 depletion adjusted the mitochondrial respiration level of CD4⁺ T cells of EAU cases to that of respective cells of healthy mice.

Interestingly, CD4⁺ T cells of ERU cases were able to reach higher rates in compensatory glycolysis compared to controls, when mitochondrial activity was blocked (**Figure 3C**). We

hypothesize that the ability of autoreactive CD4⁺ T cells to achieve higher glycolytic rates when needed, might be due to higher expression levels of glucose transporters. In human CD4⁺ effector T cells, GLUT1 was shown to be essential, as its impairment led to decreased glucose uptake, glycolysis and effector T cell differentiation (46). Furthermore, in a mouse model of inflammatory bowel disease *in vivo*, GLUT1 deficiency led to reduced ability of effector T cells to induce inflammation (46). Autoimmune phenotypes in spontaneous and induced mouse models for SLE were ameliorated upon inhibition of glucose transport with CG-5, a glucose transport inhibitor (44). Thus, higher expression levels of GLUT1 or another glucose transporter in immune cells of uveitis cases might increase their ability to induce inflammation in the immune privileged eye, which merits further investigations in the future, as soon as antibodies for equine glucose transporters are available.

Furthermore, CD4⁺ T cells of ERU cases showed decreased ATP-linked respiration and increased non-mitochondrial oxygen consumption compared to controls, when complexes of their mitochondrial respiratory chain were blocked (**Figure 1C**). Noteworthy, these differences could not be seen when CD4⁺ T cells were tested together with CD4⁻ cells (**Figure 1B**). The reason for that might be that sorting out the CD4⁺ T cells impacts the relative proportions of the remaining cell subsets in the CD4⁻ fraction. One could speculate that subset-specific metabolic patterns could now have a stronger effect on the CD4⁻ cell metabolic curve than on the PBMC metabolic curve. Another possible explanation for this observation might be that the diverse cell subsets in the PBMC population influence each other in their metabolism, especially when some complexes of the respiratory chain or the glycolytic pathway are blocked or uncoupled. This might result in the specific metabolic curve of the PBMC group, but does not evenly represent the metabolic curves of every cell subset within this group. Taken together, our results point to altered parts of CD4⁺ T cell metabolism of horses affected by ERU, namely spending less oxygen on producing ATP through oxidative phosphorylation and in return using more oxygen for non-mitochondrial processes such as glycolysis. Our study is the first to describe these results for immune cells in autoimmune uveitis. In basic research however, effector T cells of C57BL/6 mice were shown to engage in aerobic glycolysis upon pro-inflammatory signals (27, 47, 48). We therefore hypothesize that CD4⁺ T cells of ERU cases as well rather use oxygen to engage in aerobic glycolysis than trying to compensate impaired mitochondrial function with an upregulated OXPHOS. This leap between ERU CD4⁺ T cells, obtained in the quiescent stage of the disease, and T cells in inflammatory studies is possible, because former studies demonstrated that PBMC of ERU cases are locked in an inflammatory state even in the quiescent stage of the disease. For example, PBMC of ERU cases, which were obtained in a quiescent stage of the disease, had higher lactotransferrin concentrations, which the authors linked to the presence of activated immune cells (49). ERU immune cells also demonstrated a more intense reaction to the autoantigen cellular retinaldehyde binding protein, more specifically a more

directed and significantly closer movement toward this autoantigen, than control cells (1). Furthermore, the higher concentration of formin like 1 in CD4⁺ T cells of ERU cases was also linked to the activation of those cells in the quiescent stage of equine recurrent autoimmune uveitis (50).

Concerning the increased mitochondrial activity of PBMC and CD4⁺ T cells of ERU cases, another interesting aspect to investigate is if this enhanced activity influences the mass and formation of mitochondria within immune cells of ERU cases compared to controls. T cells of human SLE patients were shown to have higher mitochondrial mass than controls (51) and the increased mitochondrial mass of M2 macrophages of C57BL/6 mice with melanoma was suggested to be linked to the higher mitochondrial OXPHOS levels of these cells (52). Furthermore, mitochondrial remodeling is known to affect the metabolic status of a cell (29). For example, mitochondrial fission shifts the metabolism to aerobic glycolysis, whereas fusion processes shift the metabolism to OXPHOS (29). As a first step towards this research area, we investigated the amount of mitochondria in CD4⁺ T cells of controls and ERU cases. We could show that the mitochondrial marker protein ATP5 β was expressed to same amounts (Figures 4A, B) and that mitochondria were located in the same cellular regions (Figure 4C) in health and ERU. This finding is in line with former studies concerning the equine CD4⁺ T cell proteome, where mitochondrial markers like Timm13, Tomm70, ATP5 β and other ATP synthase subunits were not expressed significantly different in healthy horses and ERU cases (53). Thus, the metabolic alterations seen in ERU cases do not stem from a differing amount of mitochondria but more likely from a deviant metabolic activity. The altered metabolic phenotype of immune cells is not only investigated in diseases, but also in basic research, since the finding of functionally different cells that can be solely identified by their metabolic phenotype is intriguing. Mitochondria were shown to not only generate ATP and metabolic metabolites but also to control signaling pathways of a cell (54). By producing mitochondrial reactive oxygen species (mROS), they can influence the activation of transcription factors like HIF1 α or NFAT, which ultimately resulted in functional changes of the cell, for example a differentiation into a pro-inflammatory effector T cell in mice [reviewed in (54)]. The knowledge in this field is emerging and many details of mROS generation and functioning are still not fully understood to date, whether in basic research nor in disease [reviewed in (54)]. Therefore, studies in a species like the horse and spontaneous disease models are scarce to date and build a first basis for further knowledge in this complex field.

Linking the results of the mito stress test to the amount of mitochondria and mitochondrial markers found in CD4⁺ T cells in controls and ERU cases, an intriguing fact comes to attention: Although ERU and control CD4⁺ T cells had the same amount of ATP5 β , the ATP synthase (complex V) used less oxygen in ERU CD4⁺ T cells compared to controls (Figure 1C). Future research will be necessary to elucidate the reason for this in the equine model of autoimmune uveitis. One possible explanation might be that CD4⁺ effector T cells of ERU cases are likely to use the

glycolytic pathway to a higher extend than control cells, as previously described for CD4⁺ T cells of an EAE mouse model (55). Another possible explanation could be a functional defect in complex V of the respiratory chain of ERU cells, as it was shown in immortalized human ME/CFS lymphoblasts (56).

Taken together, our findings prove a clear difference in the metabolic phenotype of peripheral CD4⁺ T cells of ERU cases and controls, which allows researchers to identify and possibly target the autoreactive cells in the periphery before they migrate into the eye and destroy retinal tissue. With an increased mitochondrial metabolism under basal conditions and the ability to switch to alternative pathways when the mitochondria are impaired and to engage in higher glycolysis when needed, CD4⁺ T cells of ERU cases are metabolically suited to lead an autoimmune attack. Overall, our results provide a basis for further investigations concerning the functional implication of the altered phenotype of autoreactive lymphocytes in the pathogenesis of autoimmune uveitis.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors to any researcher upon request.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Regierung von Oberbayern, Permit number: ROB-55.2Vet-2532.Vet_03-17-88.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CD conceived, designed and analyzed the experiments and supervised the project. CB, CW, AH and SH performed the experiments. CB, AH and CD analyzed the data. CB, CW, AH and CD wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG DE 719/4-3 (to CD).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Hartmut Gerhards, Bettina Wollanke and Lutz S. Göhring as well as the staff of the Equine Hospital at LMU Munich for providing blood samples of the animals. We also thank Tanja Witte, Kirsten Hahn, Claudia Julius-Wilhelm and Yvette Ballauf for support in blood

withdrawal from the horses as well as Lydia Hoffmann, Stefanie Püls and Barbara Amann for technical assistance. We also thank Lea Lorenz, Lucia Korbonits and Roxane Degroote, as well as Joachim Manning and Herbert Kaltner for critical discussion.

REFERENCES

- Wiedemann C, Amann B, Degroote RL, Witte T, Deeg CA. Aberrant Migratory Behavior of Immune Cells in Recurrent Autoimmune Uveitis in Horses. *Front Cell Dev Biol* (2020) 8(101):1–15. doi: 10.3389/fcell.2020.00101
- Malalana F, Stylianides A, McGowan C. Equine Recurrent Uveitis: Human and Equine Perspectives. *Vet J* (2015) 206(1):22–9. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.06.017
- Gerding JC, Gilger BC. Prognosis and Impact of Equine Recurrent Uveitis. *Equine Vet J* (2016) 48(3):290–8. doi: 10.1111/evj.12451
- Zippies JK, Kirschfink M, Amann B, Hauck SM, Stangassinger M, Deeg CA. Complement Factor B Expression Profile in a Spontaneous Uveitis Model. *Immunobiology* (2010) 215(12):949–55. doi: 10.1016/j.imbio.2010.02.003
- Deeg CA, Kaspers B, Gerhards H, Thurau SR, Wollanke B, Wildner G. Immune Responses to Retinal Autoantigens and Peptides in Equine Recurrent Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2001) 42(2):393–8.
- Schauer M, Kleinwort KJH, Degroote RL, Wiedemann C, Kremmer E, Hauck SM, et al. Interaction of Septin 7 and DOCK8 in Equine Lymphocytes Reveals Novel Insights Into Signaling Pathways Associated With Autoimmunity. *Sci Rep* (2018) 8(1):12332. doi: 10.1038/s41598-018-30753-7
- Doycheva D, Preuss B, Klein R, Zierhut M. High Incidence of Antibodies to Lens Proteins in Sera From Patients With Uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2007) 245(5):683–8. doi: 10.1007/s00417-006-0407-2
- Doycheva D, Preuss B, Deuter C, Zierhut M, Klein R. Identification of Immunodominant Epitopes of Alpha-Crystallins Recognized by Antibodies in Sera of Patients With Uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2012) 250(2):297–305. doi: 10.1007/s00417-011-1758-x
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Pompetzki D, Altmann F, Raith A, et al. Equine Recurrent Uveitis—a Spontaneous Horse Model of Uveitis. *Ophthalmic Res* (2008) 40(3–4):151–3. doi: 10.1159/000119867
- Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, Hauck SM, Amann B, Suppmann S, et al. Identification and Functional Validation of Novel Autoantigens in Equine Uveitis. *Mol Cell Proteomics* (2006) 5(8):1462–70. doi: 10.1074/mcp.M500352-MCP200
- Deeg CA, Raith AJ, Amann B, Crabb JW, Thurau SR, Hauck SM, et al. CRALBP is a Highly Prevalent Autoantigen for Human Autoimmune Uveitis. *Clin Dev Immunol* (2007) 2007:39245. doi: 10.1155/2007/39245
- Neutzner RV, Jager M, Friedburg C, Deeg CA, Lorenz B. [Blind Spot Enlargement Syndrome in Acute Zonal Occult Outer Retinopathy With Detection of Autoantibodies Against the Retinal Antigens CRALBP and s-Ag]. *Ophthalmologie* (2011) 108(11):1045–9. doi: 10.1007/s00347-011-2406-x
- Busch M, Wefelmeyer KL, Walscheid K, Rothaus K, Bauer D, Deeg CA, et al. Identification of Ocular Autoantigens Associated With Juvenile Idiopathic Arthritis-Associated Uveitis. *Front Immunol* (2019) 10:1–12. doi: 10.3389/fimmu.2019.01793
- Prete M, Dammacco R, Fatone MC, Racanelli V. Autoimmune Uveitis: Clinical, Pathogenetic, and Therapeutic Features. *Clin Exp Med* (2016) 16(2):125–36. doi: 10.1007/s10238-015-0345-6
- Brandes K, Wollanke B, Niedermaier G, Brem S, Gerhards H. Recurrent Uveitis in Horses: Vitreal Examinations With Ultrastructural Detection of Leptospires. *J Vet Med* (2007) 54:270–5. doi: 10.1111/j.1439-0442.2007.00921.x
- Voelter K, Vial Z, Pot SA, Spiess BM. Leptospiral Antibody Prevalence and Surgical Treatment Outcome in Horses With Equine Recurrent Uveitis (ERU) in Switzerland. *Vet Ophthalmol* (2020) 23(4):648–58. doi: 10.1111/vop.12767
- Stathopoulou C, Nikoleri D, Bertias G. Immunometabolism: An Overview and Therapeutic Prospects in Autoimmune Diseases. *Immunotherapy* (2019) 11:813–29. doi: 10.2217/imt-2019-0002
- Brooks GA. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab* (2018) 27(4):757–85. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.008
- Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A, Verdín E. NAD(+) Metabolism and its Roles in Cellular Processes During Ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2021) 22(2):119–41. doi: 10.1038/s41580-020-00313-x
- Clanton TL. Hypoxia-Induced Reactive Oxygen Species Formation in Skeletal Muscle. *J Appl Physiol* (1985) (2007) 102(6):2379–88. doi: 10.1152/japplphysiol.01298.2006
- Muri J, Kopf M. Redox Regulation of Immunometabolism. *Nat Rev Immunol* (2021) 21:363–81. doi: 10.1038/s41577-020-00478-8
- O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A Guide to Immunometabolism for Immunologists. *Nat Rev Immunol* (2016) 16(9):553–65. doi: 10.1038/nri.2016.70
- Teng X, Li W, Cornaby C, Morel L. Immune Cell Metabolism in Autoimmunity. *Clin Exp Immunol* (2019) 197(2):181–92. doi: 10.1111/cei.13277
- Klein Geltink RI, Kyle RL, Pearce EL. Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annu Rev Immunol* (2018) 36:461–88. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053019
- Angiari S, Runtsch MC, Sutton CE, Pålsson-McDermott EM, Kelly B, Rana N, et al. Pharmacological Activation of Pyruvate Kinase M2 Inhibits CD4(+) T Cell Pathogenicity and Suppresses Autoimmunity. *Cell Metab* (2020) 31(2):391–405.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2019.10.015
- Buck MD, O'Sullivan D, Klein Geltink RI, Curtis JD, Chang CH, Sanin DE, et al. Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate Through Metabolic Programming. *Cell* (2016) 166(1):63–76. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.035
- Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Targeting Immunometabolism as an Anti-Inflammatory Strategy. *Cell Res* (2020) 30:300–14. doi: 10.1038/s41422-020-0291-z
- Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* (1956) 123:309–14. doi: 10.1126/science.123.3191.309
- Takeshima Y, Iwasaki Y, Fujio K, Yamamoto K. Metabolism as a Key Regulator in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* (2019) 48(6):1142–5. doi: 10.1016/j.semarthrit.2019.04.006
- Miller A, Nagy C, Knapp B, Laengle J, Ponweiser E, Groeger M, et al. Exploring Metabolic Configurations of Single Cells Within Complex Tissue Microenvironments. *Cell Metab* (2017) 26:788–0. doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.014
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* (2009) 324(5930):1029–33. doi: 10.1126/science.1160809
- Orang AV, Petersen J, McKinnon RA, Michael MZ. Micromanaging Aerobic Respiration and Glycolysis in Cancer Cells. *Mol Metab* (2019) 23:98–126. doi: 10.1016/j.molmet.2019.01.014
- Yin Y, Choi SC, Xu Z, Perry DJ, Seay H, Croker BP, et al. Normalization of CD4+ T Cell Metabolism Reverses Lupus. *Sci Transl Med* (2015) 7(274):274ra18. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0835
- Wollanke B, Rohrbach BW, Gerhards H. Serum and Vitreous Humor Antibody Titers in and Isolation of *Leptospira Interrogans* From Horses With Recurrent Uveitis. *Sci Rep* (2001) 219:795–800. doi: 10.2460/javma.2001.219.795
- O'Sullivan D, Pearce EL. Targeting T Cell Metabolism for Therapy. *Trends Immunol* (2015) 36(2):71–80. doi: 10.1016/j.it.2014.12.004
- Streilein JW, Niederkorn JY. Induction of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation Requires an Intact, Functional Spleen. 1981. *Ocul Immunol Inflamm* (2007) 15(3):187–94. doi: 10.1080/09273940701382473
- Caspi RR, Roberge FG, McAllister CG, el-Saied M, Kuwabara T, Gery I, et al. T Cell Lines Mediating Experimental Autoimmune Uveoretinitis (EAU) in the Rat. *J Immunol* (1986) 136:928–33.
- Hauck SM, Lepper MF, Hertl M, Sekundo W, Deeg CA. Proteome Dynamics in Biobanked Horse Peripheral Blood Derived Lymphocytes (PBL) With Induced Autoimmune Uveitis. *Proteomics* (2017) 17(19):1–5. doi: 10.1002/pmic.201700013
- Giese IM, Schilloks MC, Degroote RL, Weigand M, Renner S, Wolf E, et al. Chronic Hyperglycemia Drives Functional Impairment of Lymphocytes in Diabetic INS (C94Y) Transgenic Pigs. *Front Immunol* (2021) 11:607473. doi: 10.3389/fimmu.2020.607473

