

Erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und  
mitochondriale Stoffwechselferschiebungen in CD4<sup>+</sup> T-Zellen  
von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis

von Ronja Söth

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

Erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und  
mitochondriale Stoffwechselferschiebungen in CD4<sup>+</sup> T-Zellen  
von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis

von Ronja Söth

aus Husum

München 2025

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/in: Prof. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 26. Juli 2025

Meiner Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Equine rezidivierende Uveitis (ERU)</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Definition, Vorkommen und Relevanz .....	3
2.1.2	Klinische Symptome, Diagnose und Therapie .....	3
2.1.3	Ätiologie der ERU.....	6
2.1.4	Die ERU als Autoimmunerkrankung.....	7
2.1.5	Pathogenese der ERU .....	10
2.1.6	Veränderungen peripherer Immunzellen bei der ERU .....	15
2.1.7	Metabolischer Phänotyp peripherer Immunzellen bei der ERU .....	16
<b>2.2</b>	<b>Immunpathogenese bei vergleichbaren Uveitisformen</b> .....	<b>18</b>
2.2.1	Autoimmune Uveitis des Menschen.....	18
2.2.2	Tiermodelle mit induzierter autoimmuner Uveitis .....	21
2.2.3	Die ERU als spontanes Modell für die humane autoimmune Uveitis .....	24
<b>2.3</b>	<b>Der T-Zell Metabolismus</b> .....	<b>25</b>
2.3.1	Abbauwege verschiedener Substrate in T-Zellen .....	26
2.3.2	Mitochondrialer Metabolismus in T-Zellen.....	31
2.3.3	Die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei der T-Zell Aktivierung.....	33
2.3.4	Respirometrische Messung des Immunzellmetabolismus .....	35
<b>3</b>	<b>PUBLIKATION</b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>95</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ATP	Adenosintriphosphat
BPTES	Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide
cRALBP	Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein, <i>engl.</i> cellular retinaldehyde-binding protein
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
CPT1	Carnitin-Palmityltransferase 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
DOCK8	<i>engl.</i> dedicator of cytokinesis 8
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
ELA	Equines Leukozyten-Antigen
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
FAO	Fettsäureoxidation, <i>engl.</i> fatty acid oxidation
FMNL1	<i>engl.</i> Formin like 1
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
GLUT	Glukosetransporter
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRBP	Interphotorezeptor-Retinoid-bindendes Protein, <i>engl.</i> interphotoreceptor retinoid-binding protein
mTORC1	<i>engl.</i> mechanistic target of rapamycin class 1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>engl.</i> major histocompatibility complex
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NF-κB	Nukleärer Faktor Kappa B, <i>engl.</i> nuclear factor kappa B
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen, <i>engl.</i> nuclear factor of activated T-cells
Nrf2	Nukleärer Faktor Erythroid 2-verwandter Faktor 2, <i>engl.</i> nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate, <i>engl.</i> oxygen consumption rate
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>engl.</i> polymerase chain reaction
pmol O <sub>2</sub> /min	Pikomol Sauerstoff pro Minute
ROR $\gamma$ t	Retinsäure-Rezeptor-verwandter Orphan-Rezeptor gamma t, <i>engl.</i> retinoid-related orphan receptor gamma t
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>engl.</i> reactive oxygen species
scRNA	Einzelzell-RNA-Sequenzierung, <i>engl.</i> single-cell RNA sequencing
SOD	Superoxiddismutase
T-bet	T-box Transkriptionsfaktor in T-Zellen, <i>engl.</i> T-box transcription factor in T cells
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor beta, <i>engl.</i> transforming growth factor beta
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , <i>engl.</i> tumor necrosis factor- $\alpha$

## 1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) zählt weltweit zu den häufigsten Ursachen für Erblindung bei Pferden (GERDING und GILGER, 2016; MORÉN et al., 2023). Charakterisiert durch spontan auftretende, wiederkehrende und an Intensität zunehmende Entzündungsschübe, führt diese Erkrankung zur progressiven Zerstörung intraokulärer Strukturen, insbesondere der Retina (DEEG et al., 2002; MCMULLEN und FISCHER, 2017; LORENZ et al., 2021a). Neben ihrer Bedeutung für die Veterinärmedizin dient die ERU aufgrund signifikanter Übereinstimmungen im Verlauf und in der Immunpathogenese als wertvolles spontanes Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen (DEEG et al., 2007c; DEEG et al., 2008; BUSCH et al., 2019). Im Zentrum der Krankheitsentstehung stehen autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die im peripheren Blut aktiviert werden, woraufhin sie in der Lage sind, die Blut-Retina-Schranke zu überwinden und im Auge mit retinalen Autoantigenen reagieren, was eine entzündliche Immunreaktion auslöst (DEEG et al., 2001; DEEG et al., 2006b; WIEDEMANN et al., 2020). Die genauen Mechanismen, die zur Aktivierung dieser Zellen führen und sie befähigen, die Blut-Retina-Schranke zu überwinden, sind nach wie vor nicht geklärt (WIEDEMANN et al., 2020). Der Immunzellmetabolismus, insbesondere der Metabolismus von T-Zellen, hat in der Erforschung von Autoimmunerkrankungen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen (LIN et al., 2024). Der Metabolismus von T-Zellen beeinflusst ihre Differenzierung und Funktion und eine Fehlregulation dieser Prozesse wird zunehmend mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (MA et al., 2024). Ein Eingreifen in diesen fehlgesteuerten Zellmetabolismus ermöglicht die Entwicklung neuer Therapieansätze, die auf der Normalisierung des Stoffwechsels autoreaktiver Zellen basieren (LIN et al., 2024). Für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden wurden bereits signifikante metabolische Veränderungen identifiziert, darunter eine erhöhte kompensatorische Glykolyse sowie eine gesteigerte oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) (BARFUSSER et al., 2021). In humanen und murinen Immunzellen geht eine gesteigerte OXPHOS-Aktivität auch mit einer verstärkten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette einher (OKOYE et al., 2023; WINCUP et al., 2023; GÜLOW et al., 2024). Diese ROS beeinflussen die Aktivierung von T-Zellen und können proinflammatorische

Mechanismen verstärken – ein Prozess, dem bei Autoimmunerkrankungen wie der autoimmunen Uveitis inzwischen eine zentrale Rolle zugeschrieben wird (HUANG et al., 2022; JIANG et al., 2023). Um Elektronen für die Atmungskette im Rahmen der OXPHOS bereitzustellen, nutzen Immunzellen eine Vielzahl von Substraten wie Glukose, Glutamin und Fettsäuren (YANG et al., 2022; LIN et al., 2024). Die Präferenz für bestimmte Substrate kann dabei je nach Funktion und Aktivierungsstatus der Zellen variieren (CHEN et al., 2023a; LIN et al., 2024). Angesichts der festgestellten Stoffwechselabweichungen in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden war es Ziel dieser Arbeit, den Metabolismus dieser Zellen detaillierter zu charakterisieren, mit einem besonderen Fokus auf die mitochondriale Substratoxidation und den Zusammenhang zwischen gesteigerter OXPHOS-Aktivität und erhöhter ROS-Produktion. Die Identifikation solcher Unterschiede könnte es ermöglichen, diese autoreaktiven Zellen in der Peripherie anhand ihres metabolischen Phänotyps von gesunden Zellen abzugrenzen und gezielte Modulationen vorzunehmen, um den Metabolismus dieser Zellen therapeutisch zu beeinflussen. Auf diese Weise können potenziell neue Ansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der ERU und der autoimmunen Uveitis geschaffen werden.

