

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

Charakterisierung metabolischer Veränderungen
von peripheren Blutleukozyten bei der equinen
rezidivierenden Uveitis

von Anne Lotta Caroline Hoffmann
aus Bamberg

München 2023

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

Lehrstuhl für Physiologie

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

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

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

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

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Andreas F. Parzefall

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

Für Max und meine Familie

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	3
2.1	Equine rezidivierende Uveitis	3
2.1.1	Vorkommen und Bedeutung	3
2.1.2	Klinisches Bild, Diagnose und Therapie	3
2.1.3	Immun-Pathogenese der ERU.....	5
2.1.4	Veränderungen der Immunzellen aus dem peripheren Blut bei spontan an ERU erkrankten Pferden	7
2.2	Metabolismus von T-Zellen	11
2.2.1	Stoffwechselwege verschiedener Substrate in T-Zellen	12
2.2.2	Rolle der Mitochondrien im T-Zell-Metabolismus.....	14
2.2.2.1	Anpassung des mitochondrialen Substrat-Metabolismus bei der T- Zell-Aktivierung und -Differenzierung	15
2.2.2.2	Der Citratzyklus.....	17
2.2.2.3	Die Atmungskette.....	18
2.2.3	Respirometrische Messung des Immunzellmetabolismus	21
2.2.3.1	Messung der Substratoxidation in intakten Zellen.....	22
2.2.3.2	Messung der Substratoxidation direkt am Mitochondrium.....	22
2.3	Differentielle Proteomanalyse	24
2.3.1	LC-MS/MS	24
2.3.2	Das mitochondriale Proteom	25
2.3.2.1	MitoCarta-Datenbank	27
2.3.2.2	Das mitochondriale Proteom von T-Zellen und dessen Anpassung bei Aktivierung.....	28
2.4	Super-Resolution Mikroskopie	30
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	Probenmaterial	32
3.2	Isolierung von PBL mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	34
3.2.1	Puffer und Lösungen	34

3.2.2	Gewinnung der Blutproben	34
3.2.3	Isolierung der equinen PBL mittels Dichtegradienten-Zentrifugation ..	35
3.2.4	Ermittlung der Zellzahl	35
3.3	Magnetische Zellseparation	36
3.3.1	Puffer und Lösungen	36
3.3.2	Antikörper	36
3.3.3	Gewinnung der CD4 ⁺ -Fraktion aus equinen PBL mittels positiver magnetischer Separation	37
3.4	Durchflusszytometrie zur Kontrolle der Reinheit der CD4⁺-Fraktion ..	38
3.4.1	Puffer und Lösungen	38
3.4.2	Antikörper	38
3.4.3	Färbung	39
3.4.4	Detektion mittels Durchflusszytometrie	39
3.4.5	Auswertung	39
3.5	Messung der Sauerstoffverbrauchsrate im Seahorse XF24 Analyzer. 40	
3.5.1	Puffer und Lösungen	40
3.5.2	Inhibitoren	42
3.5.3	Vorbereitungen des Assays	43
3.5.4	Messung der Substratoxidation equiner PBL im Fuel Flex Test	44
3.5.4.1	Durchführung des Assays	44
3.5.4.2	Auswertung der Messergebnisse	46
3.5.5	Messung der Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-medierten Aktivität....	47
3.5.5.1	Durchführung des Assays	48
3.5.5.2	Auswertung der Messergebnisse	49
3.6	Isolation der Mitochondrien aus den equinen CD4⁺-Zellen.....	51
3.6.1	Puffer und Lösungen	51
3.6.2	Durchführung der Mitochondrienisolation	51
3.7	Analyse des mitochondrialen Proteoms.....	52
3.7.1	Modifizierter FASP-Verdau der equinen Mitochondrien.....	52
3.7.1.1	Puffer und Lösungen.....	52

3.7.1.2	Durchführung des FASP-Verdau der equinen Mitochondrien	54
3.7.2	LC-MS/MS	55
3.7.2.1	Puffer und Lösungen	55
3.7.2.2	Flüssigkeitschromatographie und Messung der Massenspektren ...	55
3.7.3	Rohdaten-Prozessierung und Quantifizierung	56
3.7.4	Statistische und bioinformatische Datenanalyse	57
3.8	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	
und Immunoblot	58	
3.8.1	Vorbereitung der Proben	58
3.8.1.1	Puffer und Lösungen	58
3.8.1.2	Zellyse	59
3.8.1.3	Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate	59
3.8.2	SDS-PAGE	60
3.8.2.1	Puffer und Lösungen	60
3.8.2.2	Durchführung der 1D Gelelektrophorese	62
3.8.3	Immunoblot	63
3.8.3.1	Puffer und Lösungen	63
3.8.3.2	Antikörper	65
3.8.3.3	Durchführung des Immunoblot	65
3.8.3.4	Ponceau-Färbung zur Überprüfung des Proteintransfers	66
3.8.3.5	Immun-Färbung und Entwicklung der Membranen	66
3.8.3.6	Quantifikation und statistische Auswertung der MUL1 Banden	67
3.9	Super-Resolution-Mikroskopie mittels dSTORM	68
3.9.1	Puffer und Lösungen	68
3.9.2	Antikörper	69
3.9.3	Färbung	69
3.9.4	Bildaufnahme und Bildverarbeitung	71
4	ERGEBNISSE	73
4.1	Untersuchung der Abhängigkeit und Kapazität der PBL gesunder und	
an ERU erkrankter Pferde vom Glukose-, Glutamin- und		
Fettsäurestoffwechsel	73	

4.2	Untersuchung der Aktivität von Komplex I und Komplex II der Atmungskette sowie der Oxidation langkettiger Fettsäuren im Mitochondrium der CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde ...	77
4.2.1	Etablierung einer optimalen Zellzahl zur Messung der Pyruvat- und Succinat-medierten Aktivität in permeabilisierten equinen CD4 ⁺ -Zellen.....	77
4.2.2	Für die Permeabilisierung equiner CD4 ⁺ -Zellen kann rPFO in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt werden	80
4.2.3	Zwischen der Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-medierten Aktivität der Atmungskette der CD4 ⁺ -Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde bestand kein Unterschied	81
4.3	Analyse des Proteoms der Mitochondrien von CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde.....	85
4.3.1	Identifikation von 89 differentiell abundanten mitochondrialen Proteinen in den CD4 ⁺ - Zellen von an ERU erkrankten Tieren	86
4.3.2	Pathway-Anreicherungs-Analyse differentiell abundanter Proteine im mitochondrialen Proteom von CD4 ⁺ -Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde	90
4.3.3	Pathway-Aktivitäts-Analyse differentiell abundanter Proteine im mitochondrialen Proteom von CD4 ⁺ -Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde	92
4.3.4	Das „Granzyme A Signaling“ war in den Mitochondrien der CD4 ⁺ -Zellen von an ERU erkrankten Pferden inhibiert.....	94
4.3.5	Der „Sirtuin Signaling Pathway“ war in den Mitochondrien der CD4 ⁺ -Zellen von an ERU erkrankten Pferden inhibiert	94
4.3.6	Der Stoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung war in den Mitochondrien der CD4 ⁺ -Zellen von an ERU erkrankten Pferden aktiviert	94
4.3.7	Die unterschiedlich abundanten Proteine innerhalb des Stoffwechselweges der oxidativen Phosphorylierung sind dem Komplex I, IV und V der Atmungskette angehörig.....	95
4.3.8	Downstream-Effekt-Analyse differentiell abundanter Proteine im mitochondrialen Proteom von CD4 ⁺ -Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde	96

Inhaltsverzeichnis

4.3.9	Identifikation von MUL1 als Kandidatenprotein für weiterführende Untersuchungen.....	97
4.3.10	Quantifizierung von MUL1 in CD4 ⁺ -Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden	99
4.4	Darstellung der Mitochondrien equiner PBL mittels dSTORM	100
5	DISKUSSION	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	125
7	SUMMARY	127
8	LITERATURVERZEICHNIS	129
	DANKSAGUNG	149

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AA	Antimycin A
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AGC	Automatic Gain Control
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BPTES	Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl) ethylsulfid
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Immunphänotypisches Oberflächenmerkmal (<i>engl.</i> cluster of differentiation)
CD3 ⁺ -Zellen	CD3 positive Lymphozyten
CD4 ⁺ -Zellen	CD4 positive Lymphozyten
CD8 ⁺ -Zellen	CD8 positive Lymphozyten
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
COX10	Cytochrom-c-Oxidase 10
COX6A1	Cytochrome-c-Oxidase Subunit 6A
CPT1	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1
CRALBP	Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
DDA	Datenabhängige Akquisition (<i>engl.</i> data dependent acquisition)

Abkürzungsverzeichnis

DIA	Datenunabhängige Akquisition (<i>engl.</i> data independent acquisition)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
Drp1	Dynamamin-related protein 1
dSTORM	Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
DTT	Dithiothreitol
e ⁻	Elektron
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>engl.</i>	Englisch
ERU	Equine Rezidivierende Uveitis
ESI	Elektrospray-Ionisierung
et al.	und andere (<i>lat. et alii</i>)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
FASP	Filter-aided Sample Preparation
FCCP	Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon
FDR	False Discovery Rate
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC-A	Forward-Scatter-Fläche
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunden
H ⁺	Proton
H+L	Schwere und leichte Kette (<i>engl.</i> heavy and light chain)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HADH	Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)

Abkürzungsverzeichnis

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl.</i> high-performance liquid chromatography)
HSD17B10	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10
I.E.	Internationale Einheiten
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
KS	Kolmogorov-Smirnov Test
l	Liter
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie (<i>engl.</i> liquid-chromatography- massspectrometry/massspectrometry)
LDH	Laktatdehydrogenase
LDHB	Equus caballus lactate dehydrogenase B
M	Molar
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
mA	Milliampère
MACS	Magnetische Separation (<i>engl.</i> magnetic activated cell sorting)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Mfn2	Mitofusin 2
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

Abkürzungsverzeichnis

mmu	<i>engl.</i> milli mass unit
MPC	Mitochondrialer Pyruvat-Carrier
ms	Millisekunden
MT-ATP6	ATP-Synthase subunit a
MUL1	Mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOD	Non-Obese Diabetic
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate (<i>engl.</i> oxygen consumption rate)
p	Signifikanzwert (<i>engl.</i> probability-value)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS-Tween Lösung
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol
POD	Peroxidase
ppm	Teile pro Millionen (<i>engl.</i> parts per million)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung (<i>engl.</i> relative centrifugal force)
RET	Umgekehrte Elektronenübertragung (<i>engl.</i> reverse electron transfer)
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>engl.</i> reactive oxygen species)
Rot	Rotenon
rPFO	Rekombinantes Perfringolysin O
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> rounds per minute)
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S-Ag	S-Antigen
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSC-A	Side-Scatter-Fläche
Stadium 4 _{Oligomycin}	Stadium 4 _o
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethylendiamin
Th17-Zellen	T-Helferzellen der Subgruppe 17
Th1-Zellen	T-Helferzellen der Subgruppe 1
Th2-Zellen	T-Helferzellen der Subgruppe 2
Th-Zellen	T-Helferzellen
TIRF	<i>engl.</i> total internal reflection fluorescence
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
TOMM20	Translocase of outer mitochondrial membrane 20
T-Zellen	T-Lymphozyten

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Beispielverlauf der Sauerstoffverbrauchsrate im Fuel Flex Test....	47
Abbildung 3.2 Beispielverlauf der Sauerstoffverbrauchsrate bei der Messung der Pyruvat-, Succinat- oder Palmitat-medierten Aktivität.....	50
Abbildung 4.1 Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität der PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde von Glukose.	74
Abbildung 4.2 Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität der PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde von Glutamin.	75
Abbildung 4.3 Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität der PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde von langkettigen Fettsäuren.	76
Abbildung 4.4 Optimierung der Zelldichte pro Delle zur Messung der Sauerstoffverbrauchsrate in permeabilisierten CD4 ⁺ -Zellen.....	79
Abbildung 4.5 Vergleich der Sauerstoffverbrauchsrate von equinen CD4 ⁺ -Zellen nach der Permeabilisierung mit verschiedenen rPFO Konzentrationen.	81
Abbildung 4.6 Messung der Pyruvat-medierten Aktivität von Komplex I der Atmungskette in CD4 ⁺ -Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde nach Permeabilisierung der Plasmamembran.....	82
Abbildung 4.7 Messung der Succinat-medierten Aktivität von Komplex II der Atmungskette in CD4 ⁺ -Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde nach Permeabilisierung der Plasmamembran.....	83
Abbildung 4.8 Messung der Palmitat-medierten Oxidation langkettiger Fettsäuren in CD4 ⁺ -Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde nach Permeabilisierung der Plasmamembran.....	84
Abbildung 4.9 Alle 30 im Datensatz signifikant ($p < 0,05$) angereicherten kanonischen Stoffwechselwege.	91
Abbildung 4.10 Angereicherte Stoffwechselwege mit signifikant verändertem vorausgesagten Aktivitätsmuster (absoluter z-Score >2).	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.11 Schematische Darstellung der Atmungskette mit ihren Komplexen und den in Mitochondrien der CD4 ⁺ -Zellen von ERU-Tieren differentiell abundanten Proteinen in Komplex I, IV und V.....	95
Abbildung 4.12 Volcano Plot aller 622 identifizierten mitochondrialen Proteine. ..	98
Abbildung 4.13 Quantifizierung der Expression von MUL1 in CD4 ⁺ -Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde im Western Blot.	99
Abbildung 4.14 Vergleichende Darstellung der Mitochondrien eines equinen PBL im Widefield (A) und dSTORM (B).	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Zusammensetzung der Ansätze eins bis sechs für die Messung der Substratoxidation mittels Fuel Flex Test im Seahorse XF24 Analyzer.	45
Tabelle 3.2 Zusammensetzung der Ansätze eins bis fünf für die Messung der der Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-medierten Aktivität im Seahorse XF24 Analyzer.	48
Tabelle 4.1 Alle 51 signifikant höher abundanten mitochondrialen Proteine in CD4 ⁺ -Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren.	88
Tabelle 4.2 Alle 38 signifikant geringer abundanten mitochondrialen Proteine in CD4 ⁺ Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren.	89
Tabelle 4.3 Ausgewählten Stoffwechselwegen zugeordnete Proteine.	92
Tabelle 4.4 Auswahl an signifikant angereicherten Downstream-Funktionen.....	97

Tabellenverzeichnis

1 EINLEITUNG

Aufzeichnungen über wiederkehrende Augenentzündungen beim Pferd, die wir heute unter dem Begriff der Equinen Rezidivierenden Uveitis (ERU) kennen, finden sich bereits aus dem 4. Jahrhundert nach Christus (Gilger und Deeg 2011). Damals dachte man, die wiederkehrenden Schübe würden mit den Mondphasen zusammenhängen, was den Begriff der „Mondblindheit“ prägte, der noch heute umgangssprachlich als Bezeichnung für die ERU verwendet wird (Gilger und Deeg 2011). Der Einfluss des Mondes und der Gezeiten auf entzündliche Erkrankungen gilt mittlerweile als überholt. Nach heutigem wissenschaftlichen Stand sind autoreaktive Immunzellen für die okularen Entzündungsschübe bei der ERU verantwortlich, dennoch bleiben noch viele Fragen der Krankheitsentstehung ungeklärt (Degroote und Deeg 2021).

Die ERU betrifft Pferde weltweit und ist durch periodisch-rezidivierende Entzündungsschübe des inneren Auges gekennzeichnet (Gerding und Gilger 2016, McMullen und Fischer 2017). Durch die wiederholte Infiltration des Auges mit autoreaktiven Immunzellen, mehrheitlich Zellen mit dem immunphänotypischen Oberflächenmerkmal (*engl.* cluster of differentiation, CD) 4, kommt es zur Zerstörung des intraokularen Gewebes und letztendlich zur Erblindung der betroffenen Pferde (Deeg, Kaspers et al. 2001, Gerding und Gilger 2016, Degroote und Deeg 2021). Dabei wiesen die peripheren Blutleukozyten (PBL) erkrankter Tiere auch während der symptomfreien Intervalle einen veränderten pro-inflammatorischen Phänotyp auf (Saldinger, Nelson et al. 2020, Wiedemann, Amann et al. 2020, Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Dieser zeichnete sich unter anderem durch veränderte metabolische Eigenschaften der Zellen aus (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Welche Mechanismen zu dieser Veränderung der Stoffwechseleigenschaften führten, wurde jedoch bisher nicht weiter untersucht. Ein genaues Verständnis der molekularen Vorgänge, die zur Krankheitsentstehung beitragen, kann jedoch die Möglichkeit eröffnen, in diese Prozesse einzugreifen und neue Therapien zu entwickeln (Chapman und Chi 2022).

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Vorgänge, die zu dem veränderten metabolischen, pro-inflammatorischen Phänotyp der PBL und speziell der CD4 positiven Lymphozyten (CD4⁺-Zellen) von an ERU erkrankten Pferden führen, genauer zu charakterisieren und damit zu einem besseren Verständnis der

Krankheitsentstehung beizutragen. Hierfür wurde einerseits die Nutzung verschiedener Substrate im Mitochondrium analysiert und andererseits wurden die Veränderungen auf molekularer Ebene untersucht.

2 LITERATUR

2.1 Equine rezidivierende Uveitis

2.1.1 Vorkommen und Bedeutung

Die ERU ist eine weltweit vorkommende Erkrankung und durch wiederkehrende Entzündungsschübe des inneren Auges gekennzeichnet (Gerding und Gilger 2016, McMullen und Fischer 2017). In Europa sind etwa 8-10 % der Pferde betroffen (Spiess 2010, Malalana, Ireland et al. 2020). In den USA wurden sogar Zahlen bis zu 25 % beschrieben (Gerding und Gilger 2016). Dabei sind Appaloosas und Warmblüter überdurchschnittlich häufig betroffen (Gerding und Gilger 2016, Malalana, Ireland et al. 2020). Auch wenn Pferde jeden Alters mit ERU vorstellig werden, durchlaufen sie die initiale Uveitis häufig im jungen Alter von vier bis sechs Jahren (Gilger und Michau 2004, Malalana, Ireland et al. 2020). Die Entzündung des Auges geht mit erheblichen Schmerzen und Leiden für das Tier einher und die ERU führt unbehandelt in den meisten Fällen letztendlich zur Erblindung (Gerding und Gilger 2016, McMullen und Fischer 2017). Der Verlust der Sehfähigkeit, insbesondere wenn die Tiere bilateral betroffen oder besonders schreckhaft sind, stellt beim Fluchttier Pferd ein Sicherheitsrisiko für Mensch und Tier dar. Aus diesem Grund müssen die Tiere bei beidseitiger Erblindung häufig euthanasiert werden, obwohl sie ansonsten gesund sind (Gerding und Gilger 2016). Zudem kann die ERU zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden für den Besitzer führen (Gerding und Gilger 2016). Neben den Kosten für die Behandlung kommt häufig dazu, dass die Tiere nur noch bedingt für den Reitsport genutzt werden können oder eine schlechtere Leistung erbringen (Gerding und Gilger 2016).

2.1.2 Klinisches Bild, Diagnose und Therapie

Klinisch zeigt sich die ERU durch wiederkehrende serofibrinöse oder selten auch serohämorrhagische Entzündungsschübe der Uvea (Wollanke, Gerhards et al. 2022). Dabei können die Iris, der Ziliarkörper und die Choroidea sowohl einzeln als auch gemeinsam betroffen sein (McMullen und Fischer 2017). Zwischen den Entzündungsschüben liegen symptomlose Phasen, die Wochen bis Monate oder sogar Jahre dauern können (Wollanke, Gerhards et al. 2022). Ohne therapeutische

Intervention zeigt sich ein progressiver Verlauf und die entzündungsfreien Intervalle zwischen den akuten Schüben verkürzen sich (Wollanke, Gerhards et al. 2022, Malalana, Ireland et al. 2023). Bei der ophthalmologischen Untersuchung zeigen sich Entzündungsanzeichen im Auge, die je nach Zeitpunkt im Krankheitsverlauf variieren können (Allbaugh 2017, Gilger 2022). Die Pferde werden typischerweise im akuten Entzündungsschub wegen Augenausfluss und Augenkneifen vorgestellt (Wollanke, Gerhards et al. 2022). Hierbei können am Auge oft eine schmerzbedingte Miosis der Pupille, eine Begleitkonjunktivitis, ein Corneaödem sowie Trübungen des Kammerwassers und des Glaskörpers durch Entzündungsprodukte beobachtet werden (Allbaugh 2017). Durch die chronisch wiederkehrende Entzündung kann es mit der Zeit auch zur Fibrose der Iris, Corpora nigra Atrophie, hinteren Synechien, Katarakt, Glaukom, Augapfelschrumpfung (Phthisis bulbi) und letztendlich zur Retinadegeneration und Erblindung kommen (Allbaugh 2017). Diese chronischen Befunde sind auch in den symptomfreien Intervallen vorhanden (Allbaugh 2017). Bei Pferden der Rasse Appaloosa und Knabstrupper kommt vermehrt eine schleichende (*engl.* insidious) Form der ERU vor (Kingsley, Sandmeyer et al. 2022). Ein höheres Risiko für diese Form wird mit der besonderen Fellzeichnung „Tigerschecke“ assoziiert (Kingsley, Sandmeyer et al. 2022). Sie zeichnet sich durch eine chronisch-persistierende Entzündung der Augenstrukturen aus, während die klassischen akuten Entzündungsschübe fehlen (Sandmeyer, Kingsley et al. 2020). Neben dieser schleichenden Form unterscheidet man noch eine klassische und eine posteriore Form der ERU (Gilger und Michau 2004, Kingsley, Sandmeyer et al. 2022). Während bei der klassischen Form Iris, Ziliarkörper und Choroidea, sowie auch Cornea, vordere Augenkammer, Linse, Retina und Glaskörper betroffen sind, beschränkt sich die Entzündung bei der posterioren Uveitis auf die hinteren Teile des Auges (Gilger und Michau 2004, McMullen und Fischer 2017). Bei Warmblütern kommt vor allem die klassische oder die posteriore Form vor (McMullen und Fischer 2017, Malalana, Ireland et al. 2023). Die Diagnose der ERU erfolgt anhand des klinischen Bildes – unter Ausschluss von Differentialdiagnosen – und des Vorberichtes von zwei oder mehr Entzündungsschüben (Spiess 2010). Die medikamentöse Therapie basiert vor allem auf der Unterdrückung der akuten Entzündungsreaktion durch die systemische Anwendung von nichtsteroidalen Antiphlogistika und die lokale Applikation von Glucocorticoiden (McMullen und Fischer 2017). Die initiale

Unterdrückung der Entzündungsreaktion ist essenziell, um weitere Schäden am Auge möglichst gering zu halten (McMullen und Fischer 2017). Zudem wird in der Regel ein lokales Mydriatikum eingesetzt, um Verklebungen der inneren Augenstrukturen zu verhindern (McMullen und Fischer 2017). Weitere Therapien zielen darauf ab, Rezidive zu vermeiden und momentan kommen insbesondere drei chirurgische Eingriffe zum Einsatz: suprachoroidale Ciclosporin-haltige Implantate, die intraokuläre Injektion geringer Dosen Gentamicin und die Pars Plana Vitrektomie (Fischer, Brehm et al. 2022).

2.1.3 Immun-Pathogenese der ERU

Die genaue Ursache für die Entstehung der ERU konnte bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden. Generell handelt es sich bei der ERU um eine organspezifische, immun-mediierte Erkrankung, deren Auftreten durch verschiedene Risikofaktoren begünstigt wird (Degroote und Deeg 2021). Hierbei werden vor allem genetische Faktoren sowie auch eine bakterielle Komponente (insbesondere verschiedene Leptospiren-Arten) diskutiert (Fischer, Brehm et al. 2022). Nachgewiesen ist, dass im Verlauf der Erkrankung Immunzellen aus dem peripheren Blut die Blut-Retina-Schranke überwinden und erheblich zur Zerstörung des intraokularen Gewebes beitragen, wobei die Retina meist stark betroffen ist (Lorenz, Amann et al. 2021). Das initiale Ereignis, das zur Aktivierung dieser Zellen in der Peripherie und zum folgenden Entzündungsschub im immunprivilegierten Organ Auge führt, konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden (Degroote und Deeg 2021).

Verschiedene Studien sprechen dafür, dass die Zellen der Retina selbst eine treibende Kraft der Entzündung sind (Eberhardt, Amann et al. 2011, Lorenz, Amann et al. 2021, Lorenz, Hirmer et al. 2021). Es wurde unter anderem gezeigt, dass retinale Müller-Gliazellen bei der ERU pro-inflammatorische Zytokine produzierten und weitere Daten wiesen darauf hin, dass diese sogar als atypische Antigen-präsentierende Zellen fungieren könnten (Hauck, Schoeffmann et al. 2007, Lorenz, Hirmer et al. 2021). Ob Veränderungen am retinalen Gewebe selbst jedoch ein initialer Auslöser, ein Verstärker oder lediglich eine Folge der Immunzell-Infiltration des Auges sind, ist noch unklar (Degroote und Deeg 2021).

Die im Glaskörper akkumulierten Immunzellinfiltrate von an ERU erkrankten Pferden bestanden in den meisten Fällen überwiegend aus Lymphozyten, jedoch

konnten bei einigen wenigen Tieren auch stark granulozytäre Infiltrate gefunden werden (Deeg, Kaspers et al. 2001).

Die zentrale Rolle autoreaktiver Immunzellen bei der Entstehung der ERU konnte nachgewiesen werden, da sowohl die das Auge infiltrierenden als auch die PBL von an ERU erkrankten Pferden eine Immunreaktion gegen verschiedene retinale Antigene zeigten (Deeg, Kaspers et al. 2001, Deeg, Pompetzki et al. 2006). Dazu zählen das Interphotorezeptor Retinoid-bindende Protein (IRBP), das S-Antigen (S-Ag) und das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (CRALBP) (Deeg, Kaspers et al. 2001, Deeg, Reese et al. 2004, Deeg, Pompetzki et al. 2006). Die Expression von IRBP, CRALBP und S-Ag in der Retina bleibt nachweislich auch im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, wenn bereits viel retinales Gewebe zerstört ist, konstant und kann damit auch in bereits erblindeten Augen im Endstadium der Uveitis weiterhin zu Entzündungsschüben führen, wie sie bei der ERU beobachtet werden können (Deeg, Hauck et al. 2007). Zudem wurde gezeigt, dass sich diese autoreaktive Immunreaktion auf die retinalen Antigene von der initialen Spezifität für ein Epitop auf weitere Epitope auf demselben oder einem anderen Protein ausweitete (Deeg, Amann et al. 2006). Dieser Effekt ist als Epitop-Spreading bekannt und bietet eine Erklärung für den remittierend-rezidivierenden Charakter der ERU (Vanderlugt und Miller 2002, Deeg, Amann et al. 2006). Die Fähigkeit peripherer Immunzellen, nach der Sensibilisierung mit retinalem Antigen eine uveitische Episode beim Pferd auszulösen, konnte bewiesen werden, da die subkutane Injektion sowohl von IRBP als auch CRALBP bei gesunden Pferden eine Uveitis induzierte (Deeg, Thurau et al. 2002, Deeg, Pompetzki et al. 2006). Insbesondere zwischen der IRBP-induzierten Uveitis und der spontanen ERU konnten nicht nur ein ähnlicher klinischer Verlauf, sondern auch verschiedene Übereinstimmungen auf zellulärer und molekularer Ebene aufgezeigt werden (Deeg, Thurau et al. 2002, Hauck, Lepper et al. 2017). In beiden Fällen bestanden die Zellinfiltrate in den Augen von erkrankten Tieren hauptsächlich aus T-Zellen, die folliculäre Strukturen bildeten (Gilger, Malok et al. 1999, Deeg, Thurau et al. 2002, Kleinwort, Amann et al. 2016). Die weitere Charakterisierung dieser Zellen in spontan erkrankten Pferden zeigte, dass es sich hierbei überwiegend um CD4⁺-Zellen handelte (Deeg, Kaspers et al. 2001, Kleinwort, Amann et al. 2016). Durch die Untersuchung der PBL von Pferden mit IRBP-induzierter experimenteller Uveitis konnten zudem unterschiedliche Proteinprofile vor, während und nach der

Entzündungsphase nachgewiesen werden (Hauck, Lepper et al. 2017). Dies zeigt, dass die PBL je nach Krankheitsphase einen speziellen, dynamischen Phänotyp besitzen und sich auch außerhalb der aktiven Entzündungsphase noch vom ursprünglichen Zustand unterscheiden (Hauck, Lepper et al. 2017). Es konnten hierbei einige Übereinstimmungen zwischen dem Proteom der PBL von Pferden mit IRBP-induzierter Uveitis außerhalb des Entzündungsschubes und dem Proteom der PBL von spontan an ERU erkrankten Tieren in der symptomlosen Phase gefunden werden (Hauck, Lepper et al. 2017, Degroote und Deeg 2021). Weitere Veränderungen der PBL und insbesondere der CD4⁺-Fraktion von spontan an ERU erkrankten Pferden konnten in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, was die Dysregulation der Funktion dieser Zellen unterstreicht (Degroote und Deeg 2021).

2.1.4 Veränderungen der Immunzellen aus dem peripheren Blut bei spontan an ERU erkrankten Pferden

Untersuchungen an Granulozyten aus dem peripheren Blut konnten unter anderem zeigen, dass diese Zellen bei der ERU einen vermehrt aktivierten Phänotyp und eine abweichende Reaktion auf *in vitro* Aktivierung aufweisen (Fingerhut, Ohnesorge et al. 2019, Weigand, Hauck et al. 2021, Hoffmann, Hauck et al. 2022). Dieser aktivierte Phänotyp wurde bei Pferden mit ERU bereits in den CD4⁺-Zellen nachgewiesen, die generell als treibende Kraft der ERU angesehen werden (Saldinger, Nelson et al. 2020).

Während sich die prozentualen Anteile der im peripheren Blut vorhandenen CD3⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-Zellen nicht zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden unterschieden (Saldinger, Nelson et al. 2020), konnte für die PBL und insbesondere die CD4⁺-Fraktion der erkrankten Pferde ein veränderter Phänotyp auf molekularer sowie funktioneller Ebene nachgewiesen werden (Degroote und Deeg 2021).

Die PBL von spontan an ERU erkrankten Pferden zeigten deutliche Veränderungen des Proteinprofils, insbesondere von Proteinen, die eine Rolle bei der Zelladhäsion und -migration spielen oder die Zellform beeinflussen (Degroote, Hauck et al. 2014, Degroote, Uhl et al. 2017, Schauer, Kleinwort et al. 2018). Im Einklang damit wurde eine erhöhte Migrationsrate der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen (Degroote, Uhl et al. 2017). In weiterführenden Migrationsversuchen konnte zudem gezeigt werden, dass die PBL von an ERU erkrankten Pferden in

einer 3D-Kollagenmatrix schneller und zielgerichteter in Richtung spezifischer Lockstoffe wanderten (Wiedemann, Amann et al. 2020). Die Autoren sahen eine Erklärung für das gesteigerte Migrationsverhalten in einem vermehrten Anteil an aktivierten Zellen in den PBL der ERU-Tiere (Wiedemann, Amann et al. 2020). Die größten Unterschiede im Wanderungsverhalten konnten beim Einsatz des Zytokins Interferon gamma (IFN γ) und dem retinalen Antigen CRALBP als Lockstoff beobachtet werden, was ein Hinweis auf eine vermehrte Anzahl pro-inflammatorischer, autoreaktiver T-Helferzellen der Subgruppe 1 (Th1-Zellen) im peripheren Blut von an ERU erkrankten Pferden ist (Wiedemann, Amann et al. 2020). Eine erhöhte IFN γ -Transkription in den bei ERU das Auge infiltrierenden Immunzellen konnte bereits in einer frühen Studie nachgewiesen werden (Gilger, Malok et al. 1999). In einer aktuelleren Studie konnte zudem gezeigt werden, dass auch die peripheren CD4⁺-Zellen der erkrankten Pferde durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von IFN γ und darüber hinaus durch einen Trend zu einer verminderten intrazellulären Konzentration von Interleukin (IL)-10 gekennzeichnet sind, was wiederum einen aktivierten Th1-Zell-Phänotyp dieser Zellen im Blut unterstreicht (Saldinger, Nelson et al. 2020). In Nagermodellen der autoimmunen Uveitis ist die Beteiligung verschiedener Th-Subtypen am Entzündungsgeschehen deutlich tiefgreifender untersucht (Chen, Lightman et al. 2021). Auch hier wurden Th1-Zellen in vielen Fällen als vorherrschender Zelltyp in okularen Infiltraten identifiziert (Chen, Lightman et al. 2021). Neben den Th1-Zellen wurden jedoch auch T-Helferzellen der Subgruppe 17 (Th17-Zellen) als Uveitis-
verursachender Zelltyp nachgewiesen; sowohl in verschiedenen Nagermodellen, als auch bei Menschen mit autoimmuner Uveitis (Amadi-Obi, Yu et al. 2007, Chen, Lightman et al. 2021). Dabei war die Beteiligung der beiden Th-Subgruppen abhängig von der Uveitisform und dem Zeitpunkt im Verlauf des Entzündungsgeschehens (Chen, Lightman et al. 2021). In der murinen, IRBP-induzierten, rezidivierenden autoimmunen Uveitis wurde beispielsweise gezeigt, dass Th17-Zellen der dominante Zelltyp in der frühen Entzündungsphase waren, während an der Spitze der okularen Entzündung, sowie bei den Rückfällen vorwiegend Th1-Zellen in den untersuchten Augen gefunden wurden (Chen, Lightman et al. 2021). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass beide Zelltypen unabhängig voneinander in der Lage sind, bei Nagetieren eine Uveitis auszulösen (Luger, Silver et al. 2008, Chen, Lightman et al. 2021). So konnte bei gesunden

Mäusen ein adoptiver Transfer von sowohl autoreaktiven Th1- als auch autoreaktiven Th17-Zellen eine Uveitis hervorrufen (Chen, Lightman et al. 2021). Um eine Uveitis durch adoptiven Transfer zu induzieren, werden autoreaktive Immunzellen von einem *in vivo* mit retinalen Antigenen immunisierten Tier entnommen, dann *in vitro* aktiviert und anschließend in ein gesundes Empfängertier intraperitoneal oder intravenös injiziert (Mochizuki, Kuwabara et al. 1985, Caspi, Roberge et al. 1986). Dabei wurde gezeigt, dass bereits sehr wenige autoreaktive Immunzellen ausreichen um die Uveitis im Empfängertier auszulösen (Palestine, McAllister et al. 1986, Luger und Caspi 2008), was wegweisend für das Verständnis der immunpathologischen Vorgänge bei der Entstehung der autoimmunen Uveitis war.

Die Rolle der Th17-Zellen in der Pathogenese der ERU wurde noch nicht eingehend untersucht, jedoch wurden vermehrt die Zytokine IL-6, IL-17 und IL-23 in histologischen Schnitten der Retina, Iris und des Ziliarkörpers erkrankter Tiere nachgewiesen (Regan, Aarnio et al. 2012). Diese werden mit der Th17-Subgruppe in Verbindung gebracht und machen damit eine Beteiligung dieser Zellgruppe wahrscheinlich (Regan, Aarnio et al. 2012). Sowohl in verschiedenen Nagernmodellen der autoimmunen Uveitis als auch bei der humanen autoimmunen Uveitis wurde die Remission der Erkrankung mit einer erhöhten Anzahl regulatorischer T-Zellen im Auge in Verbindung gebracht (Chen, Lightman et al. 2021). Bei der humanen autoimmunen Uveitis ging die Remission des okularen Entzündungsschubs zudem mit einer signifikanten Zunahme der regulatorischen T-Zellen im Blut einher, während sich ihr Anteil in der akuten Entzündungsphase nicht zwischen gesunden und erkrankten Individuen unterschied (Gilbert, Zhang et al. 2018). In den PBL von an ERU erkrankten Pferden zeigte sich kein Unterschied im Anteil der regulatorischen T-Zellen, jedoch wurden die Tiere in dieser Studie lediglich einmalig beprobt und befanden sich zudem in einem aktiven Uveitis-Schub und nicht in Remission (Saldinger, Nelson et al. 2020). Die Rolle der regulatorischen T-Zellen und insbesondere ihre Beteiligung am Rückgang der Entzündungsschübe bei der ERU muss daher erst noch genauer untersucht werden. Im Gegenzug konnte bei den CD4⁺- und den CD8⁺-Zellen der erkrankten Pferde eine erhöhte Expression von CD62L nachgewiesen werden, einem Adhäsionsmolekül, das auf der Oberfläche von zentralen T-Gedächtniszellen exprimiert wird, wenn sie Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatten (Saldinger, Nelson et al. 2020).

Als ein weiteres Merkmal zeigten die Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden eine verminderte Apoptose, was darauf hindeutet, dass eine erhöhte Überlebensrate der Zellen eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen könnte (Schauer, Kleinwort et al. 2018).

Die Differenzierung von Immunzellen und ihre gesteigerten Effektorfunktionen wie erhöhte Motilität, verringerte Mortalität und vermehrte Zytokinproduktion gehen mit Anpassungen ihres Zellstoffwechsels einher (Chapman und Chi 2022). Dabei konnte in Mäusen und Menschen gezeigt werden, dass sich das metabolische Profil von verschiedenen Immunzellklassen und -subtypen teilweise fundamental unterscheidet (Soriano-Baguet und Brenner 2023). Bei der Untersuchung des metabolischen Phänotyps der PBL von an ERU erkrankten Pferden konnten passend zu den bereits beschriebenen gesteigerten Effektorfunktionen deutliche Veränderungen festgestellt werden (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). So konnten signifikante Unterschiede bei der oxidativen Phosphorylierung und glykolytischen Aktivität der PBL von an ERU erkrankten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021).

Insgesamt sind diese Erkenntnisse über immunologische Veränderungen in der Pathogenese der ERU sehr vielschichtig und deuten auf ein komplexes, multifaktorielles Zusammenspiel mehrerer immunologischer Mechanismen hin, an dem das angeborene und das erworbene Immunsystem sowie das Zielorgan Auge beteiligt sind (Degroote und Deeg 2021). Trotz des großen Wissenszuwachses der letzten zwei Jahrzehnte bleiben viele Fragen bei der Entstehung der ERU noch unbeantwortet. Ein genaues Verständnis der molekularen Vorgänge ist jedoch essentiell, um den Weg für neue spezifische Therapien zu bereiten (Chapman und Chi 2022). Bei anderen Autoimmunerkrankungen zeigte sich insbesondere die Manipulation des Zellstoffwechsels hierbei als vielversprechender Ansatz (Chapman und Chi 2022).

2.2 Metabolismus von T-Zellen

In den letzten Jahrzehnten wurde deutlich, dass nahezu jede Veränderung der Zellfunktion und -umgebung mit einer Anpassung des Zellmetabolismus einhergeht (Chi 2022). Insbesondere Immunzellen sind darauf angewiesen, ihren Stoffwechsel schnell an wechselnde Bedingungen adaptieren zu können, um den Aufbau von Biomasse bei der klonalen Expansion oder die Ausführung ihrer Effektorfunktionen im entzündeten Gewebe zu ermöglichen und damit eine adäquate Immunantwort zu gewährleisten (Chapman und Chi 2022). Immunzellen können verschiedene Substrate verwenden, um ihren Stoffwechsel anzutreiben und die Verfügbarkeit von Nährstoffen sowie Metaboliten kann dabei für die Regulation des Zellmetabolismus entscheidend sein (Soriano-Baguet und Brenner 2023). Dabei ist die Differenzierung und Funktion spezieller Immunzellen mitunter durch spezifische metabolische Programme geprägt, die relativ gut konserviert oder auch situationsbezogen hoch flexibel sein können (Chapman und Chi 2022).

Im Mittelpunkt des zellulären Stoffwechsels stehen die Mitochondrien, in denen die Stoffwechselwege verschiedener Substrate im Citratzyklus zusammentreffen, Vorstufen für verschiedene Biosynthesen geliefert werden und die oxidative Phosphorylierung stattfindet (Shen, Pender et al. 2022).

Angesichts der komplexen metabolischen Netzwerke, die im physiologischen Rahmen die Immunzellhomöostase aufrechterhalten, ist es nicht überraschend, dass in einer Vielzahl von pathologischen Zuständen Abweichungen im Zellstoffwechsel nachgewiesen wurden (Chapman und Chi 2022). Die fehlerhafte Regulation des Stoffwechsels wird heute als ein maßgeblicher Faktor bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen angesehen, dennoch ist seine genaue Rolle bei ihrer Entstehung bis heute nicht eindeutig geklärt (Clayton, MacDonald et al. 2021). Sowohl ein Verständnis der Physiologie des Immunzellmetabolismus als auch seiner Abweichungen im Rahmen spezifischer immun-medierter Erkrankungen eröffnet die Möglichkeit, in diese Prozesse einzugreifen und neue Therapien zu entwickeln (Chapman und Chi 2022).

Aktuell stammt das Wissen über den Immunzellstoffwechsel hauptsächlich aus der Forschung an Mäuse- und Menschenzellen (Chapman und Chi 2022). Über die spezifischen metabolischen Programme equiner Immunzellen ist noch wenig bekannt.

2.2.1 Stoffwechselwege verschiedener Substrate in T-Zellen

Um ihre spezifischen Funktionen auszuführen und das Zellgleichgewicht aufrechtzuerhalten, brauchen die T-Zellen Energie (Yang, Yu et al. 2022). In den Immunzellen verschiedener Säugetierspezies, wie Maus und Mensch, spielt besonders der Abbau von Glukose, Glutamin und Fettsäuren eine Rolle (Yang, Yu et al. 2022). Dabei können die Immunzellen situationsbezogen zwischen diesen Abbauwegen wechseln, um sich an veränderte Anforderungen anzupassen, wie beispielsweise ihre Effektorfunktion oder eine veränderte Mikroumgebung, wie zum Beispiel im entzündeten Gewebe (Hu, Xuan et al. 2022). Dies wird auch als metabolische Flexibilität bezeichnet (Zhang, Halberstam et al. 2022).

Glukose wird in eukaryotischen Zellen über in der Plasmamembran eingelagerte Glukosetransporter (GLUT) aufgenommen (Lizak, Szarka et al. 2019). Im Zytoplasma der Immunzellen sowie auch in fast allen anderen eukaryotischen Zellen wird ein Molekül Glukose durch die zehn Reaktionen der Glykolyse zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut (Rio Bartulos, Rogers et al. 2018). Pyruvat kann dann entweder durch den mitochondrialen Pyruvat-Carrier (MPC) ins Mitochondrium transportiert und dort über den Abbau zu Acetyl-Coenzym A (CoA) in den Citratzyklus eingespeist werden oder im Zytoplasma von der Laktatdehydrogenase (LDH) in Laktat umgewandelt werden (Dai, Wang et al. 2023). Die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat bringt deutlich weniger Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) als die Weiterverarbeitung im Mitochondrium (Rangel Rivera, Knochelmann et al. 2021). Ursprünglich wurde angenommen, dass der Abbau von Pyruvat zu Laktat in Zellen nur stattfindet, wenn ihnen kein Sauerstoff für die oxidative Phosphorylierung zur Verfügung steht (Rangel Rivera, Knochelmann et al. 2021). Diese Annahme wurde durch Otto Warburg widerlegt, der zeigte, dass Krebszellen trotz ausreichender Verfügbarkeit von Sauerstoff Pyruvat zu Laktat metabolisierten (Warburg 1956). Dieser Effekt konnte kurz darauf von ebendiesem auch für aktivierte Leukozyten nachgewiesen werden und wird nach dem Entdecker als „Warburg-Effekt“ oder im Zusammenhang mit proliferierenden Zellen auch als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet (Warburg, Gawehn et al. 1958, MacIver, Michalek et al. 2013). Da der Begriff der aeroben Glykolyse manchmal auch im Zusammenhang mit dem oxidativen Stoffwechsel von Glukose verwendet wird, soll an dieser Stelle klargestellt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit unter „aerober Glykolyse“ immer

der Abbau von Glukose zu Laktat unter aeroben Bedingungen gemeint ist, während der Abbau über den Citratzyklus im Mitochondrium als „oxidativer Glukosemetabolismus“ bezeichnet wird.

Das durch die aerobe Glykolyse entstandene Laktat kann dann von den Zellen in den Extrazellularraum entlassen werden und dort verschiedene Funktionen erfüllen (Manosalva, Quiroga et al. 2021). Eine erhöhte extrazelluläre Laktatkonzentration wird in der Regel in entzündetem Gewebe beobachtet, dabei sind die Effekte von Laktat auf Immunzellen äußerst divers (Manosalva, Quiroga et al. 2021). Laktat kann jedoch auch als Substrat für humane und murine Immunzellen fungieren (Pucino, Certo et al. 2019). Es wurde beispielsweise nachgewiesen, dass aktivierte humane CD4⁺-Zellen die Expression des Laktattransporters SLC5A12 auf ihrer Zelloberfläche steigerten, wenn sie mit einer erhöhten Laktatkonzentration konfrontiert wurden (Pucino, Certo et al. 2019). Dies führte zu einer vermehrten Aufnahme von Laktat in die Zellen (Pucino, Certo et al. 2019). Dabei konnte gezeigt werden, dass das aufgenommene Laktat von den CD4⁺-Zellen zu Pyruvat, Acetyl-CoA und Citrat umgewandelt wurde und damit als Treibstoff für den Citratzyklus diente (Pucino, Certo et al. 2019). Neben dem Abbau zu Pyruvat können Zwischenprodukte der Glykolyse auch für die Biosynthese von Fett- und Aminosäuren genutzt werden oder über den Pentosephosphatweg weiterverarbeitet werden (Zhao, Raines et al. 2020). Hierbei entstehen Pentosephosphate, welche wichtige Vorstufen für die Biosynthese von Nucleotiden und Nucleotidcoenzymen darstellen (Zhao, Raines et al. 2020). Im Pentosephosphatweg wird darüber hinaus das reduzierte Reduktionsäquivalent Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) erzeugt, das für reduktive Biosynthesen wie beispielsweise die Fettsäure- und Cholesterinsynthese benötigt wird (Zhao, Raines et al. 2020).

Im Gegensatz zur Glykolyse findet der Abbau von Fettsäuren und Glutamin in der mitochondrialen Matrix statt (Dorai, Pinto et al. 2022, Endo, Kanno et al. 2022).

Glutamin wird initial durch Glutaminasen zu Glutamat desaminiert und kann im Anschluss weiter zu α -Ketoglutarat abgebaut werden, welches wiederum in den Citratzyklus eintreten kann, oder auch als Vorstufe für Glutathion oder für die Proteinbiosynthese dient (Feng, Li et al. 2022).

Fettsäuren werden in der energiebringenden β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut, welches in den Citratzyklus eintreten kann (Pompura, Hafler et al. 2022). Hierbei entstehen neben Acetyl-CoA auch die reduzierten Formen von Nicotinamid-Adenin-

Dinukleotid-Hydrid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid-Hydrid (FADH₂), deren Elektronen in die Atmungskette zur ATP-Erzeugung abgegeben werden können (Houten, Violante et al. 2016). Um den Eintritt langkettiger Fettsäuren ins Mitochondrium zu ermöglichen, ist ein spezieller Transportmechanismus erforderlich (Longo, Frigeni et al. 2016). Die Fettsäuren müssen an der äußeren Mitochondrienmembran zunächst an Carnitin gebunden werden, ein Prozess, der von der Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) katalysiert wird, um dann durch eine Translokase ins Mitochondrium befördert zu werden (Longo, Frigeni et al. 2016). Kurz- und mittelkettige Fettsäuren haben hingegen eine hohe Membranpermeabilität und können die Mitochondrienmembran frei überwinden (Hasbargen, Shen et al. 2020).