40. Abboud G, Choi SC, Kanda N, Zeumer-Spataro L, Roopenian DC, Morel L. Inhibition of Glycolysis Reduces Disease Severity in an Autoimmune Model of Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* (2018) 9:1973. doi: 10.3389/fimmu.2018.01973
41. Ventura G, Calvano CD, Porcelli V, Palmieri L, De Giacomo A, Xu Y, et al. Phospholipidomics of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs): The Tricky Case of Children With Autism Spectrum Disorder (ASD) and Their Healthy Siblings. *Anal Bioanal Chem* (2020) 412(25):6859–74. doi: 10.1007/s00216-020-02817-z
42. Radosavljevic A, Agarwal M, Bodaghi B, Smith JR, Zierhut M. Medical Therapy of Uveitic Macular Edema: Biologic Agents. *Ocul Immunol Inflamm* (2020) 28:1239–50. doi: 10.1080/09273948.2019.1709648
43. Chen YH, Eskandarpour M, Gondrand A, Zhang X, Gu R, Galatowicz G, et al. Functionally Distinct Ifngamma(+) IL-17A(+) Th Cells in Experimental Autoimmune Uveitis: T Cell Heterogeneity, Migration and Steroid Response. *Eur J Immunol* (2020) 50(12):1941–51. doi: 10.1002/eji.202048616
44. Li W, Qu G, Choi SC, Cornaby C, Titov A, Kanda N, et al. Targeting T Cell Activation and Lupus Autoimmune Phenotypes by Inhibiting Glucose Transporters. *Front Immunol* (2019) 10:833. doi: 10.3389/fimmu.2019.00833
45. Kang M, Lee HS, Choi JK, Yu CR, Ekwuagu CE. Deletion of Irf4 in T Cells Suppressed Autoimmune Uveitis and Dysregulated Transcriptional Programs Linked to CD4(+) T Cell Differentiation and Metabolism. *Int J Mol Sci* (2021) 22(5):1–15. doi: 10.3390/ijms22052775
46. Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, Michalek RD, Rudolph MC, Deoliveira D, et al. The Glucose Transporter Glut1 is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metab* (2014) 20(1):61–72. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.004
47. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling Immunity: Insights Into Metabolism and Lymphocyte Function. *Science* (2013) 342(6155):1242454. doi: 10.1126/science.1242454
48. Chang CH, Curtis JD, Maggi LBJr., Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell* (2013) 153(6):1239–51. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.016
49. Degroote RL, Hauck SM, Amann B, Hirmer S, Ueffing M, Deeg CA. Unraveling the Equine Lymphocyte Proteome: Differential Septin 7 Expression Associates With Immune Cells in Equine Recurrent Uveitis. *PLoS One* (2014) 9(3):e91684. doi: 10.1371/journal.pone.0091684
50. Degroote RL, Uhl PB, Amann B, Krackhardt AM, Ueffing M, Hauck SM, et al. Formin Like 1 Expression Is Increased on CD4+ T Lymphocytes in Spontaneous Autoimmune Uveitis. *J Proteomics* (2017) 154:102–8. doi: 10.1016/j.jprot.2016.12.015
51. Lai ZW, Marchena-Mendez I, Perl A. Oxidative Stress and Treg Depletion in Lupus Patients With Anti-Phospholipid Syndrome. *Clin Immunol* (2015) 158(2):148–52. doi: 10.1016/j.clim.2015.03.024
52. Yu Q, Wang Y, Dong L, He Y, Liu R, Yang Q, et al. Regulations of Glycolytic Activities on Macrophages Functions in Tumor and Infectious Inflammation. *Front Cell Infect Microbiol* (2020) 10:287. doi: 10.3389/fcimb.2020.00287
53. Degroote RL, Helm S, Klein U, Schmitt R, Ueffing M, Hauck SM, et al. The Equine CD4+ Lymphocyte Proteome. *Hindawi* (2014) 2014:1–4. doi: 10.1155/2014/105312
54. Mehta MM, Weinberg SE, Chandel NS. Mitochondrial Control of Immunity: Beyond A1P. *Nat Rev Immunol* (2017) 17(10):608–20. doi: 10.1038/nri.2017.66
55. Wu L, Hollinshead KER, Hao Y, Au C, Kroehling L, Ng C, et al. Niche-Selective Inhibition of Pathogenic Th17 Cells by Targeting Metabolic Redundancy. *Cell* (2020) 182(3):641–54. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.014
56. Missailidis D, Annesley SJ, Allan CY, Sanislav O, Lidbury BA, Lewis DP, et al. An Isolated Complex V Inefficiency and Dysregulated Mitochondrial Function in Immortalized Lymphocytes From ME/CFS Patients. *Int J Mol Sci* (2020) 21(3):1–26. doi: 10.3390/ijms21031074

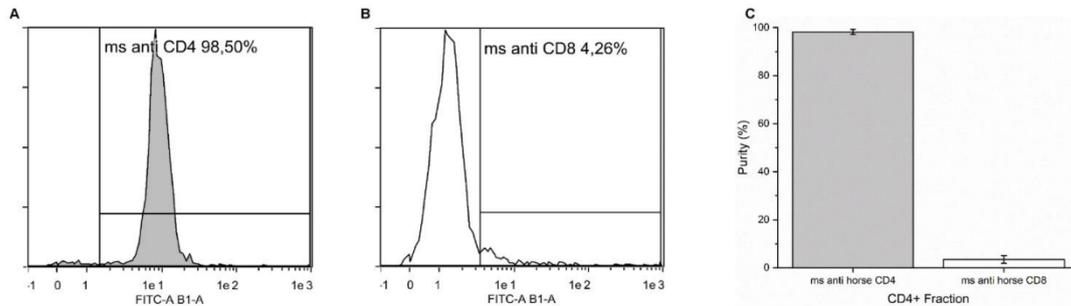
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Barfüßer, Wiedemann, Hoffmann, Hirmer and Deeg. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

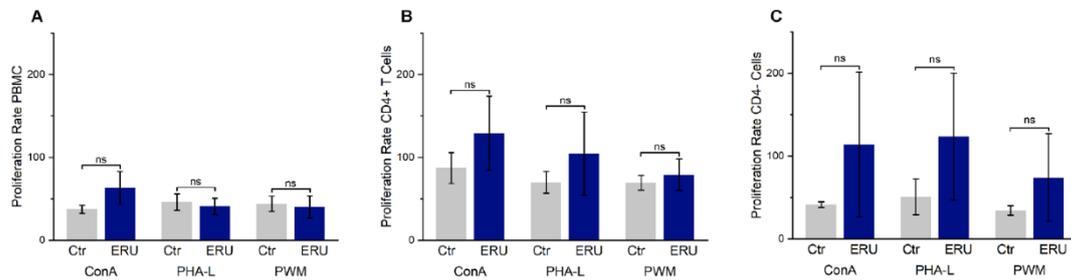
Supplementary Material

1.1 Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1: Purity of CD4⁺ fractions after magnetic activated cell sorting (MACS). **(A)** Graph showing representative flow cytometry result of a CD4⁺ cell fraction, stained with mouse anti horse CD4 FITC antibody. **(B)** Graph showing representative flow cytometry result of a CD4⁺ cell fraction, stained with mouse anti CD8 FITC antibody. **(C)** Bar chart showing the achieved purity of tested CD4⁺ cell fractions (n=18) after sorting, stained with mouse anti horse CD4 FITC antibody (left column) and mouse anti horse CD8 FITC antibody (right column).

1.2 Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2: Cell proliferation rates of PBMC, CD4⁺ T cells and CD4⁻ cells of healthy and ERU cases. Controls are represented as grey and ERU cases as blue bars. Data are shown as mean \pm SEM. **(A)** No significant difference (ns $p > 0.05$) in the proliferation rate of PBMC of control (n=16) and ERU cases (n=6) after stimulation for 48 hours with ConA, PHA-L and PWM was measured. **(B)** CD4⁺ T cells of controls (n=3) and ERU cases (n=7) showed no significant difference (ns $p > 0.05$) in the proliferation rate upon ConA, PHA-L and PWM stimulation for 48 hours. **(C)** CD4⁻ cells of controls (n=3) and ERU cases (n=3) did not differ in their proliferation rate upon stimulation with ConA, PHA-L and PWM for 48 hours (ns $p > 0.05$).

4 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der metabolische Phänotyp peripherer Immunzellen von Kontroll- und an ERU erkrankten Pferden untersucht, wobei die peripheren CD4⁺ T-Zellen von besonderem Interesse waren. Die ERU ist eine häufige Erkrankung in der weltweiten Pferdepopulation, die durch wiederkehrende intraokuläre Entzündungsschübe ohne sichtbaren Auslöser gekennzeichnet ist (Gerding and Gilger, 2016; McMullen Jr and Fischer, 2017). Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die uveitischen Attacken in der ERU durch periphere autoaggressive Immunzellen ausgelöst werden, die vor jeder Episode erneut ins Auge einwandern (Deeg et al., 2002b; Deeg et al., 2004b; Deeg et al., 2006a; Wiedemann et al., 2020). In früheren Experimenten wurden equine PBMC auf ihre Wanderungseigenschaften in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix untersucht und ein signifikanter Unterschied in Geschwindigkeit, Zielgerichtetheit und zurückgelegter Strecke zwischen PBMC von Kontroll- und ERU-Tieren nachgewiesen (Wiedemann et al., 2020). Da die Zellen für diese Effektorfunktion Energie brauchen und die metabolischen Eigenschaften von Immunzellen in der ERU noch nicht untersucht wurden (Stand der Pubmed-Literaturrecherche 31.08.2021), war dies das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Es konnten bei den untersuchten PBMC von ERU-Tieren schon im basalen Zustand signifikante Unterschiede im metabolischen Phänotyp festgestellt werden. Die Zellen hatten im Seahorse-Experiment basal signifikant erhöhte OCR-, ECAR- und glycoPER-Kurven im Vergleich zu PBMC von Kontrollpferden (Publikation, Figures 1A, 2A, 3A), was für eine erhöhte mitochondriale Respiration und Glykolyse der PBMC von ERU-Tieren spricht. Die vorliegende Arbeit beschreibt somit zum ersten Mal die veränderten Stoffwechselintensitäten im Krankheitsbild der autoimmunen Uveitis der Pferde im Vergleich zu augengesunden Kontrollpferden. Weder in EAU-Modellen noch in der autoimmunen Uveitis des Menschen wurde bisher der metabolische Phänotyp peripherer Lymphozyten untersucht (Stand der Pubmed-Literaturrecherche 31.08.2021), weshalb zu den Zusammenhängen des veränderten metabolischen Phänotyps und der Pathogenese der ERU zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden kann.