## **2 LITERATUR**

### **2.1 Equine rezidivierende Uveitis (ERU)**

#### **2.1.1 Definition, Vorkommen und Relevanz**

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine organspezifische Erkrankung des inneren Auges, die sich durch spontan auftretende, wiederkehrende Entzündungsschübe auszeichnet (GILGER, 2010; MCMULLEN und FISCHER, 2017). Weltweit verbreitet, liegt die Prävalenz der ERU bei Pferden in Europa bei etwa 8-10 %, während sie in Amerika zwischen 2-25 % variiert (GILGER, 2010; SPIESS, 2010; WOLLANKE et al., 2022). Teilweise wurde eine höhere Prävalenz der Erkrankung bei männlichen Pferden festgestellt (KULBROCK et al., 2013; GERDING und GILGER, 2016), die jedoch durch weitere Studien widerlegt wurde (PASCHALIS-TRELA et al., 2017; SANDMEYER et al., 2020). Bis heute ist eine geschlechtsspezifische Prädisposition nicht erwiesen und bedarf weiterer Untersuchungen (KINGSLEY et al., 2022). Der initiale Uveitis-Schub tritt bei Pferden meist schon im Alter von vier bis sechs Jahren auf (GILGER und MICHAU, 2004). Warmblüter sind unter anderem besonders häufig von ERU betroffen, ein Umstand, der erwiesenermaßen mit genetischen Faktoren in Verbindung steht (DEEG et al., 2004b), wie in Kapitel 2.1.3 näher erläutert wird. Die ERU ist tiermedizinisch von besonderer Relevanz, da sie für das Tier mit erheblichen Schmerzen und Leiden verbunden ist und mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf oft zur Erblindung des betroffenen Auges führt (GERDING und GILGER, 2016; MALALANA, 2020). In Fällen, in denen beide Augen betroffen sind, ist eine Euthanasie oft unumgänglich, da blinde Pferde aufgrund ihres ausgeprägten Fluchtinstinkts eine Gefahr für sich selbst und ihre Umgebung darstellen (GERDING und GILGER, 2016; DEGROOTE und DEEG, 2021). Der Verlust eines solchen Pferdes stellt für den Besitzer sowohl einen emotionalen als auch einen finanziellen Schaden dar (GERDING und GILGER, 2016).

#### **2.1.2 Klinische Symptome, Diagnose und Therapie**

Die ERU kann sowohl einseitig (unilateral) als auch beidseitig (bilateral) auftreten und ist durch einen schubförmig-remittierenden Verlauf mit fortschreitendem

Krankheitsgeschehen gekennzeichnet (GERDING und GILGER, 2016). Eine Sonderform der ERU betrifft vorwiegend Pferde der Rasse Appaloosa und Knabstrupper sowie Zugpferderassen und wird auch als schleichende (*engl.* Insidious) Form bezeichnet (MCMULLEN und FISCHER, 2017). Sie ist charakterisiert durch eine geringgradige okuläre Entzündung, die den gesamten Uvealtrakt betreffen kann, jedoch ohne die äußerlich erkennbaren akuten und schmerzhaften Entzündungsschübe verläuft (GILGER, 2010; GILGER und DEEG, 2011; MCMULLEN und FISCHER, 2017). Aus diesem Grund bleibt die schleichende Form der ERU oft lange unentdeckt, wodurch die chronisch-persistierende Entzündung eine allmähliche und kumulative zerstörerische Wirkung erreicht, die zur Degeneration der Augenstrukturen führt (GILGER, 2010; GILGER und DEEG, 2011). Die posteriore Form der ERU betrifft vor allem die hinteren Teile des Auges mit dem Glaskörper, der Retina und der Choroidea (GILGER und DEEG, 2011; MCMULLEN und FISCHER, 2017). Es kann jedoch auch eine leichte Entzündung des vorderen Segments auftreten (GILGER und DEEG, 2011; MCMULLEN und FISCHER, 2017). Vor allem Warmblutpferde und Zugpferderassen zeigen diese Form der ERU mit schubweise auftretenden Glaskörpertrübungen und chronischen Schäden wie Netzhautablösung, Katarakt und Sehverlust (GILGER, 2010; KINGSLEY et al., 2022). Läsionen im hinteren Augenabschnitt sind bei Pferden mit posteriorer ERU leichter sichtbar, da das vordere Segment besonders zu Beginn der Erkrankung unauffällig bleibt (GILGER und DEEG, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wird die klassische Form der ERU behandelt. Bei dieser Form ist typischerweise der gesamte Uvealtrakt einschließlich Iris, Ziliarkörper und Choroidea betroffen (GILGER und DEEG, 2011; MCMULLEN und FISCHER, 2017). Darüber hinaus können auch weitere Augenstrukturen wie die Hornhaut, die vordere Augenkammer, die Linse, die Retina und der Glaskörper in den Krankheitsprozess einbezogen werden (GILGER, 2010; GILGER und DEEG, 2011; MCMULLEN und FISCHER, 2017). Diese Form tritt vor allem bei Warmblut- und Islandpferden auf (MCMULLEN und FISCHER, 2017; WOLLANKE et al., 2022). Die Länge der symptomfreien Intervalle variiert erheblich und kann von weniger als zwei Wochen bis zu über einem Jahr reichen (MCMULLEN und FISCHER, 2017; WOLLANKE et al., 2022). Diese Phasen verkürzen sich jedoch mit dem Fortschreiten der Erkrankung, während die Entzündungsschübe an Intensität zunehmen (GILGER, 2010; WOLLANKE et al., 2022). Langfristig führt dies zu einer Verschlechterung der