Die *de novo* Fettsäuresynthese findet hingegen im Zytoplasma der Zellen statt. Hier werden zwei Moleküle Acetyl-CoA von der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) in Malonyl-CoA umgewandelt und die Kohlenstoffkette dann schrittweise durch die Kondensation mit weiteren Acetyl-CoA-Molekülen durch die Fettsäuresynthase verlängert (Qian, Yang et al. 2018). Hierfür ist zusätzlich NADPH notwendig, das beispielsweise im Pentosephosphatweg entsteht (Zhao, Raines et al. 2020). Da Acetyl-CoA, welches im Mitochondrium z.B. aus Pyruvat gebildet wird, die Mitochondrienmembran nicht frei passieren kann, ist auch hier ein Transportsystem notwendig, um es für die Fettsäuresynthese verfügbar zu machen (Qian, Yang et al. 2018). Dazu wird das im Citratzyklus aus Oxalacetat und Acetyl-CoA gebildete Citrat durch den mitochondrialen Citrattransporter ins Zytoplasma transportiert und dort wieder in Oxalacetat und Acetyl-CoA umgewandelt (Qian, Yang et al. 2018). Das Acetyl-CoA kann dann für die Fettsäuresynthese verwendet werden, während das Oxalacetat zunächst in Malat umgewandelt und als solches im Austausch gegen α -Ketoglutarat in die Mitochondrien zurücktransportiert wird, wo es wieder in den Citratzyklus eingeschleust werden kann (Qian, Yang et al. 2018).

2.2.2 Rolle der Mitochondrien im T-Zell-Metabolismus

Mitochondrien werden häufig als das Kraftwerk der Zellen bezeichnet (Wang und McLean 2022). Auch wenn die Erzeugung von energiereichem ATP in der oxidativen Phosphorylierung eine wichtige Funktion der Mitochondrien ist, geht ihre Beteiligung am zellulären Stoffwechsel weit darüber hinaus (Shen, Pender et al.

2022). So spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen, produzieren wichtige Stoffwechselzwischenprodukte für verschiedene Biosynthesen, setzen Signalmoleküle frei und sind maßgeblich an der Apoptose beteiligt (Song, Yi et al. 2022). Häufig werden die metabolischen Veränderungen bei der Aktivierung von T-Zellen als ein Wechsel von der oxidativen Phosphorylierung zur aeroben Glykolyse beschrieben (Almeida, Dhillon-LaBrooy Hons et al. 2021). Es wurde jedoch gezeigt, dass die T-Zellen von Mäusen nach der Aktivierung auch ihren oxidativen Stoffwechsel im Mitochondrium steigerten und die Funktion der Atmungskette essenziell für ihre Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion ist (Ron-Harel, Santos et al. 2016, Tan, Yang et al. 2017, Bailis, Shyer et al. 2019, Yin und O'Neill 2021).

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 erläutert, findet in der mitochondrialen Matrix der Abbau von Fett- und Aminosäuren statt und die Weiterverarbeitung des aus der Glykolyse stammenden Pyruvats (Shen, Pender et al. 2022). Das hierbei entstandene Acetyl-CoA und α -Ketoglutarat können dann in den Citratzyklus eintreten und letztendlich die oxidative Phosphorylierung antreiben (Martinez-Reyes und Chandel 2020).

2.2.2.1 Anpassung des mitochondrialen Substrat-Metabolismus bei der T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung

Ruhende Immunzellen decken ihren Energiebedarf sowohl durch die Oxidation von Glukose als auch von Amino- und Fettsäuren, deren Abbauprodukte im Mitochondrium den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung antreiben (Zhang, Zink et al. 2020, Chapman und Chi 2022). Der mitochondriale Stoffwechsel von humanen PBL war im ruhenden Zustand vor allem von Glukose und daraus entstandenem Pyruvat abhängig (Ajaz, McPhail et al. 2021). Bei der Aktivierung der T-Zelle wird eine Signalkaskade innerhalb der Zelle ausgelöst, die zu verschiedenen Veränderungen in der Zellstruktur und des Zellmetabolismus, zur klonalen Expansion und letztendlich zur Bildung von spezialisierten T-Zell-Subtypen führt (Chapman und Chi 2022). Zusätzlich zu den immunologischen Signalen üben auch Nährstoffe oder Stoffwechselprodukte eine regulatorische Funktion auf die Immunzellen aus und verschiedene T-Zell-Subtypen können von der Verfügbarkeit verschiedener Nährstoffe abhängig sein (Hu, Xuan et al. 2022). Es konnte

beispielsweise gezeigt werden, dass die Differenzierung muriner CD4⁺-Zellen zu Th1- und Th17-Zellen von Glutamin abhängig war, während die Wegnahme von Glutamin zur Induktion regulatorischer T-Zellen unter Th1- und Th17-Kulturbedingungen führte (Johnson, Wolf et al. 2018). Zudem steigerten murine T-Zellen nach ihrer Aktivierung die Expression von Glutamin-Transportern und die Aufnahme von Glutamin in die Zelle, was essenziell für die Aktivierung muriner und humaner T-Zellen war (Carr, Kelman et al. 2010, Sener, Cederkvist et al. 2016, Johnson, Wolf et al. 2018, Howden, Hukelmann et al. 2019). Eine Studie an humanen PBL zeigte, dass ihr Stoffwechsel nach der Aktivierung eine hohe Abhängigkeit vom Glutamin-Metabolismus hatte und sie für diesen außerdem die höchste Kapazität besaßen (Nicholas, Proctor et al. 2019). Die Abhängigkeit und Kapazität des mitochondrialen Stoffwechsels von Glutamin überstieg hierbei die von Glukose (Nicholas, Proctor et al. 2019). Ebenso wie die Glutaminaufnahme steigerten humane und murine T-Zellen auch die Aufnahme von Glukose (Marchingo und Cantrell 2022). Die erhöhte Glukoseaufnahme wurde mit der vermehrten Expression von GLUT1 in Verbindung gebracht, die bereits früh nach der T-Zell-Aktivierung beobachtet werden konnte (Macintyre, Gerriets et al. 2014). Bereits 2 h nach der Ko-Stimulation mit CD3/CD28 wurde eine erhöhte intrazelluläre GLUT1 Abundanz in murinen T-Zellen gemessen, während eine vermehrte Expression an der Zelloberfläche nach 4 h nachgewiesen wurde (Macintyre, Gerriets et al. 2014). Dabei wurde in einer Vielzahl von Studien gezeigt, dass die aktivierten T-Zellen die aufgenommene Glukose vermehrt im Zytoplasma zu Laktat abbauen, anstatt sie für den mitochondrialen Stoffwechsel zu nutzen (Warburg, Gawehn et al. 1958, Chapman und Chi 2022, Martins Pinto, Paumard et al. 2023). Diese Umlagerung des Glukosemetabolismus hin zur aeroben Glykolyse wird als ein typisches Merkmal schnell proliferierender Zellen gesehen (Warburg, Gawehn et al. 1958, Hu, Xuan et al. 2022).

Auch der Fettsäuremetabolismus nimmt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Effektorfunktion von Immunzellen ein und unterscheidet sich teilweise erheblich zwischen den verschiedenen T-Zell-Linien (Endo, Kanno et al. 2022). Während die Differenzierung von Th17-Zellen stark von der *de novo* Fettsäuresynthese im Zytoplasma abhängig ist, decken regulatorische T-Zellen ihren Energiebedarf vermehrt durch die Fettsäureoxidation im Mitochondrium (Endo, Kanno et al. 2022). Bei der Formation von T-Gedächtniszellen findet ein

metabolischer Wechsel der T-Effektorzellen zurück zur Fettsäureoxidation statt (Endo, Kanno et al. 2022). In humanen CD4⁺-Zellen wiesen an der Fettsäuresynthese beteiligte Proteine nach der Aktivierung eine erhöhte Abundanz auf (Gerner, Niederstaetter et al. 2019), während die für die Fettsäureoxidation benötigten Proteine eine verminderte Abundanz zeigten (Ron-Harel, Santos et al. 2016).

In den peripheren Immunzellen von Pferden mit ERU wurde bereits ein veränderter Glukosemetabolismus und eine erhöhte oxidative Phosphorylierung festgestellt (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). In dieser Studie zeichneten sich die PBL von an ERU erkrankten Pferden unter anderem durch eine erhöhte aerobe Glykolyse aus, die in der CD4⁺-Fraktion jedoch erniedrigt war (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Sowohl in den PBL als auch bei der gesonderten Betrachtung der CD4⁺-Fraktion konnte eine erhöhte kompensatorische aerobe Glykolyse bei an ERU erkrankten Tieren nachgewiesen werden, wenn die oxidative Phosphorylierung durch Oligomycin blockiert war (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Dabei wurde jedoch nicht untersucht, ob Veränderungen im mitochondrialen Glukosemetabolismus vorliegen, die bei der Blockierung der Atmungskette die erhöhte kompensatorische aerobe Glykolyse erklären könnten. Auch der Glutamin- und Fettsäuremetabolismus bleiben nach aktueller Literaturrecherche sowohl im Rahmen der ERU als auch bei equinen Immunzellen noch unbeschrieben (Stand: März 2023).

2.2.2.2 Der Citratzyklus

Die Abbauprodukte aus Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Fettsäureabbau werden letztendlich im Citratzyklus zusammengeführt und dieser liefert wiederum wichtige Vorstufen für verschiedene Biosynthesen (Martinez-Reyes und Chandel 2020). Er besteht aus einer Reihe von Umwandlungs-Reaktionen, die in der mitochondrialen Matrix stattfinden (Shen, Pender et al. 2022). Hierbei werden im Wesentlichen eingeführte Acetylgruppen zu CO₂ oxidiert, wobei die energiereichen Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ entstehen (Martinez-Reyes und Chandel 2020). NADH und FADH₂ können ihre Elektronen dann an die Komplexe der Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran abgeben (Shen, Pender et al. 2022).

2.2.2.3 Die Atmungskette

Die Atmungskette besteht aus fünf in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Enzymkomplexen (Yin und O'Neill 2021). Die Komplexe I bis IV gehören der Elektronentransportkette an und pumpen Protonen in den Intermembranraum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran (Yin und O'Neill 2021). Die Elektronen werden von der im Citratzyklus sowie in der Fettsäureoxidation und weiteren oxidativen zellulären Reaktionen entstandenen Reduktionsäquivalente NADH an Komplex I oder FADH₂ an Komplex II abgegeben (Yin und O'Neill 2021). Diese Elektronen werden über Komplex III auf Komplex IV weitergegeben und dort auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch dieser zu Wasser reduziert wird (Yin und O'Neill 2021). An der Elektronentransportkette sind zusätzlich zu den Komplexen I bis IV noch die beiden Elektronentransporter Coenzym Q und Cytochrom C beteiligt (Yin und O'Neill 2021). Der Komplex V, auch ATP-Synthase genannt, nutzt den durch die Komplexe I bis IV aufgebauten elektrochemischen Gradienten, der auch als mitochondriales Membranpotential bezeichnet wird, um ATP zu erzeugen (Yin und O'Neill 2021). Nach der Entdeckung, dass Cytochrom C ein treibender Faktor bei der Apoptose ist (Liu, Kim et al. 1996), wurde die Beteiligung der Proteine der Elektronentransportkette an anderen zellulären Funktionen als dem Aufbau eines Protonengradienten für die ATP-Erzeugung deutlich und ist seitdem Gegenstand umfangreicher Forschung (Yin und O'Neill 2021).

Die einzelnen Komplexe der Atmungskette nehmen hierbei spezifische Funktionen ein, die unabhängig von deren Beitrag zur ATP-Erzeugung, jedoch abhängig vom Aktivierungsstatus und dem Subtyp der T-Zellen sein können (Bailis, Shyer et al. 2019, Almeida, Dhillon-LaBrooy Hons et al. 2021, Yin und O'Neill 2021). Komplex I, auch als NADH-Dehydrogenase bezeichnet, nimmt die Elektronen aus NADH auf und überträgt sie auf das Coenzym Q, wobei vier Protonen in den Intermembranraum gepumpt werden und die oxidative Phosphorylierung antreiben (Yin und O'Neill 2021). Hierbei wird NAD⁺ regeneriert, welches beispielweise nötig ist, um die Verfügbarkeit von Aspartat im Zytoplasma und den Umsatz von Metaboliten im Citratzyklus zu gewährleisten (Sullivan, Gui et al. 2015, Yin und O'Neill 2021). Komplex II, auch Succinat-Dehydrogenase genannt, nimmt hingegen die Elektronen aus FADH₂ auf und überträgt sie auf Coenzym Q in einem an die Oxidation von Succinat zu Fumarat gekoppelten Prozess (Bennett, Latorre-Muro et

al. 2022). Komplex II stellt damit eine Schnittstelle zwischen der Atmungskette und dem Citratzyklus dar (Yin und O'Neill 2021). Die Aktivität von Komplex II ist somit auch an den Umsatz von Metaboliten im Citratzyklus gekoppelt und eine geringere Aktivität kann zur Akkumulation von vorgeschalteten Metaboliten führen und andersherum (Almeida, Dhillon-LaBrooy Hons et al. 2021). Die Aktivität von Komplex I wurde in murinen T-Zellen mit deren früher Aktivierung und Proliferation in Verbindung gebracht (Bailis, Shyer et al. 2019). Die Inhibierung von Komplex I mit Rotenon in murinen CD4⁺-Zellen an Tag 2 nach der Ko-Stimulation mit CD3/CD28 führte zu einer verminderten Teilungsrate, sowohl unter Th1- als auch Th2- und Th17-Kulturbedingungen (Bailis, Shyer et al. 2019). Derselbe Effekt konnte bei der Hemmung von Komplex III durch Antimycin A aufgezeigt werden (Bailis, Shyer et al. 2019). Interessanterweise konnte der antiproliferative Effekt von Rotenon auf die murinen Th1-Zellen durch die Supplementierung mit exogenem Aspartat aufgehoben werden, wodurch deutlich wurde, dass der Beitrag von Komplex I zur Aktivität des Malat-Aspartat Shuttle und nicht die Funktion von Komplex I bei der oxidativen Phosphorylierung entscheidend für die Proliferation war (Bailis, Shyer et al. 2019). Eine Inhibierung von Komplex I an Tag 4 nach der Stimulation muriner CD4⁺-Zellen unter Th1-Kulturbedingungen zeigte dagegen keinen Einfluss auf deren IFN γ -Produktion, wodurch geschlossen wurde, dass Komplex I wichtig für die Aktivierung der Th1-Zellen, nicht jedoch für die Ausführung ihrer Effektorfunktionen ist (Bailis, Shyer et al. 2019). Im Gegensatz dazu nahm die Inhibierung von Komplex II in murinen CD4⁺-Zellen unter Th1- und Th17-Kulturbedingungen keinen Einfluss auf deren proliferative Eigenschaften, konnte jedoch die IFN γ - und IL17-Produktion der Zellen signifikant reduzieren (Bailis, Shyer et al. 2019, Almeida, Dhillon-LaBrooy Hons et al. 2021). Diese Ergebnisse unterstützen ein Modell, in dem der Malat-Aspartat-Shuttle, der mitochondriale Citratexport und Komplex I die Substrate liefern, die für den Aufbau von Biomasse während der Proliferation und den epigenetischen Umbau in der Frühphase der T-Zell-Aktivierung benötigt werden, während Komplex II die Substrate dieser Wege verbraucht, was der Differenzierung entgegenwirkt und die terminale Th1- und Th17-Effektorfunktion verstärkt (Bailis, Shyer et al. 2019). Durch den Zusammenhang zwischen Komplex I und II und Metaboliten des Citratzyklus ist die Aktivität der Atmungskette mit epigenetischen Modifikationen verbunden und kann somit indirekt Einfluss auf die Transkription von Genen haben

(Almeida, Dhillon-LaBrooy Hons et al. 2021). Die Komplexe I, II und III sind darüber hinaus die Hauptquelle für mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Yin und O'Neill 2021). ROS sind wichtige Signalmoleküle in Immunzellen und spielen eine Rolle bei der T-Zell-Aktivierung und Differenzierung (Peng, Lucavs et al. 2021). Komplex IV, auch als Cytochrom-c-Oxidase bezeichnet, ist der letzte Komplex der Elektronentransportkette und überträgt die Elektronen von Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff (Yin und O'Neill 2021). Dabei werden 4 Protonen in den Intermembranraum gepumpt (Yin und O'Neill 2021). Komplex IV übernimmt darüber hinaus eine Funktion bei der Aktivierung, Differenzierung und der Apoptose von T-Zellen (Schull, Gunther et al. 2015, Tan, Yang et al. 2017, Yin und O'Neill 2021). Die Beteiligung von Komplex IV bei der Aktivierung von murinen T-Zellen zeigte sich durch eine vermehrte Abundanz von Komplex IV Proteinen (Tan, Yang et al. 2017) und eine vermehrte Aktivität des Komplexes in Reaktion auf den Komplex IV-spezifischen Elektronendonator Tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) 24 Stunden (h) nach der Aktivierung durch Ko-Stimulation mit CD3/CD28 (Tarasenko, Pacheco et al. 2017). Der T-Zellen-spezifische Knock-Out der strukturellen Untereinheit „Cytochrom-c-Oxidase 10“ (COX10) in Mäusen führte zu einer Beeinträchtigung ihrer Aktivierung und vermehrten Apoptose *in vitro* (Tarasenko, Pacheco et al. 2017). Dabei beeinträchtigte die COX10-Defizienz die Differenzierung muriner CD4⁺-Zellen zu Th1-Zellen, nicht jedoch zu regulatorischen T-Zellen, was wiederum die spezifische Beteiligung einzelner Atmungskettenkomplexe an der Differenzierung der Th-Zellen in ihre Subtypen unterstreicht (Tan, Yang et al. 2017, Tarasenko, Pacheco et al. 2017).

Eine erhöhte oxidative Phosphorylierung in den PBL und deren CD4⁺-Fraktion wurde auch bei an ERU erkrankten Pferden festgestellt (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Interessanterweise wiesen die CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden trotz einer erhöhten Sauerstoffverbrauchsrate eine verminderte ATP-verknüpfte Respiration auf, was auf eine vermehrte Aktivität der Atmungskette unabhängig von der ATP-Produktion hinwies (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Durch diese Studie wurde ein erster Zusammenhang zwischen einem veränderten mitochondrialen Metabolismus und der Pathogenese der ERU hergestellt (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021), jedoch bleiben die zugrundeliegenden Mechanismen noch ungeklärt und die Beteiligung einzelner Atmungskettenkomplexe an der erhöhten Sauerstoffverbrauchsrate wurden noch

nicht untersucht. Auch bei der nicht-infektiösen Uveitis des Menschen und der experimentellen autoimmunen Uveitis wurde der mitochondriale Stoffwechsel der peripheren Immunzellen noch nicht untersucht (Stand der PubMed Literaturrecherche: März 2023). Obwohl auch in anderen Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, der rheumatoiden Arthritis und dem systemischen Lupus Erythematodes, eine veränderte Aktivität der Atmungskette und eine beeinträchtigte Funktion der Mitochondrien als Kernelemente der Pathogenese angesehen werden (Clayton, MacDonald et al. 2021, Zhao, Hu et al. 2022), liegen bisher kaum spezielle Untersuchungen der einzelnen Komplexe der Atmungskette vor (Stand der PubMed Literaturrecherche: März 2023).

2.2.3 Respirometrische Messung des Immunzellmetabolismus

Die Messung der respiratorischen Aktivität von Immunzellen über deren Sauerstoffverbrauchsrate (*engl.* oxygen consumption rate, OCR) ist ein wichtiges und wirkungsvolles Verfahren bei der Untersuchung des Immunzellmetabolismus und findet eine breite Anwendung in der Forschung (Jones, Sheng et al. 2021). Die Erzeugung von ATP durch den oxidativen Stoffwechsel im Mitochondrium der Zellen ist gekoppelt an die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser durch Komplex IV der Elektronentransportkette (Yin und O'Neill 2021). Dies bietet die Möglichkeit, über die Messung des Sauerstoffverbrauchs Rückschlüsse auf die Aktivität der Atmungskette zu ziehen (Buck, O'Sullivan et al. 2016). Der Seahorse XF Analyzer von Agilent bietet beispielsweise ein geschlossenes System, in dem der Sauerstoffverbrauch im Zellkulturmedium in bestimmten Intervallen über einen gesetzten Zeitrahmen gemessen werden kann (Divakaruni, Rogers et al. 2014). So kann die zelluläre Stoffwechselaktivität lebender Zellen und ihre Reaktion auf verschiedene Stimuli in Echtzeit bestimmt werden (Jones, Sheng et al. 2021). Abhängig von der Fragestellung kann in diesem System sowohl die mitochondriale Aktivität in intakten PBL gemessen werden als auch die Nutzung verschiedener Substrate durch die Mitochondrien unabhängig von zytoplasmatischen Vorgängen untersucht werden (Divakaruni und Jastroch 2022).

2.2.3.1 Messung der Substratoxidation in intakten Zellen

Durch den Einsatz von Inhibitoren, die den Import spezifischer Substrate ins Mitochondrium oder deren Weiterverarbeitung im Mitochondrium blockieren, können Rückschlüsse auf die Abhängigkeit und Kapazität für das jeweilige Substrat gezogen werden (Voss, Hong et al. 2021). Wenn die Zellen nicht in der Lage sind, die Blockierung eines Substrates durch die Oxidation anderer Substrate auszugleichen, bedeutet das eine Abhängigkeit von dem blockierten Substrat (Martin und McGee 2019). Die Kapazität beschreibt hingegen, wie viel ihres Energiebedarfs die Zellen maximal durch ein Substrat decken können, wenn die Alternativen blockiert sind (Martin und McGee 2019). Die Differenz aus Kapazität und Abhängigkeit beschreibt damit die Fähigkeit der Zellen, die Inhibierung eines Stoffwechselweges zu kompensieren und damit die metabolische Flexibilität der Zellen (Ajaz, McPhail et al. 2021).

2.2.3.2 Messung der Substratoxidation direkt am Mitochondrium

Durch die Auswahl spezifischer Substrate, die den Mitochondrien direkt und exklusiv zur Verfügung gestellt werden, ist es möglich, Rückschlüsse auf die Aktivität einzelner Komplexe der Atmungskette zu ziehen (Salabei, Gibb et al. 2014). Wird den Mitochondrien Pyruvat zur Verfügung gestellt und dieses als Acetyl-CoA im Citratzyklus oxidiert, kommt es zur Reduktion von NAD^+ zu NADH, welches wiederum seine Elektronen an Komplex I der Atmungskette abgibt (Yin und O'Neill 2021). Dadurch spiegelt die Pyruvat-medierte Sauerstoffverbrauchsrate indirekt die Komplex I Aktivität wider (Salabei, Gibb et al. 2014). Succinat hingegen führt zur Abgabe der Elektronen an Komplex II und kann daher zur Beurteilung von dessen Aktivität herangezogen werden (Salabei, Gibb et al. 2014). Die selektive Permeabilisierung der Plasmamembran ohne Beschädigung der Mitochondrienmembran bietet eine Möglichkeit, zielgerichtet die Oxidation spezifischer Substrate durch die Mitochondrien zu beurteilen (Divakaruni und Jastroch 2022). Dabei bietet sich im Gegenzug zur Untersuchung von isolierten Mitochondrien der Vorteil, dass die strukturelle und funktionale Integrität der Mitochondrien beibehalten wird (Salabei, Gibb et al. 2014). Bei der Untersuchung der respiratorischen Aktivität von Mitochondrien können verschiedene Stadien beurteilt werden. Diese Stadien wurden ursprünglich für isolierte Mitochondrien

beschrieben, können aber genauso bei der Messung der Sauerstoffverbrauchsrate in permeabilisierten Zellen angewandt werden (Chance und Williams 1956, Salabei, Gibb et al. 2014). Die gemessene Sauerstoffverbrauchsrate der Mitochondrien, wenn nur Sauerstoff und anorganisches Phosphat, jedoch weder Adenosindiphosphat (ADP) noch Substrate anwesend sind, wird als Stadium 1 bezeichnet (Salabei, Gibb et al. 2014). Das Stadium 2 beschreibt die Sauerstoffverbrauchsrate, wenn Substrate, aber kein ADP zur Verfügung stehen und wird auch als ADP-unabhängige Respiration bezeichnet (Salabei, Gibb et al. 2014). Die mitochondriale Respiration in Anwesenheit von Substrat und ADP wird als Stadium 3 bezeichnet (Salabei, Gibb et al. 2014). Sobald das gesamte ADP durch Phosphorylierung zu ATP verbraucht wurde, kehren die Mitochondrien in ein Stadium zurück, das dem Stadium 2 ähnlich ist und Stadium 4 genannt wird (Salabei, Gibb et al. 2014). Unter experimentellen Bedingungen kann das Stadium 4 auch durch die Inhibierung der ATP-Synthase mit Oligomycin erreicht werden und wird hier als Stadium 4_{Oligomycin} (Stadium 4_o) bezeichnet (Salabei, Gibb et al. 2014). Das Stadium 4 bzw. das Stadium 4_o entspricht im Wesentlichen dem Protonenleck der Mitochondrien und damit dem von der ATP-Erzeugung unabhängigen Rückfluss von Protonen in die mitochondriale Matrix (Nicholls 2021). Anhand des Stadiums 3 kann die Kapazität der Atmungskette, ein zur Verfügung gestelltes Substrat zu nutzen, beurteilt werden (Nicholls 2021).

Während die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate den Vorteil bringt, die Stoffwechseleigenschaften lebender Zellen in Echtzeit zu messen, wird sie dadurch limitiert, dass die Anwendung in der Regel auf den Einsatz verschiedener Inhibitoren unter unphysiologischen Konditionen angewiesen ist (Jones, Sheng et al. 2021). Zudem kann jeweils nur ein einzelner Aspekt des Stoffwechsels untersucht werden (Jones, Sheng et al. 2021). Daher kann die Kombination der respirometrischen Messung mit anderen Analysemethoden, wie beispielsweise der differenziellen Proteomanalyse, zu einer vollständigeren Erfassung des mitochondrialen Metabolismus beitragen (Jones, Sheng et al. 2021).

2.3 Differentielle Proteomanalyse

Unter dem Begriff des Proteoms versteht man die Gesamtheit der vorliegenden Proteine innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen (Wilkins, Pasquali et al. 1996). Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom hoch dynamisch (Bludau und Aebersold 2020). In Abhängigkeit von extrinsischen und intrinsischen Faktoren exprimieren Zellen verschiedene Proteine oder eine unterschiedliche Quantität an Proteinen, die durch posttranslationale Modifikationen und alternatives Spleißen weiter verändert werden können (Bludau und Aebersold 2020). Mit Hilfe der differentiellen Proteomanalyse können diese quantitativen Veränderungen der Proteine bestimmt werden und anschließend kann zwischen verschiedenen Zuständen, wie beispielsweise gesund und krank, verglichen werden (Suhre, McCarthy et al. 2021). Dies ermöglicht sowohl Einblicke in physiologische Prozesse als auch in Pathogenese-assoziierte Mechanismen (Suhre, McCarthy et al. 2021).

Die Massenspektrometrie mit Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (*engl.* liquid-chromatography-massspectrometry/massspectrometry, LC-MS/MS) bietet ein wertvolles Analyseinstrument für die hochauflösende Bestimmung eines Proteoms (Rozanova, Barkovits et al. 2021).

2.3.1 LC-MS/MS

Das Grundprinzip der Massenspektrometrie basiert auf der Ionisierung von Peptiden und ihrer Auftrennung anhand des Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) mit dem anschließenden Nachweis dieser Ionen (Rozanova, Barkovits et al. 2021). Die am weitesten verbreitete Technik für proteomweite Studien ist die Bottom-up-Proteomik (Bludau, Frank et al. 2021). Hierbei werden die Proteine zunächst enzymatisch in kleinere Peptide aufgespalten und anschließend durch die Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt, ionisiert und im Massenanalysator gemessen (Bludau, Frank et al. 2021). Die Ionisierung der Proteine bzw. Peptide in der Probe erfolgt am häufigsten durch die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) oder die Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Rozanova, Barkovits et al. 2021). Bei der MS/MS, auch als Tandem-MS bezeichnet, sind zwei Masseanalysatoren hintereinander geschaltet (Rozanova, Barkovits et al. 2021). In

dem ersten dieser Analysatoren werden in der Regel Vorläuferionen isoliert, die anschließend in einer Kollisionszelle fragmentiert werden, und im zweiten Analysator werden wiederum die Fragmentspektren gemessen (Bludau, Frank et al. 2021). Erfolgt die Fragmentierung der Vorläuferionen unabhängig von der ersten Messung, spricht man von datenunabhängiger Akquisition (*engl.* data independent acquisition; DIA) (Suhre, McCarthy et al. 2021). Bei der datenabhängigen Analyse (*engl.* data dependent acquisition; DDA) werden hingegen die intensivsten Vorläuferionen für die Messung der Fragmentspektren ausgewählt (Suhre, McCarthy et al. 2021). Für die Messung des m/z der ionisierten Peptide werden verschiedene Massenspektrometer, wie die Ionenfalle, Quadrupols oder time-of-flight Analysatoren eingesetzt (Rozanova, Barkovits et al. 2021). Die Detektion der Massenspektren erfolgt letztendlich durch die Messung der Ionenanzahl pro m/z -Wert (Aebersold und Mann 2003).

Der Abgleich der Massenspektren mit speziellen Proteinsequenzdatenbanken ermöglicht letztendlich die Identifikation der ursprünglich in der Probe enthaltenen Proteine. Für die Quantifizierung der Proteine unterscheidet man Methoden, bei denen eine Markierung mit stabilen Isotopen notwendig ist und sogenannte Label-freie Methoden (Rozanova, Barkovits et al. 2021). Die Label-freien Messtechniken basieren darauf, die Abundanzen der einzelnen Peptide eines Proteins zusammenzufassen und zu normalisieren, um die Gesamtabundanz dieses Proteins zu errechnen (Rozanova, Barkovits et al. 2021).

2.3.2 Das mitochondriale Proteom

Eine Besonderheit der Mitochondrien ist, dass sie auch eigene, Protein-kodierende DNA besitzen (Wang, Zhang et al. 2021). Das equine mitochondriale Genom wurde bereits in den 90er Jahren vollständig sequenziert und es wurden 13 Protein-kodierende Gene identifiziert, die ebenfalls bei Mensch, Maus, Rind, Ratte und vielen weiteren Säugetieren gefunden wurden (Xu und Arnason 1994, Dziegielewska und Dunislawaska 2022). Bei diesen 13 mitochondrial kodierten Proteinen handelt es sich ausschließlich um Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (Wang, Zhang et al. 2021). Die restlichen mitochondrialen Proteine werden von nukleärer DNA kodiert und in anderen Zellkompartimenten

gebildet, um dann zum Mitochondrium transportiert zu werden (Morgenstern, Peikert et al. 2021).

Da die subzelluläre Lokalisation eines Proteins und seine Interaktion mit anderen Proteinen einen großen Einfluss auf die ausgeübte Funktion haben können, ohne dabei ihre Abundanz in der Gesamtzelle zu verändern, kommt den sogenannten „Spatial Proteomics“, die sich mit der räumlichen Organisation der Proteine innerhalb einer Zelle und ihrer Zuordnung zu den Zellorganellen beschäftigen, eine besondere Bedeutung zu (Lundberg und Borner 2019, Cho, Cheveralls et al. 2022). Für die Untersuchung dieser subzellulären Lokalisationen werden im Allgemeinen drei komplementäre Ansätze verwendet: Die massenspektrometrische Analyse fraktionierter Organellen, die computergestützte Analyse von Interaktionsnetzwerken und die Mikroskopie (Lundberg und Borner 2019). Dabei hat jede Technik ihre Stärken und Schwächen (Lundberg und Borner 2019). Während die massenspektrometrische Analyse einen hohen Durchsatz ermöglicht und äußerst sensitiv ist, hat die Mikroskopie eine deutlich höhere Spezifität – vorausgesetzt es stehen die entsprechenden spezifischen Antikörper zu Verfügung (Lundberg und Borner 2019). Insbesondere beim Menschen und bei Mäusen wurden systematische Untersuchungen zur Proteinlokalisierung innerhalb verschiedener Zellen unternommen (Morgenstern, Stiller et al. 2017, Thul, Akesson et al. 2017, Morgenstern, Peikert et al. 2021, Rath, Sharma et al. 2021). Eine groß angelegte Fluoreszenzmikroskopie-basierte Studie untersuchte die räumliche Lokalisation von 12.003 Proteinen in 22 verschiedenen humanen Zelllinien (Thul, Akesson et al. 2017). Hierbei konnte für 1070 der Proteine eine mitochondriale Lokalisation aufgezeigt und in den „Human Cell Atlas“ (<https://www.humancellatlas.org/>) integriert werden (Thul, Akesson et al. 2017). In dieser Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass fast die Hälfte der mitochondrialen Proteine in mindestens einer weiteren zellulären Lokalisation vorkamen (Thul, Akesson et al. 2017). Eine weitere besonders umfangreiche Studie, die darauf abzielte, ein experimentell gestütztes Verzeichnis des mitochondrialen Proteoms von Säugetieren zu erstellen, ergab ebenfalls eine mitochondriale Lokalisation bei über tausend Proteinen, welche als MitoCarta-Datenbank zusammengestellt wurden (Pagliarini, Calvo et al. 2008).

2.3.2.1 MitoCarta-Datenbank

Für die Erstellung der MitoCarta-Datenbank kam eine Kombination verschiedener Methoden zum Einsatz, um ein möglichst verlässliches Inventar der Mitochondrien zusammenzustellen (Pagliarini, Calvo et al. 2008). Es wurde eine massenspektrometrische Proteomanalyse der isolierten Mitochondrien aus 14 verschiedenen primären murinen Geweben durchgeführt, die Proteinlokalisierung einiger Proteine durch groß angelegte mikroskopische Untersuchungen bewertet und diese Ergebnisse wurden in sechs andere genomweite Datensätze zur mitochondrialen Lokalisierung unter Anwendung des Satzes von Bayes integriert (Pagliarini, Calvo et al. 2008). Für jedes humane und murine Gen wurde ein kombinierter Bayes-Wert berechnet, der mit der experimentellen Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen mitochondrialen Lokalisation korreliert und für jedes Protein einsehbar ist (Pagliarini, Calvo et al. 2008). Die letzte Überarbeitung der Datenbank, veröffentlicht im Jahr 2020, nutzte zudem den manuellen Literaturabgleich, um das vorherige Inventar zu überarbeiten (Rath, Sharma et al. 2021). Im Ergebnis umfasst die MitoCarta3.0-Datenbank (<https://www.broadinstitute.org/mitocarta/mitocarta30-inventory-mammalian-mitochondrial-proteins-and-pathways>) 1136 menschliche und 1140 murine Gene, die mit einer FDR von weniger als 5% eine mitochondriale Lokalisation aufweisen (Rath, Sharma et al. 2021).

Nicht alle von diesen Genen kodierten Proteine wurden in allen 14 Geweben gefunden (Pagliarini, Calvo et al. 2008). Nur etwa ein Drittel der Proteine kam in allen Geweben vor, während etwa 15% der Proteine gewebespezifisch waren (Pagliarini, Calvo et al. 2008, Delgado de la Herran, Cheng et al. 2021). Pro Gewebe belief sich die Zahl identifizierter mitochondrialer Proteine auf minimal 554 und maximal 797 (Pagliarini, Calvo et al. 2008). Die Autoren selbst räumen ein, dass dieses Verzeichnis mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht vollständig ist und insbesondere etwa Proteine, die nur in gewissen physiologischen oder pathologischen Zuständen ins Mitochondrium transportiert werden oder nur in äußerst spezialisierten Zellen vorkommen, möglicherweise nicht erfasst wurden (Pagliarini, Calvo et al. 2008, Rath, Sharma et al. 2021). Diese Limitation wurde durch den manuellen Literaturabgleich bereits teilweise aufgehoben, da hierdurch auch Proteine aus anderen Studien in die Datenbank aufgenommen wurden, solange mehrere qualitativ hochwertige experimentelle Belege für mitochondriale Lokalisation vorlagen (Rath, Sharma et al. 2021).

Eine systematische Charakterisierung des mitochondrialen Proteoms bei Pferden wurde noch nicht vorgenommen, sodass für die Zuordnung equiner Proteine zum Mitochondrium aktuell humane oder murine Datenbanken herangezogen werden müssen (Stand der PubMed Literaturrecherche: März 2023).

2.3.2.2 Das mitochondriale Proteom von T-Zellen und dessen Anpassung bei Aktivierung

Auch das mitochondriale Proteom in primären T-Zellen wurde noch nicht in umfangreichem Maße definiert, sondern lediglich die mitochondriale Lokalisation von einigen Proteinen durch Einzelnachweise mit mikroskopischen Verfahren bewiesen (Joshi, Stadler et al. 2019, Suomi und Elo 2022).

An murinen T-Zellen wurden jedoch verschiedene Studien durchgeführt, die auf der massenspektrometrischen Analyse des Gesamtproteoms und dem nachfolgenden Abgleich mit einer Datenbank basierten (Ron-Harel, Santos et al. 2016, Howden, Hukelmann et al. 2019, Suomi und Elo 2022). So konnten in einer Studie 552 in der MitoCarta-Datenbank als mitochondrial klassifizierte Proteine in murinen T-Zellen nachgewiesen werden (Ron-Harel, Santos et al. 2016). In diesen Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Anpassung des mitochondrialen Stoffwechsels von T-Zellen bei der Aktivierung mit fundamentalen Veränderungen ihres mitochondrialen Proteoms einhergeht (Ron-Harel, Santos et al. 2016, Tan, Yang et al. 2017, Marchingo und Cantrell 2022). So machten die mitochondrialen Proteine 24 h nach der Aktivierung muriner CD4⁺-Zellen *in vitro* einen größeren Anteil am Gesamtproteingehalt aus (Howden, Hukelmann et al. 2019). Dabei konnte eine erhöhte Expression nahezu aller mitochondrialen Proteine nach der Aktivierung beobachtet werden; diese Induktion geschah jedoch in einem unterschiedlichen Umfang (Ron-Harel, Santos et al. 2016, Marchingo und Cantrell 2022). Während manche Proteine ihre Abundanz nur etwa verdoppelten, zeigten andere eine 200-fache Steigerung 24 h nach der Ko-Stimulation mit CD3/CD28 muriner CD4⁺-Zellen *in vitro* (Ron-Harel, Santos et al. 2016). Dabei waren Proteine, die am Ein-Kohlenstoff-Metabolismus beteiligt sind, unter den am stärksten induzierten Proteinen, während Proteine, die der Fettsäureoxidation zuzuordnen sind, im Verhältnis zur Zunahme der Mitochondrienmasse der Zelle unterrepräsentiert waren (Ron-Harel, Santos et al. 2016). Proteine der oxidativen Phosphorylierung

und des Citratzyklus wurden etwa proportional zur Mitochondrienmasse induziert (Ron-Harel, Santos et al. 2016). Dies spiegelt im Wesentlichen den mit der Aktivierung der T-Zellen einhergehenden metabolischen Wechsel wieder (Ron-Harel, Santos et al. 2016). Der Fettsäuremetabolismus wechselt von der Oxidation hin zur vermehrten Synthese, was sich in einem geringeren Anteil von an der β -Oxidation beteiligten Proteinen zeigt, und die Induktion des Ein-Kohlenstoff-Metabolismus ist notwendig, um die Biosynthese verschiedener Schüsselmoleküle des Stoffwechsels zu ermöglichen (Ron-Harel, Santos et al. 2016, Kurniawan, Kobayashi et al. 2021). Der Anstieg des oxidativen Stoffwechsels war mit einer Induktion der beteiligten Proteine verbunden (Ron-Harel, Santos et al. 2016). Einzelne Proteine der Atmungskette können dabei eine wichtige funktionelle Rolle bei der T-Zell-Aktivierung, Differenzierung und deren Effektorfunktionen spielen (Tan, Yang et al. 2017). Beispielsweise wurde eine erhöhte Abundanz des dem Komplex IV angehörigen Proteins COX10 in murinen T-Zellen nach der Aktivierung nachgewiesen (Tan, Yang et al. 2017). In weiterführenden Versuchen wurde gezeigt, dass die CD4⁺-Zellen von Mäusen mit einem T-Zell-spezifischen COX10-Knock-Out eine verminderte Sauerstoffverbrauchs- und Proliferationsrate und eine erhöhte Apoptose nach der Ko-Stimulation mit CD3/CD28 aufwiesen, was für eine Beteiligung des Komplex IV am Austritt aus der Ruhephase und einer schützenden Funktion vor der Apoptose der T-Zellen spricht. Zudem zeigten die CD4⁺-Zellen der COX10-KO Mäuse nach der Stimulation *ex vivo* eine verminderte IFN γ -Produktion, während die IL-17 und IL-2 Produktion unverändert war (Tan, Yang et al. 2017). Die Veränderungen des mitochondrialen Proteinprofils sind also im Wesentlichen mit den metabolischen Anforderungen der T-Zellen verbunden und können deren metabolischen Status widerspiegeln (Ron-Harel, Santos et al. 2016, Tan, Yang et al. 2017, Marchingo und Cantrell 2022). Dabei kann die differentielle Abundanz einzelner Proteine Rückschlüsse auf spezifische Effektorfunktionen zulassen und den Gesamtmetabolismus der Zelle beeinflussen (Tan, Yang et al. 2017).

Im Rahmen der ERU wurde das mitochondriale Proteom der T-Zellen noch nicht untersucht und auch bei der humanen autoimmunen Uveitis sowie der experimentellen autoimmunen Uveitis lagen nach aktueller Literaturrecherche noch keine Studien dazu vor (Stand: März 2023).

Bei der Untersuchung des differentiellen Proteoms isolierter Mitochondrien der PBL von gesunden und an rheumatoider Arthritis erkrankten Personen wurden

vermindert abundante Proteine aufgezeigt, die der Elektronentransportkette und der oxidativen Phosphorylierung zuzuordnen waren (Khanna, Padhan et al. 2020). Dabei konnte die verminderte Abundanz von Untereinheiten der Komplexe I, II und IV der Elektronentransportkette funktionell mit einem verminderten Membranpotential und einer verminderten ROS-Produktion in Verbindung gebracht werden (Khanna, Padhan et al. 2020). Die PBL von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten zeigten in anderen Studien eine verminderte Sauerstoffverbrauchsrate, die sich durch die verminderte Proteinabundanz erklären ließe (Khanna, Padhan et al. 2020, Clayton, MacDonald et al. 2021).

Dies zeigt, wie die Untersuchung des mitochondrialen Proteoms dazu beitragen kann, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen veränderter Stoffwechseleigenschaften zu verstehen und macht die Untersuchung des differentiellen Proteoms der CD4⁺-Zellen bei an ERU-erkrankten Pferden, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, besonders interessant.

2.4 Super-Resolution Mikroskopie

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits angesprochen, kann die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle einen Einfluss auf ihre Funktion haben (Cho, Cheveralls et al. 2022). Ein Beispiel hierfür ist das „Dynamamin-related protein 1“ (Drp1), welches sich in seiner inaktivierten Form im Zytoplasma befindet (Song, Yi et al. 2022). Wenn Drp1 durch andere Proteine aktiviert wird, wird es in großem Umfang zur äußeren Mitochondrienmembran rekrutiert, wo es eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Fragmentierung einnimmt (Song, Yi et al. 2022). Die Fragmentierung hat wiederum einen Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien und damit auf den Gesamtmetabolismus der Zelle (Song, Yi et al. 2022). Somit ist die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen unter bestimmten physiologischen und pathologischen Zuständen von großem Interesse (Lundberg und Borner 2019). Aufgrund der klassischen Beugungsgrenze lichtmikroskopischer Verfahren stellte die detailreiche Darstellung der mitochondrialen Strukturen jedoch eine große Herausforderung dar (Yang, Yang et al. 2020). Die Entwicklung neuer hochauflösender fluoreszenzmikroskopischer Methoden ermöglichte es, diese klassische Beugungsgrenze der Lichtmikroskopie zu durchbrechen (Wu, Luo et al. 2023). Zu diesen unter dem Begriff der „Super-Resolution Mikroskopie“

zusammengenommenen Techniken gehört auch die „direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy“ (dSTORM), die eine Bildauflösung von etwa 20 nm zulässt (Rust, Bates et al. 2006, Heilemann, van de Linde et al. 2008). Die Technik des dSTORM ermöglicht die genaue Lokalisation einzelner Moleküle, die zusammengesetzt ein hochauflösendes Bild ergeben (Scalisi, Pisignano et al. 2023). Hierfür ist die Fähigkeit gewisser Fluorophore essenziell, zwischen einem dunklen und einem hellen Stadium zu wechseln (Heilemann, van de Linde et al. 2008, Platzer, Rossboth et al. 2020). Unter den richtigen chemischen und anregenden Bedingungen wechseln die Fluorophore rein zufällig zwischen dem Dunkel- und dem Hellzustand, woraus eine Art asynchrones Blinken resultiert (Scalisi, Pisignano et al. 2023). Es kann davon ausgegangen werden, dass dieses Aufleuchten einzelner gebundener Fluorophore jeweils von einem isolierten Molekül stammt, da die Wahrscheinlichkeit, dass unter den richtigen Bedingungen zwei benachbarte Moleküle genau gleichzeitig Licht emittieren, äußerst gering ist (Nino, Rafiei et al. 2017). Die Position jedes Aufleuchtens, und damit die Position jedes Moleküls, wird genau lokalisiert und aufgezeichnet, bis sich ein hochaufgelöstes Gesamtbild ergibt (Scalisi, Pisignano et al. 2023).

Diese Technik ermöglichte die Darstellung der 3D-Struktur des mitochondrialen Netzwerkes in einer Nierenzelllinie (Huang, Jones et al. 2008) und die Untersuchung der Anordnung verschiedener Komplexe in der inneren Mitochondrienmembran von HeLa-Zellen (Palmer, Lou et al. 2021). Sie stellt damit eine wertvolle Möglichkeit dar, die Lokalisation einzelner Proteine im Mitochondrium zu betrachten (Palmer, Lou et al. 2021) und kann damit die aus der Proteomanalyse gewonnen Erkenntnisse ergänzen. Es wurden jedoch keine Veröffentlichungen gefunden, in denen die Mitochondrien primärer PBL im dSTORM dargestellt wurden (Stand der Pub Med Literaturrecherche: März 2023).

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Immunzellen aus den Blutproben von insgesamt 15 gesunden und 17 an ERU erkrankten Pferden analysiert. Dabei wurde ein Kontrolltier in fünf Versuchen herangezogen, die Probenentnahme erfolgte jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Von einem weiteren Kontrolltier wurden die Zellen aus zwei Probenentnahmen in drei Versuchen und von zwei weiteren Kontrolltieren aus einer Probenentnahme in jeweils zwei Versuchen verwendet. Die Proben von drei an ERU erkrankten Pferden aus einer Probenentnahme wurden jeweils in zwei verschiedenen Versuchen verwendet.

Bei den gesunden Pferden, die für diese Arbeit beprobt wurden, handelte es sich entweder um Tiere aus der Klinik für Pferde der LMU oder aus Privatbesitz, die klinisch gesund waren und keine Vorgeschichte einer okularen Entzündung hatten. Die Anzeige und Genehmigung der Blutentnahme bei diesen Kontrolltieren erfolgte über die Regierung von Oberbayern mit der Genehmigungsnummer ROB-55.2Vet-2532.Vet_03-17-88.

Die Blutproben von an ERU erkrankten Pferden wurden durch das Personal der Klinik für Pferde der LMU München im Rahmen der operativen Behandlung aus der Jugularvene gewonnen. Die Diagnose der ERU wurde dort anhand des Vorberichts wiederkehrender Entzündungsschübe des inneren Auges sowie klinischer Kriterien, wie Blepharospasmus, vermehrtem Tränenfluss, Miosis und chronischen Veränderungen der inneren Augenstrukturen von spezialisiertem Fachpersonal gestellt.