Betrachtet man jedoch Autoimmunerkrankungen und -modelle, die spezifisch andere Organe betreffen, liegen bereits Ergebnisse zum Immunmetabolismus der

beteiligten Zellen vor: In Versuchen mit K/BxN-Mäusen konnte bei den autoreaktiven Lymphozyten ein ähnlicher metabolischer Phänotyp beobachtet werden (Abboud et al., 2018). K/BxN-Mäuse werden als Kreuzung zwischen weiblichen KRN-Mäusen und männlichen non obese diabetic-Mäusen gezüchtet und sind ein spontanes Modell für die autoimmune Arthritis des Menschen (Abboud et al., 2018). Sie haben einerseits ein Allel, das ein Peptid der Glukose-6-Phosphat-Isomerase kodiert und andererseits einen transgen veränderten TCR, durch den CD4⁺ T-Zellen dieses Peptid erkennen und binden, wodurch die Mäuse in den ersten Lebenswochen eine autoimmune Gelenkentzündung entwickeln (Abboud et al., 2018). Die in einem frühen Stadium der Erkrankung getesteten Lymphozyten der K/BxN-Mäuse hatten eine basal erhöhte glykolytische Aktivität im Vergleich zu Kontrollmäusen und bei den CD4⁺ T-Zellen konnte zusätzlich eine basal erhöhte mitochondriale Respiration nachgewiesen werden (Abboud et al., 2018). Durch eine frühe und durchgehende Therapie der Mäuse mit 2-DG, einem Glykolyseinhibitor, über das Trinkwasser konnte die Schwere der sich entwickelnden Arthritis signifikant gemindert werden (Abboud et al., 2018). 2-DG wird wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Glukose über Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen und hier zu 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat verstoffwechselt, welches nicht mehr weiter abgebaut wird, sich in der Zelle anhäuft und kompetitiv die ersten zwei Enzyme des Glukosestoffwechsels (Glukose-6-Phosphat-Isomerase und Hexokinase) hemmt (Wick et al., 1957; Chen and Guéron, 1992; Abboud et al., 2018). Außerdem wurde bei bereits erkrankten Tieren durch eine Behandlung mit 2-DG, das ebenfalls über das Trinkwasser verabreicht wurde, eine partielle Reduktion der Arthritis erreicht (Abboud et al., 2018). Es konnte also die höhere glykolytische Aktivität der autoreaktiven Lymphozyten mit der Entwicklung der autoimmunen Arthritis und dem Schweregrad der Entzündung verknüpft werden (Abboud et al., 2018). In einer aktuelleren Studie an transgenen Diabetesschweinen wurden ebenfalls erhöhte basale glykolytische und mitochondriale Aktivitäten der PBMC diabetischer Schweine im Vergleich zu denen von Kontrolltieren festgestellt (Giese et al., 2021). Giese et al. stellten die Hypothese auf, dass es eine Verbindung zwischen dem fundamental veränderten Zellmetabolismus der PBMC und deren autoreaktiven Charakter geben müsse (Giese et al., 2021).

Verknüpft mit den Erkenntnissen zu metabolischen Veränderungen in anderen autoimmunen Krankheiten könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum

veränderten metabolischen Phänotypen von PBMC von ERU-Tieren also bedeuten, dass die erhöhte glykolytische Aktivität für den autoaggressiven Charakter der PBMC in der ERU nötig ist. Um dies zu verifizieren, müssten jedoch weitere funktionelle Versuche durchgeführt werden, beispielsweise könnte analog zur K/BxN-Studie eine Hemmung der Glykolyse mit 2-DG *in vivo* mit nachfolgender Beurteilung des Krankheitsbildes erfolgen. Eine mögliche Verbesserung des Krankheitsverlaufs in ERU-Tieren ist jedoch nur schwer beurteilbar, da die Schübe spontan und unregelmäßig auftreten. Somit könnte für diese funktionelle Analyse *in vivo* ein induziertes EAU-Modell eine gute Alternative für eine erste Beurteilung sein. Im induzierten Uveitismodel könnten auch PBMC isoliert und dann unbehandelt oder mit 2-DG behandelt in nicht-immunisierte Spendertiere transferiert werden. Wenn die glykolytische Aktivität tatsächlich für die Autoaggressivität der Zellen nötig ist, sollten die Empfängertiere der 2-DG-behandelten Zellen keine oder nur eine mildere Uveitis entwickeln als die Empfängertiere der unbehandelten Zellen.

Zur Gruppe der PBMC gehören nicht nur CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen, sondern auch B-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (Ventura et al., 2020), die mit ihrem spezifischen Stoffwechsel das Gesamtbild des PBMC-Metabolismus mehr oder weniger stark prägen. Da einerseits aus den Messungen zum Zellmetabolismus der PBMC-Population nicht ersichtlich wird, welche Zelltypen welche Variationen im veränderten Stoffwechsel der PBMC in der ERU bewirken und andererseits in der Pathogenese der Erkrankung vor allem die CD4⁺ T-Zellen eine tragende Rolle einnehmen, wurde diese Zellart in der vorliegenden Arbeit aus der Gruppe der PBMC selektiert und auf deren individuellen metabolischen Phänotyp hin untersucht. Außerdem wurden die verbleibenden CD4⁻ Zellen ebenfalls getestet und die Ergebnisse der jeweiligen Messungen miteinander verglichen. Bei der Interpretation der Daten muss beachtet werden, dass die CD4⁻ Zellpopulation immer noch eine heterogene Zusammensetzung aufweist, denn sie besteht aus den Zelltypen, die nach der Dichtegradientenzentrifugation und dem Aussortieren der CD4⁺ T-Zellen noch übrig sind.

CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Tieren wiesen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen von augengesunden Pferden einerseits eine erhöhte Respiration und andererseits eine verminderte Glykolyseaktivität im basalen Zustand auf (Publikation, Figures

1A, 3A). Es konnte folglich gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen von ERU- und Kontrollpferden schon im basalen Zustand unterschiedliche metabolische Phänotypen haben. Diese neu gewonnenen Erkenntnisse helfen dabei, die Mechanismen hinter der ERU genauer zu verstehen und bringen translational neue Informationen für die autoimmune Uveitis des Menschen. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die ersten zum metabolischen Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen in der ERU sind, bleibt abzuwarten, welcher funktionelle Nutzen sich daraus im Krankheitsbild der ERU ergibt.

Auch für die autoimmune Uveitis des Menschen wurde der metabolische Phänotyp der autoaggressiven CD4⁺ T-Zellen noch nicht untersucht (Stand der Pubmed-Literaturrecherche 31.08.2021). In EAU wurde in einer vor kurzem veröffentlichten funktionellen Studie mit murinen CD4⁺ T-Zellen, deren Interferon-Regulations-Faktor 4 (IRF4) ausgeschaltet wurde (CD4-IRF4KO), gezeigt, dass der IRF4-Signalweg für den Metabolismus und die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen wichtig ist (Kang et al., 2021). IRF4 reguliert Gentranskriptionen, wodurch das Molekül eine essentielle Rolle bei der Differenzierung und klonalen Expansion von T-Zellen und deren metabolischer Anpassung nach TCR-Bindung spielt, was aus Experimenten mit C57BL/6-Mäusen bekannt ist (Lohoff et al., 2002; Man et al., 2013; Kang et al., 2021). Im Seahorse Analyzer konnten verminderte Werte in der basalen mitochondrialen Respiration und der maximalen Respirationskapazität der CD4-IRF4KO CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden, woraus geschlossen wurde, dass IRF4-defiziente Zellen die oxidative Phosphorylierung und ATP-Synthese weniger gut ausführen konnten als Zellen mit normaler IRF4-Abundanz (Kang et al., 2021). Die CD4-IRF4KO-Mäuse waren im Vergleich zu Wildtypmäusen resistent gegen eine EAU, die durch Immunisierung mit dem uveitogenen Peptid IRBP₆₅₁₋₆₇₀ induziert wurde (Kang et al., 2021).

Bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur ERU könnte man mutmaßen, dass auch in der spontanen autoimmunen Uveitis der Pferde der IRF4-Signalweg relevant sein könnte. IRF4 könnte beispielsweise in CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren höher abundant sein als in denen von augengesunden Pferden, da jene eine höhere basale mitochondriale Respiration aufwiesen. Diese Hypothese wird gestützt durch die niedrigere Abundanz der basalen mitochondrialen Respiration von CD4-IRF4KO CD4⁺ T-Zellen im oben beschriebenen EAU-Modell (Kang et al., 2021). Zur Überprüfung sollte als nächstes Experiment eine Bestimmung der IRF4-

Abundanz in CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden in Betracht gezogen werden. Jedoch könnte beim Pferd auch ein anderes Molekül diese Funktion übernehmen, denn es können nicht alle in der Maus gewonnenen Erkenntnisse eins zu eins auf das Pferd übertragen werden, nicht zuletzt da sich das Immunsystem nachtaktiver Mäuse anders entwickelt hat als das von tagaktiven Pferden (Karagianni et al., 2020). Ein Nachteil der Studie von Kang et al. ist, dass es keine dritte Gruppe von Mäusen gab, die als gesunde Mäuse mit gleichem genetischem Hintergrund ohne EAU-Induktion in die Studie mit aufgenommen wurden (Kang et al., 2021). Mit dieser dritten Gruppe hätte man das Abflachen der basalen OXPHOS und maximalen Respirationskapazität der CD4-IRF4KO CD4⁺ T-Zellen in der EAU einordnen können.

Durch die Diskussion von anderen autoimmunen Erkrankungen und deren Tiermodellen, bei denen der metabolische Phänotyp beteiligter Immunzellen bereits untersucht wurde, könnte der basal veränderte metabolische Phänotyp peripherer CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Tieren möglicherweise eingeordnet werden. In B6.*lpr*-Mäusen, einem murinen SLE-Modell, und einem weiteren SLE-Mausmodell wurde bei CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu nicht autoimmunen Kontrollen eine erhöhte OXPHOS- und Glykolyserate festgestellt (Yin et al., 2015; Yin et al., 2016). Durch eine Behandlung mit 2-DG oder Metformin, einem Inhibitor der mitochondrialen Atmung, konnte die Aktivierung autoimmuner Zellen in B6.*lpr*-Mäusen verhindert werden (Yin et al., 2016). Für einen Abbruch einer bereits laufenden autoimmunen Entzündung war jedoch eine Kombinationstherapie der beiden Stoffe, die durchgängig über das Trinkwasser verabreicht werden musste, nötig (Yin et al., 2016).

Im Gegensatz dazu schienen CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren basal nur die OXPHOS zu bevorzugen, während die Glykolyse dieser Zellen in der ERU sogar vermindert war (Publikation, Figures 1A, 2A, 3A). Wenn die mitochondriale Respiration jedoch gestört wurde, konnten CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren ihre kompensatorische Glykolyserate signifikant höher steigern als die CD4⁺ T-Zellen von augengesunden Pferden (Publikation, Figure 3C). Der grundsätzliche Anstieg der Glykolyserate ist nicht weiter verwunderlich, da T-Zellen, wie in Kapitel 2.4.2 besprochen, physiologisch ihre glykolytische Aktivität bei Aktivierung hochfahren können. Andererseits steigerten CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren ihre kompensatorische Glykolyse signifikant mehr als CD4⁺ T-Zellen von

Kontrollpferden, was erneut den veränderten metabolischen Phänotyp dieser Immunzellsubpopulation in der ERU unterstreicht und unter Beachtung der Forschungsergebnisse aus den oben genannten SLE-Studien für eine obligate Erhöhung der Glykolyserate in der Autoimmunität sprechen würde. Um diese Mutmaßung zu überprüfen, müssen in Zukunft funktionelle Experimente mit CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Tieren durchgeführt werden. So könnte man beispielsweise, auf den Versuchen von Wiedemann et al. aufbauend (Wiedemann et al., 2020), die Wanderungseigenschaften der CD4⁺ T-Zellen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix vor und nach einer Glykolysehemmung vergleichen. Interessant wäre hierbei nicht nur, ob die CD4⁺ T-Zellen nach der Glykolysehemmung andere Wanderungseigenschaften zeigen als ungehemmte, sondern auch, ob die Zellen aus ERU-Tieren im gehemmten Zustand ähnliche Wanderungseigenschaften wie CD4⁺ T-Zellen von augengesunden Pferden zeigen. Falls ja, wäre die spezifische Hemmung der Glykolyse der autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen ein möglicher therapeutischer Ansatz für die ERU.

Darüber hinaus könnte die glykolytische Aktivität equiner CD4⁺ T-Zellen als nächster Schritt auch am Beginn eines ERU-Entzündungsschubs gemessen und beurteilt werden. Auf der einen Seite könnte hierbei möglicherweise kein großer Unterschied zu beobachten sein, da die CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren auch in den entzündungsfreien Phasen einen inflammatorischen Charakter aufweisen, was durch verschiedene Studien bewiesen wurde (Deeg et al., 2001; Degroote et al., 2014; Degroote et al., 2017; Wiedemann et al., 2020). Andererseits wäre es möglich, dass die glykolytische Aktivität vor allem zu Beginn eines ERU-Schubs wichtig wird. So könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass der inflammatorische Charakter der CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren zwischen den Entzündungsschüben durch die erhöhte Rate der OXPHOS bedingt sein könnte, während die Glykolyse vor allem während eines aktiven Inflammationsschubs wichtig werden könnte. Eine grundsätzlich ähnliche Beobachtung wurde bei der Untersuchung natürlicher Killerzellen gemacht (Keating et al., 2016). Die aus dem Blut gesunder Spender isolierten natürlichen Killerzellen zeigten nach Zytokinstimulation erhöhte OXPHOS- und Glykolyseraten (Keating et al., 2016). Die erhöhte OXPHOS-Rate war essentiell für die Aufrechterhaltung der IFN- γ -Produktion und der Zytotoxizität als Reaktion auf die Zytokinstimulation, während die gesteigerte Glykolyse für die maximale IFN- γ -Produktion nötig war (Keating et

al., 2016). Wie in Kapitel 2.1.2 dargelegt, haben periphere CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren eine erhöhte IFN- γ -Produktion im Vergleich zu denen augengesunder Pferde (Curto et al., 2016; Saldinger et al., 2019). Ob ein Zusammenhang mit dem veränderten Zellmetabolismus in ERU besteht, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

Ebenso muss die oben aufgestellte Hypothese, dass die erhöhte OXPHOS den inflammatorischen Charakter der CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren zwischen den Entzündungsschüben bedingen und die Glykolyse vor allem während der Induktion eines aktiven Inflammationsschubs wichtig sein könnte, in weiterführenden funktionellen Experimenten untersucht werden. Durch eine Metabolismusanalyse wie in der vorliegenden Studie könnte die Glykolyserate von autoreaktiven peripheren CD4⁺ T-Zellen *in vitro* vor und nach vorheriger Stimulation mit einem Autoantigen untersucht und verglichen werden. Hier würde man erwarten, dass die stimulierten CD4⁺ T-Zellen ihre Glykolyserate signifikant steigern. Für Versuche *in vivo* könnten Pferde mit ERU, die sich frisch im Schub befinden, getestet werden. Allerdings würde sich ein induziertes Uveitismodell am besten zur *in vivo* Untersuchung der oben aufgestellten Hypothese eignen, da hier im Gegensatz zu den spontanen Schüben in der ERU der Zeitpunkt eines jeden Entzündungsschubs und das Einwandern der peripheren CD4⁺ T-Zellen genau bestimmt werden kann (Deeg et al., 2002b; Chen et al., 2013; Horai et al., 2013). Analog der Behandlung in den oben diskutierten SLE-Modellen (Yin et al., 2015; Yin et al., 2016) könnten 2-DG und Metformin als Inhibitoren eingesetzt werden.