klinischen Symptome und chronischen Schäden wie Katarakt, intraokulären Adhäsionen, Phthisis bulbi (Augapfelschrumpfung) und Sehverlust (GILGER, 2010; WOLLANKE et al., 2022). In akuten Phasen der klassischen Uveitis zeigen die betroffenen Pferde Symptome wie verstärkten Tränenfluss, Augenschmerzen und Blepharospasmus (Lidkrämpfe), Photophobie, Miosis (verengte Pupillen) und Chemosis (Bindehautödeme) (MORÉN et al., 2023). Die Schwere der klinischen Symptome kann variieren von einem leicht geschlossenen Auge bis hin zu einem Pferd, das mit starken Abwehrreaktionen reagiert und ohne Sedierung keine Manipulationen des Auges toleriert (GILGER und DEEG, 2011). Weitere klinische Anzeichen sind unter anderem Kammerwassertrübung, intraokuläre Fibrinablagerungen und ein niedriger Augeninnendruck (MALALANA, 2020; MORÉN et al., 2023). Zusätzlich können Hornhautödeme und Neovaskularisationen auftreten (MORÉN et al., 2023). ERU wird nur diagnostiziert, wenn typische klinische Anzeichen einer Uveitis zusammen mit einer dokumentierten Vorgeschichte von mindestens zwei Entzündungsschüben vorliegen (GILGER und MICHAU, 2004). Da es bis heute keine kausale Therapie für die ERU gibt, zielen therapeutische Maßnahmen aktuell primär darauf ab, Schmerzen zu lindern und die Entzündungsreaktion zu kontrollieren (MALALANA, 2020). Zur medikamentösen Behandlung werden systemische nichtsteroidale Antiphlogistika und lokale Glucocorticoide eingesetzt, um die akute Entzündung zu unterdrücken und Schäden am Auge zu minimieren (MCMULLEN und FISCHER, 2017). Zusätzlich wird ein lokales Mydriatikum verabreicht, um Verklebungen der inneren Augenstrukturen zu verhindern und Ziliarmuskelspasmen vorzubeugen (MCMULLEN und FISCHER, 2017; MALALANA, 2020). Zur Prävention weiterer Entzündungsschübe werden derzeit vor allem die Implantation von Cyclosporin-haltigen Implantaten im suprachoroidalen Raum und die Pars-plana-Vitrektomie angewendet (MALALANA, 2020; FISCHER et al., 2022). Cyclosporin A hemmt spezifisch die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, indem es die Signaltransduktion durch Calcineurin blockiert (HOLLANDER et al., 1994; LOH et al., 1996; GILGER et al., 2006). Calcineurin ist entscheidend für die Aktivierung des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NFAT), der wiederum die Expression von Interleukin (IL)-2 und weiteren Zytokinen fördert (HOLLANDER et al., 1994; LOH et al., 1996; GILGER et al., 2006). IL-2 ist ein Proliferationsfaktor für T-Zellen, der die klonale Expansion von aktivierten T-Zellen induziert (MALEK, 2008; KAMINSKI et al., 2010).

Durch die Anwendung von Cyclosporin-A-Implantaten im suprachoroidalen Raum kann die Häufigkeit von Entzündungsschüben signifikant verringert und das Sehvermögen der Pferde über längere Zeiträume stabilisiert werden (GILGER et al., 2006). Allerdings nimmt die Wirkung der Implantate mit der Zeit ab, weshalb eine erneute Implantation nach einer bestimmten Zeitspanne erforderlich sein kann (FISCHER et al., 2022). Bei der Pars-plana-Vitrektomie wird das entzündlich veränderte Glaskörpermaterial, welches Fibrin und inflammatorische Zellen enthält, chirurgisch entfernt, was zu einer Verringerung der Rezidivrate führt (WERRY und GERHARDS, 1992). Dadurch wird die Sehkraft der betroffenen Pferde verbessert und der fortschreitende Verlauf der Krankheit mit den wiederkehrenden Entzündungsschüben kann gehemmt werden (WERRY und GERHARDS, 1992). Dieser invasive Eingriff ist jedoch mit Nebenwirkungen verbunden, wie der Entstehung retinaler Narben und postoperativer Katarakte, die die Sehkraft der betroffenen Tiere beeinträchtigen können (FRUHAUF et al., 1998). Zurzeit ist jedoch die Pars-plana-Vitrektomie neben der immunsuppressiven Therapie eine wirksame Behandlungsmethode, die sich insbesondere in Europa als erfolgreich erwiesen hat (SPIESS, 2010). In Fällen, in denen Pferde nicht auf die Therapie ansprechen, kann eine Enukleation erforderlich sein, um Schmerzen und Entzündungen zu kontrollieren (MALALANA, 2020; MORÉN et al., 2023). Bei unilateral betroffenen Pferden zeigt dieser Eingriff zufriedenstellende Ergebnisse (MALALANA, 2020). Insgesamt besteht jedoch ein Bedarf an verbesserten Therapien zur Behandlung der ERU, da derzeit keine kausale Therapie existiert und die Krankheit somit nicht vollständig geheilt werden kann.

### **2.1.3 Ätiologie der ERU**

Obwohl inzwischen einige Risikofaktoren wie genetische Faktoren bei der Multiplen Sklerose (BARRIE et al., 2024) und eine geschlechtsspezifische Prädisposition für Alzheimer bei Frauen (LOPEZ-LEE et al., 2024) identifiziert wurden, bleibt die Ätiologie der meisten Autoimmunerkrankungen weitgehend unklar. Als mögliche Auslöser werden genetische Prädispositionen, Infektionen, hormonelle Einflüsse und Dysbalancen im Darmmikrobiom diskutiert (LOPEZ-LEE et al., 2024; WANG et al., 2024). Zusätzlich könnten epigenetische Modifikationen, die durch Umwelt und Lebensstil beeinflusst werden, das Immunsystem beeinflussen (WANG et al., 2024).

Aktuell wird eine Kombination verschiedener Faktoren angenommen, die genauen Mechanismen bleiben jedoch unvollständig verstanden. Die ERU ist eine Autoimmunerkrankung, bei der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie aktiviert werden, woraufhin sie in der Lage sind, die Blut-Retina-Schranke zu überwinden, um im normalerweise immunprivilegierten Organ Auge eine Entzündung auszulösen (DEEG et al., 2001; DEEG et al., 2002; DEGROOTE und DEEG, 2021). Trotz intensiver Forschung und verschiedener Theorien sind die initialen Auslöser dieser autoimmunen Prozesse bis heute nicht geklärt (DEGROOTE und DEEG, 2021; KINGSLEY et al., 2022). Erstmals wurde die ERU vor über 2000 Jahren beschrieben und war damals unter dem Namen Mondblindheit bekannt (GILGER und DEEG, 2011). Diese Bezeichnung entstand aus dem Glauben, dass die periodischen Entzündungsschübe in Verbindung mit den Mondphasen stehen (GILGER und DEEG, 2011). Inzwischen werden verschiedene Faktoren für die Entstehung der ERU diskutiert, darunter genetische Faktoren, eine bakterielle Komponente, oder auch eine Dysbiose des gastrointestinalen Mikrobioms (FISCHER et al., 2022). Bei der Pferderasse Appaloosa wurde ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer ERU bei Pferden festgestellt, die den homozygoten Genotyp des Leopard Gens tragen, das für die felltypische Färbung verantwortlich ist (ROCKWELL et al., 2020). In deutschen Warmblutpferden ist der Haplotyp ELA-A9 des equinen Leukozyten-Antigens (ELA) mit einer erhöhten Anfälligkeit für die Erkrankung assoziiert (DEEG et al., 2004b). Während keines der 37 gesunden Kontrollpferde diesen Haplotyp aufwies, trugen ihn 41 % der 32 an ERU erkrankten Pferde (DEEG et al., 2004b). Eine genetische Prädisposition ist aufgrund dieser Ergebnisse wahrscheinlich, erfordert jedoch weiterführende Untersuchungen. Eine Untersuchung des fäkalen Mikrobioms von augengesunden und an ERU erkrankten Pferden desselben Stalls zeigte zudem keine Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung, was darauf hindeutet, dass die ERU nicht mit einer veränderten gastrointestinalen Bakterienflora verbunden ist (MARTIN DE BUSTAMANTE et al., 2021). Eine bewiesene Ursache für die Entstehung der ERU gibt es bis heute nicht und erfordert weitere Untersuchungen.