Im Einzelnen wurde in den verschiedenen Experimenten die folgende Anzahl an Tieren eingesetzt:

Seahorse Fuel Flex Assay:

- PBL von sechs gesunden Pferden
- PBL von sechs an ERU erkrankten Pferden

Etablierung des Seahorse Assays für permeabilisierte Zellen:

- CD4⁺-Zellen von zwei gesunden Pferden

Untersuchung der Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-medierten Aktivität im Seahorse XF Analyzer:

- CD4⁺-Zellen von fünf gesunden Pferden
- CD4⁺-Zellen von fünf an ERU erkrankten Pferden

Analyse des mitochondrialen Proteoms:

- Isolierte Mitochondrien aus den CD4⁺-Zellen von vier gesunden Pferden
- Isolierte Mitochondrien aus den CD4⁺-Zellen von vier an ERU erkrankten Pferden

Quantifizierung von MUL1 mittels Western Blot:

- CD4⁺-Zellen von sechs gesunden Pferden
- CD4⁺-Zellen von fünf an ERU erkrankten Pferden

Darstellung der Mitochondrien im dSTORM:

- CD4⁺-Zellen von einem gesunden Pferd

3.2 Isolierung von PBL mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

3.2.1 Puffer und Lösungen

Heparin-Lösung zur Gerinnungshemmung (2500 I.E./ml)

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

Trennlösung zur Isolierung von PBL mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Pancoll-Trennlösung (Dichte 1,077g/ml)², gebrauchsfertig

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

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

in 1000 ml destilliertem Wasser lösen, pH-Wert auf 7,4 einstellen und autoklavieren.

3.2.2 Gewinnung der Blutproben

Die Blutproben wurden im oberen Halsdrittel aus der V. jugularis externa entnommen. Nach vorangegangener Desinfektion der Injektionsstelle, erfolgte je nach Bedarf eine Blutentnahme von 50 - 200 ml. Es wurden jeweils 50 ml abgenommenes Blut in Röhrchen⁵ mit 1 ml Heparin-Lösung (2.500 I.E./ml), oder 15 ml Blut in Röhrchen⁵ mit 300 µl Heparin-Lösung (2.500 I.E./ml) überführt und anschließend gründlich geschwenkt.

¹ Ratiopharm, Ulm

² PanBiotech, Aidenbach

³ Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien: Merck, Darmstadt

⁴ Carl Roth, Karlsruhe

⁵ Sarstedt, Nümbrecht

3.2.3 Isolierung der equinen PBL mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Das gewonnene equine Blut wurde zunächst etwa 10-15 min bei Raumtemperatur (RT) aufrechtstehend gelagert, um eine Sedimentierung der roten Blutbestandteile zu erlangen. Als Nächstes wurden jeweils 5 ml des überstehenden, lymphozytenreichen Plasmas mit einer sterilen serologischen Pipette⁵ unter sterilen Bedingungen auf 3 ml Pancoll-Tennlösung² in 15 ml Röhrchen⁵ geschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen⁵ bei RT für 25 min mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (*engl.* relative centrifugal force, rcf) von 350 und geringer Bremse zentrifugiert. Dadurch entsteht eine Interphase zwischen der Plasma- und Pancoll-Schicht, die hauptsächlich aus Lymphozyten besteht. Diese Interphase wurde mit Hilfe einer serologischen Pipette⁵ abgenommen und in 50 ml Röhrchen⁵ mit 30 ml PBS überführt. Die Zellen wurden zweimal gewaschen, indem sie 5 min bei 500 rcf und eingeschalteter Bremse zentrifugiert, dekantiert und dann wieder in 50 ml PBS resuspendiert wurden. Wenn die Zellen für die anschließende Analyse im Seahorse Analyzer bestimmt waren, erfolgten die Wasch- und Zentrifugationsschritte bei RT, ansonsten bei 4°C.

3.2.4 Ermittlung der Zellzahl

Für die Zellzählung wurde eine Neubauer-improved Zählkammer⁶ mit einer Kammertiefe von 0,1 mm verwendet. Es wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau⁷ vermischt und in die Zählkammer gegeben. Um die Gesamtzellzahl zu berechnen wurden mindestens 100 Zellen ausgezählt.

Die Ermittlung der Gesamtzellzahl erfolgte über folgende Formel:

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

⁶ NeoLab, Heidelberg

⁷ VWR, Darmstadt

3.3 Magnetische Zellseparation

Die CD4⁺-Fraktion wurde aus den PBL von zwölf gesunden und zwölf an ERU erkrankten Pferden mittels magnetischer Separation isoliert. Dies wurde direkt im Anschluss an die Isolierung der PBL durchgeführt.

3.3.1 Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

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

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

0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

EDTA	18,61g
------	--------

in 100 ml destilliertem Wasser lösen und pH-Wert auf 8,0 einstellen.

MACS-Puffer

Bovines Serum Albumin (BSA) ⁸ (0,5 %)	0,50 g
0,5 M EDTA (2 mM)	400 µl

in 100 ml PBS pH 7,2 lösen.

3.3.2 Antikörper

Folgender primärer Antikörper wurde für die magnetische Separation der equinen CD4⁺-Zellen verwendet:

Antikörper	Klon	Isotyp	Firma	Verdünnung
Anti-Pferd CD4	CVS4	Maus IgG1	Bio-Rad AbD Serotec, Neuried	1:2000

⁸ Serva, Heidelberg

Zudem kam folgender an supramagnetische Partikel gekoppelter sekundärer Antikörper zum Einsatz:

Anti-Maus IgG1 MicroBeads⁹.

3.3.3 Gewinnung der CD4⁺-Fraktion aus equinen PBL mittels positiver magnetischer Separation

Im Anschluss an die Präparation der equinen PBL wurden die CD4⁺-Zellen durch magnetische Separation (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS)⁹ aus dem heterogenen Zellgemisch positiv selektiert. Bei dieser Technik werden die gewünschten Zellen, in diesem Fall die equinen CD4⁺-Zellen, mit einem an supramagnetische Beads⁹ gekoppelten Antikörper markiert. Die markierten Zellen werden in einem Magnetfeld zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen durch das Magnetfeld hindurchlaufen. Anschließend wird das Magnetfeld entfernt und die zurückgehaltenen Zellen können ebenfalls herausgespült und aufgefangen werden. Hierfür wurden 5×10^7 equine PBL in 50 ml Röhrchen⁵ abzentrifugiert (800 rcf, 5 min) und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert und 2,5 µl des primären Antikörpers wurden hinzugefügt. Wenn die Zellen für die anschließende Messung im Seahorse Analyzer bestimmt waren, wurde der Antikörper 10 min bei RT inkubiert, ansonsten erfolgte die Inkubation 20 min bei 4°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 5 – 10 ml MACS-Puffer hinzugefügt und die Zellen erneut abzentrifugiert (800 rcf, 5 min). Anschließend wurde das Zellpellet in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert und 100 µl anti-Maus IgG1 MicroBeads⁹ hinzugefügt. Wenn die Zellen für die anschließende Messung im Seahorse Analyzer bestimmt waren, wurden die MicroBeads⁹ 7,5 min bei RT inkubiert, ansonsten erfolgte die Inkubation 15 min bei 4°C. Anschließend wurden wieder 5 – 10 ml MACS-Puffer hinzugefügt und die Zellen abzentrifugiert (300 rcf, 10 min). Das Zellpellet wurde wiederum in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. In der Zwischenzeit wurden die Separationssäulen⁹ in das Magnetfeld⁹ eingebracht und 3 ml MACS-Puffer zur Äquilibrierung in die Säulen gegeben. Danach wurden die 500 µl Zellsuspension auf die Säule aufgetragen und

⁹ Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

dreimal mit 3 ml Puffer nachgespült. Der Durchlauf wurde in 15 ml Röhrchen⁵ aufgefangen und entsprach der Negativfraktion. Nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld wurden die zurückgehaltenen CD4⁺-Zellen mithilfe eines Stempels aus der Säule herausgespült und ebenfalls in 15 ml Röhrchen⁵ aufgefangen. Anschließend wurde die Zellzahl ermittelt (siehe Kapitel 3.2.4) und 2 x 10⁵ Zellen jeder Fraktion für die Überprüfung der Reinheit im Durchflusszytometer abgenommen.

3.4 Durchflusszytometrie zur Kontrolle der Reinheit der CD4⁺-Fraktion

Direkt im Anschluss an die magnetische Separation wurde die Reinheit der Fraktionen anhand der Durchflusszytometrie überprüft.

3.4.1 Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

Siehe Kapitel 3.2.1 Puffer und Lösungen

3.4.2 Antikörper

Folgender primärer, direkt mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelter Antikörper wurde zur Untersuchung der Reinheit der equinen CD4⁺-Zellen nach der magnetischen Separation verwendet:

Antikörper	Klon	Isotyp	Firma	Verdünnung
Anti-Pferd CD4:FITC	CVS4	Maus IgG1	Bio-Rad AbD Serotec, Neuried	1:10

3.4.3 Färbung

Mittels Durchflusszytometrie können einzelne fluoreszenz-markierte Zellen aufgrund ihrer lichtstreuenden und fluoreszierenden Eigenschaften analysiert werden. Es wurden 2×10^5 Zellen der durch die magnetische Separation gewonnenen CD4⁺-Fraktion (Positivfraktion) sowie der Durchlaufraction (Negativfraktion) pro Delle in 96-Well Rundbodenplatten⁵ ausgesät und abzentrifugiert (800 rcf, 1 min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen in 30 µl einer 1:10 Verdünnung des Antikörpers 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 170 µl PBS gewaschen (800 rcf, 1 min, 4°C). Zuletzt wurden die Zellen wieder in 200 µl PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

3.4.4 Detektion mittels Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem MACSQuant Analyzer 10⁹ oder einem NovoCyte Quanteon¹⁰ Durchflusszytometer durchgeführt. Mithilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) kann die quantitative Proteinexpression einzelner Zellen und Zellpopulationen durch vorherige Fluorochrom-Markierung mit Antigen-spezifischen Antikörpern gemessen werden. Zur Detektion des Fluorochroms FITC wurde der 488 nm Laser verwendet und das Signal mittels dem B525 Detektor aufgezeichnet. Pro Delle wurden mindestens 5000 Events erfasst.

3.4.5 Auswertung

Die Auswertung der Analysen wurde mit der Flowlogic Software¹¹ V7 durchgeführt. Alle Zellen wurden durch Anzeigen der Forward-Scatter-Fläche (FSC-A, Größe) gegen die Side-Scatter-Fläche (SSC-A, Granularität) im Dotplot dargestellt. Alle

¹⁰ Agilent, Waldbronn

¹¹ Inivai Technologies, Mentone VIC, Australien

erfassten Zellen wurden in die prozentuale Auswertung eingeschlossen. Die Färbungen wurden mithilfe eines Histogramms ausgewertet, indem ein Gate zwischen den nicht-fluoreszierenden Zellen und den fluoreszierenden Zellen gesetzt wurde, was den Graphen des Histogramms in den linken nicht-fluoreszierenden Teil und den rechten fluoreszierenden Teil trennte. Für den prozentualen Wert der fluoreszierenden Zellen (positiv) wurde die Anzahl der Zellen bei denen ein fluoreszierendes Signal detektiert wurde, im Verhältnis zur Gesamtzellzahl ermittelt. Um für weitere Versuche verwendet zu werden, musste die CD4⁺-Fraktion eine Reinheit von mindestens 95% besitzen.

3.5 Messung der Sauerstoffverbrauchsrate im Seahorse XF24 Analyser

3.5.1 Puffer und Lösungen

Poly-D-Lysin-Lösung (50 mg/ml)

Poly-D-Lysin 5 mg
in 100 ml do lösen.

XF-Kalibrierungspuffer

Seahorse XF Calibrant Solution¹⁰, gebrauchsfertig

Seahorse XF Medium, pH 7,4

Seahorse XF RPMI Medium (ohne Phenolrot) ¹⁰	50 ml
2,5 M Glukose-Lösung	200 µl
0,2 mM L-Glutamin-Lösung	500 µl
0,1 mM Pyruvat-Lösung	500 µl

anschließend mittels Sterilfilter¹² (Porengröße 0,20 µm) steril filtrieren und bei 37°C im Wärmebad bis zum Experiment aufbewahren.

¹² Macherey-Nagel, Düren

1 M Kaliumhydroxid (KOH)-Lösung

KOH 561 g

in 10 ml destilliertem Wasser lösen.

Dimethylsulfoxid (DMSO), wasserfrei

gerauchsfertig⁷

3x Mitochondrial Assay Solution (MAS)

Mannitol (660 mM) 30,06 g

Sucrose (210 mM) 17,98 g

KH₂PO₄ (30 mM) 1,02 g

MgCl₂ (15 mM) 357 mg

1 M HEPES-Lösung 1,5 ml

EGTA (3 mM) 285 mg

in 250 ml destilliertem Wasser lösen und pH-Wert mit 1 M KOH-Lösung auf 7,2 einstellen. Puffer anschließend mittels Sterilfilter¹² (Porengröße 0,22 µm) steril filtrieren und maximal für drei Monate bei 4°C lagern.

1x MAS

3x MAS 25 ml

Destilliertes Wasser 50 ml

pH-Wert mit 1 M KOH-Lösung auf 7,2 einstellen.

1x MAS mit 0,4 % fettsäurefreiem BSA

BSA fettsäurefrei 200 mg

in 50 ml 1x MAS lösen und pH-Wert mit 1M KOH-Lösung auf 7,2 einstellen. Erst kurz vor der Verwendung herstellen.

Pyruvat-Stammlösung (500 mM)

Pyruvat 440 mg

in 10 ml 1x MAS lösen und pH-Wert mit 1 M KOH-Lösung auf 7,2 einstellen.

Aliquotiert maximal zwei Monate bei -20°C lagern.

Malat-Stammlösung (500 mM)

Malat 670 mg

in 10 ml 1x MAS lösen und pH-Wert mit 1 M KOH-Lösung auf 7,2 einstellen.
Aliquotiert maximal zwei Monate bei -20°C lagern.

Succinat-Stammlösung (500 mM)

Succinat 590 mg

in 10 ml 1x MAS lösen und pH-Wert mit 1 M KOH-Lösung auf 7,2 einstellen.
Aliquotiert maximal zwei Monate bei -20°C lagern.

Palmitoyl-L-Carnitin-Stammlösung (50 mM)

Palmitoyl-L-Carnitin-Chlorid 5 mg

in 229,5 µl DMSO wasserfrei lösen und maximal zwei Monate bei -20°C lagern.

Adenosindiphosphat (ADP)-Stammlösung (100 mM)

ADP-Monokaliumsalz Dihydrat 501 mg

in 10 ml 1x MAS lösen und pH-Wert mit 1 M KOH-Lösung auf 7,2 einstellen.
Aliquotiert maximal zwei Monate bei -20°C lagern.

10 µM rekombinates Perfringolysin O (rPFO)

XF Plasmamembran Permeabilizer, gebrauchsfertig¹⁰

3.5.2 Inhibitoren

Oligomycin-Stammlösung (0,1 M)

Oligomycin 1mg

in 12,6 µl DMSO wasserfrei lösen.

Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon (FCCP)-Stammlösung (0,1 M)

FCCP 1mg

in 39,3 µl DMSO wasserfrei lösen.

Antimycin A-Stammlösung (0,05 M)

Antimycin A 1mg
 in 37,6 µl DMSO wasserfrei lösen.

Rotenon-Stammlösung (0,05 M)

Rotenon 1mg
 in 50,1 µl DMSO wasserfrei lösen.

Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethylsulfid (BPTES) - Stammlösung (1,2 mM)

BPTES 1mg
 in 1588 µl DMSO wasserfrei lösen.

Etomoxir-Stammlösung (1,6 mM)

Etomoxir 1mg
 in 1845 µl DMSO wasserfrei lösen.

Mitochondrial Pyruvat Carrier-Inhibitor UK5099-Stammlösung (0,8 mM)

UK5099 1mg
 in 4336 µl DMSO wasserfrei lösen.

3.5.3 Vorbereitungen des Assays

Um eine bessere Haftung der Zellen zu gewährleisten, wurden die Dellen der XF24-Loch-Platten¹⁰ vor dem Assay mittels einer Poly-D-Lysin-Lösung beschichtet. In jede Delle wurden 52 µl der Poly-D-Lysin-Lösung pipettiert und für 1-2 h bei RT steril unter dem Abzug inkubiert. Anschließend wurde die Poly-D-Lysin-Lösung abgenommen und die Dellen vorsichtig mit 1 ml sterilem, destilliertem Wasser gespült und danach offen unter der Sterilwerkbank stehen gelassen, bis diese vollständig getrocknet waren. Wenn die Platten nicht direkt im Anschluss Verwendung fanden, wurden sie für maximal eine Woche bei 4°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde die mit Poly-D-Lysin beschichtete XF24-Loch-Platte¹⁰ in einer feuchten Kammer für 30 min bei 37°C in einem Inkubator ohne CO₂-Begasung

vorgewärmt. Darüber hinaus erfolgte die Vorbereitung der XFe24-Sensor-Platte¹⁰. Pro Delle wurden 1000 µl des XF-Kalibrierungspuffers pipettiert und für mindestens 4 h und maximal 48 h in einer Feuchtkammer im Wärmeschrank (37°C, ohne CO₂) äquilibriert. Zusätzlich wurde der Seahorse XF24 Analyzer¹⁰ mindestens 4 h vor der Verwendung eingeschaltet und mit der dazugehörigen Software gekoppelt, um eine konstante Betriebstemperatur von 37°C zu erreichen.

3.5.4 Messung der Substratoxidation equiner PBL im Fuel Flex Test

Für die Messung der Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität wurden die PBL von sechs gesunden und sechs an ERU erkrankten Pferden verwendet. Die PBL wurden direkt nach der Isolierung abzentrifugiert, in 200µl pro 8×10^5 Zellen warmem (37°C) Seahorse XF Medium resuspendiert und bis zur Verwendung maximal 30 min im Wärmeschrank aufbewahrt.

3.5.4.1 Durchführung des Assays

Zunächst wurde eine 1:1000 Vorverdünnung der FCCP-Stammlösung mit Seahorse XF Medium hergestellt. Danach wurde FCCP in einer Endkonzentration von 1 µM zur Zellsuspension gegeben. Pro Delle wurden 8×10^5 Zellen in 200 µl des Seahorse XF Mediums in die XF24-Loch-Platte¹⁰ ausgesät. Für die Bestimmung des Leerwertes wurden drei bis vier Dellen nur mit Seahorse XF Medium ohne Zellen befüllt. Anschließend wurde die XF24-Loch-Platte¹⁰ zentrifugiert (2000 rcf, 1 min, RT, Bremse aus), um eine gleichmäßige Haftung der Suspensionszellen am Plattenboden zu gewährleisten. Im Anschluss wurden alle Dellen auf ein Volumen von 500 µl mit XF-Medium aufgefüllt und die Platte für 45 min in einem Wärmeschrank bei 37°C, ohne CO₂-Begasung gestellt. In dieser Zeit erfolgte die Vorbereitung der Gebrauchslösungen der Inhibitoren und die Beladung der Ports. Zunächst wurde eine 1:10 Vorverdünnung der drei relevanten Inhibitoren BPTES (Glutamin), Etomoxir (Fettsäuren) und UK5099 (Pyruvat) hergestellt, indem 35 µl der Stammlösung in Eppendorf-Reaktionsgefäße⁵ mit 315 µl Seahorse XF Medium pipettiert wurden. Anschließend wurden die Ansätze eins bis sechs nach Tabelle 3.1

mit diesen 1:10 Vorverdünnungen pipettiert und für die Beladung der Ports verwendet.

Ansatz (Nr.)	Enthaltene Inhibitoren	BPTES (µl)	Etomoxir (µl)	UK5099 (µl)	Seahorse XF Medium (µl)
1	BPTES	110	-	-	330
2	ETO/ UK5099	-	110	110	220
3	ETO	-	110	-	330
4	BPTES/UK5099	110	-	110	220
5	UK5099	-	-	110	330
6	BPTES/ETO	110	110	-	220

Tabelle 3.1 Zusammensetzung der Ansätze eins bis sechs für die Messung der Substratoxidation mittels Fuel Flex Test im Seahorse XF24 Analyzer.

Für die Bestimmung der Abhängigkeit der Zellen von einem Substrat müssen der für das jeweilige Substrat-spezifische Inhibitor in Port A und die anderen beiden in Port B pipettiert werden. Für die Bestimmung der Kapazität müssen die beiden anderen Inhibitoren in Port A und der spezifische Inhibitor des Substratweges in Port B pipettiert werden. Somit ergibt sich folgende Beladung der Ports mit den Ansätzen eins bis sechs aus Tabelle 3.1:

Glutamin Abhängigkeit:	Port A: 1
	Port B: 2
Glutamin Kapazität:	Port A: 2
	Port B: 1
Fettsäure Abhängigkeit:	Port A: 3
	Port B: 4
Fettsäure Kapazität:	Port A: 4
	Port B: 3
Glukose Abhängigkeit:	Port A: 5
	Port B: 6
Glukose Kapazität:	Port A: 6
	Port B: 5

In Port A wurden jeweils 56 µl und in Port B 62 µl des entsprechenden Ansatzes pipettiert. Die finale Konzentration der Inhibitoren in der Delle während des Assays belief sich somit auf 3 µM für BPTES, 4 µM für Etomoxir und 2 µM für UK5099.

Nach der Beladung der Ports wurde die Kalibrierung der Sensoren mithilfe der vorbereiteten Sensorplatte durchgeführt und im Anschluss die Zellplatte gemessen. Die Einstellung des Messprotokolls erfolgte mithilfe der Wave Software¹⁰. Es wurden drei Basalmesszyklen und jeweils sechs Messzyklen nach der Injektion von Port A und nach der Injektion von Port B durchgeführt. Die Mischzeit wurde auf 3 min, die Wartezeit auf 2 min und die Messzeit auf 3 min eingestellt. Für jedes Tier wurden pro Ansatz mindestens drei technische Replikate gemessen.

3.5.4.2 Auswertung der Messergebnisse

Die gemessenen Sauerstoffverbrauchsdaten wurden mithilfe der Wave Software¹⁰ analysiert. Zunächst wurde eine Korrektur des Hintergrundes mithilfe der Leerwerte aus nicht mit Zellen befüllten Dellen durchgeführt. Anschließend wurden die prozentuale Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität der Zellen von Glukose, Glutamin und Fettsäuren für jede Delle nach den folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Abhängigkeit \%} = \left[\frac{\text{OCR Basalwert} - \text{OCR spezifischer Inhibitor}}{\text{OCR Basalwert} - \text{OCR alle Inhibitoren}} \right] \times 100\%$$

$$\text{Kapazität \%} = \left[1 - \frac{\text{OCR Basalwert} - \text{OCR unspezifische Inhibitoren}}{\text{OCR Basalwert} - \text{OCR alle Inhibitoren}} \right] \times 100\%$$

$$\text{Flexibilität \%} = \text{Kapazität \%} - \text{Abhängigkeit \%}$$

Die für die Berechnung herangezogenen Messwerte sind in Abbildung 3.1 markiert. Aus den drei technischen Replikaten wurde für jedes Tier ein Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der PBL der gesunden und der an ERU erkrankten Pferde wurden mittels Kolmogorov-Smirnov Test (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung (KS: > 0,05) wurde ein F-Test zur Überprüfung der Varianzhomogenität durchgeführt. Wenn eine gleiche Varianz angenommen werden konnte (F-Test > 0,05) wurde der Student's *t*-Test zur Auswertung herangezogen. Wenn eine ungleiche Varianz angenommen wurde (F-Test ≤ 0,05) fand der Welch's *t*-Test angewendet. Bei nicht normalverteilten Werten (KS: ≤ 0,05)

fand der Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test Verwendung. Werte mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

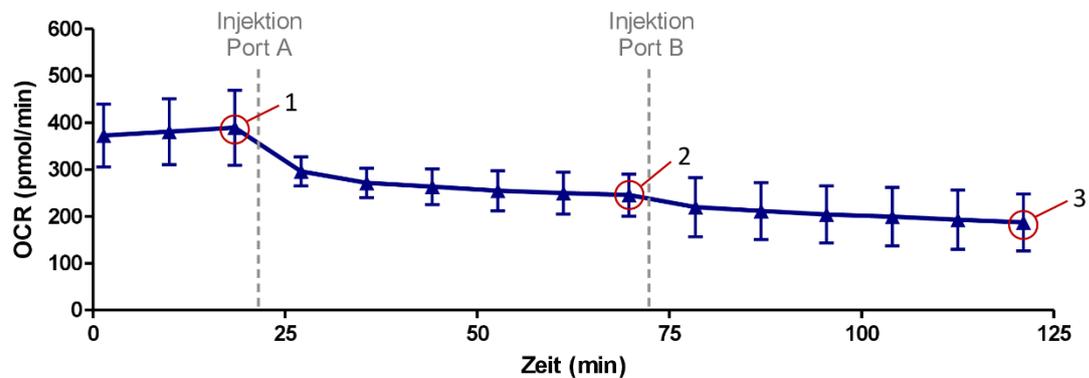


Abbildung 3.1 Beispielverlauf der Sauerstoffverbrauchsrate im Fuel Flex Test. Es ist ein beispielhafter Kurvenverlauf der Messung der Sauerstoffverbrauchsrate im Fuel Flex Test dargestellt. Nach drei Basalwertmessungen erfolgte die Injektion aus Port A und nachfolgend sechs Messungen und anschließend die Injektion aus Port B erneut gefolgt von sechs Messungen. Die Messwerte, die zur Berechnung der Abhängigkeit oder Kapazität herangezogen wurden, sind durch rote Kreise gekennzeichnet und mit den Ziffern eins bis drei beschriftet. Messpunkt 1 stellt immer den Basalwert dar. Bei der Messung der Abhängigkeit wird in Port A der Substrat-spezifische Inhibitor injiziert, sodass Messpunkt 2 die Sauerstoffverbrauchsrate nach Zugabe des spezifischen Inhibitors beschreibt. Bei der Messung der Kapazität werden in Port A die beiden anderen, Substrat-unspezifischen Inhibitoren injiziert, sodass Messpunkt 2 die Sauerstoffverbrauchsrate nach den unspezifischen Substraten darstellt. Messpunkt 3 ist die Sauerstoffverbrauchsrate, nachdem alle Inhibitoren hinzugefügt wurden.

3.5.5 Messung der Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-medierten Aktivität

Für die Etablierung des Assays wurden die CD4⁺-Zellen von zwei gesunden Pferden und für die Messung der Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-medierten Aktivität die CD4⁺-Zellen von fünf gesunden und fünf an ERU erkrankten Pferden verwendet. Die CD4⁺-Zellen wurden direkt nach der magnetischen Separation abzentrifugiert, in 200µl pro $1,2 \times 10^6$ Zellen warmem (37°C) Seahorse XF Medium resuspendiert und bis zur Verwendung maximal 30 min im Wärmeschrank aufbewahrt.

3.5.5.1 Durchführung des Assays

Die mit Poly-D-Lysin beschichtete XF24-Loch-Platte¹⁰ wurde vor der Verwendung in einer feuchten Kammer für 30 min bei 37°C in einem Inkubator ohne CO₂-Begasung vorgewärmt. Für die Etablierung der optimalen Zellzahl wurden entweder 8×10^5 , 1×10^6 oder $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Delle ausgesät. Dabei wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Delle als optimale Zellzahl festgesetzt und daher für die weiteren Versuche pro Delle $1,2 \times 10^6$ Zellen in 200 µl des Seahorse XF Mediums ausgesät. Für die Bestimmung des Leerwertes wurden vier Dellen nur mit Seahorse XF Medium ohne Zellen befüllt. Anschließend wurde die XF24-Loch-Platte¹⁰ zentrifugiert (2000 rcf, 1 min, RT, Bremse aus), um eine gleichmäßige Haftung der Suspensionszellen am Plattenboden zu gewährleisten. Im Anschluss wurde die Platte für 45 min in einem Wärmeschrank bei 37°C ohne CO₂-Begasung gestellt. In dieser Zeit erfolgte die Vorbereitung der Gebrauchslösungen der Inhibitoren und die Beladung der Ports. Zunächst wurde für die Inhibitoren Rotenon, Oligomycin und Antimycin A (AA) aus der Stammlösung eine 1:1000 Vorverdünnung in 1x MAS hergestellt.

Anschließend wurden die Ansätze eins bis sechs nach Tabelle 3.2 mit den Stammlösungen der Substrate und den 1:1000 Vorverdünnungen der Inhibitoren pipettiert und für die Beladung der Ports verwendet.

Nr.	1x MAS (µl)	ADP (µl)	Malat (µl)	Pyruvat (µl)	Succinat (µl)	Rotenon 1:1000 (µl)	Palmitoyl-L-carnitin (µl)	Oligomycin 1:1000 (µl)	AA 1:1000 (µl)
1	375	50	25	50	-	-	-	-	-
2	345	50	-	-	100	50	-	-	-
3	420	50	25	-	-	-	5	-	-
4	1350	-	-	-	-	-	-	150	-
5	1200	-	-	-	-	150	-	-	150

Tabelle 3.2 Zusammensetzung der Ansätze eins bis fünf für die Messung der der Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-medierten Aktivität im Seahorse XF24 Analyser.

Für die Bestimmung der Pyruvat-medierten Aktivität wurde Ansatz Nr. 1, für die Bestimmung der Succinat-medierten Aktivität Ansatz Nr. 2 und für die Bestimmung der Palmitat-medierten Aktivität Ansatz Nr. 3 in Port A aus Tabelle 3.2 pipettiert.

Port B wurde mit Ansatz Nr. 4 und Port C mit Ansatz Nr. 5 aus Tabelle 3.2 beladen. In Port A wurden jeweils 56 µl, in Port B 62 µl und in Port C 69 µl des entsprechenden Ansatzes pipettiert.

Nach der Beladung der Ports wurde die Kalibrierung der Sensoren mithilfe der vorbereiteten Sensorplatte durchgeführt. Direkt vor der Messung wurde das Medium der Zellplatte durch 1x MAS mit 0,4% fettsäurefreiem BSA ersetzt. Hierfür wurde zunächst vorsichtig 100 µl des Seahorse XF Mediums abgenommen und stattdessen 400 µl 1x MAS mit 0,4% fettsäurefreiem BSA in die Delle pipettiert. Als Nächstes wurden wieder 400 µl vorsichtig abgenommen und durch 400 µl 1x MAS mit 0,4% fettsäurefreiem BSA und 1,2 nM rPFO ersetzt, sodass sich eine finale Konzentration von 1 nM rPFO in der Delle ergab. Bei der Testung verschiedener rPFO-Konzentrationen wurde die rPFO-Konzentration im Medium entsprechend angepasst. Im Anschluss wurde die Zellplatte gemessen. Die Einstellung des Messprotokolls erfolgte mithilfe der Wave Software¹⁰. Es wurden zwei Basalmesszyklen und jeweils zwei Messzyklen nach der Injektion von Port A, Port B und Port C durchgeführt. Die Mischzeit wurde auf 0,5 min, die Wartezeit auf 0,5 min und die Messzeit auf 2 min eingestellt. Für jedes Tier wurden pro Ansatz mindestens drei technische Replikate gemessen.

3.5.5.2 Auswertung der Messergebnisse

Zunächst wurde für die gemessenen Sauerstoffverbrauchsdaten in der Wave Software¹⁰ eine Korrektur des Hintergrundes mithilfe der Leerwerte aus nicht mit Zellen befüllten Dellen durchgeführt. Anschließend wurden die korrigierten Werte in Excel¹³ exportiert und dort das Stadium 3 und Stadium 4_o berechnet. Das Stadium 3 wurde als Differenz aus dem ersten Messpunkt nach der Zugabe von Substrat und ADP in Port A und der vollständigen Inhibierung der Atmungskette nach Zugabe von Rotenon und Antimycin A in Port C bestimmt. Für die Berechnung des Stadiums 4_o wurde der erste Punkt nach der Injektion von Rotenon und Antimycin A in Port C vom ersten Messpunkt nach der Injektion von Oligomycin in Port B abgezogen (Abbildung 3.2).

¹³ Microsoft, Redmond, Washington, USA

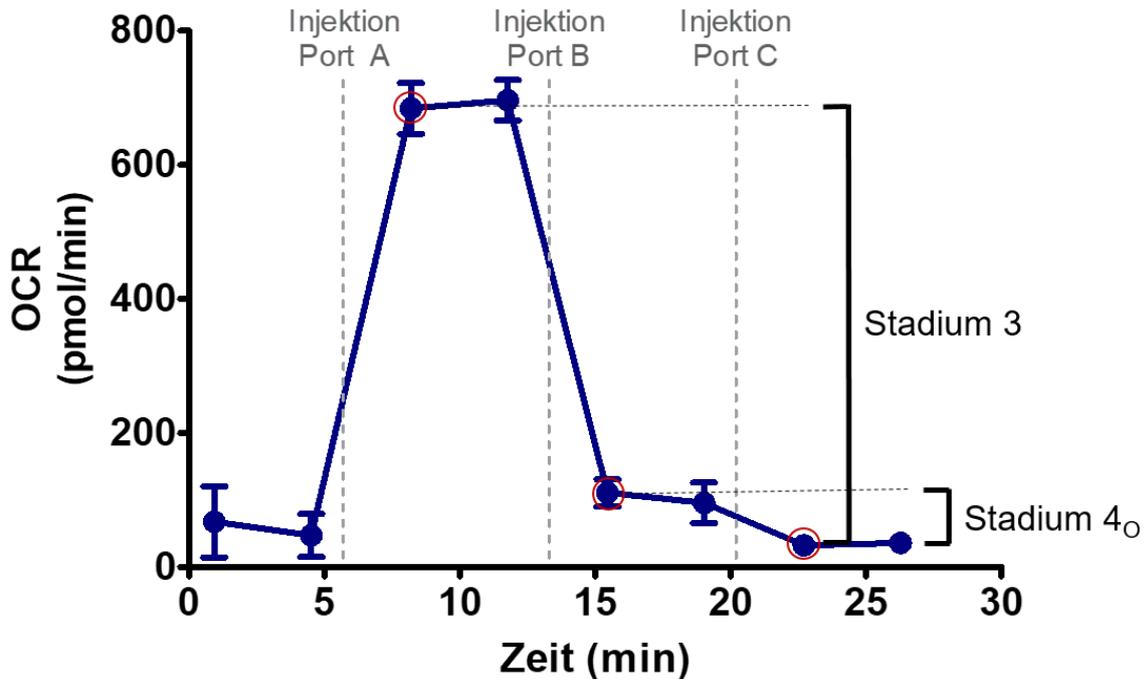


Abbildung 3.2 Beispielverlauf der Sauerstoffverbrauchsrate bei der Messung der Pyruvat-, Succinat- oder Palmitat-medierten Aktivität. Es ist ein beispielhafter Kurvenverlauf der Messung der Sauerstoffverbrauchsrate bei der Messung der Pyruvat-, Succinat- oder Palmitat-medierten Aktivität dargestellt. Nach zwei Basalwertmessungen erfolgte die Injektion von Substrat und ADP aus Port A und nachfolgend zwei Messungen. Anschließend wurde Oligomycin aus Port B injiziert erneut gefolgt von zwei Messungen und schließlich Rotenon und Antimycin A aus Port C, erneut gefolgt von 2 Messungen. Die Messwerte, die zur Berechnung von Stadium 3 und Stadium 4_o herangezogen wurden, sind durch rote Kreise gekennzeichnet.

Aus den drei technischen Replikaten wurde für jedes Tier ein Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der PBL der gesunden und der an ERU erkrankten Pferde wurden mittels Kolmogorov-Smirnov Test (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung (KS: > 0,05) wurde ein F-Test zur Überprüfung der Varianzhomogenität durchgeführt. Wenn eine gleiche Varianz angenommen werden konnte (F-Test > 0,05) wurde der Student's *t*-Test zur Auswertung herangezogen. Wenn eine ungleiche Varianz angenommen wurde (F-Test ≤ 0,05) fand der Welch's *t*-Test angewendet. Bei nicht normalverteilten Werten (KS: ≤ 0,05) fand der Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test Verwendung. Werte mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3.6 Isolation der Mitochondrien aus den equinen CD4⁺-Zellen

Die Mitochondrien wurden direkt nach der magnetischen Separation aus den CD4⁺-Zellen von vier gesunden und vier an ERU erkrankten Pferden gewonnen. Die Mitochondrien wurden jeweils aus 2×10^7 CD4⁺-Zellen gewonnen, mit Ausnahme eines Kontroll- und eines ERU-Tieres. Bei dem Kontrolltier wurden die Mitochondrien aus $6,7 \times 10^6$ CD4⁺-Zellen und bei dem ERU-Tier aus 1×10^7 CD4⁺-Zellen isoliert. Für jedes Tier wurden zwei Ansätze mit der oben genannten Zellzahl durchgeführt. Davon wurde jeweils einer für die massenspektrometrische Untersuchung und der andere für die Kontrolle der Reinheit der Mitochondrien im Western Blot weiterverwendet.

3.6.1 Puffer und Lösungen

Mitochondria Isolation Kit

Reagenz A, B und C, gebrauchsfertig¹⁴

Proteaseinhibitor ohne EDTA

Complete Proteaseinhibitor-Cocktail, gebrauchsfertig¹⁵

3.6.2 Durchführung der Mitochondrienisolation

Die Isolation der Mitochondrien erfolgte nach Angaben des Herstellers des Mitochondria Isolation Kit¹⁴. Die Zellen wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen⁵ pelletiert (850 rcf, 2 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 768 µl Reagenz A mit 32 µl Proteaseinhibitor resuspendiert und für 5 Sekunden (s) bei mittlerer Stufe auf dem Vortexmischer geschüttelt. Es folgten eine zweiminütige Inkubation auf Eis und die Zugabe von 10 µl Reagenz B. Daraufhin wurde 5 s auf maximaler Stufe gevortext und die

¹⁴Thermo Fisher Scientific, Bremen

¹⁵Roche, Penzberg

Suspension für 5 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde jede Minute wieder kurz bei Maximum gevortext. Anschließend wurden 768 µl Reagenz C und 32 µl Proteaseinhibitor hinzugegeben, die Eppendorf-Reaktionsgefäße⁵ mehrmals geschwenkt und abzentrifugiert (700 rcf, 10 min, 4°C). Im Überstand waren nun die Mitochondrien enthalten. Dieser wurde in einen neues, low-binding Eppendorf-Reaktionsgefäß⁵ überführt, während das Zellpellet verworfen wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei 3000 rcf für 10 min und 4°C. Die aufgereinigten Mitochondrien befanden sich als Pellet am Boden der Platte, während der Überstand die zytoplasmatische Fraktion beinhaltete. Der Überstand wurde abgenommen und in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße⁵ überführt, um dann bei -20°C asserviert zu werden. Das verbleibende Mitochondrienpellet wurde in 468 µl Reagenz A und 22 µl Proteaseinhibitor gelöst und erneut abzentrifugiert (12000 rcf, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde komplett entfernt und die aufgereinigten Mitochondrien bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.7 Analyse des mitochondrialen Proteoms

Zur Erstellung eines differentiellen Proteinprofils der Mitochondrien von CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde wurden die isolierten Mitochondrien von vier gesunden und vier an ERU erkrankten Tieren zunächst einem modifiziertem „Filter-aided Sample Preparation“ (FASP) - Verdau unterzogen und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert. Aus den daraus gewonnen Massenspektren wurden Proteine identifiziert und quantifiziert, sowie statistisch und bioinformatisch analysiert.

3.7.1 Modifizierter FASP-Verdau der equinen Mitochondrien

3.7.1.1 Puffer und Lösungen

1 M Dithiothreitol (DTT)

DTT (1 M)

15,42 mg

in 1 ml HPLC Wasser lösen

2-Iodacetamid (300 mM) in 1 ml HPLC Wasser lösen	55,4 mg
Harnstoffpuffer (Urea A-Puffer, UA-Puffer) Harnstoff (8 M) 1 M Tris-HCl pH 8,5 (100 mM) in 1 ml HPLC Wasser lösen	48,03 mg 100 µl
Ammoniumbicarbonat (ABC) - Puffer ABC (50 mM) in 5 ml HPLC Wasser lösen	19,75 mg
Trypsin Trypsin ¹⁶ (1mg/ml) in 20 µl ABC-Puffer lösen	20 µg
Lys-C Lysyl Endopeptidase ¹⁷ (0,5 mg/ml) in 40 µl ABC-Puffer lösen	20 µg
5% Acetonitril Acetonitril 5 % ad 1 ml ABC-Puffer	50 µl
Trifluoressigsäure 0,5 % gebrauchsfertig.	

¹⁶ Promega, Mannheim

¹⁷ Wako, Neuss

3.7.1.2 Durchführung des FASP-Verdaus der equinen Mitochondrien

Es wurden jeweils die aus 2×10^7 CD4⁺-Zellen gewonnenen Mitochondrien verwendet, mit Ausnahme von einem Kontroll- und einem ERU-Tier. Bei dem Kontrolltier wurden die Mitochondrien aus $6,7 \times 10^6$ CD4⁺-Zellen und bei dem ERU-Tier aus 1×10^7 CD4⁺-Zellen verwendet. Die Proben wurden in 200 μ l Harnstoffpuffer unter Zugabe von 1 μ l DTT (1 M) für 30 min auf dem Schüttler bei RT reduziert. Anschließend wurde die Probe mit 200 μ l Harnstoffpuffer verdünnt und es folgte die Alkylierung durch die Zugabe von 10 μ l Iodoacetamid (300 mM) für 30 min bei RT auf dem Schüttler im Dunkeln. Um nicht umgewandeltes 2-Iodoacetamid abzufangen, wurden erneut 2 μ l DTT (1 M) hinzugefügt.

Die 30 kDa Cut-off-Zentrifugenfilter¹⁸ wurden mit 100 μ l Harnstoffpuffer äquilibriert und 10 min bei RT mit 15000 rcf zentrifugiert. Die Proben wurden mittels Zentrifugation bei RT mit 15000 rcf für 15 min auf die Zentrifugenfilter⁴ übertragen und anschließend dreimal mit 200 μ l Harnstoffpuffer und zweimal mit 100 μ l ABC-Puffer (50 mM) gewaschen (15000 rcf, 15 min, RT). Nach dem Waschen wurden die Filter⁴ in neue Tubes übertragen. Die Proteine wurden zunächst 2 h bei RT durch 0,5 μ g Lysyl-Endopeptidase in 40 μ l ABC-Puffer und anschließend für 16 h bei 37°C durch 1 μ g Trypsin und 10 μ l ABC-Puffer verdaut. Die Peptide wurden durch die Zentrifugation (15000 rcf, 15 min, RT) der Filter eluiert und als Durchlauf aufgefangen. Anschließend wurden 20 μ l ABC-Puffer mit 5 % Acetonitril auf den Filter gegeben und erneut zentrifugiert (15000 rcf, 15 min, RT). Dieses Eluat wurde ebenfalls aufgefangen und mit dem ersten zusammengeführt. Zuletzt wurden die Eluate mit Trifluoressigsäure (0,5 %) angesäuert, sodass der pH-Wert 2 betrug und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

¹⁸ Sartorius, Göttingen

3.7.2 LC-MS/MS

3.7.2.1 Puffer und Lösungen

Puffer A

Acetonitril 2%	20 ml
Methansäure ¹ 0,1%	1 ml
ad 1 l HPLC Wasser ¹	

Puffer B

Acetonitril 99.9%	980 ml
Methansäure 0,1%	1 ml
Ad 1 l HPLC Wasser ¹	

3.7.2.2 Flüssigkeitschromatographie und Messung der Massenspektren

Die massenspektrometrische Analyse über LC-MS/MS wurde in Zusammenarbeit mit dem Metabolomics and Proteomics Core des Helmholtz Zentrums München unter der Leitung von Frau Dr. Stefanie Hauck durchgeführt. Die über FASP verdauten Peptide wurden im datenabhängigen Modus mittels einem Q Exactive HF-X Massenspektrometer¹⁴ analysiert, das online an eine Ultimate 3000 RSLC nano-HPLC¹⁴ gekoppelt war. Die Proben wurden automatisch injiziert und auf die Nanotrap-Säule¹⁴ (300 µm Innendurchmesser x 5 mm, Acclaim PepMap100 C18¹⁴, 5 µm, 100 Å) mit einer Flussrate von 30 µl/min geladen, um anschließend auf der analytischen Säule (75 µm Innendurchmesser x 25 cm, nanoEase MZ HSS T3 Säule¹⁹, 1,8 µm, 100 Å) durch einen 95-minütigen nicht-linearen Gradientenfluss mit einer Flussrate von 250 nl/min chromatographisch aufgetrennt zu werden. Ein Gradient von 3 bis 40 % Acetonitril wurde durch verschiedene Zusammensetzungen von Puffer A und Puffer B erreicht. Nach der Nanospray Ionisierung wurden Peptidspektren, von den sogenannten Vorläuferionen in einem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) von 300 bis 1500 mit einer Auflösung von 60.000 im

¹⁹ Waters, Eschborn

Profilmodus aufgenommen. Die „automatic gain control“ (AGC) Vorgabe war auf $3e6$ gestellt mit einer maximalen Injektionszeit von 30 ms. Aus diesen Peptidspektren wurden folgend die intensivsten 15 Stück (TOP15) für die Fragmentanalyse ausgewählt, wenn sie zwei- bis siebenfach geladen waren. Die Auflösung der Fragmentspektren lag bei 15.000 im Profilmodus, und einem AGC von $1e5$ bei einer maximalen Injektionszeit von 50 ms. Das Isolationsfenster lag bei 1.6 m/z und die normalisierte Kollisionsenergie wurde auf 28 festgesetzt. Der dynamische Ausschluss von bereits fragmentierten Vorläuferionen wurde auf 30 s eingestellt.

3.7.3 Rohdaten-Prozessierung und Quantifizierung

Die Rohspektren wurden in die Software Proteome Discoverer 2.4¹⁴ importiert. Die Peptide wurden mithilfe des Sequest HT Algorithmus in der Ensembl-Datenbank für Pferde (Release 108, <http://www.ensembl.org/EquCab>) identifiziert. Hierfür wurden folgende Einstellungen gewählt: vollständige Trypsin-Spaltung, 10 ppm Peptid-Massentoleranz der Vorläuferionen und 20 mmu Fragmentmassentoleranz, eine verpasste Spaltung war erlaubt, Carbamidomethylierung von Cystein war als feste Modifikation eingestellt, Methioninoxidation und Asparagin- oder Glutamin-Deamidierung waren als variable Modifikationen erlaubt. Für die Validierung der Peptidspektrum-Übereinstimmungen wurde der Percolator Algorithmus verwendet, wobei für jedes Spektrum nur der beste Treffer gewertet wurde und ein Grenzwert von einer False Discovery Rate (FDR) $< 1\%$ erfüllt wurde.

Die Label-freie Quantifizierung erfolgte anhand der kumulativen Abundanzen aller Peptide der einzelnen Proteine. Um Ungenauigkeiten bei der Lademenge der Proben auszugleichen wurden die Proteinabundanzen auf die Gesamtintensität der Proben normalisiert und die sich daraus ergebenden normalisierten Abundanzen wurden für die statistische Auswertung in Excel¹³ exportiert und \log_2 transformiert.

3.7.4 Statistische und bioinformatische Datenanalyse

Für die statistische Analyse wurden die \log_2 -transformierten, normalisierten Abundanzen für die Berechnung des Student's t -Tests verwendet. Proteine wurden als signifikant angesehen, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war und nur dann für die weiteren Analysen verwendet. Die humanen Orthologe der identifizierten Proteine wurden mit der humanen MitoCarta3.0-Datenbank abgeglichen und als mitochondrial klassifiziert, wenn sich entweder das HGNC-Symbol oder der Genname mit einem in der Datenbank aufgeführten Symbol oder dessen Synonymen überschneiden. Proteine, die in weniger als 2 Proben vorkamen, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die bioinformatische Analyse wurde mit dem Ingenuity Pathway Analysis (IPA)²⁰ Programm bei einem p-Wert Cut-off (FDR) $\leq 0,05$ durchgeführt (Datum: 04.01.2023).