Um auszuschließen, dass der gesteigerte Sauerstoffverbrauch der CD4⁺ T-Zellen in der ERU durch eine reine Mehrzahl an Mitochondrien in diesen Zellen bedingt war, wurde die Anzahl der Mitochondrien lichtmikroskopisch und im Blot überprüft (Publikation, Figure 4). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied bei der Menge oder Masse der Mitochondrien in CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (Publikation, Figures 4A, 4B). Auch lichtmikroskopisch konnten weder Unterschiede bei der Anzahl, noch bei der Lage der Mitochondrien in den getesteten Zellen gefunden werden (Publikation, Figure 4C). Da die getesteten Zellen von Kontroll- und ERU-Pferden ab dem Zeitpunkt der Blutentnahme gleich behandelt wurden, erhärtet sich die Hypothese, dass die erhöhte OCR-Rate und folglich gesteigerte OXPHOS nicht technisch bedingt ist,

sondern eine funktionelle Bedeutung hat und dass der veränderte metabolische Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen in der Pathogenese der ERU bedeutsam ist. Um diese Hypothese allerdings mit Sicherheit annehmen zu können, bedarf es weiterführender Experimente. Beispielsweise könnten die Mitochondrien aus CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden isoliert und nachfolgend massenspektrometrisch untersucht werden. Die differenzielle Proteomanalyse würde einen tieferen Einblick in die Regulation mitochondrialer Proteine und veränderter Proteinnetzwerke im augengesunden Zustand und der autoimmunen Uveitis der Pferde geben. Die Ergebnisse dieser Proteomanalyse sollten also einen ersten Hinweis auf die zugrundeliegenden Prozesse in der autoimmunen Uveitis liefern, die zum veränderten metabolischen Phänotyp und dem autoaggressiven Charakter der CD4⁺ T-Zellen führen.

Außerdem wäre es interessant, die Struktur der Mitochondrien der CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden detaillierter zu untersuchen. Mitochondrien unterliegen einem steten Prozess von Fusion und Spaltung, der für die Homöostase und das Wohlergehen der gesamten Zelle nötig ist (Farmer et al., 2018). Bei Fusionsvorgängen verbinden sich die innere und die äußere Membran eines Mitochondrium mit denen eines anderen Mitochondriums, wodurch sich die Membranen, der Intermembranraum und die Matrix verbinden und ein größeres, längliches Mitochondrium entsteht (Chan, 2012; Farmer et al., 2018). Durch Spaltungsprozesse werden diese länglichen Mitochondrien wieder in kleinere Mitochondrien aufgeteilt, die beispielsweise in der Mitose gut auf Tochterzellen übertragen werden können (Farmer et al., 2018). In CD4⁺ T-Zellen von SLE-Patienten gab es einen Zusammenhang zwischen einer veränderten mitochondrialen Morphologie und dem veränderten Zellmetabolismus (Takeshima et al., 2019). Spaltungsprozesse in der mitochondrialen Struktur begünstigten die aerobe Glykolyse, während Fusionsvorgänge in der mitochondrialen Morphologie den Zellstoffwechsel zugunsten der OXPHOS verschoben (Takeshima et al., 2019). Eine Untersuchung von Mitochondrien von equinen CD4⁺ T-Zellen in einem hochauflösenden Mikroskop könnte Erkenntnisse liefern, ob in equinen peripheren Blutzellen diese metabolischen Veränderungen ebenfalls mit einem strukturellen Umbau der Mitochondrien einhergehen. Danach könnten CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren auf Abweichungen im Vergleich zu den Zellen augengesunder Pferde getestet werden. Aufgrund der Tatsache, dass solche Versuche noch nicht mit

equinen Lymphozyten durchgeführt wurden, müsste die Methodik für ein solches Experiment jedoch erst etabliert werden.

Darüber hinaus wäre ein Vergleich der mitochondrialen Morphologie von peripheren und vitrealen CD4⁺ T-Zellen bei ERU-Tieren nützlich. In einer vergleichbaren Studie mit Mitochondrien aus CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit nicht-infektiöser Uveitis konnten bereits gespaltene Mitochondrien bei vitrealen und fusionierte Mitochondrien bei peripheren CD4⁺ T-Zellen im Konfokalmikroskop beobachtet werden (Tagirasa et al., 2020). Die gespaltene Mitochondrien wurden auch in der Uveitis des Menschen mit Effektor-T-Zellen in Verbindung gebracht, während T-Gedächtniszellen fusionierte Mitochondrien hatten (Tagirasa et al., 2020). Außerdem exprimierten vitreale CD4⁺ T-Zellen von Uveitispatienten signifikant mehr P-Glykoprotein und proinflammatorische Zytokine als die peripheren CD4⁺ T-Zellen der Patienten, was mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen wurde (Tagirasa et al., 2020). Ob die erhöhte Expression von P-Glykoprotein die gesteigerte Abundanz von proinflammatorischen Zytokinen bedingte oder andersherum, konnte nicht abschließend geklärt werden (Tagirasa et al., 2020). Leider wurden in diese Studie keine CD4⁺ T-Zellen von gesunden Menschen miteinbezogen (Tagirasa et al., 2020), weshalb kein Vergleich zwischen der Morphologie der Mitochondrien aus peripheren CD4⁺ T-Zellen von augengesunden Menschen und Patienten mit nicht-infektiöser Uveitis gezogen werden kann. Mit den oben beschriebenen Experimenten mit CD4⁺ T-Zellen aus Kontrollpferden und ERU-Tieren könnten einerseits die beschriebenen Erkenntnisse aus der Uveitisforschung beim Menschen mit Ergebnissen von ERU-Tieren verglichen werden und andererseits wertvolle zusätzliche Informationen zu den strukturellen Unterschieden zwischen Mitochondrien aus CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und uveitischen Pferden gewonnen werden.

Bei CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Tieren konnten eine niedrigere ATP-verknüpfte Respiration und ein höherer nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen von Kontrollpferden nachgewiesen werden (Publikation, Figure 1C). Auch hier kann über den Grund, die Bedeutung und die Funktion dieser Veränderungen derzeit nur spekuliert werden, da es noch keine vergleichbaren Studien zu peripheren CD4⁺ T-Zellen in der ERU gibt (Stand der Pubmed-Literaturrecherche 31.08.2021).

Bei IRPB-induzierten EAU-Mäusen konnte allerdings bei retinalen Mitochondrien zuerst eine verringerte mRNA-Expression und später eine verringerte Abundanz der ATP-Synthase in der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit nachfolgender Proteomanalyse gezeigt werden (Saraswathy and Rao, 2009; 2011). Die retinalen Mitochondrien wurden gewonnen, indem die Retinae von EAU- und Kontrollmäusen entnommen und anschließend homogenisiert wurden, woraufhin die Mitochondrien aus den retinalen Zellen isoliert und die Proteine analysiert wurden (Saraswathy and Rao, 2009; 2011). Außerdem wurden die Oxidation und die Carbamidomethylierung als häufige posttranslationale Modifikationen der retinalen mitochondrialen ATP-Synthase in EAU nachgewiesen (Saraswathy and Rao, 2011). Saraswathy und Rao interpretierten auf diesen Ergebnissen aufbauend, dass es schon früh oxidativen Stress und Schäden in der mitochondrialen DNA in retinalen Zellen von EAU-Mäusen geben müsse, da oxidativer Stress zu posttranslationalen Modifikationen von mitochondrialen Proteinen führt, was deren Struktur verändern und einen Funktionsverlust bewirken kann (Saraswathy and Rao, 2009; 2011). Leider wurden diese retinalen Zellen weder einer metabolischen Analyse unterzogen, noch wurden die beteiligten peripheren Immunzellen untersucht (Saraswathy and Rao, 2009; 2011).

Falls der in retinalen Mitochondrien aus EAU-Mäusen nachgewiesene oxidative Stress (Saraswathy and Rao, 2009; 2011) auch in peripheren CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Tieren zu finden wäre, könnte das ebenfalls für einen funktionellen Defekt mitochondrialer Strukturen sprechen. So könnte die geringere ATP-verknüpfte Respiration in peripheren CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren (Publikation, Figure 1C) beispielsweise durch einen Defekt der ATP-Synthase der mitochondrialen Atmungskette bedingt sein. Dies könnte mit der bereits oben als fortführendes Experiment genannten mitochondrialen Proteomanalyse von CD4⁺ T-Zellen genauer erforscht werden, wodurch die Wichtigkeit dieses weiterführenden Versuchs unterstrichen wird. Zusammengefasst könnte ein Defekt der Mitochondrien der CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren erklären, warum diese Zellen weniger ATP-verknüpfte Respiration betrieben und gleichzeitig mehr Sauerstoff für nicht-mitochondriale Prozesse verbrauchten (Publikation, Figure 1C).

Weiterhin wäre es wünschenswert, die Abundanz des Glukosetransporters GLUT1, dessen Relevanz bei der Effektorfunktion von CD4⁺ T-Zellen in Kapitel 2.4.2 genauer beleuchtet wurde, in CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und an ERU

erkrankten Pferden zu messen. Bedauerlicherweise gibt es derzeit keine spezifischen Antikörper gegen equines GLUT1 auf dem Markt und zwei getestete Antikörper gegen humanes GLUT1 zeigten keine Kreuzreaktivität zu equinem GLUT1, weshalb eine Untersuchung in diese Richtung auf die Zukunft verschoben werden muss, wenn passende Antikörper verfügbar sind.

In der Rheumatoiden Arthritis des Menschen wurden ebenfalls fehlerhaft arbeitende Mitochondrien in CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen und die Succinat-CoA-Ligase als grundlegendes fehlerhaft arbeitendes Enzym aufgezeigt (Wu et al., 2020). Eine insuffiziente Reparatur beschädigter DNA verschlechterte die OXPHOS-Rate und ATP-Synthese der betroffenen T-Zellen in RA (Li et al., 2019). Auch die Herstellung von Succinat aus α -Ketoglutarat wurde verhindert, was zu einer Anhäufung von Citrat im Zytoplasma führte (Wu et al., 2020). Dies wiederum begünstigte die Anhäufung von Acetyl-CoA im Zytoplasma und die Acetylierung zytoplasmatischer Proteine (Wu et al., 2020). Die Hyperacetylierung führte über einen Umbau des Zytoskeletts letztendlich zur Polarisierung, Uropodenbildung und Ausbildung einer Zellrichtung (Wu et al., 2020). Die so umstrukturierten CD4⁺ T-Zellen von RA-Patienten waren hypermobil und konnten gut vom Blut ins Gewebe auswandern (Wu et al., 2020). Zusammengefasst wurde die metabolische Dysregulierung der CD4⁺ T-Zellen von RA-Patienten also mit dem verbesserten Auswanderungsvermögen dieser Zellen in RA in Verbindung gebracht (Wu et al., 2020). Daraus entstand die Hypothese, dass der veränderte Metabolismus von CD4⁺ T-Zellen von RA-Patienten zumindest teilweise als Ursache der Autoimmunität angesehen werden könnte (Qiu et al., 2021). Ein spannender Forschungsansatz wäre nun die Untersuchung, ob und wie der veränderte Metabolismus der autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen in der ERU mit deren veränderten Wanderungsverhalten, das in einer früheren Studie gezeigt wurde (Wiedemann et al., 2020), in Verbindung steht.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede in den ECAR- und glycoPER-Kurven von PBMC und den aufgeteilten Fraktionen waren in sich schlüssig, denn jeweils eine oder beide der isolierten Fraktionen waren für den Verlauf der PBMC-Kurve hauptverantwortlich (Publikation, Figures 2, 3). Der Verlauf der OCR-Kurven von PBMC, CD4⁺ T-Zellen und CD4⁻ Zellen nach Injektion der Reagenzien zeigte jedoch einige unerwartete Unterschiede (Publikation, Figure 1B,