#### **2.1.4 Die ERU als Autoimmunerkrankung**

Obwohl die genaue Ätiologie der ERU weiterhin ungeklärt ist, wird mittlerweile überwiegend angenommen, dass es sich bei der ERU um eine Autoimmunerkrankung

handelt. Diese Hypothese einer autoimmunen Erkrankung wurde auf Basis mehrerer Beobachtungen formuliert: den wiederkehrenden Entzündungen ohne offensichtlich auslösendes Agens, dem Nachweis von T-Zellinfiltraten in den Augen betroffener Pferde trotz der immunologischen Abschottung des Auges, der unzureichenden Wirksamkeit von Antibiotika sowie der positiven Reaktion auf Kortikosteroide (GILGER et al., 1999; DEEG et al., 2001). Inzwischen ist nachgewiesen, dass als Folge der Aktivierung des Immunsystems aktivierte periphere Immunzellen auf bisher ungeklärte Weise in der Lage sind, die Blut-Retina-Schranke zu überwinden und so das immunprivilegierte Organ Auge zu infiltrieren (DEEG et al., 2001; WIEDEMANN et al., 2020). Untersuchungen der Zellinfiltrate aus den Augen von Pferden mit ERU zeigten, dass es sich bei den infiltrierenden Zellen größtenteils um CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelte, wodurch vor allem diese Zellpopulation in den Fokus der ERU-Forschung gerückt wurde (GILGER et al., 1999; DEEG et al., 2001; KLEINWORT et al., 2016). Ein erster Beweis für die Autoimmunreaktion zwischen autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und retinalen Autoantigenen bei der ERU erfolgte über den Nachweis von Retina-spezifischen Antikörpern im Kammerwasser und Serum betroffener Pferde sowie der Identifikation autoreaktiver T-Zellen im Glaskörper dieser Pferde, die gezielt auf retinale Antigene reagieren (DEEG et al., 2001). Zu den identifizierten Autoantigenen bei der ERU zählen das Interphotorezeptor-Retinoid-bindende Protein (IRBP), das S-Antigen und das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (cRALBP) (DEEG et al., 2001; DEEG et al., 2002; DEEG et al., 2004a; DEEG et al., 2006b). Die entscheidende Rolle des Autoantigens IRBP für die Pathogenese der ERU konnte hervorgehoben werden, indem die periphere Injektion von IRBP in gesunde Pferde sechs bis sieben Tage nach der zweiten Autoantigeninjektion in allen Pferden eine Uveitis auslöste (DEEG et al., 2002). Die Uveitis konnte zudem nach einer Remission durch eine erneute Injektion mehrfach wieder induziert werden (DEEG et al., 2002). Die dadurch verursachte Entzündung zeigte sich in klinischen und histopathologischen Veränderungen, die typisch für die ERU sind, wie der Zerstörung retinaler Strukturen und der Bildung von lymphatischen, follikelartigen Strukturen im Ziliarkörperstroma (DEEG et al., 2002). Die Mehrheit dieser infiltrierenden Lymphozyten konnte anschließend als T-Zellen identifiziert werden (DEEG et al., 2002), was die zentrale Rolle dieser Zellen in der Immunpathogenese der ERU verdeutlichte. Der Versuch, durch Immunisierung mit S-Antigenen eine Uveitis in Pferden zu induzieren, war nur bei

einem von fünf Pferden erfolgreich und zeigte keine Reproduzierbarkeit (DEEG et al., 2004a). Erste klinische Anzeichen der Uveitis waren Bindehautentzündung, Keratitis, ein leichtes Hornhautödem, ausgeprägte Miosis und eine gelbliche Verfärbung des Glaskörpers (DEEG et al., 2004a). Später trat Hypopyon in der vorderen Kammer auf, gefolgt von fortschreitenden Symptomen wie Chemosis, Vaskularisationen der Hornhaut, Hyphaema und vollständiger Miosis (DEEG et al., 2004a). Bis zum Ende des Experiments blieben milde Miosis, vordere Synechien und Linsentrübungen bestehen (DEEG et al., 2004a). Die Ergebnisse dieser Studie deuteten darauf hin, dass Pferde weniger anfällig für eine durch S-Antigen induzierte Uveitis sind als für eine induzierte Uveitis durch die Immunisierung mit IRBP (DEEG et al., 2004a). Dennoch zeigten die T-Zellen aller fünf Pferde *in vitro* eine signifikant verstärkte Proliferation nach Stimulation mit S-Antigen, was eine Immunantwort auf dieses Autoantigen belegen konnte (DEEG et al., 2004a). Die Immunisierung mit dem Autoantigen cRALBP wiederum löste in allen drei immunisierten Pferden eine Entzündung aus, die jedoch auf den hinteren Augenabschnitt beschränkt blieb und im Vergleich zum IRBP-induzierten Modell mit weniger akuten Schmerzsymptomen einherging (DEEG et al., 2006b). Histopathologisch war die durch cRALBP induzierte equine Uveitis gekennzeichnet durch eine fokale Zerstörung der retinalen Architektur sowie eine gestörte Blut-Retina-Schranke (DEEG et al., 2006b). Die Zellinfiltrate bestanden hauptsächlich aus CD3<sup>+</sup>-Zellen, die vorwiegend in der Choroidea lokalisiert waren (DEEG et al., 2006b). Eine Charakterisierung der retinalen Expression dieser Autoantigene in verschiedenen Stadien der Uveitis zeigte, dass die Autoantigene auch in Stadien der ERU stabil exprimiert werden, in denen die Netzhautarchitektur bereits geschädigt ist (DEEG et al., 2007b). Dadurch sind diese Autoantigene sogar im Endstadium der Uveitis weiterhin in der Lage, Uveitis-Schübe auszulösen (DEEG et al., 2007b). Auch eine gesteigerte Migration der peripheren Blutlymphozyten (PBL) von ERU-Pferden in Richtung des Autoantigens cRALBP in Lebendzellexperimenten unterstützte die Annahme, dass diese Autoantigene eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen (WIEDEMANN et al., 2020). Eine mögliche Erklärung für den wiederkehrenden Charakter der ERU wurde zudem im sogenannten Epitope Spreading gefunden (DEEG et al., 2006a). Intramolekulares Epitope Spreading beschreibt dabei die Erkennung eines neuen Epitops desselben Autoantigens, während sich beim intermolekularen Epitope Spreading die Reaktion

auf ein Epitop eines anderen Autoantigens ausdehnt (DEEG et al., 2006a). Bei ERU-Pferden wurde sowohl intermolekulares Epitope Spreading zwischen S-Antigen und IRBP als auch intramolekulares Epitope Spreading bei diesen beiden Autoantigenen nachgewiesen (DEEG et al., 2006a). Auf diese Weise kann nach dem Abklingen der ursprünglichen Entzündungsreaktion die Ausweitung der Epitop-Erkennung auf ein anderes, aber strukturell ähnliches Epitop eine neue Entzündungsreaktion auslösen (DEEG et al., 2006a).