Für die Voraussage der Aktivität der Stoffwechselwege (Pathway-Aktivitäts-Analyse; Kapitel 4.3.3), sowie der nachgeschalteten Funktionen (Downstream-Effect-Analyse; Kapitel 4.3.8) wurde ein z-Score berechnet. Die Berechnung des z-Scores basiert darauf, dass die Richtung der beobachteten differentiellen Proteinabundanz im Datensatz mit den aus der Literatur bekannten Zusammenhängen abgeglichen wird und für jedes Protein entweder ein Wert von +1 für „übereinstimmend“ oder -1 für „nicht übereinstimmend“ vergeben wird. Für die Berechnung des z-Scores wird die Summe der Werte durch die Wurzel aus der Gesamtanzahl der am Stoffwechselweg beteiligten, differentiell abundanten Proteine aus dem Datensatz dividiert, sodass sich die folgende Formel zur Berechnung ergibt:

$$z - \text{Score} = \frac{\sum \text{Werte}}{\sqrt{n(\text{gesamt})}}$$

Ein positiver z-score sagt eine Aktivierung und ein negativer eine Inhibition des Stoffwechselwegs voraus. Ein z-score größer als 2 oder kleiner als -2 wurde als signifikant angesehen.

²⁰ Qiagen, Hilden

3.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblot

Es wurden die CD4⁺-Zellen von sechs gesunden und fünf an ERU erkrankten Pferden für die Quantifizierung von MUL1 im Immunoblot verwendet. Je 1×10^7 Zellen wurden nach der Isolierung in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße⁵ pelletiert (2200 rcf, 4°C, 10 min). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Darüber hinaus wurden die aus den CD4⁺-Zellen isolierten Mitochondrien von vier gesunden und vier an ERU erkrankten Tieren auf ihre Reinheit überprüft.

3.8.1 Vorbereitung der Proben

3.8.1.1 Puffer und Lösungen

3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)-Lysepuffer

Harnstoff ⁷ (9 M)	27,00 g
Thioharnstoff ²¹ (2 M)	7,60 g
CHAPS (4 %)	2,00 g
DTT (65 mM)	0,50 g

in 50 ml doppelt destilliertem Wasser lösen und bei RT mindestens fünf Stunden rühren. Anschließend zu je 1 ml aliquotieren und bei -20°C lagern. Direkt vor Gebrauch 100 µl doppelt destilliertes Wasser pro 1 ml Lysepuffer zusetzen.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10 %

SDS ²²	10,00 g
-------------------	---------

in 100 ml doppelt destilliertem Wasser lösen. Lösung bei RT lagern.

²¹ Cytiva, Freiburg

²² AppliChem, Darmstadt

Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA)-Lysepuffer

Tris-HCl ⁴ , pH 8,0 (50 mM)	60,6 mg
NaCl (150 mM)	87,7 mg
Natriumdeoxycholat (0,5 %)	50 mg
NP-40 ¹⁵ (1 %)	100 µl
10% SDS-Lösung (0,1 %)	100 µl

in 10 ml destilliertem Wasser lösen.

Proteaseinhibitor ohne EDTA

Complete Proteaseinhibitor-Cocktail, gebrauchsfertig¹⁵

HCl

Salzsäure 1 M, gebrauchsfertig

3.8.1.2 Zellyse

Die Zerstörung der Zellstrukturen der CD4⁺-Zellen erfolgte durch die Zugabe von 100 – 200 µl RIPA-Lysepuffer, dem kurz vor der Verwendung 20 µl Complete Proteaseinhibitor pro ml Lysepuffer zugesetzt wurden. Anschließend wurde die Suspension in QIAshredder²⁰ pipettiert und bei 16.100 rcf für 2 min zentrifugiert, um eine möglichst vollständige Homogenisierung zu erreichen.

Die Lyse der isolierten Mitochondrien erfolgte mit 20 µl CHAPS-Lysepuffer und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren.

3.8.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem Nanophotometer²³. Der entsprechende, für die Probe verwendete Lysepuffer wurde zur Bestimmung des Leerwertes herangezogen und die Proteinkonzentration der Probe anschließend photometrisch bestimmt.

²³ Implen, München

3.8.2 SDS-PAGE

3.8.2.1 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Lösung

Acrylamid-Bis Lösung 33 %, gebrauchsfertig⁸

Bromphenolblau-Lösung

Eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver
in doppelt destilliertem Wasser lösen.

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung 10 %

APS⁸ (10 %) 0,10 g

in 1 ml doppelt destilliertem Wasser lösen.

N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamine (TEMED)-Lösung

TEMED, gebrauchsfertig²²

SDS-Lösung 10 %

Siehe Kapitel 3.8.1.1

SDS-Lösung 20 %

SDS²² 20,00 g

in 100 ml doppelt destilliertem Wasser lösen. Lösung bei RT lagern.

Gelpuffer, pH 8,8

Tris⁸ (1,5 M) 18,15 g

in 100 ml doppelt destilliertem Wasser lösen und pH 8,8 auf einstellen.

Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris⁸ (0,5 M) 6,00 g

in 100 ml doppelt destilliertem Wasser lösen und pH auf 6,8 einstellen.

5x Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3

Tris ⁸ (124 mM)	15,00 g
Glycin ⁸ (960 mM)	72,00 g
SDS ²² (0,05 %)	5,00 g

in 1000 ml destilliertem Wasser lösen und pH auf 8,3 einstellen.

Die Stammlösung wird für die Elektrophorese 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

5x Laemmlipuffer (reduzierend)

1,5 M Tris-HCl ⁴ , pH 6,8 (250 mM)	8,33 ml
20 % SDS-Lösung (5 %)	12,50 ml
Glycerin, wasserfrei ⁸ (50 %)	25,00 ml
500 mM 2-Mercaptoethanol ⁴	1,75 ml

in 50 ml doppelt destilliertem Wasser und eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver hinzufügen. Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.

Abdichtgel

Doppelt destilliertes Wasser	400 µl
33 % Acrylamid-Lösung	200 µl
10 % APS-Lösung	20 µl
TEMED-Lösung	2 µl

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

Laufgel (15 % SDS Gel)

Doppelt destilliertes Wasser	2,5 ml
Gelpuffer, pH 8,8	2,5 ml
33 % Acrylamid-Lösung	5,0 ml
10 % SDS-Lösung	100 µl
10 % APS-Lösung	50 µl
TEMED-Lösung	5 µl

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

Sammelgel (4 % SDS Gel)

Doppelt destilliertes Wasser	6,17 ml
Sammelgelpuffer, pH 6,8	2,50 ml

33 % Acrylamid-Lösung	1,33 ml
10 % SDS-Lösung	100 µl
Bromphenolblau-Lösung	100 µl
10 % APS-Lösung	50 µl
TEMED-Lösung	10 µl

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

2-Propanol

2-Propanol (Isopropanol), gebrauchsfertig²⁴

3.8.2.2 Durchführung der 1D Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine der equinen CD4⁺-Zell- und Mitochondrien-Lysate erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode durch Anlegen einer elektrischen Spannung in der SDS-PAGE (Laemmli 1970). Die Proteine werden hierbei ihrer Molekülmasse entsprechend in einem elektrischen Feld aufgetrennt, da sie unterschiedlich weit in ein Gel einlaufen. Die Gele wurden in einer Mini Protean Tetra System Gießkammer²⁵ mit einer Größe von 8 x 7 cm und einer Dicke von 1 mm gegossen. Zunächst wurde ein schnell aushärtendes Abdichtgel gegossen, um ein Auslaufen der Gele zu vermeiden. Darauf wurde das 15%ige Laufgel eingefüllt und sofort mit Isopropanol überschichtet. Das Gel wurde etwa 30 min lang bei RT stehen gelassen, um eine vollständige Aushärtung zu erreichen. Im Anschluss wurde das Isopropanol sorgfältig abgenommen und das Sammelgel auf das Laufgel geschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm zur Herstellung der Probenaschen eingeführt und das Sammelgel ebenfalls etwa 30 min bis zur Aushärtung stehen gelassen. In dieser Zeit wurden die aufzutrennenden Proben mit 0,6 µl reduzierendem 5x Lämmli-puffer pro µl Proteinlysat verdünnt und im Thermomixer²⁶ (750 rpm) fünf Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend direkt wieder auf Eis gestellt. Als Referenz für die Bandenhöhe wurde in eine der vorgeformten Geltaschen 4 µl einer Markerprotein-Mischung (Triple Colour Protein

²⁴ CLN, Freising

²⁵ BioRad, Neuried

²⁶ Eppendorf, Hamburg

Standard III⁸⁾ gegeben und in die restlichen Geltaschen die jeweils aufzutrennenden Proben. Die ausgehärteten und befüllten Gele wurden in Elektrophoresekammern²⁵ überführt und diesen 1x Elektrophoresepuffer hinzugefügt. Anschließend wurden die Kammern an das PowerPac Basic Power Supply²⁵ angeschlossen. Die Spannung wurde zunächst auf 12,5 mA pro Gel eingestellt, bis die Proben in das Sammelgel eingelaufen waren und die Lauffront das Laufgel erreicht hatte. Dann wurde die Ampèrezahl schrittweise auf 25 mA pro Gel erhöht. Als die Lauffront am unteren Gelrand ankam, wurde die Elektrophorese beendet.

3.8.3 Immunoblot

3.8.3.1 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I 0,3 M, pH 10,4

Tris ⁸	36,33 g
Methanol ²⁴	200 ml
in 1000 ml doppelt destilliertem Wasser lösen	

Anodenpuffer II 25 mM, pH 10,4

Tris ⁸	3,03 g
Methanol ²⁴	200 ml
in 1000 ml doppelt destilliertem Wasser lösen	

Kathodenpuffer, pH 9,4

Tris ⁸	3,03 g
ε-Aminocaprinsäure ²²	5,25 g
Methanol ²⁴	200 ml
in 1000 ml doppelt destilliertem Wasser lösen	

Ponceau-Färbelösung

Ponceau-S (0,2 %)	0,20 g
Trichloressigsäure ⁸ (3 %)	3,00 g
in 100 ml doppelt destilliertem Wasser lösen	

PBS-Tween Lösung (PBS-T)

Tween-20²² (0,05 %) 0,5 ml

ad 1000 ml PBS.

PBS-T mit 4% BSA

BSA 4 g

in 100 ml PBS-T lösen.

ECL (Enhanced-Chemilumineszenz)-Lösung A

Tris⁸ (20 mM) 2,42 g

Luminol⁸ 50 mg

in 200 ml doppelt destilliertem Wasser lösen, pH auf 8,6 einstellen.

Lagerung bei 4°C.

ECL-Lösung B

Para-Hydroxycumarinsäure 0,11 g

in 100 ml DMSO lösen.

Dunkel und bei RT lagern.

Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

H₂O₂ 30 %, gebrauchsfertig

ECL-Entwicklungslösung:

Lösung A 10 ml

Lösung B 1 ml

30 % H₂O₂ 3 µl

Erst unmittelbar vor dem Gebrauch anmischen.

3.8.3.2 Antikörper

Folgende primäre Antikörper wurde zur Färbung der Proteinbanden verwendet:

Antikörper	Klon	Isotyp	Firma	Verdünnung
Anti-human MUL1	Polyklonal	Kaninchen IgG	Bioss, Woburn, USA	1:2000
Anti-human ATP5 β	E-1	Maus IgG1	Santa Cruz, Heidelberg	1:100
Anti-human LAMP2b	Polyklonal	Kaninchen IgG	Abcam, Milton, UK	1:2000
Anti-human GRP78	40	Maus IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg	1:500
Anti-Ratte B23	FC82291	Maus IgG1	Merck, Darmstadt	1:1000
Anti-human GAPDH	6C5	Maus IgG1	Merck, Darmstadt	1:500

Es wurden folgende Peroxidase (POD)-gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet:

Antikörper	Wirtsspezies	Firma	Verdünnung
Anti-Maus IgG (H+L) POD	Ziege	Merck, Darmstadt	1:10.000
Anti-Kaninchen IgG (H+L) POD	Ziege	Fisher Scientific, Schwerte	1:10.000

3.8.3.3 Durchführung des Immunoblot

Nach der Elektrophorese wurde ein Western Blot durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in einem Semi-dry-Elektroblotter (PerfectBlue SedecTM M⁷) mittels vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (AmershamTM HybondTM 0,45 PVDF²¹) geblottet. Hierfür wurden zunächst spezielles Blot-Papier⁷ und die PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Auf die anodische Platte des Elektroblotters wurden zwei in Anodenpuffer I getränkte Blot-Papiere⁷ und ein in Anodenpuffer II

getränktes Blot-Papier⁷ gelegt. Als nächstes wurde die PVDF-Membran in Methanol und doppelt destilliertem Wasser getränkt und auf die Anodenpapiere gelegt. Das SDS-Gel wurde vorsichtig aus der Elektrophorese-Kammer gelöst und auf die Membran gelegt. Zuletzt kamen drei in Kathodenpuffer getränkte Blot-Papiere⁷ auf das Gel. Dabei wurde stets darauf geachtet Luftblasen zu vermeiden und entstandene Luftblasen wurden vorsichtig mit einem Western Blot Roller²⁵ ausgestrichen. Anschließend wurde die kathodische Platte des Elektroblotters aufgesetzt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe eines peqPower 250V Power Supply⁷ bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm² und einer Transferzeit von 40 min.

3.8.3.4 Ponceau-Färbung zur Überprüfung des Proteintransfers

Um den Proteintransfer auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurde die Membran zehn Minuten in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Proteinbanden auf der Membran durch kurzes Waschen in doppelt destilliertem Wasser (Entfernen der Hintergrundfärbung) sichtbar gemacht und dokumentiert. Abschließend wurden die Membranen durch mehrmaliges Waschen in PBS-T komplett entfärbt.

3.8.3.5 Immun-Färbung und Entwicklung der Membranen

Nach der Ponceau-Färbung erfolgte die Blockade der Membranen für eine Stunde bei RT mit 4 % BSA in PBS-T. Anschließend wurden diese dreimal für 10 min in PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit Antigen-spezifischen primären Antikörpern über Nacht bei 4°C. Sollten mehrere Antikörper auf einer Membran getestet werden, wurden die Membranen entsprechend zugeschnitten. Überschüssiger primärer Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für 10 min mit PBS-T entfernt und es folgte die Inkubation mit einem entsprechenden POD-konjugierten sekundären Antikörper in PBS-T für 60 min bei RT. Danach wurde überschüssiger sekundärer Antikörper durch sechs Waschschriffe in 10-Minuten-Intervallen mit PBS-T entfernt. Für die Detektion der POD-markierten

Proteine wurden die Membranen für 2 min bei RT in einer frisch angesetzten ECL-Lösung (siehe Kapitel 3.7.1.2) inkubiert und die Chemilumineszenz in einem Amersham Imager600²¹ entwickelt. Nach der Entwicklung wurden die Blotmembranen zum Entfernen der ECL-Lösung kurz in doppelt destilliertem Wasser und anschließend dreimal 10 min in PBS-T gewaschen. Es folgte die Reinkubation mit dem nächsten primären Antikörper.

3.8.3.6 Quantifikation und statistische Auswertung der MUL1 Banden

In dieser Arbeit wurden die Immunoblots zur Expressionsbestimmung von MUL1 in den CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde quantifiziert und statistisch ausgewertet (siehe Kapitel 4.3.10). Hierfür wurde die Intensität der Banden mit Hilfe der ImageQuant Software²¹ quantifiziert. Dazu wurden die Volumina der Banden unter Berücksichtigung des Schwärzungsgrades und Abzug des Hintergrundes berechnet. Ein höheres Volumen entsprach dabei einer stärkeren Expression des detektierten Proteins in der jeweiligen Probe. Zur Normalisierung der MUL1-Banden auf die Proteinladung der jeweiligen Probe wurden die Membranen zusätzlich mit einem anti-GAPDH Antikörper reinkubiert und entwickelt. Die ermittelten Volumina der MUL1-Banden wurden zu den Volumina der GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurden die ermittelten, normalisierten Werte der Proben von gesunden und an ERU erkrankten Pferden mittels eines Kolmogorov-Smirnov Tests (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Hierbei ergab sich eine Normalverteilung für beide Gruppen (KS: > 0,05), sowie eine Varianzhomogenität (F-Test > 0,05) und somit wurde der Student's *t*-Test zur Auswertung herangezogen. Ein Wert von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3.9 Super-Resolution-Mikroskopie mittels dSTORM

3.9.1 Puffer und Lösungen

Poly-D-Lysin

siehe Kapitel 3.5.1

Seahorse XF Medium

Siehe Kapitel 3.5.1

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

Siehe Kapitel 3.2.1

BD Cytofix/Cytoperm Fixierungs- und Permeabilisierungslösung

gebrauchsfertig²⁷

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 5% BSA

BSA 5,0 g

in 100 ml PBS, pH 7,4 lösen.

Paraformaldehyd (PFA)-Fixierlösung 4 %

PFA 40,0 g

in 800 ml PBS eine Stunde bei 60°C rühren und im Eisbad abkühlen lassen
auf 1000 ml mit PBS auffüllen und pH-Wert auf 7,4 einstellen.

dSTORM-Basis-Puffer

Tris-HCl, pH 8,0 (50 mM) 78,8 mg

NaCl (10mM) 5,84 mg

Glukose (10%) 1 g

in 10 ml destilliertem Wasser lösen.

²⁷ BD Biosciences, Heidelberg

dSTORM-Imaging-Puffer

56 mg/ml Glukoseoxidase (0,56 mg/ml)	100 µl
3,4 mg/ml Katalase (34 µg/ml)	100 µl
14,3 M 2-Mecaptoethanol (140 mM)	100 µl

kurz vor der Verwendung zu 10 ml dSTORM-Basis-Puffer hinzufügen.

3.9.2 Antikörper

Folgender primärer Antikörper wurde zur immunzytochemischen Färbung der equinen PBL verwendet:

Antikörper	Klon	Isotyp	Firma	Verdünnung
Anti-TOMM20	29	mIgG1	BD Biosciences, Heidelberg	1:200

Zur Fluoreszenz-Färbung wurde folgender Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet:

Antikörper und Flourchrom	Wirtsspezies	Firma	Verdünnung
Anti-Maus IgG (H+L) Alexa 647	Ziege	Merck, Darmstadt	1:500

3.9.3 Färbung

Es wurde die äußere Mitochondrienmembran mit einem Antikörper gegen das Protein „Translocase of outer mitochondrial membrane 20“ (TOMM20) auf PBL von einem gesunden Kontrollpferd immunzytologisch gefärbt. Zunächst wurden gekammerte 8-Well Objektträger²⁸ mit einer Dicke von 0,170 mm ($\pm 0,005$ mm) mit Poly-D-Lysin beschichtet. Dazu wurden 300µl in jedes Well pipettiert und eine Stunde bei RT inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und anschließend

²⁸ IBL, Gerasdorf bei Wien, Österreich

mit 300 µl destilliertem Wasser gewaschen, indem dieses vorsichtig und langsam mit einer Pipette in die Ecke eines jeden Wells gegeben und aus derselben Ecke wieder abgenommen wurde. Alle folgenden Waschschriffe wurden nach diesem Prinzip durchgeführt. Die Objektträger wurden anschließend bei RT unter dem Abzug offen stehen gelassen, bis sie vollständig trocken waren. Im Anschluss wurden 1×10^5 Zellen pro Delle in 300µl Seahorse XF Medium ausgesät und 4 h im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, um ein Absinken der PBL auf den Boden der Platte zu ermöglichen. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und jedes Well einmal mit warmem PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurde im Lichtmikroskop kontrolliert, ob die Zellen am Boden haften. Die Zellen wurden dann für 20 min mit BD Cytoperm/Cytofix Fixierungs- und Permeabilisierungslösung bei RT inkubiert, um die Plasmamembran für die intrazelluläre Färbung durchlässig zu machen. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal in 300 µl PBS mit 5% BSA gewaschen, wobei der Puffer beim letzten Waschschriff für 5 min bei RT auf den Zellen verblieb. Der primäre anti-TOMM20 Antikörper wurde 1:200 in PBS mit 5% BSA verdünnt und 300 µl der Antikörper-Verdünnung wurden in das Well gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgten drei Waschschriffe in 300 µl PBS mit 5% BSA. Beim letzten Waschschriff verblieb der Puffer wieder für 5-10 min im Well. Der mit Alexa 647 gekoppelte sekundäre anti-Maus IgG Antikörper wurde 1:500 in PBS mit 5% BSA verdünnt und anschließend mit 5% hitzedeaktiviertem Pferdeserum versetzt und für 30 min bei RT geschwenkt. Dies minimiert die unspezifische Bindung des Antikörpers gegen equine Epitope. Schließlich wurden 300 µl der präadsorbierten sekundären Antikörper-Verdünnung in das Well pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten wieder drei Waschschriffe nach dem gleichen Schema, der Puffer verblieb beim letzten Waschschriff wieder für 5 - 10 min im Well. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4% PFA für 10 min bei RT fixiert und dann dreimal in 300 µl PBS ohne BSA gewaschen. Bis zur Bildaufnahme wurden die gefärbten und fixierten Zellen in 300 µl PBS bei 4°C gelagert. Kurz vor der Bildaufnahme wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und das PBS durch 300 µl dSTORM-Imaging-Puffer ersetzt.

3.9.4 Bildaufnahme und Bildverarbeitung

Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Abbelight Super Resolution Mikroskop²⁹ bestehend aus einem inversen Olympus IX83 Mikroskop³⁰, einem Abbelight SAFe 180 Nanoscopy Modul²⁹ und Oxxius Lasern (LPX-640-500-CSB)³¹ aufgenommen. Der Laser mit einer Wellenlänge von 640 nm wurde über die ASTER-Technologie mit „total internal reflection fluorescence“ (TIRF)-Beleuchtung in das Mikroskop geleitet und mit einem dichroitischen Vierbandspiegel (Di03-R405/488/532/635-t1-25x36)³² auf das 100x Ölimmersionsobjektiv reflektiert. Das emittierte Licht wurde mit einem Vierband-Bandpassfilter (FF01-446/510/581/703-25)³² in den Detektionspfad gefiltert. Die Emission der Flouochrome wurde mit einer optischen Pixelgröße von 108 nm durch eine 2048 x 2048 Pixel sCMOS-Kamera (Orca-fusion C1440-20UP)³³ aufgenommen.

Die Bildaufnahme erfolgte mit 50 Hz. Es wurden 10.000 Bilder mit einer Laserleistung von etwa 40 mW aufgenommen. Die Rekonstruktion der hochauflösenden Bilder erfolgte mit der Software NEOAnalysis²⁹ unter Verwendung des Gauß'schen Anpassungsalgorithmus und die laterale Drift wurde mit einem Algorithmus zur Korrektur der Kreuzkorrelation korrigiert.

²⁹ Abbelight, Cachan, Frankreich

³⁰ Olympus, Tokio, Japan

³¹ Oxxius, Lannion, Frankreich

³² Semrock, Rochester, USA

³³ Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Abhängigkeit und Kapazität der PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde vom Glukose-, Glutamin- und Fettsäurestoffwechsel

Der Stoffwechsel von Immunzellen ist ein rasant wachsendes Forschungsfeld und seine Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen rückt immer mehr in den Fokus (Galgani, Bruzzaniti et al. 2020). Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe bereits einige Unterschiede im Metabolismus der PBL und CD4⁺-Zellen von Pferden mit ERU im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren aufzeigen (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Sowohl PBL als auch die daraus isolierte CD4⁺-Fraktion von Pferden mit ERU zeigten im Basalstadium eine erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate (*engl.* oxygen consumption rate; OCR), die auf eine vermehrte oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien zurückzuführen ist (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Darüber hinaus zeigten die PBL von an ERU erkrankten Tieren eine erhöhte basale sowie kompensatorische Glykolyserate (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Glykolyserate und der oxidativen Phosphorylierung wäre eine sich grundsätzlich unterscheidende Fähigkeit der Zellen, die Substrate Glukose (Pyruvat), Glutamin (Glutamat) oder Fettsäuren in den Mitochondrien zu nutzen. Um dem nachzugehen, wurden die prozentuale Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität der PBL von gesunden und an ERU erkrankten Pferden von Glukose (Pyruvat; Abbildung 4.1), Glutamin (Abbildung 4.2) und langkettigen Fettsäuren (Abbildung 4.3) mithilfe des Fuel Flex Tests im Seahorse XF Analyzer untersucht und verglichen.

Alle getesteten Tiere in beiden Gruppen hatten eine Glukosekapazität von 100%. Von Glukose waren die PBL gesunder Pferde im Mittel zu 75,8% und die PBL von an ERU erkrankten Pferden zu 73,9% abhängig. Die Glukose-Flexibilität belief sich im Durchschnitt auf 24,3% für die Kontrollgruppe und 26,1% für die ERU-Gruppe. Die prozentuale Kapazität, Abhängigkeit und Flexibilität der PBL von Glukose unterschieden sich zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden nicht signifikant (Abbildung 4.1).

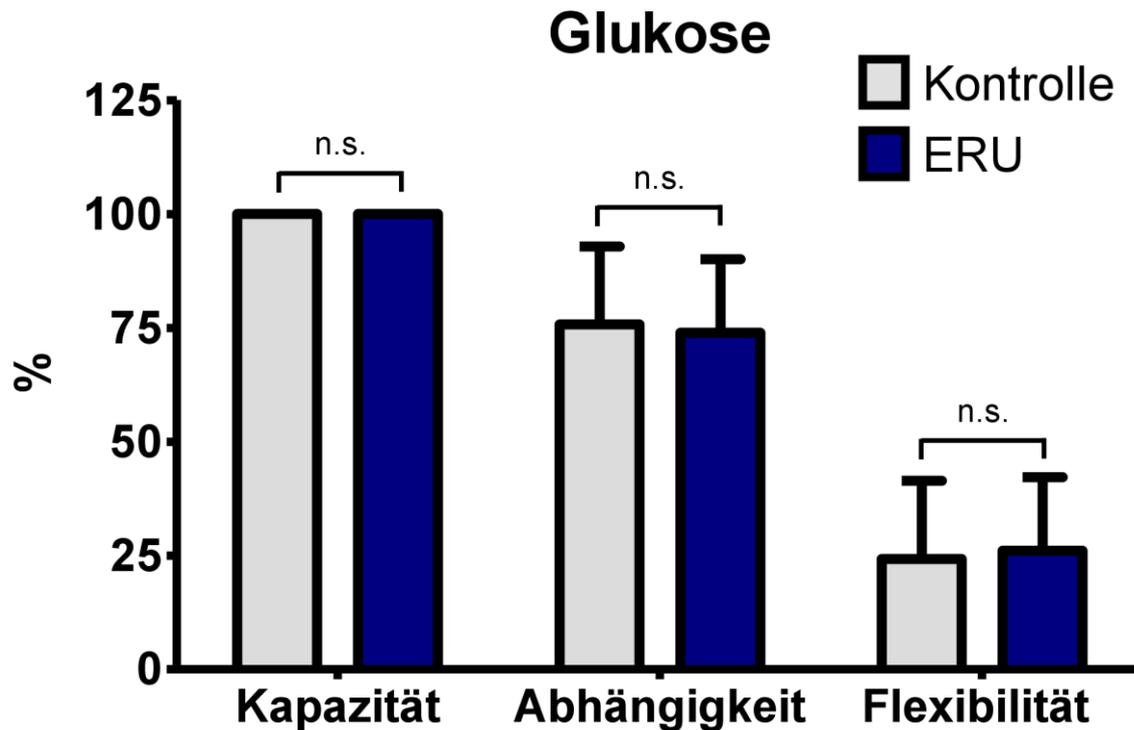


Abbildung 4.1 Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität der PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde von Glukose. Es sind die prozentuale Abhängigkeit und Kapazität der equinen PBL gesunder (grau; n=6) und an ERU erkrankter (blau; n=6) Pferde von Glukose dargestellt. Die Flexibilität ergibt sich aus der Subtraktion der Abhängigkeit von der Kapazität (Flexibilität % = Kapazität % - Abhängigkeit %). Es ist jeweils der Mittelwert in Prozent dargestellt und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei keinem der Parameter ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (n.s. = nicht signifikant; Students *t*-Test).

Die PBL von Kontrolltieren zeigten im Mittel eine Glutaminkapazität von 9,0% und die PBL von an ERU erkrankten Pferden eine von 3,6%. Die PBL von keinem der Tiere zeigte eine Abhängigkeit von Glutamin. Da die Abhängigkeit von Glutamin bei allen Tieren 0% betrug, entspricht die Flexibilität zugleich der Kapazität. Die prozentuale Kapazität, Abhängigkeit und Flexibilität der PBL von Glutamin unterschieden sich nicht signifikant zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden (Abbildung 4.2).

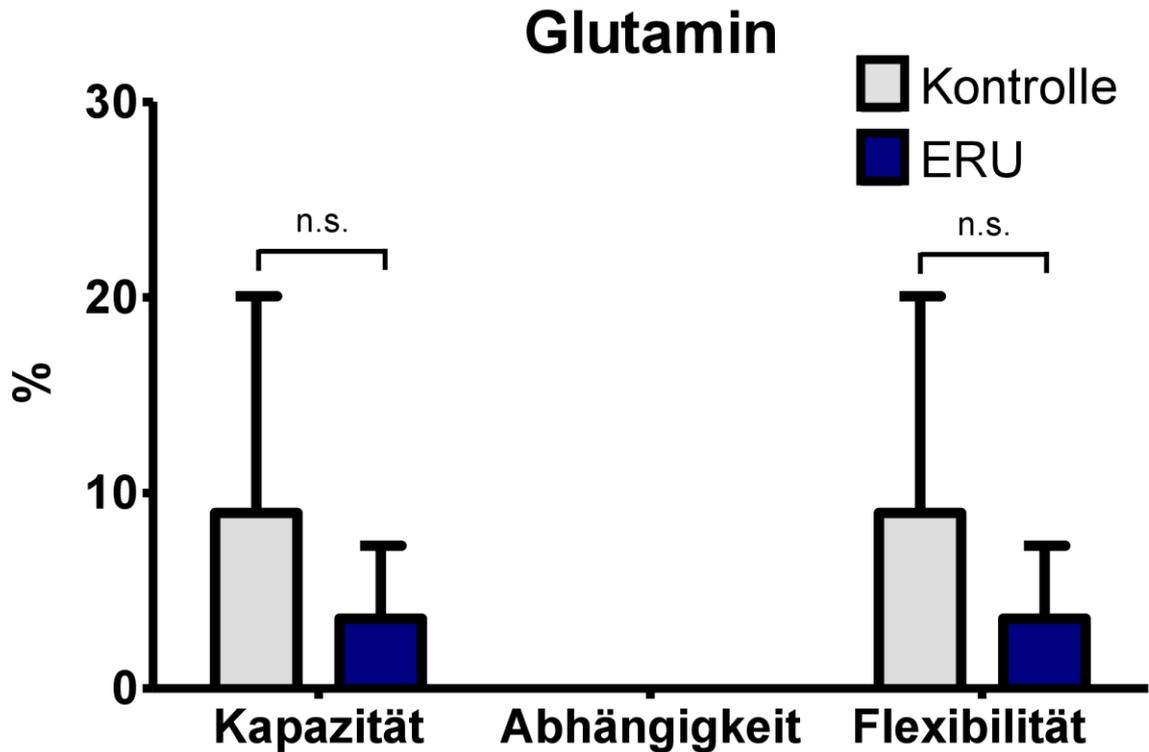


Abbildung 4.2 Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität der PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde von Glutamin. Es sind die prozentuale Abhängigkeit und Kapazität der equinen PBL gesunder (grau; n=6) und an ERU erkrankter (blau; n=6) Pferde von Glutamin dargestellt. Die Flexibilität ergibt sich aus der Subtraktion der Abhängigkeit von der Kapazität (Flexibilität % = Kapazität % - Abhängigkeit %). Es ist jeweils der Mittelwert in Prozent dargestellt und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei keinem der Parameter ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney U-Test).

Bei Fettsäuren bestand im Mittel eine Kapazität von 29,1% bei den PBL von Kontrolltieren und 27,5% bei den PBL von Pferden mit ERU. Die Abhängigkeit betrug 5,5% bei den PBL von gesunden und 3,8% bei den PBL von erkrankten Pferden. Es wurde eine Flexibilität von 23,6% für die PBL gesunder Pferde und von 24,2% für die PBL erkrankter Pferde errechnet. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den PBL von gesunden und an ERU erkrankten Tieren bei den getesteten Parametern Kapazität, Abhängigkeit und Flexibilität (Abbildung 4.3).

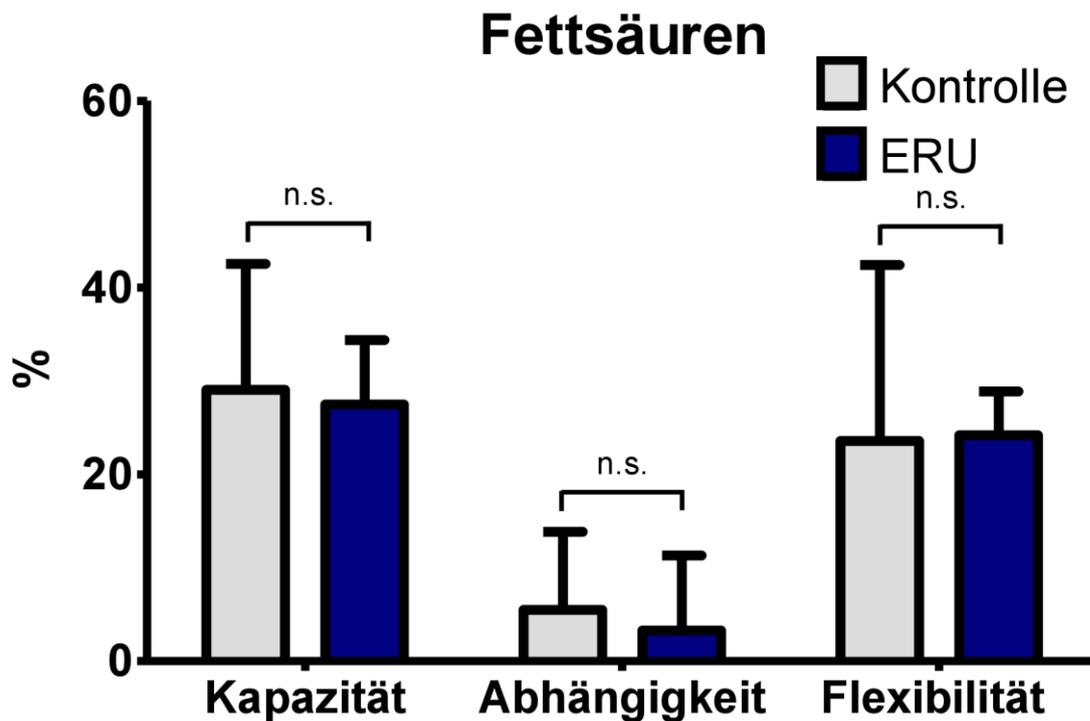


Abbildung 4.3 Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität der PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde von langkettigen Fettsäuren. Es sind die prozentuale Abhängigkeit und Kapazität der equinen PBL gesunder (grau; n=6) und an ERU erkrankter (blau; n=6) Pferde von langkettigen Fettsäuren dargestellt. Die Flexibilität ergibt sich aus der Subtraktion der Abhängigkeit von der Kapazität (Flexibilität % = Kapazität % - Abhängigkeit %). Es ist jeweils der Mittelwert in Prozent dargestellt und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei keinem der Parameter ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney U-Test).

Zusammengenommen ist zu sagen, dass die PBL sowohl bei der gesunden als auch bei der erkrankten Gruppe eine hohe Abhängigkeit und Kapazität bei der Verstoffwechslung von Glukose zeigten, während sie nur eine geringe Abhängigkeit und moderate Kapazität vom Fettsäurestoffwechsel hatten. Von Glutamin waren die equinen PBL nicht abhängig, hatten jedoch die Kapazität, dieses zu einem geringen Prozentsatz zu nutzen. Für keines der Substrate konnte ein signifikanter Unterschied bei der Abhängigkeit, Kapazität oder Flexibilität zwischen den PBL von gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden.

4.2 Untersuchung der Aktivität von Komplex I und Komplex II der Atmungskette sowie der Oxidation langkettiger Fettsäuren im Mitochondrium der CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der von unserer Arbeitsgruppe beobachteten Veränderungen bei der oxidativen Phosphorylierung in intakten CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021) besser zu verstehen, wurden nun Versuche an equinen CD4⁺-Zellen mit permeabilisierter Plasmamembran durchgeführt. Hierfür wurde die Plasmamembran der CD4⁺-Zellen mit rPFO permeabilisiert und die Sauerstoffverbrauchsrate in Reaktion auf verschiedene Substrate und Inhibitoren mithilfe eines Seahorse XF Analyzers gemessen. Als Substrat kam für die Versuche entweder Pyruvat mit Malat (Substrate für Komplex I), Succinat (Substrat für Komplex II) in Kombination mit Rotenon (Inhibitor von Komplex I) oder Palmitoyl-L-Carnitin (langkettige Fettsäure) jeweils in Kombination mit ADP zum Einsatz, gefolgt von der Injektion von Oligomycin und zuletzt Rotenon mit Antimycin A. Anhand der Veränderungen der Sauerstoffverbrauchsrate in Reaktion auf die Substrate und Inhibitoren wurde das Stadium 3 und 4_o der mitochondrialen Respiration errechnet. Da noch keine Protokolle für die Untersuchung permeabilisierter equiner CD4⁺-Zellen im Seahorse XF Analyzer vorlagen (Stand der Literaturrecherche: März 2023), musste der Assay zunächst für diesen Zelltyp optimiert werden.

4.2.1 Etablierung einer optimalen Zellzahl zur Messung der Pyruvat- und Succinat-medierten Aktivität in permeabilisierten equinen CD4⁺-Zellen

Eine Optimierung der Zelldichte ist wichtig für die funktionelle Untersuchung von Mitochondrien in permeabilisierten Zellen (Salabei, Gibb et al. 2014). Für die Messung equiner CD4⁺-Zellen im Seahorse XFe24 Analyzer wurde dies bisher noch nicht durchgeführt (Stand der PubMed Literaturrecherche: Februar 2023).

Die maximale Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen sollte dabei nicht unter 100 und nicht über 800 pmol/min liegen, um technisch verlässliche Messungen im Seahorse Analyzer zu gewährleisten (Salabei, Gibb et al. 2014). Die CD4⁺-Zellen eines

gesunden Pferdes wurden daher mit den Zellzahlen 8×10^5 , 1×10^6 und $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Delle ausgesät und mit 1 nM rPFO permeabilisiert. Nach der Messung von zwei Basalwerten wurde entweder Pyruvat mit Malat und ADP (Komplex I; Abbildung 4.4 A) oder Succinat mit Rotenon und ADP (Komplex II; Abbildung 4.4 B) in Port A injiziert. Die maximale Sauerstoffverbrauchsrate nach der Injektion der Substrate in Port A nahm mit steigender Zellzahl zu. Es konnte beobachtet werden, dass die Sauerstoffverbrauchsrate nach der Zugabe von Komplex I-Substraten deutlich niedriger lag als nach der Zugabe von Komplex II-Substraten. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass bei der Abgabe von zwei Elektronen aus NADH an Komplex I insgesamt vier Protonen mehr in den Intermembranraum gepumpt werden als beim Eintritt der Elektronen über Komplex II, was wiederum dazu führt, dass weniger Sauerstoff für die Erzeugung der gleichen Menge ATP notwendig ist (Brand und Nicholls 2011, Nicholls 2021). Erst bei einer Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Delle zeigten die permeabilisierten equinen CD4⁺-Zellen nach der Injektion der Komplex I-Substrate eine Sauerstoffverbrauchsrate von 100 pmol/min, während bei geringeren Zellzahlen dieser Grenzwert unterschritten wurde. Die Sauerstoffverbrauchsrate nach der Injektion der Komplex II-Substrate lag bei einer Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Delle im Mittel bei 635 pmol/min, sodass für beide Ansätze bei dieser Zellzahl die maximale Sauerstoffverbrauchsrate innerhalb der erwünschten Spanne von 100 bis 800 pmol/min lag. Eine Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Delle wurde daher als optimal angesehen und für alle weiteren Analysen mit permeabilisierten equinen CD4⁺-Zellen verwendet.

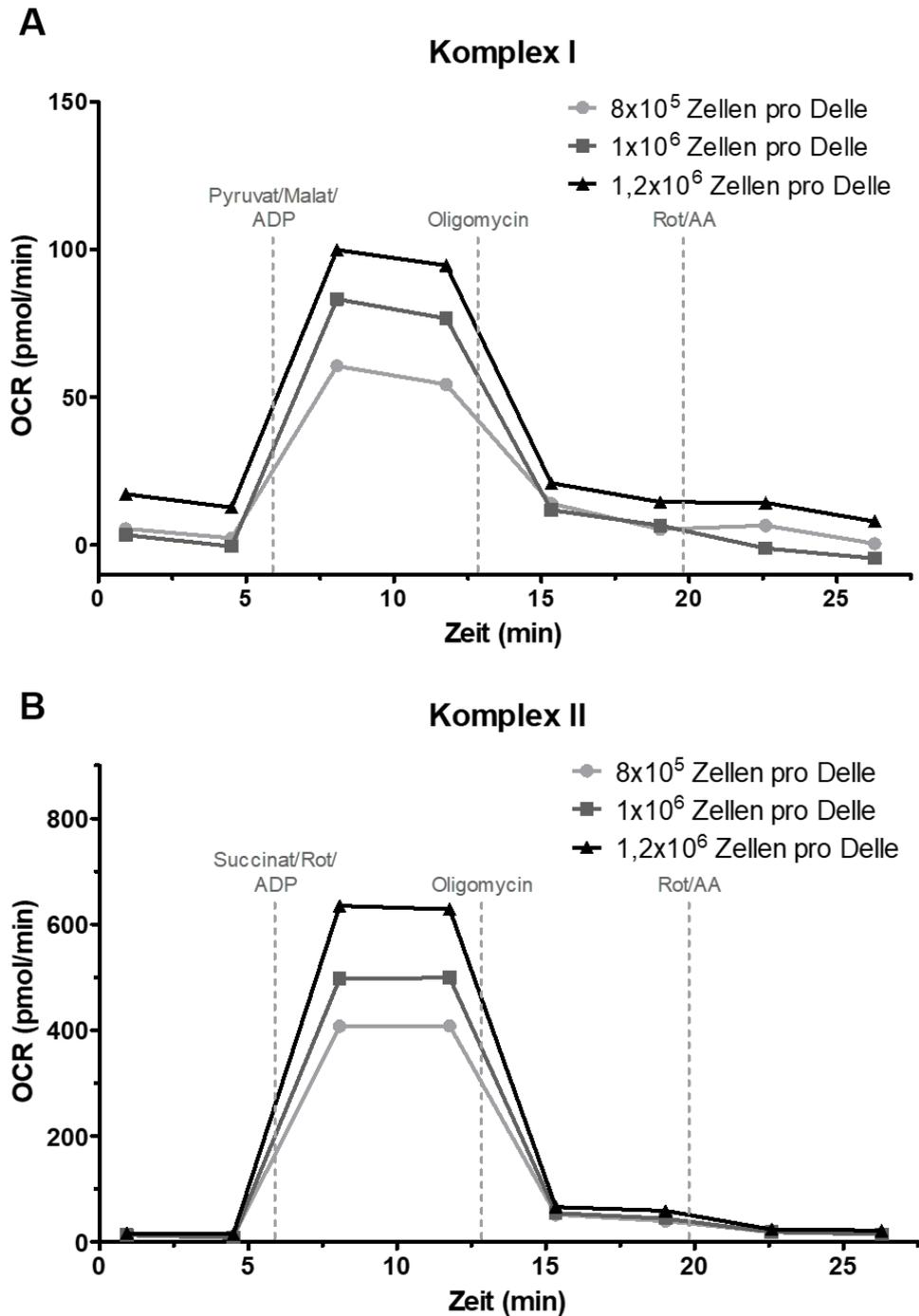


Abbildung 4.4 Optimierung der Zelldichte pro Delle zur Messung der Sauerstoffverbrauchsrate in permeabilisierten CD4⁺-Zellen. Die Darstellung zeigt vergleichend die Sauerstoffverbrauchsrate von mit rPFO permeabilisierten equinen CD4⁺-Zellen bei 8×10^5 , 1×10^6 und $1,2 \times 10^6$ ausgesäten Zellen pro Delle. In Port A wurde Pyruvat mit Malat und ADP (A) oder Succinat mit Rotenon und ADP (B) injiziert. Bei einer Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen konnten nach der Substratinjektion Sauerstoffverbrauchsraten zwischen 100 und 800 pmol/min gemessen werden, daher wurde diese Zellzahl pro Delle als optimale Zelldichte ausgewählt und für die weiteren Versuche verwendet.

4.2.2 Für die Permeabilisierung equiner CD4⁺-Zellen kann rPFO in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt werden

Die optimale Konzentration an rPFO zur Permeabilisierung der Zellmembran equiner CD4⁺-Zellen wurde ebenfalls noch nicht beschrieben (Stand der PubMed Literaturrecherche: Februar 2023). Für viele Zelltypen kann rPFO in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt werden, sollte jedoch für jede Zellart individuell bestimmt werden (Divakaruni, Wiley et al. 2013, Divakaruni, Rogers et al. 2014). Um zu testen, ob für equine CD4⁺-Zellen eine Konzentration von 1 nM ebenfalls adäquat ist, wurden die CD4⁺-Zellen eines gesunden Pferdes mit rPFO mit den Konzentrationen 0,5 nM, 1 nM oder 3 nM permeabilisiert. Eine Gruppe ohne Permeabilisierung diente als Kontrolle. Anschließend wurde die Sauerstoffverbrauchsrate in Reaktion auf die Injektion von Succinat mit ADP und Rotenon, dann Oligomycin und zuletzt Rotenon und Antimycin A im Seahorse XF Analyzer gemessen. Das in Port A injizierte Succinat und ADP kann in intakten Zellen die Plasmamembran nicht überwinden und steht daher nur in permeabilisierten Zellen den Mitochondrien als Substrat zur Verfügung (Divakaruni, Wiley et al. 2013, Divakaruni, Rogers et al. 2014). Dies verdeutlicht die Sauerstoffverbrauchskurve der CD4⁺-Zellen, die nicht permeabilisiert wurden (0 nM rPFO). Hier sieht man keinen Anstieg der Sauerstoffverbrauchsrate nach Injektion von Succinat und ADP, da diese die Plasmamembran nicht überwinden können. Bei unvollständiger Permeabilisierung ist daher eine geringere Sauerstoffverbrauchsrate nach der Injektion zu erwarten (Divakaruni, Wiley et al. 2013).

Bei den equinen CD4⁺-Zellen zeigte sich, dass die höchste Sauerstoffverbrauchsrate bei einer rPFO-Konzentration von 1 nM erreicht werden konnte, während sie bei 0,5 nM noch deutlich darunter lag. Durch eine Steigerung der rPFO-Konzentration auf 3 nM konnte keine höhere Sauerstoffverbrauchsrate erreicht werden (Abbildung 4.5). Dies spricht dafür, dass eine vollständige Permeabilisierung der equinen CD4⁺-Zellen bei 1 nM rPFO erreicht werden konnte. Die Konzentration wurde daher als optimal angesehen und für die weiteren Versuche verwendet.