1C, 1D). Die vorliegende Arbeit untersuchte und verglich erstmals die metabolischen Reaktionen von PBMC und spezifischer Lymphozytensubpopulationen in einer Studie (Stand der Pubmed-Literaturrecherche 31.08.2021). Die gezeigten Unterschiede in den metabolischen Reaktionen der Subpopulationen im Vergleich zur PBMC-Fraktion sind neu und anknüpfende Studien sollten deren Ursache und Folge erforschen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen metabolischen Reaktionen der PBMC und der nach CD4-aufgeteilten Fraktionen auf die Entkopplung der mitochondrialen Atmung, der Hemmung der ATP-Synthase oder der nicht-mitochondrialen Respiration könnte sein, dass sich die verschiedenen Zellsubtypen in der heterogenen Gruppe der PBMC in ihrem Metabolismus gegenseitig beeinflussen, besonders wenn bestimmte Komplexe der Atmungskette geblockt oder entkoppelt werden. Durch die Isolation der CD4⁺ T-Zellen aus den PBMC können sie keinen Einfluss mehr auf den Stoffwechsel der CD4⁻ Zellen nehmen und umgekehrt. Ein zweiter wichtiger Faktor, der bei der Interpretation der Ergebnisse der metabolischen Analysen zum Tragen kommt, ist die prozentuale Verteilung der Zellsubtypen in der gesamten PBMC-Population und deren Manipulation durch den magnetischen Aufteilungsprozess. Durch das Extrahieren der CD4⁺ T-Zellen aus den PBMC wird der prozentuale Anteil der verbleibenden CD4⁻ Zellsubtypen an der Gesamtzellzahl verändert. Folglich könnten subtypspezifische metabolische Muster einen höheren Einfluss auf die OCR-Kurve der CD4⁻ Zellen als auf die OCR-Kurve der PBMC nehmen. Die metabolischen Unterschiede zwischen PBMC und bestimmten Subpopulationen sind nicht nur auf die ERU bezogen sehr interessant und sollten auch in anderen Krankheiten untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse über den Metabolismus peripherer CD4⁺ T-Zellen in augengesunden Pferden und der ERU sind neu im Forschungsfeld der autoimmunen Uveitis und bilden eine gute Grundlage für weitere Forschungen in diesem Bereich. Neben den bereits vorgeschlagenen weiterführenden Experimenten wäre es beispielsweise auch wichtig, den metabolischen Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen vor dem ersten ERU-Schub zu bestimmen, um festzustellen, ob der veränderte Zellmetabolismus schon vor dem ersten Schub besteht. Falls ja, wäre dies ein Hinweis darauf, dass ein abnormer T-Zellmetabolismus am Anfang der autoimmunen Uveitis steht und es könnten

vorbeugende Maßnahmen ergriffen werden, um einen womöglich bevorstehenden Schub zu verhindern. Für ein solches Experiment wäre allerdings eine groß angelegte Studie über mehrere Jahre notwendig. Es sollten beispielsweise mindestens 50 Pferde in die Studie eingeschlossen werden, so dass statistisch gesehen mit der unter Kapitel 2.1.1 angesprochenen ERU-Inzidenz von 8 – 10 % in Europa (Spiess, 2010; Degroote and Deeg, 2021) vier bis fünf Pferde eine spontane rezidivierende Uveitis entwickeln sollten. Ab einem Alter von zwei Jahren sollten die peripheren CD4⁺ T-Zellen der Tiere monatlich in einem metabolischen Assay getestet werden, da die ERU meist ab einem Alter von drei Jahren auftritt (Sandmeyer et al., 2020), wie ebenfalls im Kapitel 2.1.1 erläutert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Glukosestoffwechsel equiner CD4⁺ T-Zellen untersucht. Weiterführend sollte eine Untersuchung des Lipidstoffwechsels dieser Zellen in augengesunden und an ERU erkrankten Pferden in Betracht gezogen werden, da dessen Wichtigkeit bereits in anderen autoimmunen Erkrankungen wie der SLE gezeigt werden konnte (Zhang et al., 2020). T-Zellen aus SLE-Patienten wiesen eine erhöhte Glykosphingolipidsynthese auf, welche mit der Aktivierung der Zelle über den TCR verbunden war (McDonald et al., 2014; Zhang et al., 2020). Die Inhibition dieses Stoffwechselwegs reduzierte die T-Zellaktivität *in vitro* und die Bildung von Autoantikörpern *in vivo* (McDonald et al., 2014). Der veränderte Glykosphingolipidmetabolismus konnte in lupusempfänglichen Mäusen und SLE-Patienten mit der Überexpression des Enzyms Neuraminidase 1 in Verbindung gebracht werden (Nowling et al., 2015). Interessanterweise wurde in der Retina von ERU-Tieren eine erhöhte Expression der Neuraminidase 1 nachgewiesen (Lorenz et al., 2021). Somit wurde bereits eine veränderte Aktivität dieses Enzyms in der ERU gezeigt, die potenzielle Auswirkung auf periphere Immunzellen in der ERU muss jedoch noch untersucht werden.

Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die aufgezeigten Unterschiede des metabolischen Phänotyps der CD4⁺ T-Zellen in ERU nur ein beiläufig auftretender Effekt sind und nichts mit der Ätiologie oder Pathogenese der spontanen autoimmunen Uveitis der Pferde zu tun haben könnten. Daher sind weiterführende Experimente nötig, die idealerweise den veränderten Metabolismus der CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden mit der Ätiologie oder der Pathogenese der Erkrankung verknüpfen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde der metabolische Phänotyp peripherer CD4⁺ T-Zellen bei augengesunden Pferden und an ERU erkrankten Tieren erstmals bestimmt und so die Grundlage für weitere Forschungen auf dem Gebiet des Immunmetabolismus in der ERU gelegt. Es konnte ein basal erhöhter Sauerstoffverbrauch der peripheren CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren im Vergleich zu augengesunden Pferden festgestellt werden, ebenso eine verminderte basale Glykolyseaktivität. CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Tieren zeigten weiter eine verminderte ATP-verknüpfte Atmung und eine höhere Kapazität der kompensatorischen Glykolyse. Die vorgelegten Ergebnisse zum metabolischen Phänotyp peripherer CD4⁺ T-Zellen augengesunder Tiere und die Veränderungen im Krankheitsbild der ERU sind von großem Interesse und weisen Forschern in der Zukunft die Richtung für weitere vielversprechende Experimente.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine hochprävalente immunmedierte Erkrankung bei Pferden, die weltweit und ungeachtet des Alters oder des Geschlechts auftreten kann. Da die Ätiologie der ERU noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, gibt es bis heute keine kausale Therapie und die ERU führt letztendlich zur irreversiblen Erblindung.

Autoreaktive CD4⁺ T-Zellen nehmen die Schlüsselrolle in der Pathogenese der ERU ein. Diese Zellen wandern, nachdem sie durch bisher nicht vollständig geklärte Mechanismen aktiviert wurden, aus der Peripherie über die Blut-Retina-Schranke ins Auge ein, wo sie intraokuläre Autoantigene erkennen und retinale Strukturen zerstören. Zwischen den akuten Inflammationsschüben sind die autoaggressiven CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie zu finden. Für die Umwandlung in eine aktivierte Effektor-T-Zelle, die Migration ins Zielgewebe, die Vermittlung der Entzündung und die Produktion von inflammatorischen Zytokinen brauchen die Immunzellen Energie, die sie durch unterschiedlich aktive Stoffwechselwege gewinnen. Die Aktivität der verschiedenen Stoffwechselwege der Immunzellen im Zusammenhang mit Erkrankungen wird im wachsenden Feld des Immunmetabolismus erforscht. Doch obwohl dem Immunmetabolismus eine Schlüsselrolle bei autoimmunen Erkrankungen zugesprochen wird, wurden Immunzellen von Pferden, die an ERU erkrankt sind, bis heute nicht auf ihre metabolischen Eigenschaften hin untersucht. Auch fehlen bislang Daten zum Immunmetabolismus augengesunder Pferde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den metabolischen Phänotyp peripherer Immunzellen und speziell von peripheren CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden zu charakterisieren. Dadurch sollten mögliche Unterschiede identifiziert werden, die die erhöhte Aktivität und Autoreaktivität der CD4⁺ T-Zellen von an ERU erkrankten Tieren erklären könnten und eine Möglichkeit bieten, die autoaggressiven Zellen allein durch ihren veränderten Stoffwechsel bereits in der Peripherie zu unterscheiden.

Durch die Analyse des Zellstoffwechsels in Echtzeit wurde zum ersten Mal ein veränderter metabolischer Phänotyp von Immunzellen von an ERU erkrankten Tieren nachgewiesen. Die Untersuchung der PBMC zeigte eine in Ruhe gesteigerte Sauerstoffverbrauchsrate und eine erhöhte glykolytische Aktivität in der ERU im Vergleich zu augengesunden Pferden. Eine genauere Betrachtung isolierter CD4⁺

T-Zellen ergab ebenso eine im basalen Zustand erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate bei Zellen, die aus ERU-Tieren isoliert wurden, was auf eine gesteigerte Aktivität der oxidativen Phosphorylierung dieser Zellen in der ERU schließen lässt. Eine Erhöhung dieses Parameters durch eine schlicht größere Anzahl an Mitochondrien konnte durch eine Western Blot Analyse und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen ausgeschlossen werden. Außerdem zeigten CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren eine verminderte ATP-verknüpfte Atmung und weniger glykolytische Aktivität in Ruhe als CD4⁺ T-Zellen von augengesunden Pferden. CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren verwendeten mehr Sauerstoff für nicht-mitochondriale Prozesse und erhöhten als Reaktion auf eine gehemmte Atmungskette ihre kompensatorische Glykolyse im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen von augengesunden Kontrolltieren in signifikant stärkerem Ausmaß.

Zusammengefasst wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal der metabolische Phänotyp peripherer CD4⁺ T-Zellen von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden untersucht und ein in mehreren Parametern veränderter metabolischer Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen von ERU-Tieren nachgewiesen. Inwieweit dieser bei der autoaggressiven Reaktion der Zellen von Nutzen ist, beispielsweise bei der Migration über die Blut-Retina-Schranke oder bei der Produktion inflammatorischer Zytokine, muss nun in weiteren funktionellen Studien analysiert werden.

6 SUMMARY

Equine recurrent uveitis (ERU) is a highly prevalent immune mediated disease in horses, which can occur worldwide and is unaffected by age or sex. Due to the fact that the etiology of ERU is still not fully elucidated, no causal therapy is available to date and ERU eventually leads to irreversible blindness.

Autoreactive CD4⁺ T cells play the key role in the pathogenesis of ERU. After being activated by mechanism which are not yet fully understood, these cells migrate from the periphery across the blood-retinal barrier into the eye, where they recognize intraocular autoantigens and destroy retinal structures. Between acute inflammatory episodes, the autoaggressive CD4⁺ T cells are found in the periphery. For their transformation to an activated effector T cell, the migration into target tissue, the mediation of inflammation and the production of inflammatory cytokines, immune cells need energy, which they generate through metabolic pathways of different activity. These different activities in context with diseases is investigated in the growing field of immunometabolism. Although the immunometabolism is thought to play a key role in autoimmune diseases, the metabolic features of immune cells of horses affected by ERU were not yet studied. Furthermore, data regarding the immunometabolism of eye-healthy horses is also lacking.

Therefore, the goal of the present study was to characterize the metabolic phenotype of peripheral immune cells and specifically of peripheral CD4⁺ T cells of eye-healthy horses and horses affected by ERU. Identifying possible differences could help explaining the upregulated activity and autoreactivity of CD4⁺ T cells in horses affected by ERU and could further allow to differentiate autoaggressive cells in the periphery, only by their aberrant metabolism.

By analyzing the metabolism of the cells in real-time, an aberrant metabolic phenotype of immune cells of horses affected by ERU could be demonstrated. PBMC of ERU horses showed both an upregulated oxygen consumption rate and an upregulated glycolytic activity in basal state, compared to eye-healthy horses. A closer look at isolated CD4⁺ T cells revealed a basal upregulated oxygen consumption rate of cells isolated from ERU horses, which indicates an upregulated oxidative phosphorylation of these cells in ERU. An increase of this parameter due to a simply larger number of mitochondria could be excluded through western blots and fluorescence microscopy. Moreover, CD4⁺ T cells of ERU cases showed lower

ATP-linked respiration and lower glycolytic activity in basal state than CD4⁺ T cells of eye-healthy horses. CD4⁺ T cells of horses affected by ERU used more oxygen on non-mitochondrial processes and upregulated their compensatory glycolysis rate as reaction to an inhibited respiratory chain to a significantly higher extent than CD4⁺ T cells of eye-healthy horses.