Insgesamt sprechen diese Erkenntnisse dafür, dass die ERU eine Autoimmunerkrankung ist, bei der autoreaktive  $CD4^+$  T-Zellen durch die Erkennung retinaler Autoantigene eine Uveitis auslösen. Der rezidivierende Charakter der Erkrankung wird dabei maßgeblich durch die stabile Expression dieser Autoantigene selbst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung sowie durch das Phänomen des Epitope Spreading geprägt.

### **2.1.5 Pathogenese der ERU**

Im Auge führt die Reaktion autoreaktiver  $CD4^+$  T-Zellen mit retinalen Autoantigenen zur Zerstörung intraokulärer Strukturen, insbesondere der Retina (DEEG et al., 2002; LORENZ et al., 2021a). Die Retina selbst wird dabei als Verstärker der intraokulären Entzündung in Betracht gezogen (DEEG et al., 2007a; HAUCK et al., 2007). Dies geschieht einerseits durch eine aktive Verringerung der Expression von Proteinen, die für den Erhalt der Blut-Retina-Schranke essenziell sind (DEEG et al., 2007a) und andererseits durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie Interferon-gamma ( $IFN-\gamma$ ) durch retinale Müller-Gliazellen (HAUCK et al., 2007). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass retinale Müller-Gliazellen als atypische antigenpräsentierende Zellen fungieren können, was zusätzlich zur Aktivierung des Immunsystems beitragen würde (LORENZ et al., 2021b). Die Beteiligung von retinalen Müller-Gliazellen schafft somit eine Verbindung zu der Präsentation retinaler Antigene an autoreaktive  $CD4^+$  T-Zellen in diesem inflammatorischen Mikromilieu (LORENZ et al., 2021b). Innerhalb der  $CD4^+$  T-Zellpopulation gibt es verschiedene Subgruppen. Von diesen spielen insbesondere die T-Helfer (Th)1- und Th17-Zellen nachweislich eine zentrale Rolle bei der Autoimmunreaktion sowohl bei der humanen autoimmunen Uveitis als auch im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU)

(LUGER et al., 2008). Th1-Zellen werden sowohl beim Menschen als auch bei der Maus durch den Transkriptionsfaktor T-box in T-Zellen (T-bet) reguliert (ANNUNZIATO et al., 2007; HUANG et al., 2022; LIN et al., 2024). Diese Zellen sind auf die Produktion von IFN- $\gamma$  spezialisiert und spielen eine zentrale Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene sowie bei der Aktivierung von Makrophagen (FARRAR et al., 2000; ANNUNZIATO et al., 2007; HUANG et al., 2022; LIN et al., 2024). Th17-Zellen werden in beiden Spezies durch den Transkriptionsfaktor Retinsäure-Rezeptor-verwandter Orphan-Rezeptor gamma t (ROR $\gamma$ t) reguliert (ANNUNZIATO et al., 2007). Ihre Funktion wird entscheidend durch IL-23 unterstützt, allerdings sind menschliche Th17-Zellen im Vergleich zu denen von Mäusen stärker von IL-23 abhängig (TESMER et al., 2008). Die Th17-Zellen von Menschen und Mäusen produzieren insbesondere IL-17 und sind unter anderem an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beteiligt (IVANOV et al., 2006; ANNUNZIATO et al., 2007; LIN et al., 2024). Aufgrund eines aktivierten Phänotyps mit erhöhter IFN- $\gamma$ -Expression in den peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden wird bei der ERU vor allem von einer Th1-medierten Immunantwort ausgegangen (SALDINGER et al., 2020). Eine Rolle von Th17-Zellen wurde für die ERU bisher nicht bewiesen, allerdings wurden unter Verwendung humaner Antikörper die Zytokine IL-6, IL-17 und IL-23 in histologischen Schnitten der Iris und des Ziliarkörpers von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen (REGAN et al., 2012). Diese Ergebnisse sprechen auch für eine Th17-induzierte Immunantwort bei der ERU, da diese Zellen typischerweise mit dem Vorkommen dieser Zytokine assoziiert sind (REGAN et al., 2012). Ein endgültiger Beweis für die Beteiligung dieser Zellpopulation steht jedoch noch aus. Eine weitere Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die eine Rolle in der Pathogenese der ERU spielen könnte, beinhaltet die regulatorischen T-Zellen. Regulatorische T-Zellen sind entscheidend für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase, indem sie die Immunreaktion sowohl gegen eigene als auch fremde Antigene kontrollieren (RODRIGUEZ-PEREA et al., 2016; MIAO et al., 2022). Eine veränderte Expression von Markern für regulatorische T-Zellen konnte im peripheren Blut von Pferden mit ERU bisher nicht nachgewiesen werden, und auch in den Augen betroffener Tiere ließ sich das Vorhandensein dieser Zellpopulation nicht bestätigen (SALDINGER et al., 2020). Bei Patienten mit autoimmuner Uveitis zeigten regulatorische T-Zellen während akuter Entzündungsschübe eine geringere Abundanz im peripheren Blut im Vergleich zu symptomlosen Phasen (YEH et al., 2009;

RUGGIERI et al., 2012). Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung von regulatorischen T-Zellen am schubweisen Verlauf der autoimmunen Uveitis des Menschen (YEH et al., 2009; RUGGIERI et al., 2012). Regulatorische T-Zellen sind eine spezialisierte Untergruppe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die bei Menschen, Mäusen und Pferden durch die Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein 3 (FoxP3) charakterisiert sind (HAMZA et al., 2011; RODRIGUEZ-PEREA et al., 2016; SALDINGER et al., 2020; MIAO et al., 2022). Ein weiterer wichtiger Marker für regulatorische T-Zellen ist CD25, die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (RODRIGUEZ-PEREA et al., 2016). CD25 wird jedoch nicht ausschließlich von regulatorischen T-Zellen, sondern auch von aktivierten T-Zellen exprimiert (RODRIGUEZ-PEREA et al., 2016). Aus diesem Grund ist die Kombination von CD25 mit FoxP3 essenziell, um regulatorische T-Zellen eindeutig von anderen T-Zell-Subtypen zu unterscheiden (RODRIGUEZ-PEREA et al., 2016). Während in Mäusen fast alle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen FoxP3 exprimieren, ist dies bei Menschen und Pferden hauptsächlich bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Fall, die eine hohe Expression von CD25 aufweisen (HAMZA et al., 2011). Allerdings ist die Population der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit hoher Expression von CD25 bei Pferden heterogen, da nur ein kleiner Anteil dieser Zellen FoxP3 exprimiert (HAMZA et al., 2011). Diese heterogene Expression der Marker für regulatorische T-Zellen erschwert eine genaue Bestimmung dieser Population bei Pferden (HAMZA et al., 2011). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit hoher CD25-Expression zeigten jedoch eine deutlich suppressive Funktion *in vitro*, die zudem positiv mit der FoxP3-Expression korrelierte (HAMZA et al., 2011). Bei Rindern beispielsweise wurde ebenfalls eine CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation mit FoxP3-Expression und hoher Expression von CD25 beschrieben, die jedoch *in vitro* keine suppressive Funktion aufwies (HOEK et al., 2009). Im Gegensatz dazu wiesen  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Rindern eine suppressive Kapazität auf, was darauf hindeutet, dass diese Zellpopulation möglicherweise regulatorische Aufgaben in dieser Spezies übernimmt (HOEK et al., 2009). Bei mit dem bovinen Leukämievirus infizierten Rindern wurde eine signifikant erhöhte Anzahl von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen mit hoher CD25-Expression nachgewiesen (OHIRA et al., 2016; VLASOVA und SAIF, 2021). Mittels Durchflusszytometrie wurde in diesen Zellen eine gesteigerte Produktion der Zytokine Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) und IL-10 detektiert, was für funktionelle immunsuppressive Eigenschaften dieser Zellen spricht (OHIRA et al., 2016; VLASOVA und SAIF, 2021). Diese relevanten