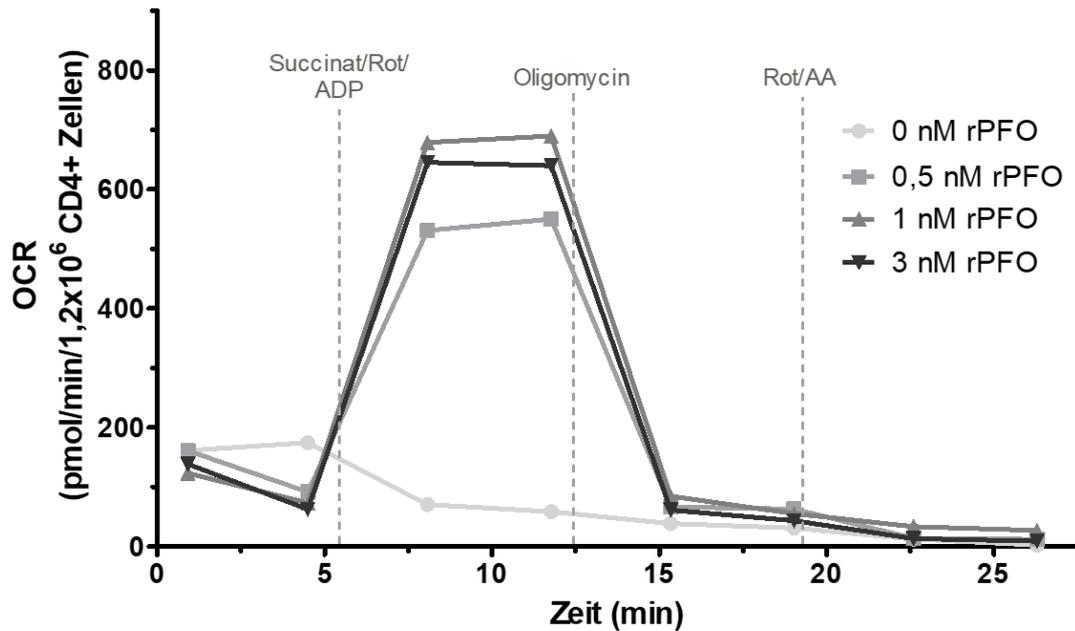


Abbildung 4.5 Vergleich der Sauerstoffverbrauchsrate von equinen CD4⁺-Zellen nach der Permeabilisierung mit verschiedenen rPFO Konzentrationen. Die Darstellung zeigt vergleichend die Sauerstoffverbrauchsrate equiner CD4⁺-Zellen nach Zugabe von rPFO in den Konzentrationen 0, 0,5, 1 und 3 nM. Nach der Messung von zwei Basalwerten wurden zunächst Succinat zusammen mit Rotenon und ADP, dann Oligomycin und zuletzt Rotenon und Antimycin A injiziert. Es ist zu sehen, dass die Sauerstoffverbrauchsrate nach Injektion von Succinat/Rot/ADP bei einer Konzentration von 1 nM rPFO am höchsten war, während sie bei 0,5 nM deutlich niedriger lag. Die Sauerstoffverbrauchsrate unterschied sich nur wenig zwischen Konzentrationen von 1 und 3 nM rPFO. Dies spricht dafür, dass die Zellen bereits bei 1 nM vollständig permeabilisiert sind und keine höhere Konzentration nötig ist. Nach der Oligomycin-Injektion sank die Sauerstoffverbrauchsrate wieder auf ein nahezu identisches Niveau zwischen allen Ansätzen.

4.2.3 Zwischen der Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-medierten Aktivität der Atmungskette der CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde bestand kein Unterschied

Nach der Optimierung der Versuchsbedingungen sollte nun die Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-medierte Aktivität der Atmungskette zwischen CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Tieren verglichen werden. Die CD4⁺-Zellen von fünf ERU und fünf Kontrolltieren wurden mittels magnetischer Separation positiv selektiert und besaßen eine Reinheit von mindestens 96%; ihre Sauerstoffverbrauchsrate wurde dann in Reaktion auf verschiedene Substrate und Inhibitoren mithilfe eines Seahorse XFe24 Analyzers bestimmt (s. auch 3.5.5).

Für die Messung der Pyruvat-medierten Respiration von Komplex I wurden den equinen CD4⁺-Zellen Pyruvat und Malat zusammen mit ADP als Substrate zur Verfügung gestellt. Es konnte eine deutliche Pyruvat-medierte Aktivität gemessen werden (Abbildung 4.6 A). Es bestand weder im Stadium 3 noch im Stadium 4_o ein signifikanter Unterschied zwischen CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden (Abbildung 4.6 B).

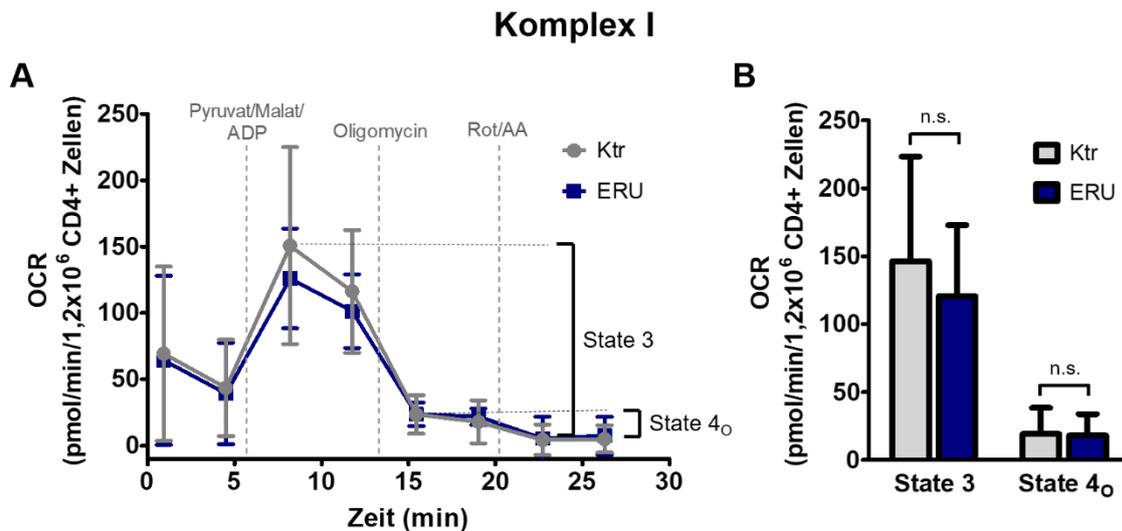


Abbildung 4.6 Messung der Pyruvat-medierten Aktivität von Komplex I der Atmungskette in CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde nach Permeabilisierung der Plasmamembran. Dargestellt ist die Sauerstoffverbrauchskurve (A) und ein Balkendiagramm der Stadium 3 und Stadium 4_o Respiration (B) von mit 1 nM rPFO permeabilisierten CD4⁺-Zellen gesunder (grau; n=5) und an ERU erkrankter (blau; n=5) Pferde. Nach der Messung von zwei Basalwerten wurden Pyruvat mit Malat und ADP injiziert. Dies führte zu einem Anstieg der respiratorischen Aktivität und damit der Sauerstoffverbrauchsrate und stellt das Stadium 3 Respiration dar. Als zweites wurde Oligomycin injiziert, um die ADP unabhängige Respiration (Stadium 4_o) zu messen und zuletzt wurden Rotenon und Antimycin A hinzugefügt, was die Beurteilung des Restwerts des Sauerstoffverbrauchs und die Berechnung des Stadium 3 und 4_o zulässt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Bei der Aktivität von Komplex I konnte kein Unterschied in den CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney U-Test).

Wird den Zellen hingegen Succinat zur Verfügung gestellt und gleichzeitig der Komplex I durch Rotenon gehemmt, lässt sich die Komplex II-medierte Respiration der Zellen beurteilen (Salabei, Gibb et al. 2014). Es konnte ein deutlicher Anstieg der Sauerstoffverbrauchsrate der equinen CD4⁺-Zellen in Reaktion auf die Succinat Injektion beobachtet werden (Abbildung 4.7 A). Die CD4⁺-Zellen von an ERU

erkrankten Tieren zeigten zwar eine durchschnittlich deutlich geringere Stadium 3 Respiration in Reaktion auf Succinat, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0.058$; Abbildung 4.7). Es konnten also auch bei der Komplex II-medierten Aktivität der Atmungskette keine signifikanten Unterschiede in der Stadium 3 oder Stadium 4_o Respiration zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (Abbildung 4.7 B).

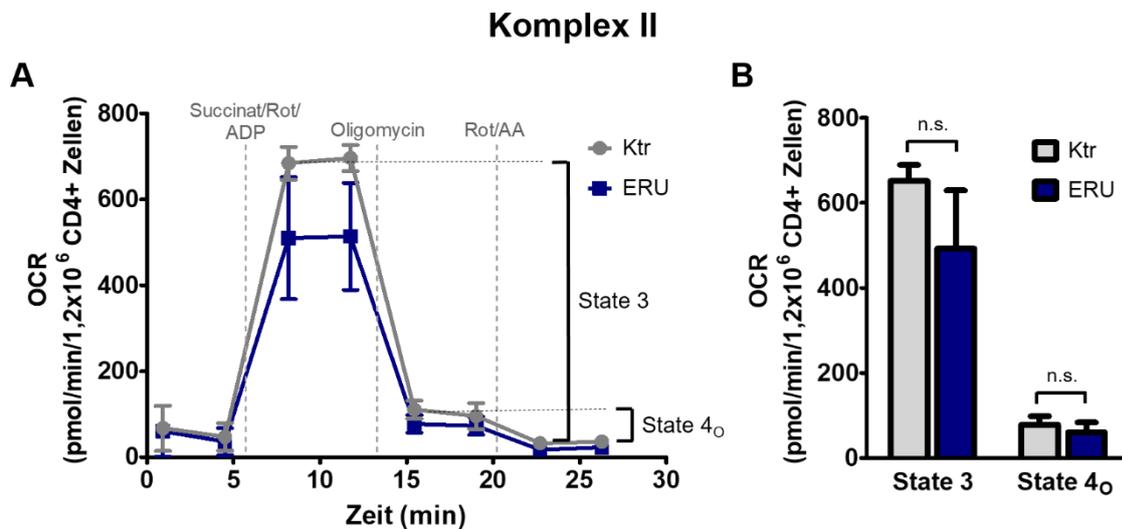


Abbildung 4.7 Messung der Succinat-medierten Aktivität von Komplex II der Atmungskette in CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde nach Permeabilisierung der Plasmamembran. Dargestellt ist die Sauerstoffverbrauchskurve (**A**) und ein Balkendiagramm der Stadium 3 und Stadium 4_o Respiration (**B**) von mit 1 nM PMP permeabilisierten CD4⁺-Zellen gesunder (grau; n=5) und an ERU erkrankter (blau; n=5) Pferde. Nach der Messung von zwei Basalwerten wurden Succinat mit Rotenon und ADP injiziert. Dies führte zu einem Anstieg der respiratorischen Aktivität und damit der Sauerstoffverbrauchsrate und stellt die Stadium 3 Respiration dar. Als zweites wurde Oligomycin injiziert, um die ADP unabhängige Respiration (Stadium 4_o) zu messen und zuletzt wurden Rotenon und Antimycin A hinzugefügt, was die Beurteilung des Restwerts des Sauerstoffverbrauchs und die Berechnung des Stadium 3 und 4_o zulässt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Bei der Aktivität von Komplex II konnte kein Unterschied in den CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (n.s. = nicht signifikant; Welch's *t*-Test).

Zuletzt wurde noch die Aktivität der Atmungskette in permeabilisierten CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden mit Palmitoyl-L-Carnitin als Substrat untersucht. Dies entspricht der Palmitat-medierten Aktivität der Atmungskette, die Kopplung an Carnitin gewährleistet den Transport von Palmitat ins Mitochondrium (Salabei, Gibb et al. 2014). Durch einen deutlichen Anstieg der

Sauerstoffverbrauchsrate als Reaktion auf die Injektion von Palmitoyl-L-Carnitin konnte gezeigt werden, dass Palmitat als Substrat für die Mitochondrien der equinen CD4⁺-Zellen fungiert (Abbildung 4.8 A). Es konnte jedoch ebenfalls weder im Stadium 3 noch im Stadium 4_o ein signifikanter Unterschied in der Palmitat-medierten Aktivität der Atmungskette bei CD4⁺-Zellen zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (Abbildung 4.8 B).

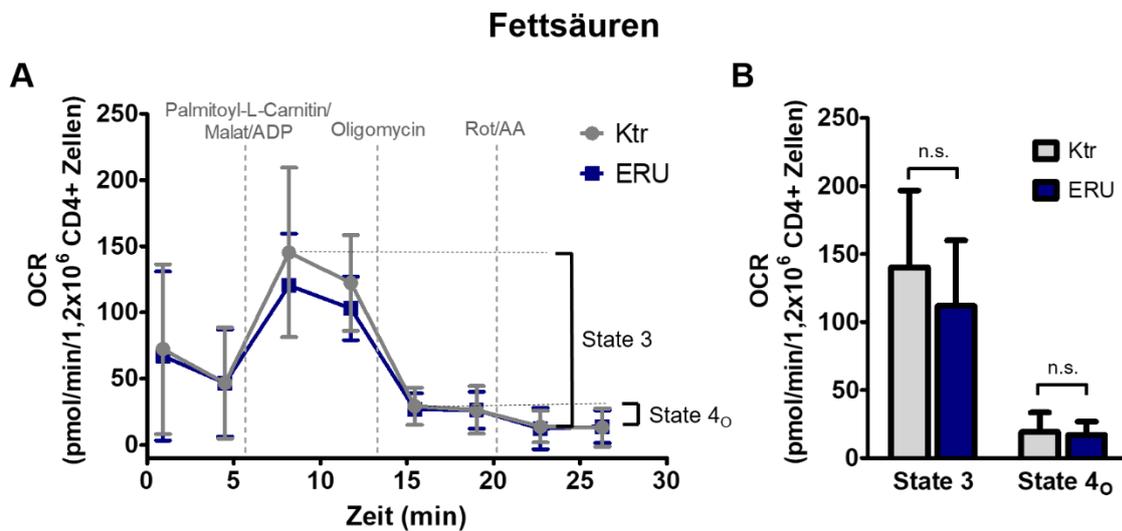


Abbildung 4.8 Messung der Palmitat-medierten Oxidation langkettiger Fettsäuren in CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde nach Permeabilisierung der Plasmamembran. Dargestellt ist die Sauerstoffverbrauchskurve (**A**) und ein Balkendiagramm der Stadium 3 und Stadium 4_o Respiration (**B**) von mit 1 nM PMP permeabilisierten CD4⁺-Zellen gesunder (grau; n=5) und an ERU erkrankter (blau; n=5) Pferde. Nach der Messung von zwei Basalwerten wurden Palmitoyl-L-Carnitin mit Malat und ADP injiziert. Dies führte zu einem Anstieg der respiratorischen Aktivität und damit der Sauerstoffverbrauchsrate und stellt die Stadium 3 Respiration dar. Als zweites wurde Oligomycin injiziert, um die ADP unabhängige Respiration (Stadium 4_o) zu messen. Zuletzt wurden Rotenon und Antimycin A hinzugefügt, was die Beurteilung des Restwerts des Sauerstoffverbrauchs und die Berechnung von Stadium 3 und 4_o zulässt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Bei der Oxidation langkettiger Fettsäuren konnte kein Unterschied in den CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney U-Test).

4.3 Analyse des Proteoms der Mitochondrien von CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde

Durch die isolierte Untersuchung der Pyruvat-, Succinat- und Palmitat-mediierten Respiration mithilfe der Messung der Sauerstoffverbrauchsrate in permeabilisierten CD4⁺-Zellen konnte keine Erklärung für die höhere basale Aktivität der oxidativen Phosphorylierung gefunden werden, die in intakten CD4⁺-Zellen von Tieren mit ERU beschrieben wurde (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021) (siehe Kapitel 4.2.3). Bei der Betrachtung einzelner Komplexe oder Substrate in permeabilisierten Zellen - oder auch isolierten Mitochondrien - ist jedoch zu bedenken, dass nicht ein einzelner Enzymkomplex für die Veränderungen in der Respirationsrate der Zellen verantwortlich sein muss und komplexere Zusammenhänge nicht dargestellt werden können (Brand und Nicholls 2011). Daher wurde als nächstes das Proteom der Mitochondrien aus CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden vergleichend untersucht und bioinformatisch analysiert. Dies sollte dazu beitragen, die Veränderungen im Mitochondrien-Stoffwechsel von CD4⁺-Zellen von Pferden mit ERU auf Proteinebene genauer zu charakterisieren und zusammenhängende Stoffwechselwege zu identifizieren. Dabei war von besonderem Interesse, ob sich Unterschiede in den Abundanzen der an der oxidativen Phosphorylierung, am Glukose- oder am Fettsäurestoffwechsel beteiligten Proteine zeigen und welche Proteine hier in den CD4⁺-Zellen vom Pferd gefunden werden können. Die CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden wurden mittels magnetischer Separation aus den PBL positiv selektiert und besaßen eine Reinheit von mindestens 96%. Nach der Isolation der Mitochondrien erfolgte die Identifizierung, Quantifizierung und differentielle Analyse ihres Proteoms.

Mit Hilfe der LC-MS/MS konnten insgesamt 4340 Proteine eindeutig identifiziert werden. Durch Abgleich der identifizierten Proteine mit der human MitoCarta3.0 Datenbank (<https://www.broadinstitute.org/files/shared/metabolism/mitocarta/human.mitocarta3.0.html>) (Rath, Sharma et al. 2021) konnten 629 dieser Proteine eindeutig dem Mitochondrium zugeordnet werden. Sieben der Proteine kamen nur in einer einzelnen Probe vor und wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, so dass sich 622 identifizierte mitochondriale Proteine für die weiteren Analysen ergaben.

4.3.1 Identifikation von 89 differentiell abundanten mitochondrialen Proteinen in den CD4⁺- Zellen von an ERU erkrankten Tieren

Von den 622 mitochondrialen Proteinen konnte bei insgesamt 89 Proteinen eine signifikant ($p < 0,05$; Student's *t*-Test) unterschiedliche Abundanz zwischen den CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden. Dies entsprach einer signifikant veränderten Abundanz bei 14,3 % der identifizierten mitochondrialen Proteine. Einundfünfzig der Proteine in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von ERU-Tieren wiesen eine höhere (Tabelle 4.1) und 38 eine geringere Abundanz (Tabelle 4.2) im Vergleich zu denen der CD4⁺-Zellen von Kontrolltieren auf.

a) Nr.	b) Protein	c) Genname	d) Accession Nummer	e) p-Wert
1	Mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1	MUL1	ENSECAP00000013139	$\leq 1 \times 10^{-17}$
2	Golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1	GBF1	ENSECAP00000021486	$\leq 1 \times 10^{-17}$
3	G-rich RNA sequence binding factor 1	GRSF1	ENSECAP00000021717	$\leq 1 \times 10^{-17}$
4	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	ENSECAP00000016379	$\leq 1 \times 10^{-17}$
5	Mitochondrial ribosomal protein L53	MRPL53	ENSECAP00000022877	$\leq 1 \times 10^{-17}$
6	Mitochondrial ribosomal protein S21	MRPS21	ENSECAP00000007760	$\leq 1 \times 10^{-17}$
7	Mitochondrial ribosomal protein S30	MRPS30	ENSECAP00000007360	$\leq 1 \times 10^{-17}$
8	Mitochondrial ribosomal protein S5	MRPS5	ENSECAP00000001647	$\leq 1 \times 10^{-17}$
9	Mitochondrial translational release factor 1-like	MTRF1L	ENSECAP00000002523	$\leq 1 \times 10^{-17}$
10	Biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 1	BLOC1S1	ENSECAP00000016922	$\leq 1 \times 10^{-17}$
11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 3	NDUFA3	ENSECAP00000013512	$\leq 1 \times 10^{-17}$
12	PTC7 protein phosphatase homolog	PPTC7	ENSECAP00000004768	$\leq 1 \times 10^{-17}$
13	Small integral membrane protein 20	SMIM20	ENSECAP00000021489	$\leq 1 \times 10^{-17}$
14	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3	MT-ND3	ENSECAP00000023102	$\leq 1 \times 10^{-17}$
15	C-x(9)-C motif containing 2	CMC2	ENSECAP00000000668	$\leq 1 \times 10^{-17}$
16	Coenzyme Q10 homolog B	COQ10B	ENSECAP00000004704	$\leq 1 \times 10^{-17}$

Ergebnisse

17	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15	DNAJC15	ENSECAP00000005755	$\leq 1 \times 10^{-17}$
18	GTP-binding protein 10	GTPBP10	ENSECAP00000015219	$\leq 1 \times 10^{-17}$
19	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	IDI1	ENSECAP00000022536	$\leq 1 \times 10^{-17}$
20	AFG1 like ATPase	AFG1L	ENSECAP00000020986	$\leq 1 \times 10^{-17}$
21	Mitochondrial ribosomal protein L54	MRPL54	ENSECAP00000001032	$\leq 1 \times 10^{-17}$
22	Mitochondrial ribosomal protein S6	MRPS6	ENSECAP00000010341	$\leq 1 \times 10^{-17}$
23	Translocase of inner mitochondrial membrane 21 homolog	TIMM21	ENSECAP00000014432	$\leq 1 \times 10^{-17}$
24	Translocase of inner mitochondrial membrane domain containing 1	TIMMDC1	ENSECAP00000004306	$\leq 1 \times 10^{-17}$
25	Equus caballus ferritin, heavy polypeptide 1	FTH1	ENSECAP00000002766	$\leq 1 \times 10^{-17}$
26	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex 1	NDUFAB1	ENSECAP00000008698	$4,45 \times 10^{-07}$
27	Acyl-CoA dehydrogenase family, member 10	ACAD10	ENSECAP00000011813	$4,45 \times 10^{-07}$
28	Diazepam binding inhibitor	DBI	ENSECAP00000016516	$6,21 \times 10^{-05}$
29	SRA stem-loop interacting RNA binding protein	SLIRP	ENSECAP00000000444	$8,38 \times 10^{-05}$
30	TP53-regulated inhibitor of apoptosis 1-like protein	TRIAP1	ENSECAP00000010061	$2,22 \times 10^{-04}$
31	BCL2-associated X protein	BAX	ENSECAP00000014372	$2,37 \times 10^{-04}$
32	Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial	COX6A1	ENSECAP00000010311	$4,27 \times 10^{-04}$
33	Iron sulfur domain 1	CISD1	ENSECAP00000006854	$4,46 \times 10^{-04}$
34	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2	PDK2	ENSECAP00000020559	$1,42 \times 10^{-03}$
35	Frataxin	FXN	ENSECAP00000016646	$1,06 \times 10^{-02}$
36	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	NDUFS7	ENSECAP00000000315	$1,37 \times 10^{-02}$
37	Synaptosomal-associated protein	SNAP29	ENSECAP00000017929	$2,01 \times 10^{-02}$
38	Oxidase (cytochrome c) assembly 1-like	OXA1L	ENSECAP00000013385	$2,19 \times 10^{-02}$
39	Mitochondrial inner membrane organizing system 1	MINOS1	ENSECAP00000006217	$2,39 \times 10^{-02}$
40	Quinoid dihydropteridine reductase	QDPR	ENSECAP00000003989	$2,62 \times 10^{-02}$
41	Solute carrier family 25, member 5	SLC25A5	ENSECAP00000011418	$2,98 \times 10^{-02}$
42	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 1	NDUFB1	ENSECAP00000021337	$3,04 \times 10^{-02}$

43	28S ribosomal protein S17, mitochondrial	ZNF713	ENSECAP00000010325	3,45 x 10 ⁻⁰²
44	Parkinson protein 7	PARK7	ENSECAP00000014829	3,61 x 10 ⁻⁰²
45	Mitochondrial intermediate peptidase	MIPEP	ENSECAP00000006416	3,87 x 10 ⁻⁰²
46	Plasminogen receptor with a C-terminal lysine	PLGRKT	ENSECAP00000012612	3,87 x 10 ⁻⁰²
47	Mitochondrial ribosomal protein L40	MRPL40	ENSECAP00000007751	4,26 x 10 ⁻⁰²
48	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 7	NDUFB7	ENSECAP00000015242	4,42 x 10 ⁻⁰²
49	Equus caballus lactate dehydrogenase B	LDHB	ENSECAP00000009370	4,52 x 10 ⁻⁰²
50	Peroxiredoxin 6	PRDX6	ENSECAP00000019986	4,56 x 10 ⁻⁰²
51	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9 B-like protein	TIMM10B	ENSECAP00000000559	4,93 x 10 ⁻⁰²

Tabelle 4.1 Alle 51 signifikant höher abundanten mitochondrialen Proteine in CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. a) Fortlaufende Nummer des Proteins sortiert nach der statistischen Signifikanz, b) Proteinname wie in der Ensembl-Protein-Datenbank für Pferde EquCab3.0 v.108.3 aufgeführt (abgerufen am 05.01.2023; https://www.ensembl.org/Equus_caballus), c) Genname des Proteins, d) Protein-Zugangsnummern, wie in der Ensembl-Datenbank für Pferde EquCab3.0 v.108.3 aufgeführt, e) Statistische Signifikanz der Unterschiede in der Abundanz der mitochondrialen Proteine in CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren, errechnet mit dem Student's *t*-Test.

a) Nr.	b) Protein	c) Genname	d) Accession Nummer	e) p-Wert
1	Solute carrier family 25, member 40	SLC25A40	ENSECAP00000007663	≤ 1 x 10 ⁻¹⁷
2	Selenoprotein O	SELENOO	ENSECAP00000022456	1,57 x 10 ⁻⁰⁶
3	Protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1	PTPMT1	ENSECAP00000010555	1,17 x 10 ⁻⁰⁵
4	Mitochondrial ribosomal protein L17	MRPL17	ENSECAP00000008082	4,00 x 10 ⁻⁰⁵
5	Isochorismatase domain containing 2	ISOC2	ENSECAP00000013611	1,13 x 10 ⁻⁰³
6	Solute carrier family 25, member 19	SLC25A19	ENSECAP00000008460	1,19 x 10 ⁻⁰³
7	Lysophospholipase-like 1	LYPLAL1	ENSECAP00000010337	1,23 x 10 ⁻⁰³
8	Solute carrier family 25, member 1	SLC25A1	ENSECAP00000018840	5,19 x 10 ⁻⁰³
9	Deoxyuridine triphosphatase	DUT	ENSECAP00000013678	5,73 x 10 ⁻⁰³
10	Diablo, IAP-binding mitochondrial protein	DIABLO	ENSECAP00000017797	5,86 x 10 ⁻⁰³
11	GrpE-like 1, mitochondrial	GRPEL1	ENSECAP00000007642	7,54 x 10 ⁻⁰³

12	Equus caballus superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	ENSECAP00000009823	1,09 x 10 ⁻⁰²
13	Solute carrier family 25, member 29	SLC25A29	ENSECAP00000004540	1,15 x 10 ⁻⁰²
14	Spastic paraplegia 7	SPG7	ENSECAP00000016432	1,33 x 10 ⁻⁰²
15	NIF3 NGG1 interacting factor 3-like 1	NIF3L1	ENSECAP00000018398	1,49 x 10 ⁻⁰²
16	Peroxiredoxin 5	PRDX5	ENSECAP00000015414	1,50 x 10 ⁻⁰²
17	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	HADH	ENSECAP00000017807	1,52 x 10 ⁻⁰²
18	Translocator protein	TSPO	ENSECAP00000019163	1,54 x 10 ⁻⁰²
19	FUN14 domain containing 2	FUNDC2	ENSECAP00000022812	1,59 x 10 ⁻⁰²
20	GTP binding protein 3	GTPBP3	ENSECAP00000016285	1,61 x 10 ⁻⁰²
21	Phospholipid scramblase 3	PLSCR3	ENSECAP00000013329	1,70 x 10 ⁻⁰²
22	Stomatin (EPB72)-like 2	STOML2	ENSECAP00000015477	1,78 x 10 ⁻⁰²
23	Mitochondrial ribosomal protein L38	MRPL38	ENSECAP00000012373	1,87 x 10 ⁻⁰²
24	Peroxiredoxin 4	PRDX4	ENSECAP00000008266	2,08 x 10 ⁻⁰²
25	Coproporphyrinogen oxidase	CPOX	ENSECAP00000014225	2,16 x 10 ⁻⁰²
26	Mitochondrial ribosomal protein L18	MRPL18	ENSECAP00000010237	2,21 x 10 ⁻⁰²
27	Flavin adenine dinucleotide synthetase 1	FLAD1	ENSECAP00000020238	2,26 x 10 ⁻⁰²
28	Equus caballus catechol-O-methyltransferase	COMT	ENSECAP00000005379	2,31 x 10 ⁻⁰²
29	Acyl-CoA thioesterase 4	ACOT4	ENSECAP00000007897	2,51 x 10 ⁻⁰²
30	Nipsnap homolog 3A	NIPSNAP3A	ENSECAP00000004528	2,52 x 10 ⁻⁰²
31	ATP synthase subunit a	MT-ATP6	ENSECAP00000023105	2,70 x 10 ⁻⁰²
32	Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	ETFa	ENSECAP00000002000	2,88 x 10 ⁻⁰²
33	Translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog	TOMM20	ENSECAP00000017214	2,88 x 10 ⁻⁰²
34	Mitochondrial ribosomal protein S28	MRPS28	ENSECAP00000013010	3,32 x 10 ⁻⁰²
35	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	HSD17B10	ENSECAP00000013274	3,70 x 10 ⁻⁰²
36	Branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial	BCAT2	ENSECAP00000009482	3,75 x 10 ⁻⁰²
37	Malic enzyme	ME2	ENSECAP00000005430	4,38 x 10 ⁻⁰²
38	Peptidylprolyl isomerase F	PPIF	ENSECAP00000007049	4,89 x 10 ⁻⁰²

Tabelle 4.2 Alle 38 signifikant geringer abundanten mitochondrialen Proteine in CD4+ Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. a) Fortlaufende Nummer des Proteins sortiert nach der statistischen Signifikanz, b) Proteinname wie in der Ensembl-Protein-Datenbank für Pferde EquCab3.0 v.108.3 aufgeführt (abgerufen am 05.01.2023);

https://www.ensembl.org/Equus_caballus), c) Genname des Proteins, d) Protein-Zugangsnummern, wie in der Ensembl-Datenbank für Pferde EquCab3.0 v.108.3 aufgeführt, e) Statistische Signifikanz der Unterschiede in der Abundanz der mitochondrialen Proteine in CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren, errechnet mit dem Student's *t*-Test.

4.3.2 Pathway-Anreicherungs-Analyse differentiell abundanter Proteine im mitochondrialen Proteom von CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde

Um funktionelle Zusammenhänge der differentiell abundanten mitochondrialen Proteine mit biologischen Stoffwechselwegen und Funktionen zu ermitteln, wurde eine Pathway-Anreicherungs-Analyse durchgeführt. Pathway-Anreicherungs-Analysen basieren darauf, Schnittmengen zwischen vordefinierten kanonischen Stoffwechselwegen und im Datensatz vorhandenen Proteinen zu identifizieren (Reimand, Isserlin et al. 2019). Findet sich eine Schnittmenge, die größer als zufällig zu erwarten ist, besteht eine Anreicherung dieses Stoffwechselwegs. Die Canonical-Pathway-Analyse der Proteine, die in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von Pferden mit ERU differentiell abundant waren, ergab insgesamt 30 signifikant ($p < 0,05$; Fisher's exact test) angereicherte Stoffwechselwege (Abbildung 4.9).

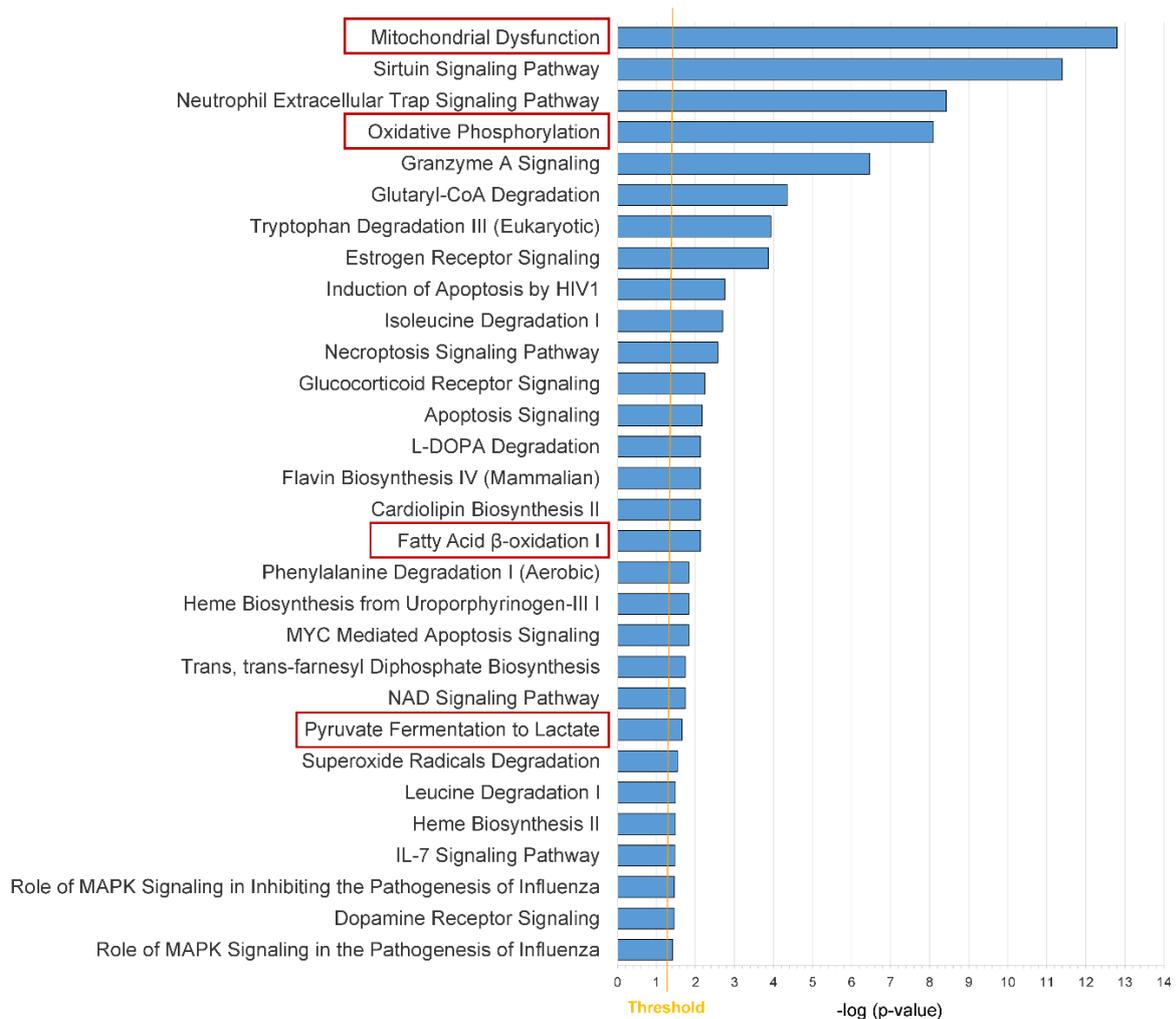


Abbildung 4.9 Alle 30 im Datensatz signifikant ($p < 0,05$) angereicherten kanonischen Stoffwechselwege. Die Länge der Balken korreliert mit der statistischen Signifikanz, welche von oben nach unten abnehmend ist. Die orangene Linie symbolisiert den Grenzwert der Signifikanz. Unter den signifikant angereicherten Stoffwechselwegen sind unter anderem die mitochondriale Dysfunktion sowie die oxidative Phosphorylierung zu finden. Darüber hinaus kommen Stoffwechselwege, die dem Lipid-, Glukose- und Aminosäurestoffwechsel zugeordnet werden können vor.

Interessanterweise befanden sich die „Mitochondriale Dysfunktion“ und die „Oxidative Phosphorylierung“ unter den fünf angereicherten Stoffwechselwegen mit der höchsten Signifikanz. Des Weiteren ergaben sich signifikant angereicherte Stoffwechselwege, die mit dem Lipidstoffwechsel zusammenhängen, wie „Fatty Acid β -Oxidation I“, oder dem Glukosestoffwechsel zuzuordnen sind, wie „Pyruvat Fermentation to Lactate“. Den genannten Stoffwechselwegen zugeordnete, differentiell abundante Proteine können der Tabelle 4.3 entnommen werden. Diese Ergebnisse zeigen erhebliche Unterschiede im mit dem Stoffwechsel assoziierten,

differentiellen Proteom der Mitochondrien von CD4⁺-Zellen von Pferden im Zusammenhang mit ERU auf.

a) Angereicherter Pathway	b) Zugeordnete Proteine
Mitochondrial Dysfunction	BAX▲, COX6A1▲, CPOX▼, HSD17B10▼, MT-ATP6▼, MT-ND3▲, NDUFA3▲, NDUFAB1▲, NDUFB1▲, NDUFB7▲, NDUFS7▲, PARK7▲, PPIF▼, PRDX6▲, SOD2▼, TOMM20▼
Oxidative Phosphorylation	COX6A1▲, MT-ATP6▼, MT-ND3▲, NDUFA3▲, NDUFAB1▲, NDUFB1▲, NDUFB7▲, NDUFS7▲
Fatty Acid β -Oxidation	HADH▼, HSD17B10▼
Pyruvat Fermentation to Lactate	LDHB▲

Tabelle 4.3 Ausgewählten Stoffwechselwegen zugeordnete Proteine. a) Auswahl an signifikant angereicherten Pathways im Datensatz, b) dem Pathway zugeordnete, differentiell abundante Proteine. Das nachstehende Dreieck gibt die Richtung der veränderten Abundanz an (▲= höher abundant in Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von ERU Tieren; ▼= geringer abundant in Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von ERU Tieren).

4.3.3 Pathway-Aktivitäts-Analyse differentiell abundanter Proteine im mitochondrialen Proteom von CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde

Die höhere Abundanz eines Proteins bedeutet nicht gleich, dass es eine erhöhte Aktivierung des zugeordneten Stoffwechselweges bewirkt und andersherum bewirkt eine verminderte Abundanz nicht immer eine Inhibierung. So stellt die Pathway-Anreicherungs-Analyse zwar eine wichtige Grundlage für die erste Einordnung der differentiell abundanten Proteine in biologischen Systemen dar, lässt aber nur bedingt eine Voraussage über die Aktivität des jeweiligen Stoffwechselweges zu. Daher wurde im nächsten Schritt eine Pathway-Aktivitäts-Analyse der Stoffwechselwege mithilfe der Berechnung eines z-Scores zur Aktivitätsvoraussage durchgeführt. Hierfür wird die Richtung der beobachteten differentiellen Proteinabundanz im Datensatz mit aus der Literatur bekannten Zusammenhängen abgeglichen und jeweils entweder eine Aktivierung (positiver z-Score) oder Inhibierung (negativer z-Score) vorausgesagt. Ein z-Score größer als zwei oder kleiner als minus zwei kann als signifikant angesehen werden (Kramer, Green et al. 2014, Shao, Wang et al. 2020).

Für drei der angereicherten Stoffwechselwege konnten signifikante Aktivierungsprognosen abgegeben werden. Für den „Sirtuin Signaling Pathway“ ($z=-2,33$) und das „Granzyme A Signaling“ ($z=-2,45$) wurde eine Inhibition vorausgesagt, während die oxidative Phosphorylierung ($z=2,12$) aktiviert war (Abbildung 4.10).

Für die restlichen Stoffwechselwege ergab sich entweder kein klares Aktivitätsmuster oder es konnte kein Aktivitätsmuster berechnet werden.

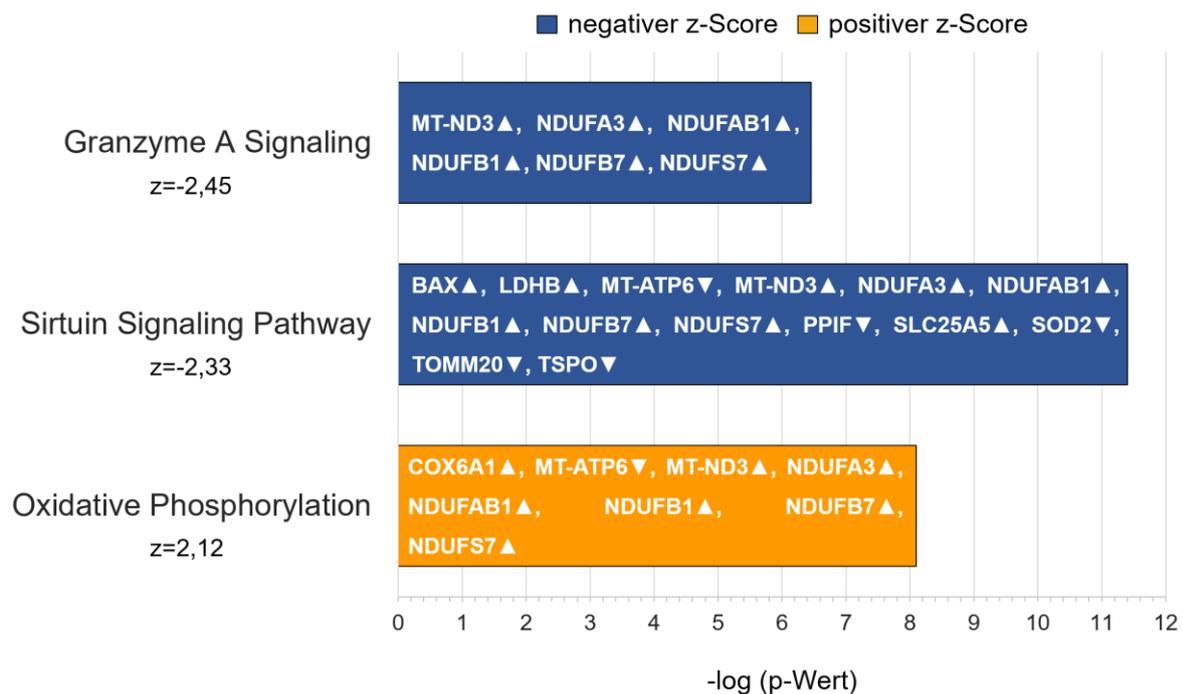


Abbildung 4.10 Angereicherte Stoffwechselwege mit signifikant verändertem vorausgesagten Aktivitätsmuster (absoluter z-Score >2). Die Länge der Balken impliziert die Signifikanz der Anreicherung des Stoffwechselwegs auf einer negativ logarithmischen Skala. Die Stoffwechselwege sind aufsteigend nach z-Score sortiert und der errechnete z-Score ist jeweils unterhalb des Namens des Stoffwechselweges angegeben. Die Stoffwechselwege „Granzyme A Signaling“ und „Sirtuin Signaling Pathway“ sind in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren inhibiert (negativer z-Score; blau), die „Oxidative Phosphorylation“ aktiviert (positiver z-Score; orange). Zum jeweiligen Stoffwechselweg zugeordnete Proteine sind im jeweiligen Balken angegeben und das nachstehende Dreieck gibt die Richtung der veränderten Abundanz an (▲= höher abundant in Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von ERU Tieren; ▼= geringer abundant in Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von ERU Tieren).

4.3.4 Das „Granzyme A Signaling“ war in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden inhibiert

Für das „Granzyme A Signaling“ ergab sich ein signifikant negativer z-Score ($z=-2,45$) und damit eine Inhibition. Dem „Granzyme A Signaling“ wurden 6 Proteine (Abbildung 4.10) aus dem Datensatz zugeordnet, die alle Subeinheiten des Komplexes I der Atmungskette sind und eine höhere Abundanz in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von ERU-Tieren zeigten.

4.3.5 Der „Sirtuin Signaling Pathway“ war in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden inhibiert

Für den Sirtuin Signalweg wurde ebenfalls ein signifikant negativer z-Score berechnet ($z=-2,33$) und damit eine Inhibition vorausgesagt. Das mitochondriale Sirtuin-Netzwerk umfasst viele Bereiche des Stoffwechsels und besteht aus mehreren Subnetzwerken, in denen insgesamt 197 Proteine und 341 Interaktionen identifiziert wurden (Yang, Nagasawa et al. 2016). Insgesamt wurden diesem Stoffwechselweg 14 der differentiell abundanten Proteine zugeordnet (Abbildung 4.10).

4.3.6 Der Stoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung war in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden aktiviert

Für den Stoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung wurde eine deutliche Aktivierung vorausgesagt. Insgesamt acht differentiell abundante Proteine in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von Pferden mit ERU konnten der Atmungskette zugeordnet werden (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.10). Dieses Ergebnis unterstreicht die durch unsere Arbeitsgruppe bereits beobachtete erhöhte basale oxidative Phosphorylierungsrate in CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021) und kann jetzt einen genaueren Einblick in die zugrundeliegenden molekularen Veränderungen und Funktionsmechanismen innerhalb der Atmungskette liefern.

4.3.7 Die unterschiedlich abundanten Proteine innerhalb des Stoffwechselweges der oxidativen Phosphorylierung sind dem Komplex I, IV und V der Atmungskette angehörig

Eine erhöhte Aktivität der oxidativen Phosphorylierung in den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren konnte bereits gezeigt werden (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Bisher konnte allerdings noch nicht geklärt werden, wo im Stoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung der Ursprung der veränderten Aktivität liegt. Um nun ein besseres Verständnis über die molekularen Vorgänge zu gewinnen, nahmen wir als nächstes die acht signifikant differentiell abundanten Proteine unter die Lupe, die dem Stoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung zugehörig waren. Sechs der Proteine (75%) stellten Subeinheiten der NADH Dehydrogenase (Komplex I) dar und zeigten alle eine signifikant höhere Abundanz in den Mitochondrien bei CD4⁺-Zellen von ERU Tieren. Es handelte sich dabei um die Proteine MT-ND3, NDUFA3, NDUFAB1, NDUFB1, NDUFS7 und NDUFB7. Das in Mitochondrien equiner CD4⁺-Zellen von ERU-Tieren signifikant höher abundante Protein COX6A1 wurde der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) zugeordnet, während das signifikant geringer abundante, mitochondrial kodierte Protein MT-ATP6 zur ATP-Synthase (Komplex V) gehörte (Abbildung 4.11).