Taken together, the present study investigated for the first time the metabolic phenotype of CD4⁺ T cells of eye-healthy horses and horses affected by ERU and could show an altered metabolic phenotype of CD4⁺ T cells of ERU cases by several parameters. How this altered metabolic phenotype is of use for the autoaggressive reaction of these cells, for example the migration across the blood-retinal barrier or the production of inflammatory cytokines, has to be evaluated in future functional studies.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- 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. *Front Immunol* 9(1973), 1-11. doi: 10.3389/fimmu.2018.01973.
- Amadi-Obi, A., Yu, C.R., Liu, X., Mahdi, R.M., Clarke, G.L., Nussenblatt, R.B., et al. (2007). TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13(6), 711-718. doi: 10.1038/nm1585.
- Angiari, S., Runtsch, M.C., Sutton, C.E., Palsson-McDermott, E.M., Kelly, B., Rana, N., et al. (2020). Pharmacological Activation of Pyruvate Kinase M2 Inhibits CD4(+) T Cell Pathogenicity and Suppresses Autoimmunity. *Cell Metab* 31(2), 391-405. doi: 10.1016/j.cmet.2019.10.015.
- Awwad, S., Mohamed Ahmed, A.H.A., Sharma, G., Heng, J.S., Khaw, P.T., Brocchini, S., et al. (2017). Principles of pharmacology in the eye. *Br J Pharmacol* 174(23), 4205-4223. doi: 10.1111/bph.14024.
- Bantug, G.R., Galluzzi, L., Kroemer, G., and Hess, C. (2018). The spectrum of T cell metabolism in health and disease. *Nat Rev Immunol* 18(1), 19-34. doi: 10.1038/nri.2017.99.
- Barisani-Asenbauer, T., Maca, S.M., Mejdoubi, L., Emminger, W., Machold, K., and Auer, H. (2012). Uveitis- a rare disease often associated with systemic diseases and infections- a systematic review of 2619 patients. *Orphanet J Rare Dis* 7(57), 1-7. doi: 10.1186/1750-1172-7-57.
- Bergmann, B.C., Horning, M.A., Casazza, G.A., Wolfel, E.E., Butterfield, G.E., and Brooks, G.A. (2000). Endurance training increases gluconeogenesis during rest and exercise in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(2), 244-251. doi: 10.1152/ajpendo.2000.278.2.E244. .
- Boehm, T., and Swann, J.B. (2014). Origin and evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Anim Biosci* 2, 259-283. doi: 10.1146/annurev-animal-022513-114201.
- Brandes, K., Wollanke, B., Niedermaier, G., Brem, S., and H., G. (2007). Recurrent Uveitis in Horses: Vitreal Examinations with Ultrastructural Detection of Leptospire. *J. Vet. Med.* 54(5), 270-275. doi: 10.1111/j.1439-0442.2007.00921.x.
- Brooks, G.A. (2018). The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab* 27(4), 757-785. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.008.
- Buck, M.D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R.I., Curtis, J.D., Chang, C.H., Sanin, D.E., et al. (2016). Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell* 166(1), 63-76. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.035.
- Buck, M.D., Sowell, R.T., Kaech, S.M., and Pearce, E.L. (2017). Metabolic Instruction of Immunity. *Cell* 169(4), 570-586. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.004.
- Busch, M., Wefelmeyer, K.L., Walscheid, K., Rothaus, K., Bauer, D., Deeg, C.A., et al. (2019). Identification of Ocular Autoantigens Associated With Juvenile Idiopathic Arthritis-Associated Uveitis. *Front Immunol* 10(1793), 1-12. doi: 10.3389/fimmu.2019.01793.
- Caspi, R.R. (2006). Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev* 213, 23-35. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00439.x. .
- Caspi, R.R., Chan, C.C., Fujino, Y., Najafian, F., Grover, S., Hansen, C.T., et al. (1993). Recruitment of antigen-nonspecific cells plays a pivotal role in the

- pathogenesis of a T cell-mediated organ-specific autoimmune disease, experimental autoimmune uveoretinitis. *J Neuroimmunol* 47(2), 177-188. doi: 10.1016/0165-5728(93)90028-w.
- Caspi, R.R., Roberge, F.G., Chan, C.C., Wiggert, B., Chader, G.J., Rozenszajn, L.A., et al. (1988). A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 140(5), 1490-1495.
- Caspi, R.R., Roberge, F.G., McAllister, C.G., el-Saied, M., Kuwabara, T., Gery, I., et al. (1986). T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J Immunol* 136(3), 928-933.
- Chan, D.C. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 46, 265-287. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132529.
- Chan, L.S., Vanderlugt, C.J., Hashimoto, T., Nishikawa, T., Zone, J.J., Black, M.M., et al. (1998). Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol* 110(2), 103-109. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00107.x.
- Chang, C.H., Curtis, J.D., Maggi Jr, L.B., Faubert, B., Villarino, A.V., O'Sullivan, D., et al. (2013). Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 153(6), 1239-1251. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.016.
- 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), 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0072161
- Chen, W., and Guéron, M. (1992). The inhibition of bovine heart hexokinase by 2 deoxy-D glucose-6 phosphate: characterization by ³¹P NMR and metabolic implications. *Biochimie* 74(9-10), 867-873. doi: 10.1016/0300-9084(92)90070-u.
- Chen, Y.H., Eskandarpour, M., Gondrand, A., Zhang, X., Gu, R., Galatowicz, G., et al. (2020). Functionally Distinct IFN γ (+) IL-17A(+) Th cells in experimental autoimmune uveitis: T cell heterogeneity, migration and steroid response. *Eur J Immunol* 50(12), 1941-1951. doi: 10.1002/eji.202048616.
- Chen, Z., Zhang, T., Kam, H.T., Qiao, D., Jin, W., Zhong, Y., et al. (2021). Induction of antigen-specific Treg cells in treating autoimmune uveitis via bystander suppressive pathways without compromising anti-tumor immunity. *EBioMedicine* 70(103496), 1-12. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103496.
- Clarke, S.L., Sen, E.S., and Ramanan, A.V. (2016). Juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. *Pediatr Rheumatol Online J* 14(1), 27. doi: 10.1186/s12969-016-0088-2.
- Clayton, S.A., MacDonald, L., Kurowska-Stolarska, M., and Clark, A.R. (2021). Mitochondria as Key Players in the Pathogenesis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 12(673916), 1-26. doi: 10.3389/fimmu.2021.673916.
- Covarrubias, A.J., Perrone, R., Grozio, A., and Verdin, E. (2021). NAD(+) metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(2), 119-141. doi: 10.1038/s41580-020-00313-x.
- Crispin, J.C., Kyttaris, V.C., Terhorst, C., and Tsokos, G.C. (2010). T cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 6(6), 317-325. doi: 10.1038/nrrheum.2010.60.
- Curto, E., Messenger, K.M., Salmon, J.H., and Gilger, B.C. (2016). Cytokine and chemokine profiles of aqueous humor and serum in horses with uveitis

- measured using multiplex bead immunoassay analysis. *Vet Immunol Immunopathol* 182, 43-51. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.09.008.
- Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., et al. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 146(5), 772-784. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.033.
- de Smet, M.D., Yamamoto, K., Mochizuki, M., Gery, I., Singh, H., Shinohara, T., et al. (1990). Cellular Immune Responses of Patients with Uveitis to Retinal Antigens and Their Fragments. *Am J Ophthalmol* 110(2), 135-142. doi: 10.1016/S0002-9394(14)76981-8.
- Deeg, C.A. (2008). Ocular immunology in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 11, 61-65. doi: 10.1111/j.1463-5224.2008.00625.x.
- Deeg, C.A., Amann, B., Raith, A.J., and Kaspers, B. (2006a). Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(2), 652-656. doi: 10.1167/iovs.05-0789.
- Deeg, C.A., Ehrenhofer, M., Thurau, S.R., Reese, S., Wildner, G., and Kaspers, B. (2002a). Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* 75(2), 127-133. doi: 10.1006/exer.2002.2011.
- Deeg, C.A., Kaspers, B., Gerhards, H., Thurau, S.R., Wollanke, B., and Wildner, G. (2001). Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(2), 393-398.
- Deeg, C.A., Marti, E., Gaillard, C., and Kaspers, B. (2004a). Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9. *Equine Vet J* 36(1), 73-75. doi: 10.2746/0425164044864651.
- Deeg, C.A., Pompetzki, D., Raith, A.J., Hauck, S.M., Amann, B., Suppmann, S., et al. (2006b). Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 5(8), 1462-1470. doi: 10.1074/mcp.M500352-MCP200.
- Deeg, C.A., Raith, A.J., Amann, B., Crabb, J.W., Thurau, S.R., Hauck, S.M., et al. (2007). CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol* 2007(39245), 1-6. doi: 10.1155/2007/39245.
- Deeg, C.A., Reese, S., Gerhards, H., Wildner, G., and Kaspers, B. (2004b). The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(7), 2286-2292. doi: 10.1167/iovs.03-1226.
- Deeg, C.A., Thurau, S.R., Gerhards, H., Ehrenhofer, M., Wildner, G., and Kaspers, B. (2002b). Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* 32(9), 2598-2606. doi: 10.1002/1521-4141(200209)32:9<2598::Aid-immu2598>3.0.Co;2-#.
- Degroote, R.L., and Deeg, C.A. (2021). Immunological Insights in Equine Recurrent Uveitis. *Frontiers in Immunology* 11(609855), 1-9. doi: 10.3389/fimmu.2020.609855.
- 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), 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0091684.
- Degroote, R.L., Hauck, S.M., Kremmer, E., Amann, B., Ueffing, M., and Deeg, C.A. (2012). Altered expression of talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics* 75(14), 4536-4544. doi: 10.1016/j.jprot.2012.01.023.

- Degroote, R.L., Hauck, S.M., Treutlein, G., Amann, B., Frohlich, K.J., Kremmer, E., et al. (2013). Expression changes and novel interaction partners of talin 1 in effector cells of autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 12(12), 5812–5819. doi: 10.1021/pr400837f.
- Degroote, R.L., Uhl, P.B., Amann, B., Krackhardt, A.M., Ueffing, M., Hauck, S.M., et al. (2017). Formin like 1 expression is increased on CD4+ T lymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics* 154, 102-108. doi: 10.1016/j.jprot.2016.12.015.
- Dick, A.D., Tundia, N., Sorg, R., Zhao, C., Chao, J., Joshi, A., et al. (2016). Risk of Ocular Complications in Patients with Noninfectious Intermediate Uveitis, Posterior Uveitis, or Panuveitis. *Ophthalmology* 123(3), 655-662. doi: 10.1016/j.ophtha.2015.10.028.
- Didona, D., and Di Zenzo, G. (2018). Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. *Front Immunol* 9(779), 1-27. doi: 10.3389/fimmu.2018.00779.
- Diedrichs-Möhring, M., Kaufmann, U., and Wildner, G. (2018). The immunopathogenesis of chronic and relapsing autoimmune uveitis - Lessons from experimental rat models. *Prog Retin Eye Res* 65, 107-126. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.02.003.
- Domblides, C., Lartigue, L., and Faustin, B. (2018). Metabolic Stress in the Immune Function of T Cells, Macrophages and Dendritic Cells. *Cells* 7(7), 1-20. doi: 10.3390/cells7070068.
- Durrani, O.M., Meads, C.A., and Murray, P.I. (2004). Uveitis: A Potentially Blinding Disease. *Ophthalmologica* 218(4), 223-236. doi: 10.1159/000078612.
- Egwuagu, C.E., Alhakeem, S.A., and Mbanefo, E.C. (2021). Uveitis: Molecular Pathogenesis and Emerging Therapies. *Front Immunol* 12(623725), 1-11. doi: 10.3389/fimmu.2021.623725.
- EITanbouly, M.A., and Noelle, R.J. (2021). Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nat Rev Immunol* 21(4), 257-267. doi: 10.1038/s41577-020-00454-2.
- Espinosa, J.A., Pohan, G., Arkin, M.R., and Markossian, S. (2021). Real-Time Assessment of Mitochondrial Toxicity in HepG2 Cells Using the Seahorse Extracellular Flux Analyzer. *Curr Protoc* 1(3), e75-94. doi: 10.1002/cpz1.75.
- Farmer, T., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2018). Tying trafficking to fusion and fission at the mighty mitochondria. *Traffic* 19(8), 569-577. doi: 10.1111/tra.12573.
- Fingerhut, L., Ohnesorge, B., von Borstel, M., Schumski, A., Strutzberg-Minder, K., Mörgelin, M., et al. (2019). Neutrophil Extracellular Traps in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis (ERU). *Cells* 8(12), 1528-1551. doi: 10.3390/cells8121528.
- Fischer, B.M., McMullen Jr, R.J., 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 Vet Res* 15(1), 29-40. doi: 10.1186/s12917-018-1722-7.
- Flores, M.M., Del Piero, F., Habecker, P.L., and Langohr, I.M. (2020). A retrospective histologic study of 140 cases of clinically significant equine ocular disorders. *J Vet Diagn Invest* 32(3), 382-388. doi: 10.1177/1040638720912698.

- Freitag, J., Berod, L., Kamradt, T., and Sparwasser, T. (2016). Immunometabolism and autoimmunity. *Immunol Cell Biol* 94(10), 925-934. doi: 10.1038/icb.2016.77.
- Fu, X., Chen, Y., and Chen, D. (2020). The Role of Gut Microbiome in Autoimmune Uveitis. *Ophthalmic Res* 64(2), 168-177. doi: 10.1159/000510212.
- Gaber, T., Chen, Y., Krauss, P.L., and Buttgereit, F. (2019). Metabolism of T Lymphocytes in Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 342, 95-148. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.06.002.
- Gerding, J.C., and Gilger, B.C. (2016). Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. *Equine Vet J* 48(3), 290-298. doi: 10.1111/evj.12451.
- Gery, I., and Caspi, R.R. (2018). Tolerance Induction in Relation to the Eye. *Front Immunol* 9(2304), 1-8. doi: 10.3389/fimmu.2018.02304.
- Giese, I.M., Schilloks, M.C., Degroote, R.L., Weigand, M., Renner, S., Wolf, E., et al. (2021). Chronic Hyperglycemia Drives Functional Impairment of Lymphocytes in Diabetic INS (C94Y) Transgenic Pigs. *Front Immunol* 11(607473), 1-11. doi: 10.3389/fimmu.2020.607473.
- Gilbert, R.M., Zhang, X., Sampson, R.D., Ehrenstein, M.R., Nguyen, D.X., Chaudhry, M., et al. (2018). Clinical Remission of Sight-Threatening Non-Infectious Uveitis Is Characterized by an Upregulation of Peripheral T-Regulatory Cell Polarized Towards T-bet and TIGIT. *Front Immunol* 9(907), 1-19. doi: 10.3389/fimmu.2018.00907.
- Gilger, B.C. (2010). Equine recurrent uveitis: The viewpoint from the USA. *Equine Vet J* 42(S37), 57-61. doi: 10.1111/042516409X090002.
- Gilger, B.C., Malok, E., Cutter, K.V., Stewart, T., Horohov, D.W., and Allen, J.B. (1999). Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* 71(1), 17-28. doi: 10.1016/s0165-2427(99)00082-3.
- Gilger, B.C., Salmon, J.H., Wilkie, D.A., Cruysberg, L.P., Kim, J., Hayat, M., et al. (2006). A novel bioerodible deep scleral lamellar cyclosporine implant for uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(6), 2596-2605. doi: 10.1167/iov.05-1540.
- Gilger, B.C., Wilkie, D.A., Clode, A.B., McMullen Jr, R.J., Utter, M.E., Komaromy, A.M., et al. (2010). Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 13(5), 294-300. doi: 10.1111/j.1463-5224.2010.00807.x
- Hashimoto, T., Hussien, R., Oommen, S., Gohil, K., and Brooks, G.A. (2007). Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J* 21(10), 2602-2612. doi: 10.1096/fj.07-8174com.
- Hauck, S.M., Lepper, M.F., Hertl, M., Sekundo, W., and Deeg, C.A. (2017). Proteome Dynamics in Biobanked Horse Peripheral Blood Derived Lymphocytes (PBL) with Induced Autoimmune Uveitis. *Proteomics* 17(19), 1-5. doi: 10.1002/pmic.201700013.
- Hoel, A., Osman, T., Hoel, F., Elsaid, H., Chen, T., Landolt, L., et al. (2021). Axl-inhibitor bemcentinib alleviates mitochondrial dysfunction in the unilateral ureter obstruction murine model. *J Cell Mol Med* 25(15), 7407-7417. doi: 10.1111/jcmm.16769.
- Horai, R., Silver, P.B., Chen, J., Agarwal, R.K., Chong, W.P., Jittayasothorn, Y., et al. (2013). Breakdown of immune privilege and spontaneous autoimmunity in