Speziesunterschiede heben die Notwendigkeit hervor, regulatorische T-Zellen bei Pferden genauer zu charakterisieren, bevor ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Dysfunktion oder einem Fehlen regulatorischer T-Zellen und den wiederkehrenden Entzündungsschüben bei der ERU bewiesen werden kann. Neutrophile Granulozyten könnten zudem in Verbindung mit Th17-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der ERU spielen (KERR et al., 2008; DEGROOTE et al., 2023). Dafür spricht unter anderem, dass in 12,5 % der entzündlichen Zellinfiltrate aus Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden eine signifikante Infiltration von Granulozyten nachgewiesen wurde, wobei 90 % aller Zellen Granulozyten waren (Deeg, Kaspers et al. 2001). Dies unterstützt die Annahme, dass diese Zellen an der Pathogenese beteiligt sind. Bei der EAU gibt es zwei verschiedene Mausmodelle, die sich je nach auslösenden Faktoren in der Zusammensetzung der beteiligten Zellpopulationen unterscheiden (CASPI, 2011). Im klassischen EAU-Modell wird die Erkrankung durch Immunisierung mit IRBP ausgelöst, während ein alternatives Modell durch die Injektion von mit IRBP-beladenen, *in vitro* gereiften dendritischen Zellen entsteht (siehe Kapitel 2.2.2) (TANG et al., 2007). Das klassische EAU-Modell wird hauptsächlich durch Th17-Zellen vermittelt und die infiltrierenden Zellen bestehen überwiegend aus Monozyten, während das EAU-Modell mit dendritischen Zellen von Th1-Zellen abhängig ist und ein granulozytäres Infiltrat aufweist (TANG et al., 2007; CASPI, 2011). Allerdings wurden in einem weiteren IRBP-induzierten Mausmodell der EAU vor allem Th17-Zellen mit neutrophilen Granulozyten in Verbindung gebracht, da der Höhepunkt der Neutrophilen-Infiltration mit der höchsten relativen Anzahl an infiltrierenden Th17-Zellen zusammenfiel (KERR et al., 2008). Diese Entdeckung wurde einem regulatorischen Effekt von Th17-Zellen auf die Mobilisierung und Migration von Neutrophilen ins Auge zugeschrieben (KERR et al., 2008). Ähnliche Beobachtungen wurden in einem murinen EAU-Modell gemacht, in dem Th17-Zellen eine EAU in IFN- $\gamma$ -Knockout-Mäusen auslösten, die durch ein überwiegend neutrophiles Infiltrat gekennzeichnet war (LUGER et al., 2008). Humane und murine Th17-Zellen spielen erwiesenermaßen eine Rolle bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an Entzündungsorte, vor allem über die Produktion spezifischer Zytokine (PELLETIER et al., 2010; MINNS et al., 2021). Ebenso können humane und murine neutrophile Granulozyten ihrerseits Th17-Zellen rekrutieren (MINNS et al., 2021). Ein Beispiel hierfür ist das Wirtsabwehr-Peptid Cathelicidin, das

von neutrophilen Granulozyten bei der neutrophilen Degranulation freigesetzt wird (MINNS et al., 2021). Bei Cathelicidin-defizienten Mäusen war die Differenzierung von Th17-Zellen stark beeinträchtigt, was auf eine entscheidende Rolle dieses Peptids für die Differenzierung muriner Th17-Zellen hinweist (MINNS et al., 2021). Da der kanonische Signalweg „Neutrophile Degranulation“ in den Granulozyten von Pferden mit ERU stark aktiviert war, wurde für die ERU ebenfalls eine solche Wechselwirkung zwischen der neutrophilen Degranulation und der Differenzierung von Th17-Zellen hypothetisiert (DEGROOTE et al., 2023). Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine mögliche Wechselwirkung zwischen neutrophilen Granulozyten und Th17-Zellen bei der Pathogenese der ERU. Um diese Hypothese zu validieren, sind jedoch weiterführende Untersuchungen erforderlich. Die neutrophilen Granulozyten selber wurden im Rahmen der ERU intensiv erforscht und wiesen unter anderem eine verminderte Expression des Proteins Talin 1 auf (DEGROOTE et al., 2012). Talin 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Integrin-Expression, die wiederum einen Effekt auf die Wanderungseigenschaften und die Aktivierung von PBL hat (DEGROOTE et al., 2012). Der genaue Effekt der verringerten Talin 1-Expression konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden (DEGROOTE et al., 2013). Weitere Untersuchungen am Proteinprofil der Granulozyten von ERU-Pferden offenbarten, dass die identifizierten differentiell abundanten Proteine hauptsächlich mit den Signalwegen RAF/MAP-Kinase-Kaskade, Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC I)-medierte Antigenpräsentation und neutrophile Degranulation assoziiert waren (WEIGAND et al., 2021). Diese Ergebnisse deuten auf einen latent aktivierten Phänotyp der Granulozyten von ERU-Pferden und somit auf eine Beteiligung an der Pathogenese hin.

Zusammengefasst ist die ERU eine komplexe, multifaktorielle Autoimmunerkrankung unbekannter Ätiologie, die durch autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen angetrieben wird und verschiedene Zellpopulationen involviert. Die metabolische Charakterisierung dieser autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen eröffnet neue Ansätze, um diese Zellen auf metabolischer Ebene zu klassifizieren und von gesunden Zellen abzugrenzen. Über die Analyse ihrer spezifischen metabolischen Signaturen können zudem potenzielle Ansatzpunkte gefunden werden, um gezielt in den veränderten Zellstoffwechsel einzugreifen.