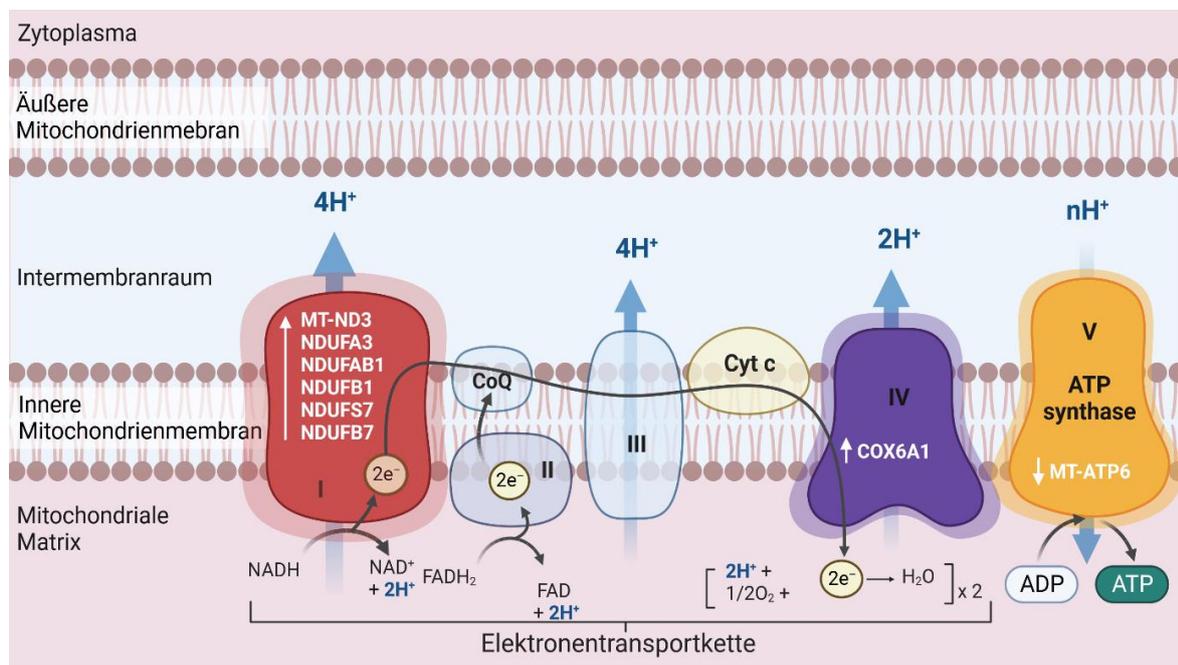


Abbildung 4.11 Schematische Darstellung der Atmungskette mit ihren Komplexen und den in Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von ERU-Tieren differentiell abundanten Proteinen in Komplex

I, IV und V. Dargestellt sind die Komplexe I-V der Atmungskette, lokalisiert in der inneren Mitochondrienmembran. Elektronen von NADH+H⁺ bzw. FADH₂ werden über Komplex I bzw. Komplex II in die Elektronentransportkette aufgenommen und über Coenzym Q (CoQ) an Komplex III und dann Komplex IV weitergegeben. Die Komplexe I, III und IV pumpen hierdurch Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum, sodass ein Protonengradient entsteht. Diese protonenmotorische Kraft wird wiederum von Komplex V, der ATP-Synthase, genutzt um ADP zu ATP zu phosphorylieren, während die Protonen entlang ihres Gradienten zurück in die mitochondriale Matrix strömen. Komplex I, IV und V wurden besonders hervorgehoben und die differentiell abundanten Proteine in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren in dem Komplex beschriftet, dem sie jeweils zugehörig sind. Der Pfeil vor dem Protein gibt jeweils die Richtung der veränderten Abundanz in ERU an. Erstellt mit BioRender.com.

4.3.8 Downstream-Effekt-Analyse differentiell abundanter Proteine im mitochondrialen Proteom von CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde

Eine Analyse der Downstream-Effekte erlaubt die Identifizierung von molekularen und zellulären Funktionen, die durch die differentiell abundanten Proteine im Datensatz mit hoher Wahrscheinlichkeit beeinflusst sind (Kramer, Green et al. 2014).

Die Downstream-Effekt-Analyse der differentiell abundanten Proteine im mitochondrialen Proteom von CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde zeigte die „Cellular Assembly and Organization“ als hoch signifikant angereicherte Kategorie und innerhalb dieser Kategorie die „Organization of Mitochondria“ als angereicherte Funktion mit der höchsten Signifikanz.

Auch bei der Analyse der Downstream-Effekte ist über die Berechnung des z-Scores eine Voraussage möglich, ob eine molekulare oder zelluläre Funktion erhöht oder vermindert ist. Es konnte für zwei Downstream-Funktionen ein signifikant veränderter z-Score berechnet werden. Für die Funktion „Fatty Acid Metabolism“ wurde eine signifikant verminderte Aktivität vorausgesagt, während für die „Accumulation of Lipid“ eine signifikant erhöhte Aktivität identifiziert wurde. Die der jeweiligen Funktion zugeordneten Proteine können der Tabelle 4.4 entnommen werden.

a) Kategorie	b) Funktion	c) p-Wert	d) Vorausgesagtes Aktivitätsmuster	e) z-Score	f) Zugeordnete Proteine
Cellular Assembly and Organization	Organization of Mitochondria	1,26 x 10 ⁻⁰⁹	–	–	MUL1▲ AFG1L▲ BAX▲ FXN▲ HSD17B10▼ PARK7▲ SOD2▼ SPG7▼ STOML2▼
Lipidmetabolism	Fatty Acid Metabolism	6,73 x 10 ⁻⁰³	vermindert	-2,0	ACOT4▼ DBI▲ ETFA▼ ME2▼ PARK7▲ PRDX6▲ SLC25A1▼ TRIAP1▲ TSPO▼
	Accumulation of Lipid	1,18 x 10 ⁻⁰²	erhöht	2,2	BAX▲ BLOC1S1▲ DBI▲ FXN▲ PRDX6▲ PTPMT1▼

Tabelle 4.4 Auswahl an signifikant angereicherten Downstream-Funktionen. a) Kategorie; Überbegriff der Downstream-Funktion, b) angereicherte Downstream-Funktion, c) p-Wert der Anreicherung der Downstream-Funktion, d) aufgrund des z-Scores vorausgesagtes Aktivitätsmuster, e) z-Score der Downstream-Funktion, f) der Funktion zugeordnete, differentiell abundante Proteine. Das nachstehende Dreieck gibt die Richtung der veränderten Abundanz an (▲ = höher abundant in Mitochondrien der CD4⁺ Zellen von ERU Tieren; ▼ = geringer abundant in Mitochondrien der CD4⁺ Zellen von ERU Tieren).

4.3.9 Identifikation von MUL1 als Kandidatenprotein für weiterführende Untersuchungen

Das Protein „Mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1“ (MUL1) zeigte in Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu den Kontrolltieren eine höhere Proteinabundanz mit hoch signifikantem p-Wert (Abbildung 4.12.). Bei anderen Spezies und Zelllinien wurde gezeigt, dass MUL1 dynamische Vorgänge in den Mitochondrien reguliert und die mitochondriale Fragmentierung (Fission) begünstigt (Braschi, Zunino et al. 2009, Peng, Ren et al. 2016). Beim Pferd wurde das Protein bisher noch nicht beschrieben (Stand der

PubMed Literaturrecherche: Februar 2023). MUL1 spielt eine Rolle bei der Funktion „Organization of Mitochondria“ (s. 4.3.7). Dies macht es zu einem interessanten Kandidaten für weitere Analysen.

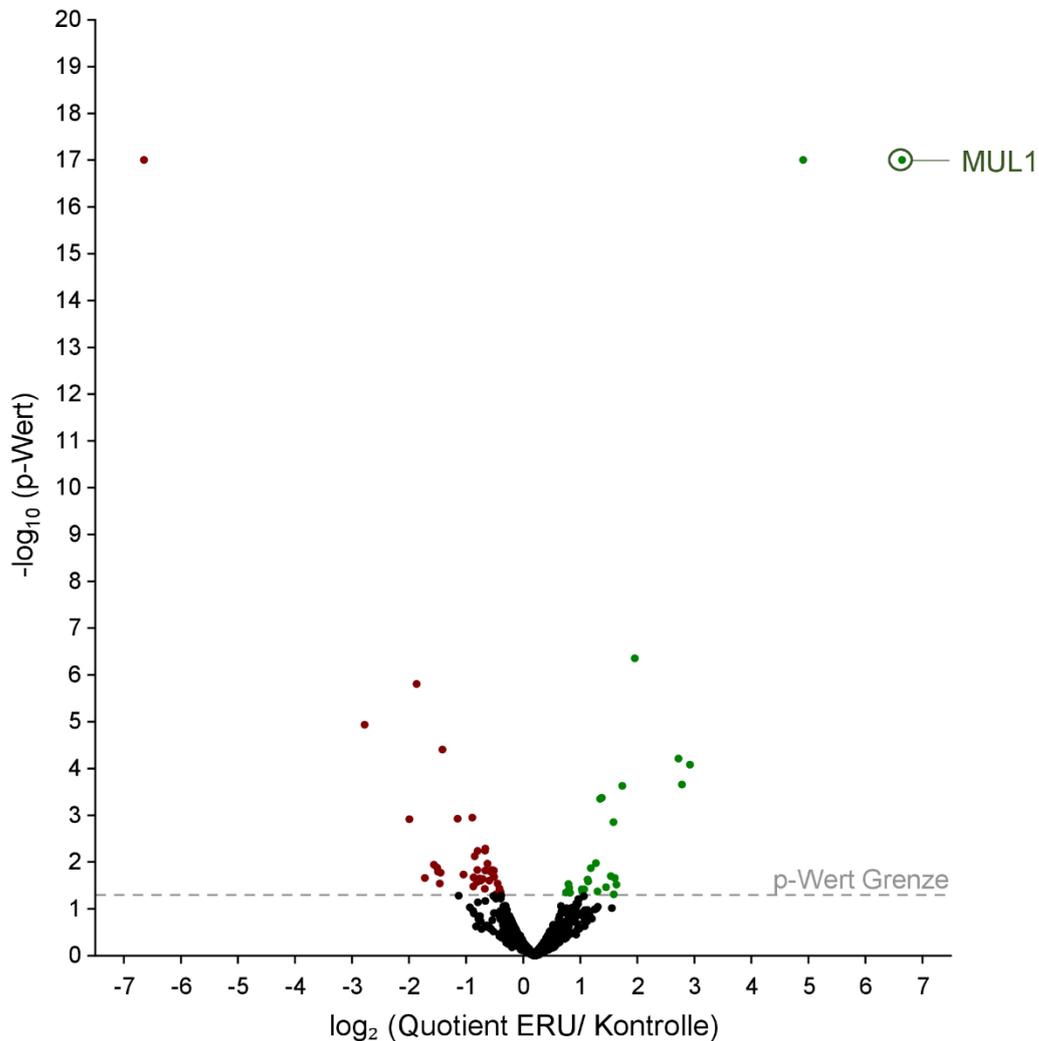


Abbildung 4.12 Volcano Plot aller 622 identifizierten mitochondrialen Proteine. Es ist die Signifikanz (y-Achse) gegen das Verhältnis der Proteinabundanz von ERU zu Kontrolle (x-Achse) aufgetragen. Jedes Protein aus dem Datensatz ist als Punkt dargestellt und die grau gestrichelte Linie gibt den Grenzwert der statistischen Signifikanz ($p < 0.05$) an. Die 51 Proteine, die in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden eine statistisch signifikant höhere Abundanz zeigten, sind in grün dargestellt, während die 38 Proteine mit geringerer Abundanz in rot dargestellt sind.

4.3.10 Quantifizierung von MUL1 in CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden

Die Expression von MUL1 in CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden wurde als nächstes im Western Blot untersucht.

In den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden war MUL1 signifikant erhöht ($p = 0,044$; Student's *t*-Test; Abbildung 4.13). Darüber hinaus konnte damit das Vorkommen von MUL1 in equinen CD4⁺-Zellen bestätigt werden.

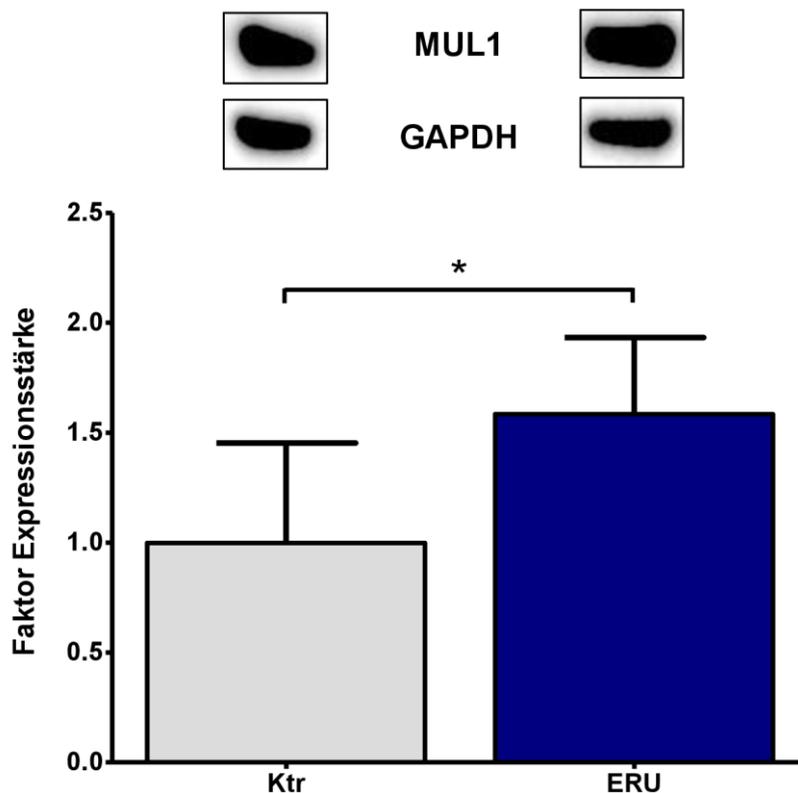


Abbildung 4.13 Quantifizierung der Expression von MUL1 in CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde im Western Blot. Die MUL1-Expression wurde mittels Western Blot untersucht und nach Normalisierung auf GAPDH quantifiziert. Es sind die auf den Faktor 1 genormten Daten der Kontrollgruppe (graue Säule) und die darauf bezogenen Werte der an ERU erkrankten Pferde (blaue Säule) dargestellt. Die Expressionsstärke von MUL1 war in CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden (n=5) um das 1,6-fache höher als in CD4⁺-Zellen gesunder Kontrollpferde (n=6). Der Unterschied war signifikant (* $p \leq 0,05$; Student's *t*-Test).

4.4 Darstellung der Mitochondrien equiner PBL mittels dSTORM

In der Proteomanalyse wurde MUL1 zunächst in Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von Pferden identifiziert. Mit Western Blots wurde das Vorhandensein von MUL1 in equinen CD4⁺-Zellen bestätigt. Deshalb sollte das Protein in einem nächsten Schritt eingehender charakterisiert werden und geklärt werden, ob es neben den Mitochondrien auch in anderer intrazellulärer Lokalisation vorkommt. Eine einfache Methode der Aufklärung der Topografie ist die Fluoreszenz-basierte Mikroskopie. Allerdings stellt die gut aufgelöste, fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Mitochondrien und ihrer Proteinkomplexe eine Herausforderung dar, denn die Größe der Proteinkomplexe unterschreitet die klassische Beugungsgrenze der optischen Mikroskopie teilweise beträchtlich (Palmer, Lou et al. 2021). Durch die hochauflösende direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM), welche eine Bildauflösung von etwa 20 nm zulässt, kann diese Beugungsgrenze durchbrochen werden (Rust, Bates et al. 2006). Dies erlaubt nicht nur eine Darstellung der Anordnung und Interaktion von Proteinkomplexen in der Mitochondrienmembran, sondern auch eine wesentlich detailliertere Beurteilung der mitochondrialen Morphologie (Huang, Jones et al. 2008, Palmer, Lou et al. 2021). Bisher konnten noch keine Veröffentlichungen gefunden werden, in denen die Mitochondrien primärer PBL im dSTORM dargestellt werden (Stand der Pub Med Literaturrecherche: Februar 2023). Um die Untersuchung der subzellulären Lokalisation einzelner Kandidatenproteine zu ermöglichen, wurde daher zunächst eine Methode für die Bildgebung equiner PBL mittels dSTORM etabliert (Methode s. 3.10). Die äußere Mitochondrienmembran wurde mit einem Antikörper gegen das Protein „Translocase of outer mitochondrial membrane 20“ (TOMM20) markiert. Mithilfe der dSTORM Technik konnte ein hochauflösendes Bild der Mitochondrien in equinen PBL erstellt werden (Abbildung 4.16 B). Während in der lichtmikroskopischen Darstellung aufgrund der Brechungsgrenze kein scharfes Bild der Mitochondrien möglich ist, können im dSTORM die einzelnen Mitochondrien scharf dargestellt und ihre Hohlraumstruktur sichtbar gemacht werden (Abbildung 4.16 A und B). Dies bereitet den Weg für zukünftige Untersuchungen zur Proteinlokalisierung im Mitochondrium und anderen zellulären Abteilungen, sowie zur Beurteilung der mitochondrialen Morphologie.

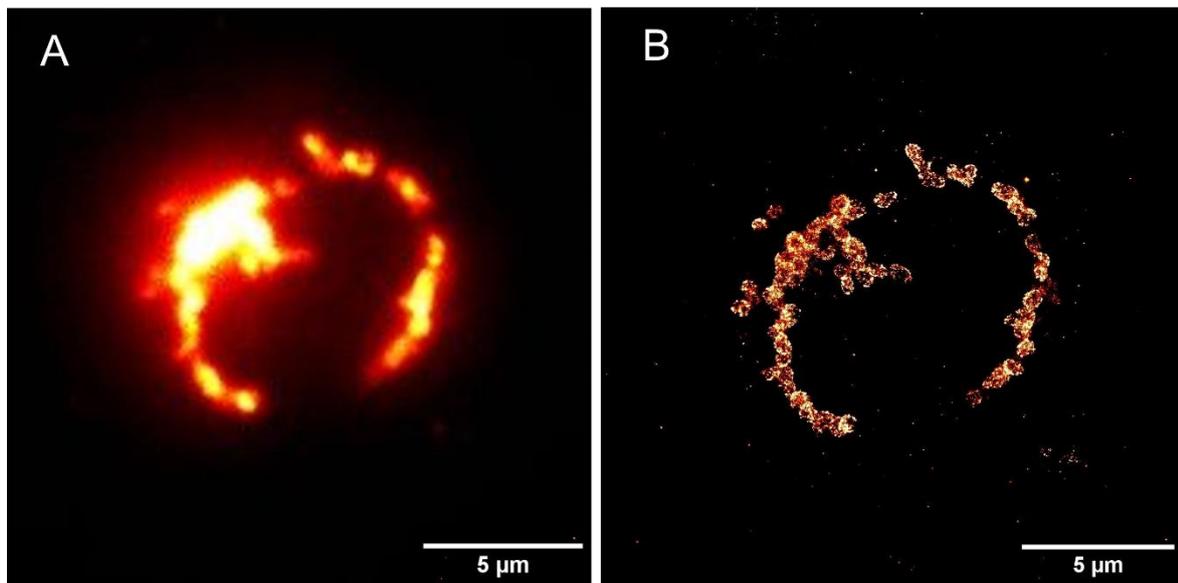


Abbildung 4.14 Vergleichende Darstellung der Mitochondrien eines equinen PBL im Widefield (A) und dSTORM (B). Die äußere Mitochondrienmembran wurde mit einem Antikörper gegen TOMM20 markiert und dieser mit einem Alexa 647 gekoppelten sekundären Ziege-anti-Maus IgG (H und L) Antikörper sichtbar gemacht. Im Widefield ist aufgrund der klassischen Beugungsbegrenzung von mikroskopischen Aufnahmen die mitochondriale Struktur nur zu erahnen, während bei der dSTORM Aufnahme das mitochondriale Netzwerk detailreich dargestellt ist und die Hohlraumstruktur der Mitochondrien sichtbar wird.

5 DISKUSSION

Die ERU ist eine weltweit vorkommende, immun-medierte Augenerkrankung bei Pferden, die durch spontane, wiederkehrende Entzündungsschübe im inneren Auge gekennzeichnet ist (Degroote und Deeg 2021). Im Krankheitsverlauf überwinden autoreaktive Lymphozyten, insbesondere CD4⁺-Zellen, die Blut-Retina-Schranke (Gilger, Malok et al. 1999, Deeg, Kaspers et al. 2001). Dies führt zur Zerstörung von intraokularem Gewebe und unbehandelt letztendlich zur Erblindung des betroffenen Auges (Deeg, Ehrenhofer et al. 2002, Gerding und Gilger 2016). Die zugrundeliegenden Mechanismen, die die autoreaktiven Immunzellen dazu befähigen, die Blut-Retina-Schranke zu überwinden und in das immunprivilegierte Organ Auge einzudringen, konnten bis heute nicht vollständig geklärt werden (Degroote und Deeg 2021). In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die PBL von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu den PBL gesunder Pferde einen veränderten metabolischen Phänotyp aufweisen (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Es konnten signifikante Unterschiede bei der oxidativen Phosphorylierung und glykolytischen Aktivität der PBL festgestellt werden, insbesondere bei der CD4⁺-Fraktion von gesunden und an ERU-erkrankten Pferden (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Die PBL von an ERU erkrankten Tieren zeigten unter anderem eine erhöhte oxidative Phosphorylierung im Basalstadium, die auch bei der isolierten Betrachtung der CD4⁺-Zellen zu sehen war (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese metabolischen Unterschiede der PBL und insbesondere der CD4⁺-Zellen genauer charakterisiert und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen in den CD4⁺-Zellen untersucht werden.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die erhöhte basale oxidative Phosphorylierung durch eine veränderte Fähigkeit der PBL von an ERU erkrankten Pferden, ein bestimmtes Substrat zu nutzen, bedingt sein könnte. Hierfür wurde die Fähigkeit der PBL von gesunden und an ERU erkrankten Pferden, verschiedene Substrate im Mitochondrium zu verwenden, untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass equine PBL unabhängig von der Gruppe, zu der sie gehörten, eine hohe Abhängigkeit und eine hohe Kapazität für den Glukosestoffwechsel aufwiesen, während sie eine geringe Abhängigkeit und eine mittlere Kapazität für den Fettsäurestoffwechsel besaßen. Von Glutamin waren die equinen PBL beider

Gruppen nicht abhängig, hatten jedoch die Kapazität, dieses zu einem geringen Prozentsatz zu nutzen (siehe Kapitel 4.1). Dieses Ergebnis trägt grundsätzlich zu einer Charakterisierung der Stoffwechseleigenschaften equiner PBL bei und deckt sich mit Untersuchungen an humanen PBL, die ebenfalls eine Abhängigkeit von Glukose, nicht jedoch von Glutamin und Fettsäuren nach der Entkopplung mit FCCP zeigten (Ajaz, McPhail et al. 2021).

Die PBL der gesunden Pferde unterschieden sich in ihrer prozentualen Abhängigkeit und Kapazität sowie Flexibilität bei allen drei Substraten nicht signifikant von den PBL der an ERU erkrankten Tiere (siehe Kapitel 4.1). Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die PBL beider Gruppen unter den experimentellen Bedingungen grundsätzlich die gleichen Fähigkeiten besitzen, die Substrate Glukose, Glutamin und langkettige Fettsäuren zur Deckung ihres Energiebedarfs im Mitochondrium zu nutzen. Die in den PBL von an ERU erkrankten Pferden festgestellte erhöhte basale oxidative Phosphorylierung und aerobe Glykolyse (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021) konnte also nicht auf veränderte prozentuale Fähigkeiten der Zellen, ein bestimmtes Substrat zu nutzen, zurückgeführt werden. Hierfür gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. In einer Studie mit CD4⁺-Zellen eines Mäusemodells für Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) sowie mit CD4⁺-Zellen von SLE-Patienten wurde beispielsweise festgestellt, dass diese eine vermehrte Expression von Genen aus Glukose-, Fettsäure- und Aminosäuremetabolismus im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten (Yin, Choi et al. 2015). Bei diesen Zellen wurde zuvor ebenfalls eine erhöhte Glykolyserate sowie oxidative Phosphorylierung beobachtet und es wurde daraus geschlossen, dass alle drei Stoffwechselwege zu den Veränderungen beitragen könnten (Yin, Choi et al. 2015). Wenn man bedenkt, dass die Abhängigkeit und die Kapazität der equinen PBL in dieser Arbeit in Prozent bestimmt wurden, ist es möglich, dass die PBL von Pferden mit ERU zwar eine erhöhte Substratoxidation aufweisen, dies aber keinen Einfluss auf die prozentuale Verteilung der Substratnutzung hat, da diese für alle Substrate gleichermaßen erhöht ist.

Zudem ist denkbar, dass Veränderungen nur in bestimmten Subgruppen, wie beispielsweise den CD4⁺-Zellen, gesehen werden können und in der heterogenen Gruppe der PBL nicht sichtbar werden. Entweder weil die Unterschiede sehr klein sind oder weil sich Subgruppen entgegengesetzt verhalten. Beispielsweise konnte in

den PBL von gesunden und an ERU erkrankten Pferden kein Unterschied in der ATP-verknüpften Respiration gesehen werden, wohl aber bei der Betrachtung isolierter CD4⁺-Zellen (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Um zu überprüfen, ob es Unterschiede bei den CD4⁺-Zellen gibt, die bei der Untersuchung der Gesamtgruppe der PBL nicht gesehen wurden, sollte der Fuel Flex Test mit dieser Untergruppe der PBL durchgeführt werden.

Darüber hinaus wird bei dem hier angewandten Test ein Minimum (Abhängigkeit) und Maximum (Kapazität) der Substratoxidation durch die Zellen bestimmt, während sich die tatsächliche Rate der Substratverwendung irgendwo dazwischen befinden kann. Kleine Veränderungen im Verhältnis der Substratoxidation müssen keinen Einfluss auf die messbare Kapazität der Zellen haben, können aber einen großen Einfluss auf ihr Schicksal haben (Jones, Sheng et al. 2021). Es wäre also eine weitere Möglichkeit, dass die Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden zwar die gleiche Abhängigkeit und Kapazität von einem Substrat haben, die tatsächliche Oxidation dieses Substrates aber verändert ist, da die Zellen es mehr oder weniger bevorzugt nutzen. Dies konnte zum Beispiel bei stimulierten PBL von Typ 2 Diabetes Patienten im Vergleich zu stimulierten PBL von Personen ohne Diabetes beobachtet werden (Nicholas, Proctor et al. 2019). Hier konnte in den PBL der Diabetes-Gruppe ebenfalls eine erhöhte aerobe Glykolyse festgestellt werden, aber kein Unterschied in der Abhängigkeit und Kapazität der Zellen bei der Nutzung der Substrate Glukose, Glutamin oder Fettsäuren (Nicholas, Proctor et al. 2019). In diesem Fall wurde durch weitere Versuche gezeigt, dass die PBL der Typ 2 Diabetes Patienten die Oxidation von Glukose und Fettsäuren über Glutamin bevorzugten, eine Vorliebe, die bei PBL von Personen ohne Diabetes nicht beobachtet werden konnte (Nicholas, Proctor et al. 2019). Dies weist darauf hin, dass trotz gleicher Fähigkeiten der Mitochondrien bestimmte Substrate bevorzugt verwendet werden können und diese Vorliebe unter Umständen ausreicht, um Veränderungen im glykolytischen oder oxidativen Stoffwechsel auszulösen. Um in equinen PBL den Umsatz einzelner Substrate in speziellen Stoffwechselwegen zu beurteilen, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. Besonders geeignet hierfür wäre beispielsweise die Bestimmung des Metaboloms nach Inkubation mit stabilen, Isotopen-markierten Substraten, wie ¹³C₆-Glukose, ¹³C₅-Glutamin oder ¹³C₁₆-Palmitat (Jones, Sheng et al. 2021). Hierdurch könnten neben dem Umsatz der Substrate im naiven Zustand auch kompensatorische Mechanismen der Zellen

untersucht und zwischen gesunden und erkrankten Tieren verglichen werden. Es könnte beispielsweise nach einer Inhibierung des mitochondrialen Pyruvat-Carriers beurteilt werden, ob in den Zellen beider Gruppen vermehrt Zwischenprodukte des Citratzyklus aus $^{13}\text{C}_5$ -Glutamin oder $^{13}\text{C}_{16}$ -Palmitat vorliegen.

Zuletzt ist denkbar, dass die PBL von an ERU erkrankten Pferden ihren erhöhten oxidativen Stoffwechsel durch Substrate antreiben, die im Rahmen des Fuel Flex Tests nicht untersucht wurden, oder zumindest auf solche ausweichen können. So können beispielsweise kurz- und mittelkettige Fettsäuren die Mitochondrienmembran ohne spezifische Transportsysteme überwinden und ihre Oxidation im Mitochondrium daher durch Etomoxir nicht gehemmt werden (Cucchi, Camacho-Munoz et al. 2019). In humanen und murinen T-Effektorzellen führten Kulturbedingungen ohne Glukose zu einer verminderten Proliferation, die durch Supplementation mit Inosin als alternativer Kohlenhydratquelle für den Stoffwechsel wiederhergestellt werden konnte (Wang, Gnanaprakasam et al. 2020). Dies unterstreicht die metabolische Flexibilität von Immunzellen und zeigt, dass auch andere Kohlenhydratquellen die Effektorfunktionen der Zellen unterstützen können. Die Verfügbarkeit der extrazellulären Nährstoffe im Medium wurde unter den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Versuchsbedingungen zwar kontrolliert, allerdings haben die Zellen hierbei noch die Möglichkeit verschiedenste endogene Substrate abzubauen und damit die blockierten Stoffwechselwege zu kompensieren.

Eine Möglichkeit, die Aktivität der Atmungskette als Reaktion auf bestimmte Substrate unabhängig von den im Zytoplasma ablaufenden Prozessen und damit weitgehend unabhängig von endogenen Substraten zu betrachten, ist die Untersuchung der mitochondrialen Aktivität nach selektiver Permeabilisierung der Plasmamembran. Nach aktueller Literaturrecherche wurden noch keine Daten aus Versuchen an permeabilisierten equinen Immunzellen veröffentlicht (Stand der PubMed Literaturrecherche: März 2023), sodass zunächst eine Optimierung der Versuchsbedingungen notwendig war. Nach der Optimierung der Zelldichte und rPFO-Konzentration war eine verlässliche Messung der Sauerstoffverbrauchsrate in permeabilisierten equinen CD4^+ -Zellen möglich. Im Vergleich zu dem Assay mit intakten equinen CD4^+ -Zellen war eine höhere Zellzahl notwendig, um für alle Substrate eine Sauerstoffverbrauchsrate oberhalb der mindestens erwünschten 100 pmol/min zu erlangen (siehe Kapitel 4.2.1). Zudem war eine Konzentration des

rPFO von 1 nM optimal zur Permeabilisierung der Plasmamembran equiner CD4⁺-Zellen, während eine geringere Dosis noch nicht ausreichte. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus anderen Studien, in denen rPFO in einer Konzentration von 1 nM für verschiedene Zelllinien und primäre Zellen optimal war (Divakaruni, Wiley et al. 2013). Darunter fallen primäre Makrophagen aus dem Knochenmark, C2C12-Myoblasten, primäre kortikale Neuronen der Ratte, H9C2-Kardiomyozyten und einige weitere adhärente Zellen sowie murine CD8⁺-Zellen (Divakaruni, Wiley et al. 2013, Champagne, Hatle et al. 2016). In unserer Studie konnten wir zeigen, dass dies auch für equine CD4⁺-Zellen galt. Somit konnte hier zum ersten Mal der Einfluss verschiedener Substrate auf die Sauerstoffverbrauchsrate in permeabilisierten equinen Immunzellen und damit die Untersuchung ihrer respiratorischen Komplexaktivität beschrieben werden.

Im Vergleich zeigte sich bei den getesteten Substraten Pyruvat, Succinat und Palmitat kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der Atmungskette zwischen permeabilisierten CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden (siehe Kapitel 4.2.3). Dies weist darauf hin, dass diese Substrate und damit die dadurch gemessene Aktivität von Komplex I oder Komplex II nicht alleine für die durch Barfüßer et al. beobachtete erhöhte oxidative Phosphorylierung in CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren verantwortlich ist (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Es ist zu bedenken, dass im Rahmen dieser Arbeit nur Pyruvat und Malat als Komplex I Substrate getestet wurden. Neben Pyruvat kann auch Glutamat als Substrat für Komplex I dienen (Nolfi-Donagan, Braganza et al. 2020). Es wäre also eine Möglichkeit, dass eine Veränderung der Komplex I Aktivität nicht für Pyruvat sichtbar ist, jedoch für Glutamat als Substrat. Um abzu prüfen, ob eine Veränderung der Aktivität von Komplex I in Reaktion auf andere Substrate auftritt, sollte eine Messung der Sauerstoffverbrauchsrate in Reaktion auf Glutamat oder auch der Kombination aus Pyruvat, Malat und Glutamat als Substrat in zukünftigen Versuchen durchgeführt werden.

In Reaktion auf Succinat zeigten die CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden sogar die Tendenz zu einer geringeren Respirationskapazität und damit zu einer geringeren Komplex II Aktivität. Eine verminderte Komplex II Aktivität könnte zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp der CD4⁺-Zellen beitragen, der über eine erhöhte intrazelluläre Citratkonzentration vermittelt wird. Komplex II nimmt nicht nur Elektronen aus FADH₂ in die Elektronentransportkette auf, sondern katalysiert in

einem gekoppelten Prozess auch die Reaktion von Succinat zu Fumarat im Citratzyklus (Yin und O'Neill 2021). In den PBL von Patienten mit rheumatoider Arthritis führte eine verminderte Expression der Succinyl-CoA-Ligase, die den Schritt vor Komplex II im Citratzyklus und damit die Bildung von Succinat katalysiert, zu einer erhöhten Ansammlung von Citrat und einem dadurch mediierten, vermehrt pro-inflammatorischen T-Effektor-Phänotyp (Wu, Qiu et al. 2020). Dieser zeichnete sich durch eine erhöhte IFN γ -Produktion sowie gesteigerte Wanderungseigenschaften aus (Wu, Qiu et al. 2020), wie sie auch bei an ERU erkrankten Pferden beschrieben wurden (Saldinger, Nelson et al. 2020, Wiedemann, Amann et al. 2020). Zunächst müsste hier jedoch geprüft werden, ob sich die Tendenz einer geringeren Komplex II Aktivität in den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren bestätigt, indem eine größere Kohorte getestet wird. Eine Erklärung für eine erhöhte basale oxidative Phosphorylierung der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren könnte eine verminderte Komplex II Aktivität allerdings nicht liefern.

So konnte durch die Untersuchung individueller Komplexe und Substrate der Mitochondrien in den PBL von an ERU erkrankten im Vergleich zu gesunden Pferden die Ursache der Veränderungen bei der oxidativen Phosphorylierung weder auf ein spezielles Substrat noch auf einen speziellen Komplex der Atmungskette eingegrenzt werden. Dagegen konnten auf Proteinebene erhebliche Unterschiede in den Mitochondrien von CD4⁺-Zellen zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden aufgezeigt werden. Es zeigten sich Veränderungen von am Substratstoffwechsel sowie der Atmungskette und der mitochondrialen Organisation beteiligten Proteine. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass nicht ein einzelnes Enzym oder Substrat für die Veränderung der oxidativen Phosphorylierung ausschlaggebend ist, sondern vielmehr ein komplexerer Zusammenhang besteht. Die quantitative massenspektrometrische Untersuchung mit nachfolgender bioinformatischer Auswertung bietet eine äußerst sensitive Methode, die im Gegensatz zur Untersuchung einzelner Aspekte des Metabolismus komplexere Zusammenhänge der Stoffwechsel- und Signalwege im Mitochondrium darstellen kann (Gomez-Serrano, Camafeita et al. 2018).

Es konnten insgesamt 4340 Proteine im Mitochondrienisolat der equinen CD4⁺-Zellen eindeutig identifiziert und quantifiziert werden. Es wurde gezielt das Proteom isolierter Mitochondrien untersucht, da dies im Vergleich zur Untersuchung ganzer

Zellen einige Vorteile bringt (Kabiri, von Toerne et al. 2021). Zum einen werden die meisten mitochondrialen Proteine im Zytoplasma gebildet und dann zu ihrer Ziellokalisierung im Mitochondrium transportiert (Song, Herrmann et al. 2021). Zum anderen gibt es Proteine, die nicht ausschließlich im Mitochondrium, sondern auch in anderen Organellen vorkommen, oder nur unter gewissen physiologischen oder pathologischen Zuständen ins Mitochondrium transportiert werden (Thul, Akesson et al. 2017). Die Untersuchung des differentiellen Proteoms isolierter Mitochondrien lässt daher ein klareres Bild der tatsächlich vorliegenden mitochondrialen Proteinverhältnisse zu, ohne dass die im Zytoplasma oder anderen Organellen vorkommende Quantität der Proteine einen großen Einfluss nimmt. Die Anzahl von 4340 identifizierten Proteinen wirkt zunächst relativ hoch, wenn man bedenkt, dass bisher laut MitoCarta3.0 Datenbank insgesamt 1136 Proteine beim Menschen und 1140 Proteine bei der Maus einer mitochondrialen Lokalisation zugeordnet wurden (Rath, Sharma et al. 2021). Ein Grund für diese Diskrepanz könnte darin liegen, dass die Mitochondrien im Zellverband teilweise sehr eng mit anderen Organellen verbunden sind (Giorgi, De Stefani et al. 2009, Gomez-Serrano, Camafeita et al. 2018). Durch diese strukturelle Verbindung der Mitochondrien, v.a. mit dem endoplasmatischen Retikulum, aber auch dem Nucleus und den Peroxisomen, kann bei der Isolierung der Mitochondrien eine Kontamination der mitochondrialen Fraktion mit Proteinen aus diesen Organellen nie ganz ausgeschlossen werden (Gomez-Serrano, Camafeita et al. 2018, Kruse, Sahebekhtari et al. 2020).

Um diese Mitochondrien-fremden Proteine aus der weiteren Analyse auszuschließen, wurden die identifizierten Proteine aus unserer Studie mit der humanen MitoCarta3.0 Datenbank abgeglichen. Insgesamt konnten so 622 Proteine eindeutig dem Mitochondrium zugeordnet werden. Es ist allerdings zu beachten, dass noch keine pferdespezifischen Datenbanken des mitochondrialen Proteoms zur Verfügung stehen, da dieses bei Pferden noch nicht untersucht wurde (Stand der Literaturrecherche: Februar 2023). Daher erfolgte der Abgleich der humanen Orthologe unserer Proteinidentifikationen mit einer humanen Datenbank. Darüber hinaus werden laufend neue Proteine im mitochondrialen Proteom identifiziert und ergänzt, sodass die in der Datenbank aufgeführten Proteine, wenn auch laufend aktualisiert und erweitert, nur den aktuellen Wissensstand widerspiegeln (Delgado de la Herran, Cheng et al. 2021). Es besteht also die Möglichkeit, dass einzelne, eigentlich mitochondriale Proteine von der Analyse

ausgeschlossen wurden, da sie pferdespezifisch oder nach dem aktuellen Wissensstand nicht als „mitochondrial“ klassifiziert sind. Führt man auf der anderen Seite keinen Abgleich mit einer Datenbank durch, wird man Proteine in die Analyse einbeziehen, die als Kontamination aus anderen Organellen einzustufen sind. Um möglichst spezifische Veränderungen in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen bei an ERU erkrankten Pferden zu finden, wurde der Abgleich mit der Datenbank gewählt und dadurch das Risiko eines Informationsverlustes in Kauf genommen. Dennoch lieferten die Ergebnisse dieses Datensatzes nun wertvolle grundlegende Erkenntnisse über das mitochondriale Proteinprofil der CD4⁺-Zellen bei Pferden und können zudem zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der ERU beitragen.

Die Zahl von 622 mitochondrialen Proteinen deckt sich im Wesentlichen mit der Anzahl mitochondrialer Proteine, die in anderen Studien beschrieben wurden. In einer Proteomstudie an primären murinen CD4⁺-Zellen wurden durch Abgleich des Proteoms der Gesamtzelle mit der MitoCarta-Datenbank 552 mitochondriale Proteine identifiziert (Ron-Harel, Santos et al. 2016). Bei der proteomischen Untersuchung isolierter Mitochondrien einer Jurkat-Zelllinie konnte insgesamt 680 Proteinen eine mitochondriale Lokalisation zugeordnet werden (Rezaul, Wu et al. 2005). In verschiedenen Geweben von Mäusen konnten je nach Gewebe zwischen 554 und 797 Proteine aus Mitochondrien gefunden werden (Pagliarini, Calvo et al. 2008).

Insgesamt waren 14,3 % der 622 identifizierten mitochondrialen Proteine signifikant differentiell abundant zwischen den CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Hierdurch konnten deutliche Veränderungen der Mitochondrien aufgezeigt und neue Erkenntnisse über die möglichen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der in den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden beobachteten veränderten Stoffwechseleigenschaften erlangt werden. Besonderes Interesse galt Veränderungen, die mit der mitochondrialen Substratoxidation und der oxidativen Phosphorylierung zusammenhängen.

Interessanterweise wiesen die Ergebnisse der differentiellen mitochondrialen Proteomanalyse nun auf einen verminderten Lipidmetabolismus und eine vermehrte Akkumulation von Lipiden hin (siehe Kapitel 4.3.2 und 4.3.8). In den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden konnte eine verminderte Abundanz der an der Fettsäureoxidation beteiligten Proteine „Hydroxyacyl-CoA

dehydrogenase“ (HADH) und „Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10“ (HSD17B10) festgestellt werden (siehe Kapitel 4.3.2). Beide Proteine haben Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenaseaktivität und sind in den dritten Schritt der β -Oxidation von Fettsäuren involviert (Liu, Chen et al. 2020, Fang, Li et al. 2022). Ihre verminderte Abundanz könnte also bedeuten, dass die Oxidation von Fettsäuren im Mitochondrium der CD4⁺-Zellen vermindert ist. Bezieht man hier mit ein, dass keine signifikanten Unterschiede bei der Untersuchung der Abhängigkeit und Kapazität der PBL von langkettigen Fettsäuren sowie in der Palmitat-medierten Aktivität der Atmungskette festgestellt werden konnten (siehe Kapitel 4.1 und 4.2.3), liegt nahe, dass die Veränderung des Lipidmetabolismus durch die Oxidation kurz- und mittelkettiger Fettsäuren und nicht durch die Oxidation langkettiger Fettsäuren bedingt sein könnte. Im Einklang mit dieser Annahme konnte in verschiedenen humanen Geweben gezeigt werden, dass HADH und HSD17B10 eine höhere Affinität zu kurzen und mittleren Hydroxyacetyl-CoA-Kettenlängen haben (He, Yang et al. 1989, He, Schulz et al. 1998, Shafqat, Marschall et al. 2003, Yang, He et al. 2005, Fang, Li et al. 2022). Durch weitere Versuche könnte die Beteiligung kurz- und mittelkettiger Fettsäuren am mitochondrialen Metabolismus der Immunzellen von Pferden und insbesondere Unterschiede bei der ERU charakterisiert werden. Dies könnte durch die Untersuchung der mitochondrialen Aktivität in permeabilisierten CD4⁺-Zellen in Reaktion auf mittelkettige Fettsäuren, wie beispielsweise Octanoat und kurzkettige Fettsäuren, wie beispielsweise Butyrat, erfolgen.

Darüber hinaus könnte eine verminderte Fettsäureoxidation und die verminderte HADH-Abundanz auf einen aktivierten T-Effektorzell-Phänotyp der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden hinweisen. In humanen T-Zellen wurde nach der Aktivierung eine verminderte Proteinabundanz der an der Fettsäureoxidation beteiligten Proteine, darunter HADH, festgestellt (Ron-Harel, Santos et al. 2016). Die funktionelle Bedeutung einer verminderten HADH-Abundanz wurde in Lymphozyten allerdings noch nicht untersucht (Stand der PubMed Literaturrecherche: Februar 2023). In Darmkrebszellen konnte die verminderte Expression von HADH jedoch mit einer vermehrten Proliferation, Migration und Invasivität der Tumorzellen in Verbindung gebracht werden (Shen, Song et al. 2017). Metabolisch gesehen können zwischen aktivierten T-Zellen und Tumorzellen immer wieder Parallelen gefunden werden, die auf ähnliche Anforderungen beim

Aufbau von Biomasse für die rasche Proliferation zurückzuführen sind (Andrejeva und Rathmell 2017), sodass denkbar ist, dass eine verminderte HADH-Abundanz in aktivierten Lymphozyten ähnliche Effekte hat. Um zunächst eine Einsicht zu bekommen, welche Folgen eine verminderte HADH Aktivität in equinen CD4⁺-Zellen hat, könnten die proliferativen Eigenschaften oder auch die Wanderungseigenschaften der CD4⁺-Zellen von gesunden Pferden nach der Inhibierung von HADH überprüft werden.

Im Gegensatz zur verminderten Oxidation wurde auf der anderen Seite eine vermehrte Akkumulation von Lipiden vorausgesagt. Die Akkumulation von Lipiden könnte unter anderem durch eine vermehrte Fettsäuresynthese bedingt sein. Dies konnte beispielsweise bei T-Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis gezeigt werden, in denen vermehrte Lipideinlagerungen festgestellt wurden (Shen, Wen et al. 2017). In dieser Studie wurde die Beteiligung der erhöhten Fettsäuresynthese bei der Formation von Lipideinlagerungen nachgewiesen und zudem ein direkter Einfluss der Fettsäuresynthese auf die vermehrte Migration und Gewebeinvasivität der CD4⁺-Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis gezeigt (Shen, Wen et al. 2017). Da die PBL von an ERU erkrankten Pferden ebenfalls erhöhte Migrationseigenschaften besaßen (Wiedemann, Amann et al. 2020), könnte dies einen interessanten Zusammenhang darstellen. Der Lipidgehalt der CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Tieren sollte zunächst in weiteren Versuchen quantifiziert werden, um so eine Akkumulation von Lipiden in den Zellen von an ERU erkrankten Tieren zu bestätigen. Neutrale Fette könnten in den equinen Immunzellen zum Beispiel mit dem fluoreszierenden Farbstoff 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacen (BODIPY 493/503) gefärbt (Qiu und Simon 2016) und anschließend mithilfe eines Durchflusszytometers oder Fluoreszenzmikroskops dargestellt und quantifiziert werden.

Der Stoffwechselweg „Pyruvate Fermentation to Lactate“, dem das in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden höher abundante Protein „Equus caballus lactate dehydrogenase B“ (LDHB) zugeordnet wurde, war ebenfalls signifikant angereichert. Laktatdehydrogenasen katalysieren die Umwandlung von Pyruvat und NADH zu Laktat und NAD⁺ und andersherum (Shibata, Sogabe et al. 2021). Bei der Laktatdehydrogenase handelt es sich um ein Tetramer, das aus verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten A und B zusammengesetzt sein kann (Dawson, Goodfriend et al. 1964). Während die

Untereinheit Laktatdehydrogenase A eine höhere Affinität für Pyruvat zeigt, katalysiert die LDHB bevorzugt die Reaktion von Laktat zu Pyruvat, die unter anderem im Mitochondrium stattfinden kann (Dawson, Goodfriend et al. 1964, Deng, Gao et al. 2022). Dies könnte bedeuten, dass die CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren vermehrt Laktat in ihren Mitochondrien umsetzen und dieses als Substrat für den Citratzyklus nutzen. In humanen und murinen CD4⁺-Zellen führten erhöhte Laktatkonzentrationen im Medium zu verminderter Proliferation, Zytokinproduktion und oxidativer sowie glykolytischer Stoffwechselaktivität (Decking, Bruss et al. 2022). Die Überexpression von LDHB konnte die Zytokinproduktion in den humanen CD4⁺-Zellen teilweise wiederherstellen und steigerte deren oxidativen Stoffwechsel (Decking, Bruss et al. 2022). Im Zusammenhang mit der ERU könnte die erhöhte Abundanz von LDHB also eine Rolle bei der beobachteten erhöhten oxidativen Phosphorylierung der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden spielen und dazu führen, dass sie ihre Effektorfunktionen im entzündeten Gewebe besser ausführen können. Ob Laktat als Substrat für den mitochondrialen oxidativen Stoffwechsel von equinen CD4⁺-Zellen dienen kann und ob in dessen Nutzung ein Unterschied zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden besteht, ist bislang nicht bekannt. Dies sollte mit weiteren Versuchen erforscht werden. Hierzu könnte die Sauerstoffverbrauchsrate permeabilisierter CD4⁺-Zellen in Reaktion auf Laktat als Substrat bestimmt und zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden verglichen werden. Darüber hinaus wäre eine Untersuchung des Einflusses der LDHB-Aktivität auf die glykolytische Aktivität der Zellen interessant. Die CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren eine verminderte basale Glykolyserate, aber eine erhöhte kompensatorische Glykolyse bei Inhibition der mitochondrialen Respiration (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Die dort im Rahmen des Glycolytic Rate Assays bestimmte Glykolyserate geht im Wesentlichen auf die Ansäuerung des Mediums durch von den Zellen produzierte Protonen bei der Umwandlung von Glukose zu Laktat zurück (Travaglio, Michopoulos et al. 2023). Geht man davon aus, dass die CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden vermehrt im Zytoplasma entstandenes Laktat ins Mitochondrium aufnehmen und dort zu Pyruvat verstoffwechseln, könnte das dazu führen, dass das Medium weniger angesäuert wird und daraus eine vermeintlich geringere Glykolyserate resultiert. Auch diese Hypothese sollte durch weitere Versuche untersucht werden.