- mice expressing a transgenic T cell receptor specific for a retinal autoantigen. *J Autoimmun* 44, 21-33. doi: 10.1016/j.jaut.2013.06.003.
- Hori, J., Wang, M., Miyashita, M., Tanemoto, K., Takahashi, H., Takemori, T., et al. (2006). B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J Immunol* 177(9), 5928-5935. doi: 10.4049/jimmunol.177.9.5928.
- Hori, J., Yamaguchi, T., Keino, H., Hamrah, P., and Maruyama, K. (2019). Immune privilege in corneal transplantation. *Prog Retin Eye Res* 72(100758), 1-32. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.04.002.
- Jha, P., Sohn, J.H., Xu, Q., Wang, Y., Kaplan, H.J., Bora, P.S., et al. (2006). Suppression of complement regulatory proteins (CRPs) exacerbates experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). *J Immunol* 176(12), 7221-7231. doi: 10.4049/jimmunol.176.12.7221.
- Kalinina Ayuso, V., Makhotkina, N., van Tent-Hoeve, M., de Groot-Mijnes, J.D., Wulffraat, N.M., Rothova, A., et al. (2014). Pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis associated uveitis: the known and unknown. *Surv Ophthalmol* 59(5), 517-531. doi: 10.1016/j.survophthal.2014.03.002.
- Kang, M., Lee, H.S., Choi, J.K., Yu, C.R., and Egwuagu, C.E. (2021). Deletion of *Irf4* in T Cells Suppressed Autoimmune Uveitis and Dysregulated Transcriptional Programs Linked to CD4(+) T Cell Differentiation and Metabolism. *Int J Mol Sci* 22(5), 1-15. doi: 10.3390/ijms22052775.
- Karagianni, A.E., Lisowski, Z.M., Hume, D.A., and Scott Pirie, R. (2020). The equine mononuclear phagocyte system: The relevance of the horse as a model for understanding human innate immunity. *Equine Vet J* 53(2), 231-249. doi: 10.1111/evj.13341.
- Kaufmann, U., Diedrichs-Möhring, M., and Wildner, G. (2012). Dynamics of intraocular IFN-gamma, IL-17 and IL-10-producing cell populations during relapsing and monophasic rat experimental autoimmune uveitis. *PLoS One* 7(11), 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0049008.
- Keating, S.E., Zaiatz-Bittencourt, V., Loftus, R.M., Keane, C., Brennan, K., Finlay, D.K., et al. (2016). Metabolic Reprogramming Supports IFN-gamma Production by CD56bright NK Cells. *J Immunol* 196(6), 2552-2560. doi: 10.4049/jimmunol.1501783.
- Klein Geltink, R.I., Kyle, R.L., and Pearce, E.L. (2018). Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annu Rev Immunol* 36, 461-488. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053019.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9(12), 833-844. doi: 10.1038/nri2669.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L., and Dang, C.V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11(5), 325-337. doi: 10.1038/nrc3038.
- 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), 1-6. doi: 10.1371/journal.pone.0071619.
- Kunishige, T., Taniguchi, H., Terada, M., Akiba, H., Yagita, H., Abe, R., et al. (2016). Protective Role of ICOS and ICOS Ligand in Corneal Transplantation and in Maintenance of Immune Privilege. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(15), 6815-6823. doi: 10.1167/iovs.16-20644.

- Li, Y., Shen, Y., Jin, K., Wen, Z., Cao, W., Wu, B., et al. (2019). The DNA Repair Nuclease MRE11A Functions as a Mitochondrial Protector and Prevents T Cell Pyroptosis and Tissue Inflammation. *Cell Metab* 30(3), 477-492. doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.016.
- Lindsey, A.E., and Townes-Anderson, E. (2018). Antibiotics Reduce Retinal Cell Survival In Vitro. *Neurotox Res* 33(4), 781-789. doi: 10.1007/s12640-017-9826-6.
- Liu, Y.H., Molzer, C., Makinen, K., Kamoi, K., Corbett, C.L.C., Klaska, I.P., et al. (2020). Treatment With FoxP3+ Antigen-Experienced T Regulatory Cells Arrests Progressive Retinal Damage in a Spontaneous Model of Uveitis. *Front Immunol* 11(2071), 1-17. doi: 10.3389/fimmu.2020.02071.
- Lohoff, M., Mittrücker, H.-W., Prechtel, S., Bischof, S., Sommer, F., Kock, S., et al. (2002). Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18), 11808-11812. doi: 10.1073/pnas.182425099.
- Lorenz, L., Amann, B., Hirmer, S., Degroote, R.L., Hauck, S.M., and Deeg, C.A. (2021). NEU1 is more abundant in uveitic retina with concomitant desialylation of retinal cells. *Glycobiology* 31(7), 873-883. doi: 10.1093/glycob/cwab014.
- Macintyre, A.N., Gerriets, V.A., Nichols, A.G., Michalek, R.D., Rudolph, M.C., Deoliveira, D., et al. (2014). The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab* 20(1), 61-72. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.004.
- Malalana, F., Stylianides, A., and McGowan, C. (2015). Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives. *Vet J* 206(1), 22-29. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.06.017.
- Man, K., Miasari, M., Shi, W., Xin, A., Henstridge, D.C., Preston, S., et al. (2013). The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat Immunol* 14(11), 1155-1165. doi: 10.1038/ni.2710.
- Martin de Bustamante, M., Gomez, D., MacNicol, J., Hamor, R., and Plummer, C. (2021). The Fecal Bacterial Microbiota in Horses with Equine Recurrent Uveitis. *Animals (Basel)* 11(3), 1-16. doi: 10.3390/ani11030745.
- Martinez-Reyes, I., and Chandel, N.S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun* 11(1), 1-11. doi: 10.1038/s41467-019-13668-3.
- McDonald, G., Deepak, S., Miguel, L., Hall, C.J., Isenberg, D.A., Magee, A.I., et al. (2014). Normalizing glycosphingolipids restores function in CD4+ T cells from lupus patients. *J Clin Invest* 124(2), 712-724. doi: 10.1172/JCI69571.
- McMullen Jr, R.J., and Fischer, B.M. (2017). Medical and Surgical Management of Equine Recurrent Uveitis. *Vet Clin Equine* 33(3), 465-481. doi: 10.1016/j.cveq.2017.07.003.
- McPherson, S.W., Heuss, N.D., and Gregerson, D.S. (2009). Lymphopenia-induced Proliferation is a Potent Activator for CD4+ T Cell Mediated Autoimmune Disease in the Retina. *J Immunol* 182(2), 969-979. doi: 10.4049/jimmunol.182.2.969.
- McPherson, S.W., Heuss, N.D., Pierson, M.J., and Gregerson, D.S. (2014). Retinal antigen-specific regulatory T cells protect against spontaneous and induced autoimmunity and require local dendritic cells. *J Neuroinflamm* 11(205), 1-14. doi: 10.1186/s12974-014-0205-4.

- 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. *Br J Exp Pathol* 29(1), 58-69.
- Miles, E.A., and Calder, P.C. (2021). Effects of Citrus Fruit Juices and Their Bioactive Components on Inflammation and Immunity: A Narrative Review. *Front Immunol* 12(712608), 1-18. doi: 10.3389/fimmu.2021.712608.
- Miller, A., Nagy, C., Knapp, B., Laengle, J., Ponweiser, E., Groeger, M., et al. (2017). Exploring Metabolic Configurations of Single Cells within Complex Tissue Microenvironments. *Cell Metab* 26(5), 788-780. doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.014.
- Mochizuki, M., Kuwabara, T., McAllister, C., Nussenblatt, R.B., and Gery, I. (1985). Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(1), 1-9.
- Mochizuki, M., Sugita, S., and Kamoi, K. (2013). Immunological homeostasis of the eye. *Prog Retin Eye Res* 33, 10-27. doi: 10.1016/j.preteyeres.2012.10.002.
- Muhammad, F., Avalos, P.N., Mursalin, M.H., Ma, J.X., Callegan, M.C., and Lee, D.J. (2020). Kallistatin Attenuates Experimental Autoimmune Uveitis by Inhibiting Activation of T Cells. *Front Immunol* 11(975), 1-10. doi: 10.3389/fimmu.2020.00975.
- Muri, J., and Kopf, M. (2021). Redox regulation of immunometabolism. *Nat Rev Immunol* 21(6), 363-381. doi: 10.1038/s41577-020-00478-8.
- Nakamura, Y.K., Metea, C., Karstens, L., Asquith, M., Gruner, H., Moscibrocki, C., et al. (2016). Gut Microbial Alterations Associated With Protection From Autoimmune Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(8), 3747-3758. doi: 10.1167/iovs.16-19733.
- Neutzner, R.V., Jager, M., Friedburg, C., Deeg, C.A., and Lorenz, B. (2011). [Blind spot enlargement syndrome in acute zonal occult outer retinopathy with detection of autoantibodies against the retinal antigens CRALBP and S-Ag]. *Ophthalmologe* 108(11), 1045-1049. doi: 10.1007/s00347-011-2406-x.
- Nowling, T.K., Mather, A.R., Thiyagarajan, T., Hernandez-Corbacho, M.J., Powers, T.W., Jones, E.E., et al. (2015). Renal glycosphingolipid metabolism is dysfunctional in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 26(6), 1402-1413. doi: 10.1681/ASN.2014050508.
- Orang, A.V., Petersen, J., McKinnon, R.A., and Michael, M.Z. (2019). Micromanaging aerobic respiration and glycolysis in cancer cells. *Mol Metab* 23, 98-126. doi: 10.1016/j.molmet.2019.01.014.
- Palestine, A.G., McAllister, C., Carter, C., Keenan, A.M., Vistica, B., Gery, I., et al. (1986). Lymphocyte migration in the adoptive transfer of EAU. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27(4), 611-615.
- Palmer, C.S., Ostrowski, M., Balderson, B., Christian, N., and Crowe, S.M. (2015). Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. *Front Immunol* 6(1), 1-6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00001.
- Pålsson-McDermott, E.M., and O'Neill, L.A.J. (2020). Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. *Cell Research* 30(4), 300-314. doi: 10.1038/s41422-020-0291-z.
- Paschalis-Trela, K., Cywińska, 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), 319-326. doi: 10.1186/s12917-017-1252-8.

- Patel, R.S., Tomlinson, J.E., Divers, T.J., Van de Walle, G.R., and Rosenberg, B.R. (2021). Single-cell resolution landscape of equine peripheral blood mononuclear cells reveals diverse cell types including T-bet(+) B cells. *BMC Biol* 19(1), 1-18. doi: 10.1186/s12915-020-00947-5.
- Plummer, C.E. (2017). Corneal Response to Injury and Infection in the Horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* 33(3), 439-463. doi: 10.1016/j.cveq.2017.07.002.
- Prete, M., Dammacco, R., Fatone, M.C., and Racanelli, V. (2016). Autoimmune uveitis: clinical, pathogenetic, and therapeutic features. *Clin Exp Med* 16(2), 125-136. doi: 10.1007/s10238-015-0345-6.
- Prete, M., Guerriero, S., Dammacco, R., Fatone, M.C., Vacca, A., Dammacco, F., et al. (2014). Autoimmune uveitis: a retrospective analysis of 104 patients from a tertiary reference center. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 4, 1-12. doi: 10.1186/s12348-014-0017-9
- Qiu, J., Wu, B., Goodman, S.B., Berry, G.J., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2021). Metabolic Control of Autoimmunity and Tissue Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 12(652771), 1-17. doi: 10.3389/fimmu.2021.652771.
- Quinn, K.M., Palchaudhuri, R., Palmer, C.S., and La Gruta, N.L. (2019). The clock is ticking: the impact of ageing on T cell metabolism. *Clin Transl Immunology* 8(11), 1-18. doi: 10.1002/cti2.1091.
- Regan, D.P., Aarnio, M.C., Davis, W.S., Carmichael, K.P., Vandenplas, M.L., Lauderdale, J.D., et al. (2012). Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 15(3), 145-152. doi: 10.1111/j.1463-5224.2011.00951.x.
- Rohrbach, B.W., Ward, D.A., Hendrix, D.V.H., Cawrse-Foss, M., and Moyers, T.D. (2005). Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 8(3), 171-179. doi: 10.1111/j.1463-5224.2005.00367.x
- Romeike, A., Brüggmann, M., and Drommer, W. (1998). Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol* 35(6), 515-526. doi: 10.1177/030098589803500606.
- Rosenbaum, J.T., Bodaghi, B., Couto, C., Zierhut, M., Acharya, N., Pavesio, C., et al. (2019). New observations and emerging ideas in diagnosis and management of non-infectious uveitis: A review. *Semin Arthritis Rheum* 49(3), 438-445. doi: 10.1016/j.semarthrit.2019.06.004.
- Sakaguchi, S., and Sakaguchi, N. (2005). Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 24(3-4), 211-226. doi: 10.1080/08830180590934976.
- Saldinger, L.K., Nelson, S.G., Bellone, R.R., Lassaline, M., Mack, M., Walker, N.J., et al. (2019). Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells in vitro. *Vet Ophthalmol* 23(1), 160-170. doi: 10.1111/vop.12704.
- Sandmeyer, L.S., Kingsley, N.B., Walder, C., Archer, S., Leis, M.L., Bellone, R.R., et al. (2020). Risk factors for equine recurrent uveitis in a population of Appaloosa horses in western Canada. *Vet Ophthalmol* 23(3), 515-525. doi: 10.1111/vop.12749.
- Sano, Y., Matsuda, K., Okamoto, M., Takehana, K., Hirayama, K., and Taniyama, H. (2016). Distribution of CD163-positive cell and MHC class II-positive cell