### 2.1.6 Veränderungen peripherer Immunzellen bei der ERU

Außerhalb der akuten Entzündungsschübe scheint sich ein erheblicher Anteil der autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei ERU-Pferden in der peripheren Blutzirkulation zu befinden (DEEG et al., 2002; DEEG et al., 2006a; WIEDEMANN et al., 2020; BARFUSSER et al., 2021). Aus diesem Grund bietet die Charakterisierung peripherer Blutzellen wertvolle Einblicke in die Pathogenese der Erkrankung. Die PBL von ERU-Pferden wurden eingehenden Untersuchungen unterzogen, deren Ziel es war, diese Zellen auf proteomischer, funktioneller und metabolischer Ebene detailliert zu charakterisieren (WIEDEMANN et al., 2020; BARFUSSER et al., 2021). Zusätzlich wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus den PBL isoliert und ebenfalls gezielten Analysen unterzogen (DEGROOTE et al., 2014; DEGROOTE et al., 2017; BARFUSSER et al., 2021). Durch diese Untersuchungen konnten signifikante Veränderungen offenbart werden, die zu den abweichenden Immunantworten und der Fähigkeit dieser Zellen beitragen, die Blut-Retina-Schranke zu überwinden und im normalerweise immunprivilegierten Auge autoimmune Entzündungen auszulösen (WIEDEMANN et al., 2020; BARFUSSER et al., 2021; DEGROOTE und DEEG, 2021). Dazu gehören relevante Veränderungen im Proteom der PBL und CD4<sup>+</sup> T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden (DEGROOTE et al., 2014; DEGROOTE et al., 2017; SCHAUER et al., 2018). Besonders auffällig sind dabei signifikante Änderungen in der Expression von Proteinen, die für die Zelladhäsion, Zellmigration und die Regulierung der Zellmorphologie wichtig sind und somit wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Überwindung der Blut-Retina-Schranke spielen (DEGROOTE et al., 2014; DEGROOTE et al., 2017; SCHAUER et al., 2018). Die PBL von ERU-Pferden wiesen beispielsweise eine verringerte Expression des Proteins Septin 7 auf (DEGROOTE et al., 2014). Diese reduzierte Septin 7-Expression war spezifisch in T-Zellen lokalisiert (DEGROOTE et al., 2014). In Lebendzell-Experimenten wurde die verminderte Septin 7-Expression mit einer erhöhten Migrationsfähigkeit der PBL assoziiert, insbesondere in Richtung des Zytokins IFN- $\gamma$  und des ERU-Autoantigens cRALBP (WIEDEMANN et al., 2020). Experimente an murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten, dass eine Herunterregulierung von Septin 7 die Fähigkeit dieser Zellen zur Migration durch enge Poren verbesserte (TOOLEY et al., 2009). Diese Wechselwirkung zwischen der verringerten Septin 7-Expression und der Fähigkeit dieser Zellen, die Blut-Retina-Schranke zu überwinden, wurde auch für die PBL von an ERU erkrankten Pferden

hypothetisiert, jedoch bislang nicht abschließend nachgewiesen (WIEDEMANN et al., 2020). Dem Protein dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) wird als einem Interaktor von Septin 7 ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese zugeschrieben, da in den Zellen von ERU-Pferden eine geringere Expression dieses Proteins nachgewiesen wurde (SCHAUER et al., 2018). Diese reduzierte Abundanz von DOCK8 wurde dabei mit einem gesteigerten Potenzial für wiederkehrende Uveitis-Schübe in Verbindung gebracht, da eine Studie an humanen Patienten mit DOCK8-Defizienz zeigte, dass diese Patienten ein erhöhtes Risiko für bakterielle und virale Infektionen und Allergien tragen (AYDIN et al., 2015). Außerdem konnte in den PBL von ERU-Pferden eine erhöhte Expression des DOCK8-Interaktor-Proteins Integrin-linked Kinase nachgewiesen, und diese wiederum mit einer verringerten Apoptose-Rate der PBL in Verbindung gebracht werden (SCHAUER et al., 2018). Eine erhöhte Überlebensrate könnte diesen Zellen einen zusätzlichen Vorteil bei der Aufrechterhaltung der Autoimmunreaktion verschaffen (SCHAUER et al., 2018). Die erhöhte Expression des Proteins Formin like 1 (FMNL1) in peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden wurde zudem mit einer verstärkten Zellmigration dieser Zellen in Verbindung gebracht (DEGROOTE et al., 2017). In Transmigrationsexperimenten zeigte sich eine gesteigerte Migration dieser Zellen, die durch die Blockade von FMNL1 reduziert werden konnte (DEGROOTE et al., 2017). Insgesamt weisen die peripheren Immunzellen von an ERU erkrankten Pferden signifikante Veränderungen sowohl in ihrem Proteom als auch in ihren funktionellen Eigenschaften auf, insbesondere in Anbetracht ihrer Überlebensfähigkeit und ihres Migrationsverhaltens (DEGROOTE et al., 2017; SCHAUER et al., 2018; WIEDEMANN et al., 2020). Diese identifizierten Veränderungen in den Proteinprofilen der PBL und CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden sind entscheidend für die Fähigkeit dieser Zellen, die Blut-Retina-Schranke zu überwinden und im Auge über die Reaktion mit retinalen Autoantigenen die Entzündung auszulösen (DEGROOTE et al., 2017; SCHAUER et al., 2018).

### **2.1.7 Metabolischer Phänotyp peripherer Immunzellen bei der ERU**

Der metabolische Phänotyp von Immunzellen spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, da er eng mit der Funktion und Differenzierung von Immunzellen verknüpft ist und auf diese Weise die fehlgesteuerten Immunreaktionen beeinflusst (HAGHIKIA et al., 2015; LIN et al., 2024; MA et al., 2024).

Der metabolische Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit autoimmuner Uveitis wurde bisher nicht eingehend charakterisiert (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 05.12.2024). Ein veränderter metabolischer Phänotyp der beteiligten Immunzellen wurde jedoch bereits bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematodes, Multipler Sklerose und Psoriasis nachgewiesen (YIN et al., 2016; XIA et al., 2020; WINCUP et al., 2023; LIN et al., 2024). Die Identifizierung solcher Unterschiede bei der ERU könnte dabei helfen, die zugrundeliegenden Mechanismen der gesteigerten Aktivität und Autoreaktivität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden besser zu verstehen. Darüber hinaus könnte sie ermöglichen, die CD4<sup>+</sup> T-Zellen über ihren Metabolismus zu charakterisieren, anstatt sie lediglich anhand von Oberflächenrezeptoren zu unterscheiden. Auf diese Weise könnten diese autoaggressiven Zellen auch während symptomloser Phasen im peripheren Blut von gesunden Zellen abgegrenzt und therapeutisch gezielt angesprochen werden. Der Metabolismus peripherer Immunzellen von ERU-Pferden wurde zu diesem Zweck bereits eingehenden Untersuchungen unterzogen, wodurch ein veränderter metabolischer Phänotyp dieser Zellen offenbart wurde (BARFUSSER et al., 2021). Die PBL von Pferden mit ERU zeigten unter anderem eine gesteigerte basale OXPHOS und Glykolyse (BARFUSSER et al., 2021). Nach Hemmung der mitochondrialen Atmung durch Rotenon und Antimycin A trat zudem in den PBL von ERU-Pferden eine erhöhte kompensatorische Glykolyse auf, was darauf hindeutet, dass diese Zellen sowohl die mitochondriale Atmung als auch die Glykolyse im Zytoplasma intensiver nutzen können, was einen aktivierten metabolischen Zustand widerspiegelt (BARFUSSER et al., 2021). Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden aus einem murinen Lupus-Modell überein, in dem die CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine gesteigerte OXPHOS und Glykolyse aufwiesen (YIN et al., 2015). Durch die kombinierte Behandlung mit Metformin, das den mitochondrialen Stoffwechsel hemmt, und 2-Desoxy-D-Glukose, einem Glykolyse-Inhibitor, konnte der T-Zell-Stoffwechsel in diesem Tiermodell normalisiert werden (YIN et al., 2015). Zudem zeigten die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes ebenfalls eine verstärkte Glykolyse und mitochondriale Aktivität, die mit ihrem Aktivierungsstatus korrelierte (YIN et al., 2015). Die übermäßige IFN- $\gamma$ -Produktion dieser Zellen wurde *in vitro* durch die Behandlung mit Metformin signifikant reduziert (YIN et al., 2015). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Veränderungen im mitochondrialen Stoffwechsel und der Glykolyse