Hierfür könnte beispielsweise die LDHB-Aktivität durch den LDHB-spezifischen Inhibitor AXKO-0046 (Shibata, Sogabe et al. 2021) blockiert und daraufhin erneut die Glykolyserate der Zellen bestimmt werden.

Passend zu der in vorherigen Versuchen beobachteten erhöhten basalen oxidativen Phosphorylierung der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021) konnte in der bioinformatischen Analyse des differentiellen Proteoms die oxidative Phosphorylierung als signifikant angereicherter, aktivierter Stoffwechselweg in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden aufgezeigt werden (siehe Kapitel 4.3.5). Darüber hinaus konnten hierbei die am Stoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung beteiligten differentiell abundanten Proteine dem Komplex I, IV und V der Atmungskette zugeordnet werden (siehe Kapitel 4.3.6). Das dem Komplex V der Atmungskette zugehörige, durch mitochondriale DNA kodierte Protein „ATP-Synthase subunit a“ (MT-ATP6) zeigte eine verminderte Abundanz in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden. In den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden konnte zuvor eine verminderte, ATP-verknüpfte Respiration festgestellt werden (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021) und es liegt daher nahe, dass MT-ATP6 hierbei eine Rolle spielt. MT-ATP6 ist eine Untereinheit des F₀-Komplexes der ATP-Synthase (Komplex V) der Atmungskette, die den Protonenkanal in der inneren Mitochondrienmembran bildet. MT-ATP6 ist hier hauptsächlich bei der Bildung der Protonenpore und der Kopplung des Protonenflusses an die rotierende F₀-Untereinheit c beteiligt (Jonckheere, Smeitink et al. 2012, Moreno-Loshuertos, Movilla et al. 2023). Im Zusammenhang mit ERU oder anderen Uveitiden ist dieses Protein in Immunzellen bisher noch nicht beschrieben worden (Stand PubMed Literaturrecherche: Februar 2023). Ein Zusammenhang zwischen MT-ATP6 und Autoimmunerkrankungen wurde jedoch bereits bei Patienten mit SLE hergestellt, bei denen eine verminderte MT-ATP6 Genexpression in PBL nachgewiesen wurde (Lee, Sugino et al. 2011). Die funktionelle Bedeutung dieser verminderten Genexpression wurde allerdings nicht weiter untersucht (Lee, Sugino et al. 2011). Eine Möglichkeit wäre, dass die verminderte MT-ATP6-Abundanz zu einer generellen Inhibierung der ATP-Synthase führt, sodass weniger Protonen zur ATP-Erzeugung durch die Pore strömen und damit die geringere ATP-verknüpfte Respiration zustande kommt. Zusammen mit der erhöhten Aktivität der Elektronentransportkette (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021) würde dies zu einer

Hyperpolarisation der Mitochondrienmembran führen. Im physiologischen Rahmen wurde eine Hyperpolarisation der Mitochondrienmembran bei der Aktivierung von humanen T-Zellen gezeigt (Matarrese, Gambardella et al. 2003, Gerner, Niederstaetter et al. 2019), aber auch im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise bei humanen T-Zellen von SLE-Patienten (Gergely, Grossman et al. 2002) und PBL von Typ 1-Diabetes-Patienten (Chen, Chernatynskaya et al. 2017) beschrieben.

Unter Berücksichtigung der Funktionen von MT-ATP6 bei der Bildung der Protonenpore der ATP-Synthase wäre eine weitere Möglichkeit, dass die verminderte Abundanz zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Pore für Protonen führt, deren Durchfluss nicht an die Synthese von ATP gekoppelt ist, und dass dadurch die verminderte ATP-verknüpfte Respiration zustande kommt. In diesem Fall wäre eine Erklärung für die erhöhte basale Sauerstoffverbrauchsrate, dass vermehrt Protonen durch die Elektronentransportkette in den Intermembranraum gepumpt werden müssen, um einer Depolarisierung entgegenzuwirken und ein normales Membranpotential aufrechtzuerhalten. Beim Menschen sind verschiedene Mutationen des MT-ATP6 Gens bekannt und je nach Mutation konnte es sowohl zu einem erhöhten als auch zu einem verringerten mitochondrialen Membranpotential kommen (Ganetzky, Stendel et al. 2019). Es sind also beide Möglichkeiten denkbar. Jedoch waren die Mutationen im MT-ATP6 Gen beim Menschen in der Regel mit einer verminderten Sauerstoffverbrauchsrate verknüpft (Ganetzky, Stendel et al. 2019), was einen Kontrast zu den im Pferd beobachteten Verhältnissen darstellt. Die Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten im Vergleich zu gesunden Pferden könnte helfen, hier weiter zu differenzieren. Hierfür könnten beispielsweise fluoreszierende Farbstoffe wie TMRE herangezogen werden, die sich ladungsabhängig im Mitochondrium ansammeln und deren Fluoreszenzintensität somit negativ mit dem Membranpotential korreliert (Jones, Sheng et al. 2021).

In dieser Arbeit konnte erstmals das in ERU vermindert abundante Protein MT-ATP6 als potenziell verantwortlicher Kandidat identifiziert und damit eine sehr wahrscheinliche Beteiligung von Komplex V selbst an der verminderten ATP-verknüpften Respiration festgestellt werden.

Im Gegensatz zu MT-ATP6 zeigten die dem Komplex I und IV zugeordneten differentiellen Proteine alle eine signifikant höhere Abundanz in den Mitochondrien

der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten im Vergleich zu gesunden Pferden (siehe Kapitel 4.3.6).

Der Komplex IV, auch Cytochrom-c-Oxidase, katalysiert den Transfer von Elektronen auf Sauerstoff und pumpt gleichzeitig zwei Protonen in den Intermembranraum (Mansilla, Racca et al. 2018, Yin und O'Neill 2021). Eine erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate während der oxidativen Phosphorylierung, wie sie in den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren beobachtet wurde (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021), ist daher zwangsläufig mit einem erhöhten Umsatz von Sauerstoff zu Wasser durch Komplex IV verbunden. Hierbei ist denkbar, dass Komplex IV selbst an diesem erhöhten Sauerstoffverbrauch beteiligt ist, oder aber dieser nur begleitend durch die erhöhte Aufnahme von Elektronen in die Transportkette durch Komplex I oder II bedingt ist. Durch die differentielle Proteomanalyse wurde nun gezeigt, dass sowohl Proteine aus Komplex I als auch aus Komplex IV eine erhöhte Abundanz in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden hatten. Dies legt nahe, dass beide Komplexe eine höhere Aktivität aufweisen könnten und so an der erhöhten Sauerstoffverbrauchsrate und damit an der erhöhten oxidativen Phosphorylierung beteiligt sein könnten. Dies könnte wiederum für einen aktivierten metabolischen Phänotyp der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden sprechen. So wurde sowohl Komplex I als auch Komplex IV in anderen Spezies mit der Aktivierung von T-Zellen und deren proliferativen Eigenschaften in Verbindung gebracht (Tan, Yang et al. 2017, Bailis, Shyer et al. 2019, Yin und O'Neill 2021). In murinen T-Zellen wurde nach der Aktivierung eine Erhöhung der Komplex IV Aktivität beobachtet, wobei hierbei keine vermehrte Abundanz der Komplex IV Proteine festgestellt wurde (Tarasenko, Pacheco et al. 2017). In einer anderen Studie konnte dagegen in den T-Zellen von Mäusen gezeigt werden, dass diese nach der Ko-Stimulation mit CD3/CD28 eine höhere Abundanz des Komplex IV Proteins „Cytochrom-c-Oxidase 10“ (COX10) zeigten (Tan, Yang et al. 2017).

In den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden zeigte hingegen das dem Komplex IV zugeordnete Protein „Cytochrome-c-Oxidase Subunit 6A“ (COX6A1) eine erhöhte Abundanz. Dessen Funktion wurde bisher weder in den Immunzellen beim Pferd noch im Zusammenhang mit der T-Zellen-Aktivierung beschrieben (Stand der PubMed Literaturrecherche: Februar 2023). Es wäre also denkbar, dass COX6A1 bei equinen Immunzellen eine ähnliche Funktion

bei der Aktivierung aufweist wie COX10 bei den murinen Zellen. Beide Proteine stellen eine nukleär kodierte, strukturelle Untereinheit des Komplex IV dar, deren bekannte Funktionen vor allem in der Regulation und dem Zusammenbau des Komplexes liegen (Tan, Yang et al. 2017, Luo, Yan et al. 2021). Darüber hinaus wurde für beide Proteine eine schützende Funktion vor der Apoptose beschrieben (Eun, Woo et al. 2008, Tarasenko, Pacheco et al. 2017). Die Deletion von COX10 in den murinen T-Zellen und die damit verbundene Dysfunktion von Komplex IV führte zu einer verringerten Proliferationsrate sowie einer erhöhten Apoptose nach der Aktivierung (Tan, Yang et al. 2017). Eine verminderte Apoptose der PBL von an ERU erkrankten Pferden wurde bereits nachgewiesen (Schauer, Kleinwort et al. 2018). Die höhere Abundanz von COX6A1 in den CD4⁺-Zellen könnte hierbei eine Rolle spielen und die Zellen vor der Apoptose schützen. So konnte die Überexpression von COX6A1 in einer humanen Glioblastomzelllinie die induzierte Apoptose unterdrücken (Eun, Woo et al. 2008).

Die genaue Rolle von Komplex IV bei der Pathogenese der ERU sollte in weiteren Versuchen beleuchtet werden. Zunächst sollte untersucht werden, ob tatsächlich eine gesteigerte Aktivität von Komplex IV in den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren besteht. Hierfür könnte zum Beispiel die Sauerstoffverbrauchsrate der CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden nach Permeabilisierung der Plasmamembran in Reaktion auf Tetramethylphenylendiamin (TMPD) gemessen werden (Salabei, Gibb et al. 2014). TMPD ist ein nicht-physiologischer Elektronendonator, der seine Elektronen direkt an Komplex IV abgibt und damit eine Beurteilung unabhängig von den vorangeschalteten Komplexen ermöglicht (Salabei, Gibb et al. 2014, Acin-Perez, Beninca et al. 2021).

Dem Komplex I der Atmungskette wurden insgesamt 6 Proteine zugeordnet, die alle eine höhere Abundanz in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden zeigten (siehe Kapitel 4.3.6). Dies legt eine Beteiligung des Komplex I am veränderten Stoffwechsel, insbesondere der erhöhten oxidativen Phosphorylierung der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden nahe. Der Komplex I, auch NADH-Dehydrogenase genannt, transferiert zwei Elektronen von NADH auf Cytochrom c und pumpt dabei vier Protonen in den Intermembranraum (Yin und O'Neill 2021). Die erhöhte Abundanz von Proteinen aus Komplex I der Atmungskette könnte dafürsprechen, dass sich die peripheren CD4⁺-Zellen von

Pferden mit ERU in einem frühen Stadium der Aktivierung befinden und der Komplex I der Atmungskette hierbei eine wichtige Rolle einnimmt. In murinen Th1-Zellen führte die Inhibierung von Komplex I mit Rotenon zu einer signifikant reduzierten Proliferation, was zeigt, dass die Komplex I Aktivität eine wichtige Rolle für die proliferativen Eigenschaften der Zellen spielt (Bailis, Shyer et al. 2019). Die Inhibierung führte hier zu einem erhöhten NADH/NAD⁺ Verhältnis und zudem zu einer verminderten zellulären Aspartatkonzentration (Bailis, Shyer et al. 2019). Durch die Zugabe von Aspartat zu den mit Rotenon behandelten Zellen konnten die proliferativen Eigenschaften weitestgehend wiederhergestellt werden (Bailis, Shyer et al. 2019). Damit wurde gezeigt, dass die Rolle von Komplex I für die Proliferation der murinen Th1 Zellen nicht etwa von dessen Beitrag zur ATP-Generierung abhängt, sondern vielmehr von dessen Beeinflussung des NADH/NAD⁺-Verhältnisses und des zellulären Aspartatstoffwechsels (Bailis, Shyer et al. 2019). Aspartat stellt wiederum eine wichtige Aminosäure für die Biosynthese von Nukleotiden und Proteinen dar, die für die Proliferation benötigt werden (Sullivan, Gui et al. 2015). Interessanterweise führte die Rotenonbehandlung der Zellen am Tag 4 nach der Aktivierung nicht zur Reduktion der IFN γ -Produktion der murinen Th1-Zellen (Bailis, Shyer et al. 2019). Unter diesem Aspekt ist davon auszugehen, dass die Aktivität von Komplex I vor allem in der frühen Aktivierungs- und Differenzierungsphase von Bedeutung ist, nicht jedoch für die Ausführung der Effektorfunktionen (Bailis, Shyer et al. 2019). Darüber hinaus ist Komplex I eine Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies (*engl.* reactive oxygen species, ROS), die wiederum als Signalmoleküle für metabolische Veränderungen dienen (Scialo, Fernandez-Ayala et al. 2017, Yin und O'Neill 2021). Dadurch wird klar, dass die Effekte von Veränderungen an Komplex I und damit die Bedeutung der erhöhten Proteinabundanz in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden äußerst vielfältig sein können. Bezieht man hier jedoch mit ein, dass gleichzeitig zur erhöhten Aktivität der Elektronentransportkette eine verminderte ATP-verknüpfte Respiration in den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden gezeigt wurde (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021), könnte das bedeuten, dass vermehrt Funktionen des Komplexes I, die nicht der reinen ATP-Synthese dienen, in den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden für den veränderten Phänotyp ausschlaggebend sind. Bei verschiedenen Zelllinien konnte sogar gezeigt werden, dass deren Proliferationsfähigkeit durch die Behandlung mit Oligomycin unterdrückt

wurde, aber durch Zugabe von einer geringen Dosis an FCCP wiederhergestellt werden konnte (Sullivan, Gui et al. 2015). Das zeigt, dass dort die Proliferation zwar abhängig von der Aktivität der Elektronentransportkette, aber unabhängig von der ATP-Synthase-Aktivität war (Sullivan, Gui et al. 2015). Entsprechende Versuche wurden jedoch noch nicht mit Immunzellen von Pferden durchgeführt und daher muss hier zunächst nachgewiesen werden, dass der Komplex I bei equinen CD4⁺-Zellen ähnliche Funktionen erfüllt (Stand der Literaturrecherche: Februar 2023). Durch Stimulationsversuche könnte untersucht werden, ob die CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine höhere Proliferationsrate zeigen und wie sich die Inhibition von Komplex I der Atmungskette, beispielsweise durch Rotenon, auf die Proliferation der equinen Zellen auswirkt.

Eine höhere Aktivität des Komplexes I in Reaktion auf Pyruvat konnte jedoch zwischen den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten und gesunden Pferden nicht festgestellt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die erhöhte Abundanz von Komplex I Proteinen keine vermehrte Aktivität des Komplexes in der Elektronentransportkette mit sich bringt. So könnte es sich beispielsweise auch um die Akkumulation nicht funktionstüchtiger Proteine handeln, oder die höher abundanten Proteine nehmen keinen direkten Einfluss auf die Aktivität der Elektronentransportkette. Allerdings würde weder die Akkumulation funktionsunfähiger Proteine noch eine unveränderte Aktivität der Atmungskette die beobachtete erhöhte basale oxidative Phosphorylierung der intakten CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden erklären. Wahrscheinlicher ist daher die bereits diskutierte Möglichkeit, dass die Komplexaktivität in Reaktion auf andere Substrate eine Rolle spielt, oder erst die Kombination verschiedener Substrate zu einer erhöhten Aktivität des Komplexes führt.

Bei der Analyse der den differentiell angereicherten Proteinen nachgelagerten Funktionen (siehe Kapitel 4.3.8) zeigte sich die „organization of mitochondria“ als angereicherte Funktion mit der höchsten Signifikanz. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass Veränderungen in der Morphologie der Mitochondrien bei den CD4⁺-Zellen von Pferden mit ERU vorliegen könnten. Mitochondrien haben die Fähigkeit, sich zu verbinden oder zu teilen und können somit sowohl in einer länglichen, fusionierten Form, als auch in einer fragmentierten Form vorliegen (Di Daniele, Simula et al. 2021). Unter den Proteinen, die die mitochondriale

Organisation beeinflussen können, fand sich das in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden höher abundante Protein "Mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1" (MUL1) (siehe Kapitel 4.3.7.). Dieses Protein wurde beim Pferd bisher noch nicht beschrieben (Stand der Literaturrecherche: März 2023). In HeLa Zellen wurde gezeigt, dass die Überexpression von MUL1 die mitochondriale Fragmentierung fördert, indem es das für die mitochondriale Fragmentierung wichtige Protein „Dynamamin-related protein 1“ (Drp1) durch SUMOylation stabilisiert (Ding, Li et al. 2017, Calle, Garrido-Moreno et al. 2022). Darüber hinaus bewirkt MUL1 in HeLa Zellen eine Degradierung des Proteins „Mitofusin 2“ (Mfn2), welches eine Rolle bei der Fusionierung von Mitochondrien spielt (Yun, Puri et al. 2014). Morphologische Veränderungen in CD4⁺-Zellen stehen in enger Verbindung mit ihrem metabolischen Phänotyp und ihren Effektorfunktionen (Song, Yi et al. 2022). In Mäusen wurde gezeigt, dass T-Effektorzellen eher mit kleineren, fragmentierten Mitochondrien assoziiert sind, während vermehrt fusionierte Mitochondrien bei T-Gedächtniszellen gesehen wurden (Buck, O'Sullivan et al. 2016, Song, Yi et al. 2022). Die erhöhte MUL1-Abundanz in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden könnte bedeuten, dass diese ebenfalls vermehrt in einer fragmentierten Form vorliegen. Die erhöhte Abundanz könnte auch an der verminderten Kopplung von Elektronentransportkette und ATP-Synthese in den CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren beteiligt sein. Die Umwandlung der mitochondrialen Struktur geht in der Regel mit einer Veränderung der Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran (Cristae mitochondriales) einher, was wiederum die Effizienz der Elektronentransportkette und ihre Kopplung an die oxidative Phosphorylierung beeinflusst (Buck, O'Sullivan et al. 2016). Zellen mit fragmentierten Mitochondrien favorisierten die aerobe Glykolyse, während sie mit fusionierten Mitochondrien vermehrt die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung nutzten (Buck, O'Sullivan et al. 2016). Die CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden zeigten allerdings basal einen vermehrt oxidativen Stoffwechsel und eine geringere glykolytische Aktivität (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Sie konnten bei Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung allerdings vermehrt auf die aerobe Glykolyse zurückgreifen (Barfuesser, Wiedemann et al. 2021). Diese Ergebnisse passen nicht ganz zu einer rein fragmentierten mitochondrialen Morphologie und bedürfen daher weiterer Untersuchungen. Darüber hinaus wurde in humanen T-Zellen gezeigt, dass die mitochondriale

Fragmentierung und Umlagerung an die Polkappen der Zelle für die Zellpolarisation und -migration essenziell ist (Campello, Lacalle et al. 2006). Dies könnte wiederum ebenfalls für eine vermehrt fragmentierte Form der Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden sprechen, da die PBL von an ERU erkrankten Tieren gesteigerte Wanderungseigenschaften in einer 3D Kollagenmatrix zeigten (Wiedemann, Amann et al. 2020).

Weder im Rahmen der ERU noch der experimentellen autoimmunen Uveitis wurde die mitochondriale Morphologie oder Lokalisation nach aktueller Literaturrecherche bisher beschrieben (Stand: Februar 2023). In einer Studie an einem humanen Patienten mit nicht infektiöser Uveitis wurden in den vitrealen CD4⁺-Zellen vermehrt fragmentierte Mitochondrien beschrieben, während die peripheren CD4⁺-Zellen vergleichsweise elongierte Mitochondrien zeigten (Tagirasa, Kaza et al. 2020). In dieser Studie wurde die mitochondriale Morphologie allerdings nur bei einem einzelnen Patienten bestimmt und keine peripheren CD4⁺-Zellen von augengesunden Menschen einbezogen (Tagirasa, Kaza et al. 2020). Die Fragmentierung der Mitochondrien der vitrealen CD4⁺-Zellen spricht für einen Effektorzell-Phänotyp (Song, Yi et al. 2022). Eine Beurteilung, ob dieser Prozess gegebenenfalls schon in den peripheren CD4⁺-Zellen von Uveitispatienten beginnt, ist in der genannten Studie allerdings nicht möglich, da keine Analyse der mitochondrialen Morphologie der peripheren CD4⁺-Zellen von augengesunden Menschen zum Vergleich vorliegt (Tagirasa, Kaza et al. 2020). So wäre es auch möglich, dass die peripheren CD4⁺-Zellen der Uveitispatienten im Vergleich zu peripheren CD4⁺-Zellen von augengesunden Menschen keinen Unterschied bei der Morphologie oder sogar eine höhere Fragmentierung aufweisen. Die mitochondriale Morphologie peripherer und vitrealer CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden sowie peripherer CD4⁺-Zellen von gesunden Pferden sollte untersucht und verglichen werden. Als erster Schritt in diese Richtung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll für die Darstellung der Mitochondrien von equinen PBL mittels dSTORM etabliert (siehe Kapitel 4.4).

Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse für einen frühen Aktivierungsstatus der peripheren CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden auf molekularer Ebene. Ein solch vermehrt aktivierter Phänotyp wurde bereits durch andere Ergebnisse bei den peripheren CD4⁺-Zellen beschrieben (Saldinger, Nelson et al. 2020, Wiedemann, Amann et al. 2020, Degroote und Deeg 2021) und hier

konnten entsprechende Veränderungen auch auf Proteinebene gezeigt werden. Inwiefern diese Unterschiede auf Proteinebene der Grund oder die Folge eines geänderten metabolischen Phänotyps sind, ist in der Regel schwer zu beurteilen (Tan, Yang et al. 2017). Insbesondere, da die molekularen Mechanismen bei der Aktivierung von equinen CD4⁺-Zellen noch nicht ausreichend erforscht sind und die gezogenen Schlüsse größtenteils auf Erkenntnissen aus Zelllinien oder aus anderen Spezies basieren. Die differentielle Untersuchung des mitochondrialen Proteoms der CD4⁺-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden nach polyklonaler Stimulation wäre daher ein interessanter Ansatz für die weitere Forschung. Hierdurch könnten sowohl physiologische Mechanismen der Aktivierung equiner CD4⁺-Zellen aufgezeigt als auch Unterschiede in der Aktivierung der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden untersucht werden. Besonders spannend wäre es dabei, die Proteinprofile zu verschiedenen Zeitpunkten der Aktivierung zu betrachten. Dadurch könnte beurteilt werden, ob sich die hier beschriebenen Veränderungen tatsächlich mit einem frühen Aktivierungsstatus der equinen CD4⁺-Zellen decken oder sich ein alternativer Aktivierungsweg zeigt.

Ein genaues Verständnis der molekularen Vorgänge, die zur Entstehung von Pathologien führen, ist essenziell für die Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten. Durch die in der Proteomanalyse dargestellten mitochondrialen Veränderungen bei an ERU erkrankten Pferden könnte beispielsweise Metformin ein interessanter Kandidat für die therapeutische Intervention sein. Metformin wird bereits bei Patienten mit Typ-2-Diabetes eingesetzt, sein genauer Wirkmechanismus ist aber noch nicht vollständig verstanden (Nojima und Wada 2023). Als einer der Effekte von Metformin ist die Inhibierung von Komplex I der Atmungskette beschrieben (Nojima und Wada 2023). In primären murinen Makrophagen aus dem Knochenmark, die mit LPS stimuliert wurden, konnte Metformin die durch umgekehrte Elektronenübertragung (engl. reverse electron transfer, RET) an Komplex I induzierte ROS-Produktion senken (Batandier, Guigas et al. 2006, Kelly, Tannahill et al. 2015, Yin und O'Neill 2021). Darüber hinaus unterdrückte Metformin in Non-Obese Diabetic (NOD)-Mäusen die Differenzierung von T-Zellen zu Th1- und Th17-Zellen und förderte die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen über die Inhibierung von Komplex I (Duan, Ding et al. 2019). Ein Ungleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen und

regulatorischen T-Zellen wurde auch im Rahmen der experimentellen Uveitis bei der Maus beschrieben (Wang, Zhou et al. 2022). Ein solches Ungleichgewicht wurde im Rahmen der ERU noch nicht untersucht, könnte aber auch dort eine Rolle spielen. In humanen Leber-, Lungen- und Dünndarmzelllinien konnte gezeigt werden, dass Metformin die mitochondriale Morphologie beeinflusst und zu vermehrt fusionierten Mitochondrien führt (Du, Zhu et al. 2022). Bei primären Immunzellen oder Immunzelllinien wurde dieser Effekt bislang nicht untersucht (Stand der PubMed Literaturrecherche: Februar 2023). Positive Effekte von Metformin konnten schon bei anderen Autoimmunerkrankungen wie SLE (Yin, Choi et al. 2015), experimenteller autoimmuner Arthritis (Son, Lee et al. 2014) und Psoriasis (Tsuji, Hashimoto-Hachiya et al. 2020) gezeigt werden. In einem Nagermodell für infektiöse Uveitis konnte Metformin den Krankheitsverlauf der Endotoxin-induzierten Uveitis mildern (Kalariya, Shoeb et al. 2012). Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Beteiligung von Komplex I der Atmungskette an den metabolischen Veränderungen und die erlangten Hinweise auf eine vermehrte Fragmentierung der Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden machen Metformin daher zu einem besonders spannenden Kandidaten mit möglichem therapeutischem Potential. In weiteren Versuchen sollte deshalb zunächst die dosisabhängige Wirkung von Metformin auf equine Immunzellen *in vitro* getestet werden. Es sollte untersucht werden, ob durch die Behandlung der Zellen mit Metformin die in Immunzellen von ERU-Tieren beobachteten metabolischen Unterschiede, wie die erhöhte basale Sauerstoffverbrauchsrate oder die erhöhte IFN γ -Produktion und deren gesteigerten Wanderungseigenschaften, aufgehoben werden können und wie deren Effektoreigenschaften, wie beispielsweise die Proliferation, hierdurch beeinflusst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die bereits publizierten Veränderungen der oxidativen Phosphorylierung der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden mit erheblichen Veränderungen des mitochondrialen Proteinprofils in Verbindung gebracht werden. Die Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Komplex I und IV an der erhöhten Aktivität der Atmungskette und lassen sich mit einem vermehrt aktivierten Phänotyp der Immunzellen bei der ERU in Einklang bringen. Es konnte eine fundierte wissenschaftliche sowie technische Grundlage für spezifische weiterführende Untersuchungen geschaffen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine weltweit vorkommende, hochprävalente, immun-mediierte Erkrankung, die durch wiederkehrende Entzündungsschübe innerer Augenstrukturen gekennzeichnet ist. Im Krankheitsverlauf überwinden autoreaktive Immunzellen, mehrheitlich CD4⁺-Zellen, die Blut-Retina-Schranke und führen zur Zerstörung von intraokularem Gewebe.

Die genauen Mechanismen, die zur Aktivierung der Immunzellen in der Peripherie und deren anschließender Migration ins Auge führen, konnten bis heute nicht vollständig geklärt werden. Nachgewiesen ist, dass die Immunzellen im peripheren Blut der erkrankten Pferde auch während der symptomfreien Intervalle einen pro-inflammatorischen Phänotyp aufweisen, der sich unter anderem durch eine erhöhte Motilität, verminderte Apoptose und vermehrte Zytokinproduktion äußert. Solche Veränderungen in der Effektorfunktion von Immunzellen sind in der Regel eng mit Veränderungen ihres Metabolismus verbunden. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe wurden bei an ERU erkrankten Pferden veränderte Stoffwechseleigenschaften ihrer peripheren Blutlymphozyten und insbesondere der CD4⁺-Fraktion nachgewiesen. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser metabolischen Veränderungen sind bisher jedoch noch ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Vorgänge, die zu dem veränderten metabolischen, pro-inflammatorischen Phänotyp der peripheren Blutlymphozyten und speziell der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden führen, genauer zu charakterisieren und damit zu einem besseren Verständnis der Krankheitsentstehung beizutragen. Hierfür wurde einerseits die Nutzung verschiedener Substrate im Mitochondrium analysiert und andererseits wurden die Veränderungen auf molekularer Ebene untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die veränderten Stoffwechseleigenschaften der peripheren Blutlymphozyten von an ERU erkrankten Pferden nicht auf veränderte Fähigkeiten zur Nutzung von Glukose, Glutamin oder langkettigen Fettsäuren im mitochondrialen Stoffwechsel zurückzuführen sind.

Um Zusammenhänge zwischen dem veränderten mitochondrialen Metabolismus und den Vorgängen auf molekularer Ebene aufzudecken, wurde im Weiteren eine differenzielle Proteom-Analyse des mitochondrialen Proteinprofils von CD4⁺-Zellen gesunder und an ERU-erkrankter Tiere durchgeführt. Im Ergebnis konnten hierbei

622 mitochondriale Proteine identifiziert werden, von denen 14,3 % eine signifikant differenzielle Abundanz zwischen gesunden und an ERU erkrankten Tieren aufwiesen.

Dabei konnte zum ersten Mal eine signifikant verminderte Abundanz der Proteine HADH und HSD17B10 im Zusammenhang mit der ERU aufgezeigt werden. Beide Proteine spielen eine Rolle bei der Fettsäure β -Oxidation mit einer erhöhten Affinität für kurz- und mittelkettige Fettsäuren. Ein veränderter Lipidmetabolismus, insbesondere kurz- und mittelkettiger Fettsäuren, könnte damit zu den metabolischen Veränderungen der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren beitragen.

Außerdem zeigte sich eine erhöhte Abundanz der Laktatdehydrogenase B, die auf eine gesteigerte Verstoffwechslung von Laktat hindeutet und eine Erklärung für die in vorangegangenen Studien nachgewiesene, verminderte Laktatsekretion der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden bieten könnte.

Darüber hinaus war das Protein MUL1 unter den hoch signifikanten und am stärksten angereicherten Proteinen in den Mitochondrien der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Tieren. Dieses Protein wurde beim Pferd zuvor in Lymphozyten noch nicht beschrieben, nimmt jedoch bei anderen Spezies eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Fragmentierung ein, was auf eine veränderte mitochondriale Morphologie der CD4⁺-Zellen von an ERU erkrankten Pferden hindeutet. Das Vorkommen und die erhöhte Expression von MUL1 in den equinen CD4⁺-Zellen konnte im Western Blot bestätigt werden.

Zudem konnte eine vermehrte Aktivität der Atmungskette nicht nur allgemein bestätigt, sondern spezifisch mit einer erhöhten Abundanz von Proteinen aus Komplex I und IV in Verbindung gebracht werden. Das dem Komplex V zugeordnete Protein MT-ATP6 zeigte dagegen eine verminderte Abundanz und gibt eine Erklärung für die verminderte ATP-verknüpfte Respiration der CD4⁺-Zellen ERU-erkrankter Tiere auf molekularer Ebene, die in vorangegangenen Studien gezeigt wurde.

Insgesamt lassen sich die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen auf molekularer Ebene mit einem vermehrt aktivierten, pro-inflammatorischen Phänotyp der CD4⁺-Zellen in Einklang bringen, können eine Erklärung für einige zuvor beschriebene Veränderungen des Immunzellmetabolismus bieten und schaffen die Grundlage für weitere spezifische Untersuchungen.

7 SUMMARY

Equine recurrent uveitis (ERU) is a highly prevalent, immune-mediated disease characterized by remitting-relapsing inflammation of the inner eye, affecting horses worldwide. In the course of the disease, autoreactive immune cells, mainly CD4⁺ cells, cross the blood-retinal barrier and lead to the destruction of intraocular tissue. The exact mechanisms that lead to the activation of the immune cells in the periphery and their subsequent migration into the eye have not been fully elucidated to date. It has been proven that the immune cells in the peripheral blood of the diseased horses exhibit a pro-inflammatory phenotype, which manifests itself through increased motility, reduced apoptosis and increased cytokine production, even during quiescent stage of the disease. Such changes in the effector function of immune cells are closely associated with changes in their metabolism. In a previous study conducted by our research group, altered metabolic properties of their peripheral blood lymphocytes and in particular of the CD4⁺ fraction were detected in horses suffering from ERU. However, the underlying mechanisms of these metabolic changes are still unclear.

The aim of this work was therefore to more precisely characterize the mechanisms that lead to the altered metabolic, pro-inflammatory phenotype of the peripheral blood lymphocytes and especially of the CD4⁺ cells of horses suffering from ERU and thus to contribute to a better understanding of the disease development. For this purpose, the use of different substrates in the mitochondrion was analyzed and the changes on the molecular level were investigated.

In this study, it was shown that the altered metabolic properties of peripheral blood lymphocytes of horses suffering from ERU are not due to altered abilities in utilizing glucose, glutamine or long-chain fatty acids in mitochondrial metabolism.

In order to uncover correlations between the altered mitochondrial metabolism and the processes at the molecular level, a differential proteome analysis of the mitochondrial protein profile of CD4⁺ cells from healthy and ERU-diseased animals was carried out. As a result, 622 mitochondrial proteins were identified, of which 14.3 % showed a significant differential abundance between healthy and ERU-diseased animals.

For the first time, a significantly reduced abundance of the proteins HADH and HSD17B10 could be shown in connection with ERU. Both proteins play a role in

fatty acid β -oxidation with an increased affinity for short and medium chain fatty acids. An altered lipid metabolism, especially of short- and medium-chain fatty acids, could thus contribute to the metabolic alterations of CD4⁺ cells from animals suffering from ERU.

Furthermore, an increased abundance of lactate dehydrogenase B was shown, which indicates an increased metabolism of lactate and could explain the reduced lactate secretion of CD4⁺ cells of ERU-diseased horses, which has been shown in previous studies.

Furthermore, the protein MUL1 was among the highly significant and most enriched proteins in the mitochondria of CD4⁺ cells of ERU-diseased animals. This protein has not yet been described in equine lymphocytes, but plays an important role in mitochondrial fragmentation (fission) in other species, suggesting that mitochondrial morphology is altered in CD4⁺ cells of ERU-affected horses. The presence and increased expression of MUL1 in the equine CD4⁺ cells was confirmed by Western Blot analysis.

In addition, an increased activity of the respiratory chain could not only be confirmed in general, but specifically associated with an increased abundance of proteins in complex I and IV. In contrast, the protein MT-ATP6, which is assigned to complex V, had a reduced abundance and provides an explanation for the reduced ATP-linked respiration of CD4⁺ cells of ERU-diseased animals at the molecular level shown in previous studies.

Overall, the changes at the molecular level described in this study are consistent with a pre-activated, pro-inflammatory phenotype of CD4⁺ cells, may explain some previously described changes in immune cell metabolism, and provide the basis for further investigations.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Acin-Perez, R., C. Beninca, B. Shabane, O. S. Shirihai und L. Stiles (2021). "Utilization of Human Samples for Assessment of Mitochondrial Bioenergetics: Gold Standards, Limitations, and Future Perspectives." *Life (Basel)* 11(9). <https://doi.org/10.3390/life11090949>
- Aebbersold, R. und M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." *Nature* 422(6928): 198-207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- Ajaz, S., M. J. McPhail, K. K. Singh, S. Mujib, F. M. Trovato, S. Napoli und K. Agarwal (2021). "Mitochondrial metabolic manipulation by SARS-CoV-2 in peripheral blood mononuclear cells of patients with COVID-19." *Am J Physiol Cell Physiol* 320(1): C57-C65. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00426.2020>
- Allbaugh, R. A. (2017). "Equine recurrent uveitis: A review of clinical assessment and management." *Equine Veterinary Education* 29(5): 279-288. <https://doi.org/10.1111/eve.12548>
- Almeida, L., A. Dhillon-LaBrooy Hons, G. Carriche, L. Berod und T. Sparwasser (2021). "CD4+ T-cell differentiation and function: Unifying glycolysis, fatty acid oxidation, polyamines NAD mitochondria." *JACI* 148(1): 16-32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.033>
- Amadi-Obi, A., C. R. Yu, X. Liu, R. M. Mahdi, G. L. Clarke, R. B. Nussenblatt, I. Gery, Y. S. Lee und C. E. Egwuagu (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. <https://doi.org/10.1038/nm1585>
- Andrejeva, G. und J. C. Rathmell (2017). "Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors." *Cell Metab* 26(1): 49-70. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.004>
- Bailis, W., J. A. Shyer, J. Zhao, J. C. G. Canaveras, F. J. Al Khazal, R. Qu, H. R. Steach, P. Bielecki, O. Khan, R. Jackson, Y. Kluger, L. J. Maher, 3rd, J. Rabinowitz, J. Craft und R. A. Flavell (2019). "Distinct modes of mitochondrial metabolism uncouple T cell differentiation and function." *Nature* 571(7765): 403-407. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1311-3>
- Barfuesser, C., C. Wiedemann, A. L. C. Hoffmann, S. Hirmer und C. A. Deeg (2021). "Altered Metabolic Phenotype of Immune Cells in a Spontaneous Autoimmune Uveitis Model." *Front Immunol* 12: 601619. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.601619>
- Batandier, C., B. Guigas, D. Demaille, M. Y. El-Mir, E. Fontaine, M. Rigoulet und X. M. Leverve (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin." *J Bioenerg Biomembr* 38(1): 33-42. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9003-8>

- Bennett, C. F., P. Latorre-Muro und P. Puigserver (2022). "Mechanisms of mitochondrial respiratory adaptation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 23(12): 817-835. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00506-6>
- Bludau, I. und R. Aebersold (2020). "Proteomic and interactomic insights into the molecular basis of cell functional diversity." *Nat Rev Mol Cell Biol* 21(6): 327-340. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0231-2>
- Bludau, I., M. Frank, C. Dorig, Y. Cai, M. Heusel, G. Rosenberger, P. Picotti, B. C. Collins, H. Rost und R. Aebersold (2021). "Systematic detection of functional proteoform groups from bottom-up proteomic datasets." *Nat Commun* 12(1): 3810. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24030-x>
- Brand, M. D. und D. G. Nicholls (2011). "Assessing mitochondrial dysfunction in cells." *Biochem J* 435(2): 297-312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>
- Braschi, E., R. Zunino und H. M. McBride (2009). "MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission." *EMBO Rep* 10(7): 748-754. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.86>
- Buck, M. D., D. O'Sullivan, R. I. Klein Geltink, J. D. Curtis, C. H. Chang, D. E. Sanin, J. Qiu, O. Kretz, D. Braas, G. J. van der Windt, Q. Chen, S. C. Huang, C. M. O'Neill, B. T. Edelson, E. J. Pearce, H. Sesaki, T. B. Huber, A. S. Rambold und E. L. Pearce (2016). "Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming." *Cell* 166(1): 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.035>
- Calle, X., V. Garrido-Moreno, E. Lopez-Gallardo, I. Norambuena-Soto, D. Martínez, A. Peñaloza-Otárola, A. Troncosi, A. Guerrero-Moncayo, A. Ortega, V. Maracaja-Coutinho, V. Parra, M. Chiong und S. Lavandero (2022). "Mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1 (MUL1) as a novel therapeutic target for diseases associated with mitochondrial dysfunction." *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1002/iub.2657>
- Campello, S., R. A. Lacalle, M. Bettella, S. Manes, L. Scorrano und A. Viola (2006). "Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics." *J Exp Med* 203(13): 2879-2886. <https://doi.org/10.1084/jem.20061877>
- Carr, E. L., A. Kelman, G. S. Wu, R. Gopaul, E. Senkevitch, A. Aghvanyan, A. M. Turay und K. A. Frauwirth (2010). "Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation." *J Immunol* 185(2): 1037-1044. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903586>
- Caspi, R. R., F. G. Roberge, C. G. McAllister, M. el-Saied, T. Kuwabara, I. Gery, E. Hanna und R. B. Nussenblatt (1986). "T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat." *J Immunol* 136(3): 928-933.
- Champagne, D. P., K. M. Hatle, K. A. Fortner, A. D'Alessandro, T. M. Thornton, R. Yang, D. Torralba, J. Tomas-Cortazar, Y. W. Jun, K. H. Ahn, K. C. Hansen, L. Haynes, J. Anguita und M. Rincon (2016). "Fine-Tuning of CD8(+) T Cell Mitochondrial Metabolism by the Respiratory Chain Repressor MCJ Dictates

- Protection to Influenza Virus." *Immunity* 44(6): 1299-1311.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.018>
- Chance, B. und G. R. Williams (1956). "Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 221(1): 477-489.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)65266-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)65266-4)
- Chapman, N. M. und H. Chi (2022). "Metabolic adaptation of lymphocytes in immunity and disease." *Immunity* 55(1): 14-30.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.012>
- Chen, J., A. V. Chernatynskaya, J. W. Li, M. R. Kimbrell, R. J. Cassidy, D. J. Perry, A. B. Muir, M. A. Atkinson, T. M. Brusko und C. E. Mathews (2017). "T cells display mitochondria hyperpolarization in human type 1 diabetes." *Sci Rep* 7(1): 10835. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11056-9>
- Chen, Y. H., S. Lightman und V. L. Calder (2021). "CD4(+) T-Cell Plasticity in Non-Infectious Retinal Inflammatory Disease." *Int J Mol Sci* 22(17).
<https://doi.org/10.3390/ijms22179584>
- Chi, H. (2022). "Immunometabolism at the intersection of metabolic signaling, cell fate, and systems immunology." *Cell Mol Immunol* 19(3): 299-302.
<https://doi.org/10.1038/s41423-022-00840-x>
- Cho, N. H., K. C. Cheveralls, A. D. Brunner, K. Kim, A. C. Michaelis, P. Raghavan, H. Kobayashi, L. Savy, J. Y. Li, H. Canaj, J. Y. S. Kim, E. M. Stewart, C. Gnann, F. McCarthy, J. P. Cabrera, R. M. Brunetti, B. B. Chhun, G. Dingle, M. Y. Hein, B. Huang, S. B. Mehta, J. S. Weissman, R. Gomez-Sjoberg, D. N. Itzhak, L. A. Royer, M. Mann und M. D. Leonetti (2022). "OpenCell: Endogenous tagging for the cartography of human cellular organization." *Science* 375(6585): eabi6983. <https://doi.org/10.1126/science.abi6983>
- Clayton, S. A., L. MacDonald, M. Kurowska-Stolarska und A. R. Clark (2021). "Mitochondria as Key Players in the Pathogenesis and Treatment of Rheumatoid Arthritis." *Front Immunol* 12(673916): 1-26.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.673916>
- Cucchi, D., D. Camacho-Munoz, M. Certo, V. Pucino, A. Nicolaou und C. Mauro (2019). "Fatty acids - from energy substrates to key regulators of cell survival, proliferation and effector function." *Cell Stress* 4(1): 9-23.
<https://doi.org/10.15698/cst2020.01.209>
- Dai, M., L. Wang, J. Yang, J. Chen, X. Dou, R. Chen, Y. Ge und Y. Lin (2023). "LDHA as a regulator of T cell fate and its mechanisms in disease." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 158.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114164>
- Dawson, D. M., T. L. Goodfriend und N. O. Kaplan (1964). "LACTIC DEHYDROGENASES: FUNCTIONS OF THE TWO TYPES RATES OF SYNTHESIS OF THE TWO MAJOR FORMS CAN BE CORRELATED WITH METABOLIC DIFFERENTIATION." *Science* 143(3609): 929-933.
<https://doi.org/10.1126/science.143.3609.929>

- Decking, S. M., C. Bruss, N. Babl, S. Bittner, S. Klobuch, S. Thomas, M. Feuerer, P. Hoffmann, K. Dettmer, P. J. Oefner, K. Renner und M. Kreutz (2022). "LDHB Overexpression Can Partially Overcome T Cell Inhibition by Lactic Acid." *Int J Mol Sci* 23(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23115970>
- Deeg, C. A., B. Amann, A. J. Raith und B. Kaspers (2006). "Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(2): 652-656. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0789>
- Deeg, C. A., M. Ehrenhofer, S. R. Thurau, S. Reese, G. Wildner und B. Kaspers (2002). "Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses." *Exp Eye Res* 75(2): 127-133. <https://doi.org/10.1006/exer.2002.2011>
- Deeg, C. A., S. M. Hauck, B. Amann, E. Kremmer, M. Stangassinger und M. Ueffing (2007). "Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis." *Mol Immunol* 44(13): 3291-3296. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.02.027>
- Deeg, C. A., B. Kaspers, H. Gerhards, S. R. Thurau, B. Wollanke und G. Wildner (2001). "Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(2): 393-398.
- Deeg, C. A., D. Pompetzki, A. J. Raith, S. M. Hauck, B. Amann, S. Suppmann, T. W. Goebel, U. Olazabal, H. Gerhards, S. Reese, M. Stangassinger, B. Kaspers und M. Ueffing (2006). "Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis." *Mol Cell Proteomics* 5(8): 1462-1470. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500352-MCP200>
- Deeg, C. A., S. Reese, H. Gerhards, G. Wildner und B. Kaspers (2004). "The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(7): 2286-2292. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1226>
- Deeg, C. A., S. R. Thurau, H. Gerhards, M. Ehrenhofer, G. Wildner und B. Kaspers (2002). "Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease." *Eur J Immunol* 32(9): 2598-2606. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200209\)32:9<2598::Aid-immu2598>3.0.Co;2-#](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200209)32:9<2598::Aid-immu2598>3.0.Co;2-#)
- Degroote, R. L. und C. A. Deeg (2021). "Immunological Insights in Equine Recurrent Uveitis." *Frontiers in Immunology* 11(609855): 1-9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609855>
- Degroote, R. L., S. M. Hauck, B. Amann, S. Hirmer, M. Ueffing und C. A. Deeg (2014). "Unraveling the equine lymphocyte proteome: differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis." *PLoS One* 9(3): e91684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091684>
- Degroote, R. L., P. B. Uhl, B. Amann, A. M. Krackhardt, M. Ueffing, S. M. Hauck und C. A. Deeg (2017). "Formin like 1 expression is increased on CD4+ T lymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis." *J Proteomics* 154: 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.12.015>

- Delgado de la Herran, H. C., Y. Cheng und F. Perocchi (2021). "Towards a systems-level understanding of mitochondrial biology." *Cell Calcium* 95: 102364. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102364>
- Deng, H., Y. Gao, V. Trappetti, D. Hertig, D. Karatkevich, T. Losmanova, C. Urzi, H. Ge, G. A. Geest, R. Bruggmann, V. Djonov, J. M. Nuoffer, P. Vermathen, N. Zamboni, C. Riether, A. Ochsenbein, R. W. Peng, G. J. Kocher, R. A. Schmid, P. Dorn und T. M. Marti (2022). "Targeting lactate dehydrogenase B-dependent mitochondrial metabolism affects tumor initiating cells and inhibits tumorigenesis of non-small cell lung cancer by inducing mtDNA damage." *Cell Mol Life Sci* 79(8): 445. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04453-5>
- Di Daniele, A., L. Simula und S. Campello (2021). "Following the Dynamism of the Mitochondrial Network in T Cells." *Methods Mol Biol* 2310: 287-299. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1433-4_16
- Ding, Y., J. Li, Z. Liu, H. Liu, H. Li und Z. Li (2017). "IGF-1 potentiates sensory innervation signalling by modulating the mitochondrial fission/fusion balance." *Sci Rep* 7: 43949. <https://doi.org/10.1038/srep43949>
- Divakaruni, A. S. und M. Jastroch (2022). "A practical guide for the analysis, standardization and interpretation of oxygen consumption measurements." *Nat Metab* 4(8): 978-994. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00619-4>
- Divakaruni, A. S., G. W. Rogers und A. N. Murphy (2014). "Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode." *Curr Protoc Toxicol* 60: 25 22 21-16. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2502s60>
- Divakaruni, A. S., S. E. Wiley, G. W. Rogers, A. Y. Andreyev, S. Petrosyan, M. Loviscach, E. A. Wall, N. Yadava, A. P. Heuck, D. A. Ferrick, R. R. Henry, W. G. McDonald, J. R. Colca, M. I. Simon, T. P. Ciaraldi und A. N. Murphy (2013). "Thiazolidinediones are acute, specific inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(14): 5422-5427. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303360110>
- Dorai, T., J. T. Pinto, T. T. Denton, B. F. Krasnikov und A. J. L. Cooper (2022). "The metabolic importance of the glutaminase II pathway in normal and cancerous cells." *Anal Biochem* 644: 114083. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.114083>
- Du, Y., Y. J. Zhu, B. Zeng, X. L. Mu und J. Y. Liu (2022). "Super-Resolution Quantification of T2DM-Induced Mitochondrial Morphology Changes and Their Implications in Pharmacodynamics of Metformin and Sorafenib." *Front Pharmacol* 13: 932116. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.932116>
- Duan, W., Y. Ding, X. Yu, D. Ma, B. Yang, Y. Li, L. Huang, Z. Chen, J. Zheng und C. Yang (2019). "Metformin mitigates autoimmune insulinitis by inhibiting Th1 and Th17 responses while promoting Treg production." *Am J Transl Res* 11(4): 2393-2402.