- in the normal equine uveal tract. *J Vet Med Sci* 78(2), 287-291. doi: 10.1292/jvms.15-0406.
- Saraswathy, S., and Rao, N.A. (2009). Mitochondrial proteomics in experimental autoimmune uveitis oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(12), 5559-5566. doi: 10.1167/iovs.08-2842.
- Saraswathy, S., and Rao, N.A. (2011). Posttranslational modification of differentially expressed mitochondrial proteins in the retina during early experimental autoimmune uveitis. *Mol Vis* 17, 1814-1821.
- Schauer, M., Kleinwort, K.J.H., Degroote, R.L., Wiedemann, C., Kremmer, E., Hauck, S.M., et al. (2018). Interaction of septin 7 and DOCK8 in equine lymphocytes reveals novel insights into signaling pathways associated with autoimmunity. *Sci Rep* 8(1), 1-11. doi: 10.1038/s41598-018-30753-7.
- Shi, L.Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D.R., et al. (2011). HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med* 208(7), 1367-1376. doi: 10.1084/jem.20110278.
- Silver, P.B., Horai, R., Chen, J., Jittayasothorn, Y., Chan, C.C., Villasmil, R., et al. (2015). Retina-specific T regulatory cells bring about resolution and maintain remission of autoimmune uveitis. *J Immunol* 194(7), 3011-3019. doi: 10.4049/jimmunol.1402650.
- Spiess, B.M. (2010). Equine recurrent uveitis: The European viewpoint. *Equine Vet J Suppl* 42(S37), 50-56. doi: 10.1111/042516409X090007.
- Spinelli, J.B., and Haigis, M.C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 20(7), 745-754. doi: 10.1038/s41556-018-0124-1.
- Stathopoulou, C., Nikoleri, D., and Bertias, G. (2019). Immunometabolism: an overview and therapeutic prospects in autoimmune diseases. *Immunotherapy* 11, 813-829. doi: 10.2217/imt-2019-0002.
- Stein-Streilein, J., and Streilein, J.W. (2002). Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int Rev Immunol* 21(2-3), 123-152. doi: 10.1080/08830180212066.
- Streilein, J.W. (2003). Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 3(11), 879-889. doi: 10.1038/nri1224.
- Streilein, J.W., and Niederkorn, J.Y. (2007). Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. 1981. *Ocul Immunol Inflamm* 15(3), 187-194. doi: 10.1080/09273940701382473.
- Swadzba, M.E., Hauck, S.M., Naim, H.Y., Amann, B., and Deeg, C.A. (2012). Retinal glycoprotein enrichment by concanavalin a enabled identification of novel membrane autoantigen synaptotagmin-1 in equine recurrent uveitis. *PLoS One* 7(12), 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0050929.
- Tagirasa, R., Kaza, H., and Basu, S. (2020). Increased local expression of P-glycoprotein on CD4+ T-cells in vitreous of patients with non-infectious uveitis: a pilot study. *Ophthalmic Res*. doi: 10.1159/000512619.
- Takeshima, Y., Iwasaki, Y., Fujio, K., and Yamamoto, K. (2019). Metabolism as a key regulator in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 48(6), 1142-1145. doi: 10.1016/j.semarthrit.2019.04.006.
- Taniguchi, H., Hase, H., Akiba, H., Yagita, H., Azuma, M., and Hori, J. (2017). Role of B7-H3/TLT-2 pathway in immune privilege of corneal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58(8), 5734-5734.

- Taylor, A.W. (2016). Ocular Immune Privilege and Transplantation. *Front Immunol* 7, 37. doi: 10.3389/fimmu.2016.00037.
- Teng, X., Li, W., Cornaby, C., and Morel, L. (2019). Immune cell metabolism in autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 197(2), 181-192. doi: 10.1111/cei.13277.
- Thangadurai, R., Sharma, S., Bali, D., Rana, B.P., Mahajan, V., Samanta, I., et al. (2010). Prevalence of Ocular Disorders in an Indian Population of Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 30(6), 326-329. doi: 10.1016/j.jevs.2010.05.001.
- Thorne, J.E., Skup, M., Tundia, N., Macaulay, D., Revol, C., Chao, J., et al. (2016). Direct and indirect resource use, healthcare costs and work force absence in patients with non-infectious intermediate, posterior or panuveitis. *Acta Ophthalmol* 94(5), e331-e339. doi: 10.1111/aos.12987.
- van der Windt, G.J.W., Chang, C.H., and Pearce, E.L. (2016). Measuring Bioenergetics in T Cells Using a Seahorse Extracellular Flux Analyzer. *Curr Protoc Immunol* 113, 3.16B.11-13.16B.14. doi: 10.1002/0471142735.im0316bs113.
- 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), 1029-1033. doi: 10.1126/science.1160809.
- Ventura, G., Calvano, C.D., Porcelli, V., Palmieri, L., De Giacomo, A., Xu, Y., et al. (2020). Phospholipidomics of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): the tricky case of children with autism spectrum disorder (ASD) and their healthy siblings. *Anal Bioanal Chem* 412(25), 6859-6874. doi: 10.1007/s00216-020-02817-z.
- Verma, A., Kumar, P., Babb, K., Timoney, J.F., and Stevenson, B. (2010). Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. *PLoS Negl Trop Dis* 4(8), 1-9. doi: 10.1371/journal.pntd.0000778.
- Verma, A., and Stevenson, B. (2012). Leptospiral uveitis - there is more to it than meets the eye! *Zoonoses Public Health* 59(S2), 132-141. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01445.x.
- Voelter, K., Vial, Z., Pot, S.A., and Spiess, B.M. (2020). Leptospiral antibody prevalence and surgical treatment outcome in horses with Equine Recurrent Uveitis (ERU) in Switzerland. *Vet Ophthalmol* 23(4), 648-658. doi: 10.1111/vop.12767.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123(3191), 309-314. doi: 10.1126/science.123.3191.309.
- Weber, A., Born, J., and Rodriguez Martínez, M. (2021). TITAN: T-cell receptor specificity prediction with bimodal attention networks. *Bioinformatics* 37(Supplement_1), i237-i244. doi: 10.1093/bioinformatics/btab294.
- Weigand, M., Hauck, S.M., Deeg, C.A., and Degroote, R.L. (2020). Deviant proteome profile of equine granulocytes associates to latent activation status in organ specific autoimmune disease. *J Proteomics* 230, 1-9. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103989.
- Werry, H., and Gerhards, H. (1992). [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax* 20(2), 178-186.
- Wick, A.N., Drury, D.R., Nakada, H.I., Wolfe, J.B., Britton, B., and Grabowski, R. (1957). Localization of the Primary Metabolic Block Produced by 2-Deoxyglucose. *J Biol Chem* 224(2), 963-969. doi: 10.1016/s0021-9258(18)64988-9.

- Wiedemann, C., Amann, B., Degroote, R.L., Witte, T., and Deeg, C.A. (2020). Aberrant Migratory Behavior of Immune Cells in Recurrent Autoimmune Uveitis in Horses. *Front Cell Dev Biol* 8(101), 1-15. doi: 10.3389/fcell.2020.00101.
- Wu, B., Qiu, J., Zhao, T.V., Wang, Y., Maeda, T., Goronzy, I.N., et al. (2020). Succinyl-CoA Ligase Deficiency in Pro-inflammatory and Tissue-Invasive T Cells. *Cell Metab* 32(6), 967-980. doi: 10.1016/j.cmet.2020.10.025.
- Xue, Y., Shen, S.Q., Jui, J., Rupp, A.C., Byrne, L.C., Hattar, S., et al. (2015). CRALBP supports the mammalian retinal visual cycle and cone vision. *J Clin Invest* 125(2), 727-738. doi: 10.1172/JCI79651.
- Yanamoto, J.H., Minami, M., Inaba, G., Masuda, K., and Mochizuki, M. (1993). Cellular autoimmunity to retinal specific antigens in patients with Behçet's disease. *Br J Ophthalmol* 77(9), 584-589. doi: 10.1136/bjo.77.9.584. .
- Yin, Y., Choi, S.C., Xu, Z., Perry, D.J., Seay, H., Croker, B.P., et al. (2015). Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus. *Sci Transl Med* 7(274), 1-20. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0835.
- Yin, Y., Choi, S.C., Xu, Z., Zeumer, L., Kanda, N., Croker, B.P., et al. (2016). Glucose Oxidation Is Critical for CD4+ T Cell Activation in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 196(1), 80-90. doi: 10.4049/jimmunol.1501537.
- Yoshida, M., Kezuka, T., and Streilein, J.W. (2000). Participation of Pigment Epithelium of Iris and Ciliary Body in Ocular Immune Privilege. 2. Generation of TGF- β -Producing Regulatory T Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(12), 3862-3870.
- Zhang, C.X., Wang, H.Y., Yin, L., Mao, Y.Y., and Zhou, W. (2020). Immunometabolism in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Transl Autoimmun* 3(100046), 1-10. doi: 10.1016/j.jtauto.2020.100046.
- Zhang, L., Bell, B.A., Yu, M., Chan, C.C., Peachey, N.S., Fung, J., et al. (2016). Complement anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR are required in the pathogenesis of experimental autoimmune uveitis. *J Leukoc Biol* 99(3), 447-454. doi: 10.1189/jlb.3A0415-157R.
- Zhu, L., Chen, B., and Su, W. (2021). A Review of the Various Roles and Participation Levels of B-Cells in Non-Infectious Uveitis. *Front Immunol* 12(676046), 1-13. doi: 10.3389/fimmu.2021.676046.
- Zipplies, J.K., Hauck, S.M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M., Ueffing, M., et al. (2009). Serum PEDF levels are decreased in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 8(2), 992-998. doi: 10.1021/pr800694y.
- Zipplies, J.K., Kirschfink, M., Amann, B., Hauck, S.M., Stangassinger, M., and Deeg, C.A. (2010). Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model. *Immunobiology* 215(12), 949-955. doi: 10.1016/j.imbio.2010.02.003.
- Zou, W., Wu, Z., Xiang, X., Sun, S., and Zhang, J. (2014). The expression and significance of T helper cell subsets and regulatory T cells CD(4)(+) CD(2)(5)(+) in peripheral blood of patients with human leukocyte antigen B27-positive acute anterior uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 52(4), 665-672. doi: 10.1007/s00417-014-2567-9.

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg, für die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas bedanken. Vielen Dank für die außergewöhnliche Betreuung, die hilfreichen Kommentare und die schnellen Korrekturen. Es ist nicht selbstverständlich, dass die Doktormutter bzw. der Doktorvater zu jeder Zeit erreichbar ist und die Antwort auf eine Frage spätestens am nächsten Tag im E-Mail-Postfach liegt. Ein herzliches Dankeschön auch für die tatkräftige Unterstützung und die aufmunternden Worte während des Revisionprozess.

Herrn Prof. Dr. Lutz Göhring, Herrn Prof. Dr. Hartmut Gerhards und Frau PD Dr. Bettina Wollanke und ihren Mitarbeitern gilt mein Dank für die zuverlässige Entnahme und das Überlassen der in dieser Arbeit verwendeten Blutproben.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Tanja Witte, Frau Dr. Kirsten Hahn und Claudia Julius-Wilhelm bedanken, die mir bei den Institutsperden zu jeder Zeit eine Blutentnahme ermöglicht haben, auch wenn es manchmal sehr spontan war.

Vielen Dank auch an die ehemaligen und aktuellen TAs Bärbl Amann, Claudia Guggenmoos, Florian Gosselin, Lydia Hoffmann, Sieglinde Hirmer und Steffi Püls. Egal ob ich eine Frage hatte, die Bitte ob Ihr mir einen Puffer anmachen könnt oder Eure Hilfe für einen spontan Blot gebraucht habe, Ihr wart immer zur Stelle. Ein ganz großes Dankeschön gebührt an dieser Stelle Dir, Sieglinde, für Deine Unterstützung und Deine guten Ratschläge - Du bist wirklich eine Laborfee.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen Anne Hoffmann, Dr. Bernhard Hobmeier, Dr. Carmen Wiedemann, Felix Gard, Dr. Franziska Stetter, Dr. Isabella Giese, Lea Lorenz, Lucia Korbonits, Dr. Maria Weigand, Marie Schilloks, Dr. Sandra Sagmeister und den Postdocs Dr. Kristina Kleinwort, Dr. Margarete Swadzba und Dr. Roxane Degroote. Auf Eure Unterstützung im Labor konnte ich immer zählen und egal ob beim gemeinsamen Mittagessen in der Sonne, im Labor, beim Rätseln oder wenn es darum ging den Bus aus dem Schnee zu befreien, Ihr habt dafür gesorgt, dass ich jeden Tag gern zur Arbeit gekommen bin. Und noch ein Extra-Dankeschön an Dich, Lea, dass Du

immer ein offenes Ohr und eine gute Antwort für mich hattest. So tolle Kollegen wie Ihr sind nicht selbstverständlich.

Und schließlich möchte ich meiner Familie danken. Meinen Eltern, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht und mich auch während der Promotionszeit stets unterstützt und motiviert haben. Meiner Schwester danke ich für die ständige Erreichbarkeit, die große Hilfe beim Erstellen der Figures und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Auch meiner Mutter gilt ein herzliches Dankeschön für das Korrekturlesen trotz fachlichen Neulands und die vielen guten Bemerkungen wie „da spielt schon wieder was eine Rolle“.