- Dziegielewska, A. und A. Dunislawska (2022). "Mitochondrial Dysfunctions and Potential Molecular Markers in Sport Horses." *Int J Mol Sci* 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158655>
- Eberhardt, C., B. Amann, A. Feuchtinger, S. M. Hauck und C. A. Deeg (2011). "Differential expression of inwardly rectifying K⁺ channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates misbalance in Muller glial cell-dependent ion and water homeostasis." *Glia* 59(5): 697-707. <https://doi.org/10.1002/glia.21139>
- Endo, Y., T. Kanno und T. Nakajima (2022). "Fatty acid metabolism in T-cell function and differentiation." *Int Immunol* 34(11): 579-587. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxac025>
- Eun, S. Y., I. S. Woo, H. S. Jang, H. Jin, M. Y. Kim, H. J. Kim, J. H. Lee, K. C. Chang, J. H. Kim und H. G. Seo (2008). "Identification of cytochrome c oxidase subunit 6A1 as a suppressor of Bax-induced cell death by yeast-based functional screening." *Biochem Biophys Res Commun* 373(1): 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.178>
- Fang, H., H. Li, H. Zhang, S. Wang, S. Xu, L. Chang, Y. Yang und R. Cui (2022). "Short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: A novel vital oncogene or tumor suppressor gene in cancers." *Front Pharmacol* 13: 1019312. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1019312>
- Feng, X., X. Li, N. Liu, N. Hou, X. Sun und Y. Liu (2022). "Glutaminolysis and CD4(+) T-cell metabolism in autoimmunity: From pathogenesis to therapy prospects." *Front Immunol* 13: 986847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.986847>
- Fingerhut, L., B. Ohnesorge, M. von Borstel, A. Schumski, K. Strutzberg-Minder, M. Mörgelin, C. A. Deeg, H. P. Haagsman, A. Beineke, M. von Köckritz-Blickwede und N. de Buhr (2019). "Neutrophil Extracellular Traps in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis (ERU)." *Cells* 8(12): 1528-1551. <https://doi.org/10.3390/cells8121528>
- Fischer, B. M., W. Brehm, S. Reese und R. J. McMullen (2022). "Equine recurrent uveitis—A review." *Equine Veterinary Education*. <https://doi.org/10.1111/eve.13695>
- Galgani, M., S. Bruzzaniti und G. Matarese (2020). "Immunometabolism and autoimmunity." *Curr Opin Immunol* 67: 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.07.002>
- Ganetzky, R. D., C. Stendel, E. M. McCormick, Z. Zolkipli-Cunningham, A. C. Goldstein, T. Klopstock und M. J. Falk (2019). "MT-ATP6 mitochondrial disease variants: Phenotypic and biochemical features analysis in 218 published cases and cohort of 14 new cases." *Hum Mutat* 40(5): 499-515. <https://doi.org/10.1002/humu.23723>
- Gerding, J. C. und B. C. Gilger (2016). "Prognosis and impact of equine recurrent uveitis." *Equine Vet J* 48(3): 290-298. <https://doi.org/10.1111/evj.12451>

- Gergely, P., Jr., C. Grossman, B. Niland, F. Puskas, H. Neupane, F. Allam, K. Banki, P. E. Phillips und A. Perl (2002). "Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 46(1): 175-190. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200201\)46:1<175::AID-ART10015>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200201)46:1<175::AID-ART10015>3.0.CO;2-H)
- Gerner, M. C., L. Niederstaetter, L. Ziegler, A. Bileck, A. Slany, L. Jancker, R. L. J. Schmidt, C. Gerner, G. Del Favero und K. G. Schmetterer (2019). "Proteome Analysis Reveals Distinct Mitochondrial Functions Linked to Interferon Response Patterns in Activated CD4+ and CD8+ T Cells." *Front Pharmacol* 10: 727. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00727>
- Gilbert, R. M., X. Zhang, R. D. Sampson, M. R. Ehrenstein, D. X. Nguyen, M. Chaudhry, C. Mein, N. Mahmud, G. Galatowicz, O. Tomkins-Netzer, V. L. Calder und S. Lightman (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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00907>
- Gilger, B. C. (2022). "Developing advanced therapeutics through the study of naturally occurring immune-mediated ocular disease in domestic animals." *Am J Vet Res* 83(11). <https://doi.org/10.2460/ajvr.22.08.0145>
- Gilger, B. C. und C. Deeg (2011). Equine Recurrent Uveitis. *Equine Ophthalmology*: 317-349.
- Gilger, B. C., E. Malok, K. V. Cutter, T. Stewart, D. W. Horohov und J. B. Allen (1999). "Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis." *Vet Immunol Immunopathol* 71(1): 17-28. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(99)00082-3)
- Gilger, B. C. und T. M. Michau (2004). "Equine recurrent uveitis: new methods of management." *Vet Clin North Am Equine Pract* 20(2): 417-427, vii. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2004.04.010>
- Giorgi, C., D. De Stefani, A. Bononi, R. Rizzuto und P. Pinton (2009). "Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum." *Int J Biochem Cell Biol* 41(10): 1817-1827. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.04.010>
- Gomez-Serrano, M., E. Camafeita, M. Loureiro und B. Peral (2018). "Mitoproteomics: Tackling Mitochondrial Dysfunction in Human Disease." *Oxid Med Cell Longev* 2018: 1435934. <https://doi.org/10.1155/2018/1435934>
- Hasbargen, K. B., W. J. Shen, Y. Zhang, X. Hou, W. Wang, Q. Shuo, D. A. Bernlohr, S. Azhar und F. B. Kraemer (2020). "Slc43a3 is a regulator of free fatty acid flux." *J Lipid Res* 61(5): 734-745. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000294>
- Hauck, S. M., M. F. Lepper, M. Hertl, W. Sekundo und C. A. Deeg (2017). "Proteome Dynamics in Biobanked Horse Peripheral Blood Derived Lymphocytes (PBL) with Induced Autoimmune Uveitis." *Proteomics* 17(19). <https://doi.org/10.1002/pmic.201700013>

- Hauck, S. M., S. Schoeffmann, B. Amann, M. Stangassinger, H. Gerhards, M. Ueffing und C. A. Deeg (2007). "Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis." *J Proteome Res* 6(6): 2121-2131. <https://doi.org/10.1021/pr060668y>
- He, X. Y., H. Schulz und S. Y. Yang (1998). "A human brain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is identical to an amyloid beta-peptide-binding protein involved in Alzheimer's disease." *J Biol Chem* 273(17): 10741-10746. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10741>
- He, X. Y., S. Y. Yang und H. Schulz (1989). "Assay of L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase with substrates of different chain lengths." *Anal Biochem* 180(1): 105-109. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90095-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90095-x)
- Heilemann, M., S. van de Linde, M. Schuttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld und M. Sauer (2008). "Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes." *Angew Chem Int Ed Engl* 47(33): 6172-6176. <https://doi.org/10.1002/anie.200802376>
- Hoffmann, A. L. C., S. M. Hauck, C. A. Deeg und R. L. Degroote (2022). "Pre-Activated Granulocytes from an Autoimmune Uveitis Model Show Divergent Pathway Activation Profiles upon IL8 Stimulation In Vitro." *Int J Mol Sci* 23(17). <https://doi.org/10.3390/ijms23179555>
- Houten, S. M., S. Violante, F. V. Ventura und R. J. Wanders (2016). "The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid beta-Oxidation and Its Genetic Disorders." *Annu Rev Physiol* 78: 23-44. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105045>
- Howden, A. J. M., J. L. Hukelmann, A. Brenes, L. Spinelli, L. V. Sinclair, A. I. Lamond und D. A. Cantrell (2019). "Quantitative analysis of T cell proteomes and environmental sensors during T cell differentiation." *Nat Immunol* 20(11): 1542-1554. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0495-x>
- Hu, C., Y. Xuan, X. Zhang, Y. Liu, S. Yang und K. Yang (2022). "Immune cell metabolism and metabolic reprogramming." *Mol Biol Rep* 49(10): 9783-9795. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07474-2>
- Huang, B., S. A. Jones, B. Brandenburg und X. Zhuang (2008). "Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution." *Nat Methods* 5(12): 1047-1052. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1274>
- Johnson, M. O., M. M. Wolf, M. Z. Madden, G. Andrejeva, A. Sugiura, D. C. Contreras, D. Maseda, M. V. Liberti, K. Paz, R. J. Kishton, M. E. Johnson, A. A. de Cubas, P. Wu, G. Li, Y. Zhang, D. C. Newcomb, A. D. Wells, N. P. Restifo, W. K. Rathmell, J. W. Locasale, M. L. Davila, B. R. Blazar und J. C. Rathmell (2018). "Distinct Regulation of Th17 and Th1 Cell Differentiation by Glutaminase-Dependent Metabolism." *Cell* 175(7): 1780-1795 e1719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.001>

- Jonckheere, A. I., J. A. Smeitink und R. J. Rodenburg (2012). "Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology." *J Inherit Metab Dis* 35(2): 211-225. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9382-9>
- Jones, A. E., L. Sheng, A. Acevedo, M. Veliova, O. S. Shirihai, L. Stiles und A. S. Divakaruni (2021). "Forces, fluxes, and fuels: tracking mitochondrial metabolism by integrating measurements of membrane potential, respiration, and metabolites." *Am J Physiol Cell Physiol* 320(1): C80-C91. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00235.2020>
- Joshi, R. N., C. Stadler, R. Lehmann, J. Lehtio, J. Tegner, A. Schmidt und M. Vesterlund (2019). "TcellSubC: An Atlas of the Subcellular Proteome of Human T Cells." *Front Immunol* 10: 2708. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02708>
- Kabiri, Y., C. von Toerne, A. Fontes, P. A. Knolle und H. Zischka (2021). "Isolation and Purification of Mitochondria from Cell Culture for Proteomic Analyses." *Methods Mol Biol* 2261: 411-419. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1186-9_25
- Kalariya, N. M., M. Shoeb, N. H. Ansari, S. K. Srivastava und K. V. Ramana (2012). "Antidiabetic drug metformin suppresses endotoxin-induced uveitis in rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(7): 3431-3440. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9432>
- Kelly, B., G. M. Tannahill, M. P. Murphy und L. A. O'Neill (2015). "Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1beta (IL-1beta) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Macrophages." *J Biol Chem* 290(33): 20348-20359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662114>
- Khanna, S., P. Padhan, K. S. Jaiswal, A. P. Jain, A. Ghosh, A. Tripathy, H. Gowda, S. K. Raghav und B. Gupta (2020). "Altered mitochondrial proteome and functional dynamics in patients with rheumatoid arthritis." *Mitochondrion* 54: 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.005>
- Kingsley, N. B., L. Sandmeyer und R. R. Bellone (2022). "A review of investigated risk factors for developing equine recurrent uveitis." *Vet Ophthalmol*. <https://doi.org/10.1111/vop.13002>
- Kingsley, N. B., L. Sandmeyer, S. E. Parker, A. Dwyer, S. Heden, C. Reilly, A. Hallendar-Edman, S. Archer und R. R. Bellone (2022). "Risk factors for insidious uveitis in the Knabstrupper breed." *Equine Vet J*. <https://doi.org/10.1111/evj.13879>
- Kleinwort, K. J., B. Amann, S. M. Hauck, R. Feederle, W. Sekundo und C. A. Deeg (2016). "Immunological Characterization of Intraocular Lymphoid Follicles in a Spontaneous Recurrent Uveitis Model." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(10): 4504-4511. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19787>

- Kramer, A., J. Green, J. Pollard, Jr. und S. Tugendreich (2014). "Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis." *Bioinformatics* 30(4): 523-530. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt703>
- Kruse, R., N. Sahebkhitiari und K. Hojlund (2020). "The Mitochondrial Proteomic Signatures of Human Skeletal Muscle Linked to Insulin Resistance." *Int J Mol Sci* 21(15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155374>
- Kurniawan, H., T. Kobayashi und D. Brenner (2021). "The emerging role of one-carbon metabolism in T cells." *Curr Opin Biotechnol* 68: 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.001>
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lee, H. M., H. Sugino, C. Aoki und N. Nishimoto (2011). "Underexpression of mitochondrial-DNA encoded ATP synthesis-related genes and DNA repair genes in systemic lupus erythematosus." *Arthritis Res Ther* 13(2): R63. <https://doi.org/10.1186/ar3317>
- Liu, L., S. Chen, M. Yu, C. Ge, M. Ren, B. Liu, X. Yang, T. W. Christian, Jr., Y. M. Hou, J. Zou, W. G. Zhu und J. Luo (2020). "Deacetylation of HSD17B10 by SIRT3 regulates cell growth and cell resistance under oxidative and starvation stresses." *Cell Death Dis* 11(7): 563. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02763-9>
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson und X. Wang (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* 86(1): 147-157. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9)
- Lizak, B., A. Szarka, Y. Kim, K. S. Choi, C. E. Nemeth, P. Marcolongo, A. Benedetti, G. Banhegyi und E. Margittai (2019). "Glucose Transport and Transporters in the Endomembranes." *Int J Mol Sci* 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235898>
- Longo, N., M. Frigeni und M. Pasquali (2016). "Carnitine transport and fatty acid oxidation." *Biochim Biophys Acta* 1863(10): 2422-2435. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.023>
- Lopes, N., C. McIntyre, S. Martin, M. Raverdeau, N. Sumaria, A. C. Kohlgruber, G. J. Fiala, L. Z. Agudelo, L. Dyck, H. Kane, A. Douglas, S. Cunningham, H. Prendeville, R. Loftus, C. Carmody, P. Pierre, M. Kellis, M. Brenner, R. J. Arguello, B. Silva-Santos, D. J. Pennington und L. Lynch (2021). "Distinct metabolic programs established in the thymus control effector functions of gammadelta T cell subsets in tumor microenvironments." *Nat Immunol* 22(2): 179-192. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00848-3>
- Lorenz, L., B. Amann, S. Hirmer, R. L. Degroote, S. M. Hauck und C. A. Deeg (2021). "NEU1 is more abundant in uveitic retina with concomitant desialylation of retinal cells." *Glycobiology* 31(7): 873-883. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab014>

- Lorenz, L., S. Hirmer, A. Schmalen, S. M. Hauck und C. A. Deeg (2021). "Cell Surface Profiling of Retinal Muller Glial Cells Reveals Association to Immune Pathways after LPS Stimulation." *Cells* 10(3). <https://doi.org/10.3390/cells10030711>
- Luger, D. und R. R. Caspi (2008). "New perspectives on effector mechanisms in uveitis." *Semin Immunopathol* 30(2): 135-143. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0108-5>
- Luger, D., P. B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, E. P. Bowman, N. M. Sgambellone, C. C. Chan und R. R. Caspi (2008). "Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category." *J Exp Med* 205(4): 799-810. <https://doi.org/10.1084/jem.20071258>
- Lundberg, E. und G. H. H. Borner (2019). "Spatial proteomics: a powerful discovery tool for cell biology." *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(5): 285-302. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0094-y>
- Luo, P., H. Yan, J. Du, X. Chen, J. Shao, Y. Zhang, Z. Xu, Y. Jin, N. Lin, B. Yang und Q. He (2021). "PLK1 (polo like kinase 1)-dependent autophagy facilitates gefitinib-induced hepatotoxicity by degrading COX6A1 (cytochrome c oxidase subunit 6A1)." *Autophagy* 17(10): 3221-3237. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1851492>
- Macintyre, A. N., V. A. Gerriets, A. G. Nichols, R. D. Michalek, M. C. Rudolph, D. Deoliveira, S. M. Anderson, E. D. Abel, B. J. Chen, L. P. Hale und J. C. Rathmell (2014). "The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function." *Cell Metab* 20(1): 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.004>
- MacIver, N. J., R. D. Michalek und J. C. Rathmell (2013). "Metabolic regulation of T lymphocytes." *Annu Rev Immunol* 31: 259-283. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>
- Malalana, F., J. L. Ireland, G. Pinchbeck und C. M. McGowan (2020). "Equine uveitis in the UK: a retrospective study (2008-2018)." *Vet Rec* 186(3): 92. <https://doi.org/10.1136/vr.105423>
- Malalana, F., J. L. Ireland, G. L. Pinchbeck und C. M. McGowan (2023). "Risk factors for a first episode of primary uveitis in the UK and proportion of cases that experience recurrence following this first episode." *Equine Vet J* 55(1): 42-47. <https://doi.org/10.1111/evj.13576>
- Manosalva, C., J. Quiroga, A. I. Hidalgo, P. Alarcon, N. Anseoleaga, M. A. Hidalgo und R. A. Burgos (2021). "Role of Lactate in Inflammatory Processes: Friend or Foe." *Front Immunol* 12: 808799. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808799>
- Mansilla, N., S. Racca, D. E. Gras, D. H. Gonzalez und E. Welchen (2018). "The Complexity of Mitochondrial Complex IV: An Update of Cytochrome c

- Oxidase Biogenesis in Plants." *Int J Mol Sci* 19(3).
<https://doi.org/10.3390/ijms19030662>
- Marchingo, J. M. und D. A. Cantrell (2022). "Protein synthesis, degradation, and energy metabolism in T cell immunity." *Cell Mol Immunol* 19(3): 303-315.
<https://doi.org/10.1038/s41423-021-00792-8>
- Martin, S. D. und S. L. McGee (2019). "A systematic flux analysis approach to identify metabolic vulnerabilities in human breast cancer cell lines." *Cancer Metab* 7: 12. <https://doi.org/10.1186/s40170-019-0207-x>
- Martinez-Reyes, I. und N. S. Chandel (2020). "Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease." *Nat Commun* 11(1): 102.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
- Martins Pinto, M., P. Paumard, C. Bouchez, S. Ransac, S. Duvezin-Caubet, J. P. Mazat, M. Rigoulet und A. Devin (2023). "The Warburg effect and mitochondrial oxidative phosphorylation: Friends or foes?" *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1864(1): 148931.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2022.148931>
- Matarrese, P., L. Gambardella, A. Cassone, S. Vella, R. Cauda und W. Malorni (2003). "Mitochondrial membrane hyperpolarization hijacks activated T lymphocytes toward the apoptotic-prone phenotype: homeostatic mechanisms of HIV protease inhibitors." *J Immunol* 170(12): 6006-6015.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.6006>
- McMullen, R. J., Jr. und B. M. Fischer (2017). "Medical and Surgical Management of Equine Recurrent Uveitis." *Vet Clin North Am Equine Pract* 33(3): 465-481.
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2017.07.003>
- Mochizuki, M., T. Kuwabara, C. McAllister, R. B. Nussenblatt und I. Gery (1985). "Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(1): 1-9.
- Moreno-Loshuertos, R., N. Movilla, J. Marco-Brualla, R. Soler-Agesta, P. Ferreira, J. A. Enriquez und P. Fernandez-Silva (2023). "A Mutation in Mouse MT-ATP6 Gene Induces Respiration Defects and Opposed Effects on the Cell Tumorigenic Phenotype." *Int J Mol Sci* 24(2).
<https://doi.org/10.3390/ijms24021300>
- Morgenstern, M., C. D. Peikert, P. Lubbert, I. Suppanz, C. Klemm, O. Alka, C. Steiert, N. Naumenko, A. Schendzielorz, L. Melchionda, W. W. D. Muhlhauser, B. Knapp, J. D. Busch, S. B. Stiller, S. Dannenmaier, C. Lindau, M. Licheva, C. Eickhorst, R. Galbusera, R. M. Zerbes, M. T. Ryan, C. Kraft, V. Kozjak-Pavlovic, F. Drepper, S. Dennerlein, S. Oeljeklaus, N. Pfanner, N. Wiedemann und B. Warscheid (2021). "Quantitative high-confidence human mitochondrial proteome and its dynamics in cellular context." *Cell Metab* 33(12): 2464-2483 e2418. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.11.001>

- Morgenstern, M., S. B. Stiller, P. Lubbert, C. D. Peikert, S. Dannenmaier, F. Drepper, U. Weill, P. Hoss, R. Feuerstein, M. Gebert, M. Bohnert, M. van der Laan, M. Schuldiner, C. Schutze, S. Oeljeklaus, N. Pfanner, N. Wiedemann und B. Warscheid (2017). "Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale." *Cell Rep* 19(13): 2836-2852. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.014>
- Nicholas, D. A., E. A. Proctor, M. Agrawal, A. C. Belkina, S. C. Van Nostrand, L. Panneerseelan-Bharath, A. R. t. Jones, F. Raval, B. C. Ip, M. Zhu, J. M. Cacicedo, C. Habib, N. Sainz-Rueda, L. Persky, P. G. Sullivan, B. E. Corkey, C. M. Apovian, P. A. Kern, D. A. Lauffenburger und B. S. Nikolajczyk (2019). "Fatty Acid Metabolites Combine with Reduced beta Oxidation to Activate Th17 Inflammation in Human Type 2 Diabetes." *Cell Metab* 30(3): 447-461 e445. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.004>
- Nicholls, D. G. (2021). "Mitochondrial proton leaks and uncoupling proteins." *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1862(7): 148428. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148428>
- Nino, D., N. Rafiei, Y. Wang, A. Zilman und J. N. Milstein (2017). "Molecular Counting with Localization Microscopy: A Bayesian Estimate Based on Fluorophore Statistics." *Biophys J* 112(9): 1777-1785. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.020>
- Nojima, I. und J. Wada (2023). "Metformin and Its Immune-Mediated Effects in Various Diseases." *Int J Mol Sci* 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010755>
- Nolfi-Donagan, D., A. Braganza und S. Shiva (2020). "Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement." *Redox Biol* 37: 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Pagliarini, D. J., S. E. Calvo, B. Chang, S. A. Sheth, S. B. Vafai, S. E. Ong, G. A. Walford, C. Sugiana, A. Boneh, W. K. Chen, D. E. Hill, M. Vidal, J. G. Evans, D. R. Thorburn, S. A. Carr und V. K. Mootha (2008). "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology." *Cell* 134(1): 112-123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.016>
- Palestine, A. G., C. McAllister, C. Carter, A. M. Keenan, B. Vistica, I. Gery, R. Davey und R. Nussenblatt (1986). "Lymphocyte migration in the adoptive transfer of EAU." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27(4): 611-615.
- Palmer, C. S., J. Lou, B. Kouskousis, E. Pandzic, A. J. Anderson, Y. Kang, E. Hinde und D. Stojanovski (2021). "Super-resolution microscopy reveals the arrangement of inner membrane protein complexes in mammalian mitochondria." *J Cell Sci* 134(13). <https://doi.org/10.1242/jcs.252197>
- Peng, H. Y., J. Lucavs, D. Ballard, J. K. Das, A. Kumar, L. Wang, Y. Ren, X. Xiong und J. Song (2021). "Metabolic Reprogramming and Reactive Oxygen Species in T Cell Immunity." *Front Immunol* 12: 652687. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.652687>

- Peng, J., K. D. Ren, J. Yang und X. J. Luo (2016). "Mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1: A key enzyme in regulation of mitochondrial dynamics and functions." *Mitochondrion* 28: 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.03.007>
- Platzer, R., B. K. Rossboth, M. C. Schneider, E. Sevcsik, F. Baumgart, H. Stockinger, G. J. Schutz, J. B. Huppa und M. Brameshuber (2020). "Unscrambling fluorophore blinking for comprehensive cluster detection via photoactivated localization microscopy." *Nat Commun* 11(1): 4993. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18726-9>
- Pompura, S. L., D. A. Hafler und M. Dominguez-Villar (2022). "Fatty Acid Metabolism and T Cells in Multiple Sclerosis." *Front Immunol* 13: 869197. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.869197>
- Pucino, V., M. Certo, V. Bulusu, D. Cucchi, K. Goldmann, E. Pontarini, R. Haas, J. Smith, S. E. Headland, K. Blighe, M. Ruscica, F. Humby, M. J. Lewis, J. J. Kamphorst, M. Bombardieri, C. Pitzalis und C. Mauro (2019). "Lactate Buildup at the Site of Chronic Inflammation Promotes Disease by Inducing CD4(+) T Cell Metabolic Rewiring." *Cell Metab* 30(6): 1055-1074 e1058. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.10.004>
- Qian, X., Z. Yang, E. Mao und E. Chen (2018). "Regulation of fatty acid synthesis in immune cells." *Scand J Immunol* 88(5): e12713. <https://doi.org/10.1111/sji.12713>
- Qiu, B. und M. C. Simon (2016). "BODIPY 493/503 Staining of Neutral Lipid Droplets for Microscopy and Quantification by Flow Cytometry." *Bio Protoc* 6(17). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1912>
- Rangel Rivera, G. O., H. M. Knochelmann, C. J. Dwyer, A. S. Smith, M. M. Wyatt, A. M. Rivera-Reyes, J. E. Thaxton und C. M. Paulos (2021). "Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy." *Front Immunol* 12: 645242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645242>
- Rath, S., R. Sharma, R. Gupta, T. Ast, C. Chan, T. J. Durham, R. P. Goodman, Z. Grabarek, M. E. Haas, W. H. W. Hung, P. R. Joshi, A. A. Jourdain, S. H. Kim, A. V. Kotrys, S. S. Lam, J. G. McCoy, J. D. Meisel, M. Miranda, A. Panda, A. Patgiri, R. Rogers, S. Sadre, H. Shah, O. S. Skinner, T. L. To, M. A. Walker, H. Wang, P. S. Ward, J. Wengrod, C. C. Yuan, S. E. Calvo und V. K. Mootha (2021). "MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations." *Nucleic Acids Res* 49(D1): D1541-D1547. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1011>
- Regan, D. P., M. C. Aarnio, W. S. Davis, K. P. Carmichael, M. L. Vandenplas, J. D. Lauderdale und P. A. Moore (2012). "Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis." *Vet Ophthalmol* 15(3): 145-152. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2011.00951.x>
- Reimand, J., R. Isserlin, V. Voisin, M. Kucera, C. Tannus-Lopes, A. Rostamianfar, L. Wadi, M. Meyer, J. Wong, C. Xu, D. Merico und G. D. Bader (2019).

- "Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap." *Nat Protoc* 14(2): 482-517. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0103-9>
- Rezaul, K., L. Wu, V. Mayya, S. I. Hwang und D. Han (2005). "A systematic characterization of mitochondrial proteome from human T leukemia cells." *Mol Cell Proteomics* 4(2): 169-181. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400115-MCP200>
- Rio Bartulos, C., M. B. Rogers, T. A. Williams, E. Gentekaki, H. Brinkmann, R. Cerff, M. F. Liaud, A. B. Hehl, N. R. Yarlett, A. Gruber, P. G. Kroth und M. van der Giezen (2018). "Mitochondrial Glycolysis in a Major Lineage of Eukaryotes." *Genome Biol Evol* 10(9): 2310-2325. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy164>
- Ron-Harel, N., D. Santos, J. M. Ghergurovich, P. T. Sage, A. Reddy, S. B. Lovitch, N. Dephore, F. K. Satterstrom, M. Sheffer, J. B. Spinelli, S. Gygi, J. D. Rabinowitz, A. H. Sharpe und M. C. Haigis (2016). "Mitochondrial Biogenesis and Proteome Remodeling Promote One-Carbon Metabolism for T Cell Activation." *Cell Metab* 24(1): 104-117. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.007>
- Rozanova, S., K. Barkovits, M. Nikolov, C. Schmidt, H. Urlaub und K. Marcus (2021). "Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview." *Methods Mol Biol* 2228: 85-116. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4_8
- Rust, M. J., M. Bates und X. Zhuang (2006). "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)." *Nat Methods* 3(10): 793-795. <https://doi.org/10.1038/nmeth929>
- Salabei, J. K., A. A. Gibb und B. G. Hill (2014). "Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis." *Nat Protoc* 9(2): 421-438. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.018>
- Saldinger, L. K., S. G. Nelson, R. R. Bellone, M. Lassaline, M. Mack, N. J. Walker und D. L. Borjesson (2020). "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. <https://doi.org/10.1111/vop.12704>
- Sandmeyer, L. S., N. B. Kingsley, C. Walder, S. Archer, M. L. Leis, R. R. Bellone und B. S. Bauer (2020). "Risk factors for equine recurrent uveitis in a population of Appaloosa horses in western Canada." *Vet Ophthalmol* 23(3): 515-525. <https://doi.org/10.1111/vop.12749>
- Scalisi, S., D. Pisignano und F. Cella Zancchi (2023). "Single-molecule localization microscopy goes quantitative." *Microsc Res Tech*. <https://doi.org/10.1002/jemt.24281>
- Schauer, M., K. J. H. Kleinwort, R. L. Degroote, C. Wiedemann, E. Kremmer, S. M. Hauck und C. A. Deeg (2018). "Interaction of septin 7 and DOCK8 in equine lymphocytes reveals novel insights into signaling pathways associated with

- autoimmunity." *Sci Rep* 8(1): 12332. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30753-7>
- Schull, S., S. D. Gunther, S. Brodesser, J. M. Seeger, B. Tosetti, K. Wiegmann, C. Pongratz, F. Diaz, A. Witt, M. Andree, K. Brinkmann, M. Kronke, R. J. Wiesner und H. Kashkar (2015). "Cytochrome c oxidase deficiency accelerates mitochondrial apoptosis by activating ceramide synthase 6." *Cell Death Dis* 6(3): e1691. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.62>
- Scialo, F., D. J. Fernandez-Ayala und A. Sanz (2017). "Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease." *Front Physiol* 8: 428. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00428>
- Sener, Z., F. H. Cederkvist, R. Volchenkov, H. L. Holen und B. S. Skalhegg (2016). "T Helper Cell Activation and Expansion Is Sensitive to Glutaminase Inhibition under Both Hypoxic and Normoxic Conditions." *PLoS One* 11(7): e0160291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160291>
- Shafqat, N., H. U. Marschall, C. Filling, E. Nordling, X. Q. Wu, L. Björk, J. Thyberg, E. Mårtensson, S. Salim, H. Jörnvall und U. Oppermann (2003). "Expanded substrate screenings of human and Drosophila type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional 3alpha/7alpha/7beta/17beta/20beta/21-HSD." *Biochem J* 376(Pt 1): 49-60. <https://doi.org/10.1042/bj20030877>
- Shao, Z., K. Wang, S. Zhang, J. Yuan, X. Liao, C. Wu, Y. Zou, Y. Ha, Z. Shen, J. Guo und W. Jie (2020). "Ingenuity pathway analysis of differentially expressed genes involved in signaling pathways and molecular networks in RhoE gene-edited cardiomyocytes." *Int J Mol Med* 46(3): 1225-1238. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4661>
- Shen, C., Y. H. Song, Y. Xie, X. Wang, Y. Wang, C. Wang, S. Liu, S. L. Xue, Y. Li, B. Liu, Z. Tang, W. Chen, J. Song, H. M. Amin und J. Zhou (2017). "Downregulation of HADH promotes gastric cancer progression via Akt signaling pathway." *Oncotarget* 8(44): 76279-76289. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19348>
- Shen, K., C. L. Pender, R. Bar-Ziv, H. Zhang, K. Wickham, E. Willey, J. Durieux, Q. Ahmad und A. Dillin (2022). "Mitochondria as Cellular and Organismal Signaling Hubs." *Annu Rev Cell Dev Biol* 38: 179-218. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120420-015303>
- Shen, Y., Z. Wen, Y. Li, E. L. Matteson, J. Hong, J. J. Goronzy und C. M. Weyand (2017). "Metabolic control of the scaffold protein TKS5 in tissue-invasive, proinflammatory T cells." *Nat Immunol* 18(9): 1025-1034. <https://doi.org/10.1038/ni.3808>
- Shibata, S., S. Sogabe, M. Miwa, T. Fujimoto, N. Takakura, A. Naotsuka, S. Kitamura, T. Kawamoto und T. Soga (2021). "Identification of the first highly

- selective inhibitor of human lactate dehydrogenase B." *Sci Rep* 11(1): 21353. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00820-7>
- Son, H. J., J. Lee, S. Y. Lee, E. K. Kim, M. J. Park, K. W. Kim, S. H. Park und M. L. Cho (2014). "Metformin attenuates experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Th17/Treg balance and osteoclastogenesis." *Mediators Inflamm* 2014: 973986. <https://doi.org/10.1155/2014/973986>
- Song, J., J. M. Herrmann und T. Becker (2021). "Quality control of the mitochondrial proteome." *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(1): 54-70. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00300-2>
- Song, J., X. Yi, R. Gao, L. Sun, Z. Wu, S. Zhang, L. Huang, C. Han und J. Ma (2022). "Impact of Drp1-Mediated Mitochondrial Dynamics on T Cell Immune Modulation." *Front Immunol* 13: 873834. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.873834>
- Soriano-Baguet, L. und D. Brenner (2023). "Metabolism and epigenetics at the heart of T cell function." *Trends Immunol* 44(3): 231-244. <https://doi.org/10.1016/j.it.2023.01.002>
- Spiess, B. M. (2010). "Equine recurrent uveitis: the European viewpoint." *Equine Vet J Suppl*(37): 50-56. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.tb05635.x>
- Suhre, K., M. I. McCarthy und J. M. Schwenk (2021). "Genetics meets proteomics: perspectives for large population-based studies." *Nat Rev Genet* 22(1): 19-37. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0268-2>
- Sullivan, L. B., D. Y. Gui, A. M. Hosios, L. N. Bush, E. Freinkman und M. G. Vander Heiden (2015). "Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells." *Cell* 162(3): 552-563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.017>
- Suomi, T. und L. L. Elo (2022). "Statistical and machine learning methods to study human CD4(+) T cell proteome profiles." *Immunol Lett* 245: 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2022.03.006>
- Tagirasa, R., H. Kaza und S. Basu (2020). "Increased local expression of P-glycoprotein on CD4+ T-cells in vitreous of patients with non-infectious uveitis: a pilot study." *Ophthalmic Res*. <https://doi.org/10.1159/000512619>
- Tan, H., K. Yang, Y. Li, T. I. Shaw, Y. Wang, D. B. Blanco, X. Wang, J. H. Cho, H. Wang, S. Rankin, C. Guy, J. Peng und H. Chi (2017). "Integrative Proteomics and Phosphoproteomics Profiling Reveals Dynamic Signaling Networks and Bioenergetics Pathways Underlying T Cell Activation." *Immunity* 46(3): 488-503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.010>
- Tarasenko, T. N., S. E. Pacheco, M. K. Koenig, J. Gomez-Rodriguez, S. M. Kapnick, F. Diaz, P. M. Zerfas, E. Barca, J. Sudderth, R. J. DeBerardinis, R. Covian, R. S. Balaban, S. DiMauro und P. J. McGuire (2017). "Cytochrome c Oxidase Activity Is a Metabolic Checkpoint that Regulates Cell Fate Decisions During

- T Cell Activation and Differentiation." *Cell Metab* 25(6): 1254-1268 e1257. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.007>
- Thul, P. J., L. Akesson, M. Wiking, D. Mahdessian, A. Geladaki, H. Ait Blal, T. Alm, A. Asplund, L. Bjork, L. M. Breckels, A. Backstrom, F. Danielsson, L. Fagerberg, J. Fall, L. Gatto, C. Gnann, S. Hober, M. Hjelmare, F. Johansson, S. Lee, C. Lindskog, J. Mulder, C. M. Mulvey, P. Nilsson, P. Oksvold, J. Rockberg, R. Schutten, J. M. Schwenk, A. Sivertsson, E. Sjostedt, M. Skogs, C. Stadler, D. P. Sullivan, H. Tegel, C. Winsnes, C. Zhang, M. Zwahlen, A. Mardinoglu, F. Ponten, K. von Feilitzen, K. S. Lilley, M. Uhlen und E. Lundberg (2017). "A subcellular map of the human proteome." *Science* 356(6340). <https://doi.org/10.1126/science.aal3321>
- Travaglio, M., F. Michopoulos, Y. Yu, R. Popovic, E. Foster, M. Coen und L. M. Martins (2023). "Increased cysteine metabolism in PINK1 models of Parkinson's disease." *Dis Model Mech* 16(1). <https://doi.org/10.1242/dmm.049727>
- Tsuji, G., A. Hashimoto-Hachiya, V. H. Yen, M. Takemura, A. Yumine, K. Furue, M. Furue und T. Nakahara (2020). "Metformin inhibits IL-1beta secretion via impairment of NLRP3 inflammasome in keratinocytes: implications for preventing the development of psoriasis." *Cell Death Discov* 6: 11. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0245-8>
- Vanderlugt, C. L. und S. D. Miller (2002). "Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy." *Nat Rev Immunol* 2(2): 85-95. <https://doi.org/10.1038/nri724>
- Voss, K., H. S. Hong, J. E. Bader, A. Sugiura, C. A. Lyssiotis und J. C. Rathmell (2021). "A guide to interrogating immunometabolism." *Nat Rev Immunol* 21(10): 637-652. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00529-8>
- Wang, C., W. Zhou, G. Su, J. Hu und P. Yang (2022). "Progranulin Suppressed Autoimmune Uveitis and Autoimmune Neuroinflammation by Inhibiting Th1/Th17 Cells and Promoting Treg Cells and M2 Macrophages." *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 9(2). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001133>
- Wang, F., D. Zhang, D. Zhang, P. Li und Y. Gao (2021). "Mitochondrial Protein Translation: Emerging Roles and Clinical Significance in Disease." *Front Cell Dev Biol* 9: 675465. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.675465>
- Wang, T., J. N. R. Gnanaprakasam, X. Chen, S. Kang, X. Xu, H. Sun, L. Liu, H. Rodgers, E. Miller, T. A. Cassel, Q. Sun, S. Vicente-Munoz, M. O. Warmoes, P. Lin, Z. L. Piedra-Quintero, M. Guerau-de-Arellano, K. A. Cassady, S. G. Zheng, J. Yang, A. N. Lane, X. Song, T. W. Fan und R. Wang (2020). "Inosine is an alternative carbon source for CD8(+)-T-cell function under glucose restriction." *Nat Metab* 2(7): 635-647. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0219-4>

- Wang, Y. und A. S. McLean (2022). "The Role of Mitochondria in the Immune Response in Critical Illness." *Crit Care* 26(1): 80. <https://doi.org/10.1186/s13054-022-03908-2>
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* 123(3191): 309-314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Warburg, O., K. Gawehn und A. W. Geissler (1958). "[Metabolism of leukocytes]." *Z Naturforsch B* 13b(8): 515-516.
- Weigand, M., S. M. Hauck, C. A. Deeg und R. L. Degroote (2021). "Deviant proteome profile of equine granulocytes associates to latent activation status in organ specific autoimmune disease." *J Proteomics* 230: 103989. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103989>
- Wiedemann, C., B. Amann, R. L. Degroote, T. Witte und C. A. Deeg (2020). "Aberrant Migratory Behavior of Immune Cells in Recurrent Autoimmune Uveitis in Horses." *Front Cell Dev Biol* 8: 101. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00101>
- Wilkins, M. R., C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams und D. F. Hochstrasser (1996). "From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis." *Biotechnology (N Y)* 14(1): 61-65. <https://doi.org/10.1038/nbt0196-61>
- Wollanke, B., H. Gerhards und K. Ackermann (2022). "Infectious Uveitis in Horses and New Insights in Its Leptospiral Biofilm-Related Pathogenesis." *Microorganisms* 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020387>
- Wu, B., J. Qiu, T. V. Zhao, Y. Wang, T. Maeda, I. N. Goronzy, M. Akiyama, S. Ohtsuki, K. Jin, L. Tian, J. J. Goronzy und C. M. Weyand (2020). "Succinyl-CoA Ligase Deficiency in Pro-inflammatory and Tissue-Invasive T Cells." *Cell Metab* 32(6): 967-980. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.025>
- Wu, W., S. Luo, C. Fan, T. Yang, S. Zhang, W. Meng, T. Xu, W. Ji und L. Gu (2023). "Tetra-color superresolution microscopy based on excitation spectral demixing." *Light Sci Appl* 12(1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41377-022-01054-6>
- Xu, X. und U. Arnason (1994). "The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region." *Gene* 148(2): 357-362. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90713-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90713-7)
- Yang, S. Y., X. Y. He und H. Schulz (2005). "3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease." *FEBS J* 272(19): 4874-4883. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04911.x>
- Yang, W., K. Nagasawa, C. Munch, Y. Xu, K. Satterstrom, S. Jeong, S. D. Hayes, M. P. Jedrychowski, F. S. Vyas, E. Zaganjor, V. Guarani, A. E. Ringel, S. P. Gygi, J. W. Harper und M. C. Haigis (2016). "Mitochondrial Sirtuin Network

- Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization." *Cell* 167(4): 985-1000 e1021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.016>
- Yang, W., T. Yu und Y. Cong (2022). "CD4(+) T cell metabolism, gut microbiota, and autoimmune diseases: implication in precision medicine of autoimmune diseases." *Precis Clin Med* 5(3): pbac018. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbac018>
- Yang, X., Z. Yang, Z. Wu, Y. He, C. Shan, P. Chai, C. Ma, M. Tian, J. Teng, D. Jin, W. Yan, P. Das, J. Qu und P. Xi (2020). "Mitochondrial dynamics quantitatively revealed by STED nanoscopy with an enhanced squaraine variant probe." *Nat Commun* 11(1): 3699. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17546-1>
- Yin, M. und L. A. J. O'Neill (2021). "The role of the electron transport chain in immunity." *Faseb j* 35(12): e21974. <https://doi.org/10.1096/fj.202101161R>
- Yin, Y., S. C. Choi, Z. Xu, D. J. Perry, H. Seay, B. P. Croker, E. S. Sobel, T. M. Brusko und L. Morel (2015). "Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus." *Sci Transl Med* 7(274): 274ra218. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0835>
- Yun, J., R. Puri, H. Yang, M. A. Lizzio, C. Wu, Z. H. Sheng und M. Guo (2014). "MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin." *Elife* 3: e01958. <https://doi.org/10.7554/eLife.01958>
- Zhang, X., A. A. Halberstam, W. Zhu, B. P. Leitner, D. Thakral, M. W. Bosenberg und R. J. Perry (2022). "Isotope tracing reveals distinct substrate preference in murine melanoma subtypes with differing anti-tumor immunity." *Cancer Metab* 10(1): 21. <https://doi.org/10.1186/s40170-022-00296-7>
- Zhang, X., F. Zink, F. Hezel, J. Vogt, U. Wachter, M. Wepler, M. Loconte, C. Kranz, A. Hellmann, B. Mizaikoff, P. Radermacher und C. Hartmann (2020). "Metabolic substrate utilization in stress-induced immune cells." *Intensive Care Med Exp* 8(Suppl 1): 28. <https://doi.org/10.1186/s40635-020-00316-0>
- Zhao, H., L. N. Raines und S. C. Huang (2020). "Carbohydrate and Amino Acid Metabolism as Hallmarks for Innate Immune Cell Activation and Function." *Cells* 9(3). <https://doi.org/10.3390/cells9030562>
- Zhao, L., X. Hu, F. Xiao, X. Zhang, L. Zhao und M. Wang (2022). "Mitochondrial impairment and repair in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus." *Front Immunol* 13: 929520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.929520>

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau **Prof. Dr. Cornelia Deeg**, bedanken, die mir dieses spannende Forschungsthema überlassen und diese wissenschaftliche Arbeit ermöglicht hat. Für Rückfragen und Korrekturen wurde sich trotz des vollen Terminkalenders immer Zeit genommen und diese in bemerkenswerter Schnelligkeit und Gründlichkeit erledigt. Vielen Dank für die zuverlässige und kompetente fachliche Betreuung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Lutz Göhring**, Frau **PD Dr. Bettina Wollanke** und den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik für Pferde der LMU München für die zuverlässige Entnahme und das Überlassen der in dieser Arbeit verwendeten Blutproben. Mein besonderer Dank geht hierbei auch an Frau **Dr. Tanja Witte**, Frau **Dr. Kirsten Hahn** und **Markus Grabatin**, die mir eine Blutentnahme bei den Institutspferden zu jeder Zeit ermöglicht haben.

Mein Dank gilt auch Frau **Dr. Stefanie Hauck** und ihren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Core Facility Metabolomics and Proteomics des Helmholtz Zentrum München, die mir die massenspektrometrische Analyse ermöglicht und mich bei der Auswertung der Ergebnisse unterstützt haben.

Ich danke **Prof. Dr. Benedikt Sabass** für die Bereitstellung des dSTORM-Mikroskops und **Armina Mortazavi** für ihre große fachliche Hilfe bei der Entwicklung der Methode und die viele Zeit, die sie für mich bei der Bildaufnahme und -verarbeitung investiert hat.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine aktuellen und ehemaligen Mitdoktoranden und –doktorandinnen: **Lucia Korbonits**, **Marie-Christin Schilloks**, **Felix Gard**, **Ronja Söth**, **Amelie Fleischer**, **Heidi Duda**, **Dr. Claudia Barfüßer** und **Dr. Lea Lorenz**. Dank Euch bin ich jeden Tag ein bisschen lieber zur Arbeit gegangen. Ihr habt die stressigen Tage ein bisschen weniger stressig und die schönen Tage noch sehr viel schöner gemacht. Danke für die tolle Zusammenarbeit, die Hilfe im Labor und die vielen schönen Momente während und

außerhalb der Arbeit. Ich bin sehr froh, Euch nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde nennen zu dürfen.

Vielen Dank auch an unsere Postdocs **Dr. Roxane Degroote**, **Dr. Adrian Schmalen** und **Dr. Kristina Kleinwort** für die tatkräftige Unterstützung. Vielen Dank insbesondere dir, liebe Roxy, für deine endlose Geduld, fachlichen Input, hilfreichen Korrekturen und aufmunternden Worte.

Mein herzlicher Dank gilt auch unseren ehemaligen und aktuellen Technischen Assistentinnen **Barbara Amann**, **Sieglinde Hirmer**, **Lydia Hoffmann**, **Tanja Weißer**, **Stefanie Püls** und **Miriam Telorac** für die tatkräftige Unterstützung im Labor und die Hilfe bei technischen Fragen.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern, **Karl Seel** und **Heike Hoffmann**, sowie meiner **Oma Lore**. Danke, dass Ihr es mir ermöglicht habt an den Punkt zu kommen, an dem ich heute stehe und mich immer unterstützt habt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem lieben **Maximilian Müller** bedanken. Egal ob es um die kulinarische Versorgung, das Sauberhalten der Wohnung oder um Rechtschreib- und Grammatikkorrekturen ging, du warst immer und zu jeder Zeit für mich da und hast mir den Rücken freigehalten. Du hast alle meine Höhen und Tiefen mitgemacht und immer an mich geglaubt. Vielen Dank für deine uneingeschränkte Unterstützung während dieser intensiven Zeit.