vielversprechende therapeutische Ziele darstellen. In der CD4<sup>+</sup> T-Zellfraktion von ERU-Pferden zeigte sich ebenfalls eine erhöhte basale OXPHOS und eine signifikant reduzierte basale, aber gesteigerte kompensatorische Glykolyse (BARFUSSER et al., 2021). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwar initial nicht vermehrt Glykolyse betreiben, aber bei einer Inhibierung der mitochondrialen Atmung in der Lage sind, verstärkt zur aeroben Glykolyse im Zytoplasma zu wechseln, was auf eine höhere metabolische Flexibilität in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden hindeutet. Der genaue Hintergrund dieser veränderten metabolischen Eigenschaften ist noch nicht bekannt, allerdings sind sie möglicherweise hilfreich für das Aufrechterhalten der entzündlichen Prozesse und das Überleben dieser Zellen. Es wurde überprüft, ob eine höhere Anzahl an Mitochondrien in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden die gesteigerte OXPHOS verursacht (BARFUSSER et al., 2021). Eine Quantifizierung der Mitochondrien in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied, was darauf hindeutet, dass die OXPHOS in den einzelnen Mitochondrien der ERU-Pferde verstärkt stattfindet und nicht auf eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien zurückzuführen ist (BARFUSSER et al., 2021).

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die peripheren Immunzellen von ERU-Pferden einen anpassungsfähigeren Stoffwechsel und veränderten metabolischen Phänotyp aufweisen, insbesondere hinsichtlich ihrer metabolischen Effizienz und Flexibilität (BARFUSSER et al., 2021). Diese Veränderungen könnten von Vorteil sein, um die entzündlichen Prozesse aktiv voranzutreiben und aufrechtzuerhalten. Aktuell ist jedoch unklar, ob diese Zellen bestimmte Substrate bevorzugt oxidieren, um Elektronen für die gesteigerte OXPHOS-Aktivität bereitzustellen. Unterschiede in der mitochondrialen Substratoxidation könnten wertvolle Hinweise auf die metabolischen Besonderheiten dieser Zellen liefern und helfen, sie phänotypisch genauer zu klassifizieren.

## **2.2 Immunpathogenese bei vergleichbaren Uveitisformen**

### **2.2.1 Autoimmune Uveitis des Menschen**

Die autoimmune Uveitis des Menschen ist eine nicht-infektiöse entzündliche

Erkrankung des inneren Auges, die potenziell zur Erblindung führen kann (EGWUAGU et al., 2021; ZHU et al., 2023; ZHAO und YU, 2024). Sie kann schon im Kindesalter auftreten, betrifft jedoch meist junge Erwachsene (THORNE et al., 2016) und wird nach betroffener anatomischer Struktur eingeteilt in die anteriore, intermediäre, posteriore, oder Panuveitis (EGWUAGU et al., 2021; ZHANG et al., 2023). Die anteriore Uveitis ist die häufigste Form und manifestiert sich als Iritis oder Iridozyklitis (EGWUAGU et al., 2021; ZHANG et al., 2023). Die intermediäre Uveitis betrifft vor allem den Glaskörper und ist durch Vitritis und periphere retinale Vaskulitis gekennzeichnet (WU et al., 2023b; ZHANG et al., 2023). Die posteriore Uveitis betrifft vorwiegend die Retina und die Choroidea, während die Panuveitis die gesamte Uvea umfasst (EGWUAGU et al., 2021; ZHANG et al., 2023). Das klinische Bild der autoimmunen Uveitis variiert je nach betroffenem Teil der Uvea, die Symptome reichen von Augenrötung und Schmerzen bis hin zu Lichtempfindlichkeit, verschwommener Sicht und abnehmender Sehschärfe (PRETE et al., 2016). Insbesondere die posteriore Uveitis kann jedoch auch asymptomatisch verlaufen (PRETE et al., 2016). Die Symptome können ein oder beide Augen betreffen, treten oft plötzlich auf und weisen einen progressiven Charakter auf, können aber auch allmählich entstehen und chronisch oder rezidivierend verlaufen (PRETE et al., 2016). Zu den Komplikationen der autoimmunen Uveitis zählen Katarakte und weniger häufig auch Glaukome und Retinaablösungen, die zum Verlust der Sehkraft beitragen (PRETE et al., 2014; WU et al., 2023b). Die autoimmune Uveitis kann entweder als eigenständige Augenkrankheit auftreten oder im Zusammenhang mit systemischen Erkrankungen, wie unter anderem der Sarkoidose, verschiedenen rheumatischen Erkrankungen, Morbus Behçet, dem Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom und systemischem Lupus erythematodes (EGWUAGU et al., 2021; WU et al., 2023b; HUANG et al., 2024). Die Ätiologie der autoimmunen Uveitis ist nach wie vor nicht vollständig geklärt (EGWUAGU et al., 2021). Es ist jedoch bekannt, dass autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen, ähnlich wie bei der ERU (siehe Kapitel 2.1.5), in das Auge einwandern und dort über die Reaktion mit retinalen Autoantigenen die Entzündung auslösen (ZHANG und ZHANG, 2023). Im Gegensatz zur ERU spielen bei der autoimmunen Uveitis erwiesenermaßen sowohl Th1- als auch Th17-Zellen eine zentrale Rolle (AMADI-OBI et al., 2007; ZHANG und ZHANG, 2023). Diese sind zudem auch unabhängig voneinander dazu in der Lage, eine Uveitis in Mäusen auszulösen, wie in einem murinen EAU-Modell gezeigt wurde, in dem Th17-Zellen eine EAU auch

in IFN- $\gamma$ -Knockout-Mäusen auslösten (LUGER et al., 2008). Für die autoimmune Uveitis ist auch eine Beteiligung von regulatorischen T-Zellen gut belegt. Bei Patienten mit aktiver Uveitis wurde im peripheren Blut eine geringere Abundanz regulatorischer T-Zellen festgestellt als bei Patienten in der klinischen Remission (GILBERT et al., 2018). Dies deutet darauf hin, dass diese Zellen eine wesentliche Rolle im schubförmigen Verlauf der Entzündung spielen (GILBERT et al., 2018). Zudem wiesen die regulatorischen T-Zellen von Patienten in der klinischen Remission *in vitro* im Vergleich zu den Zellen gesunder Kontrollpersonen sowie von Patienten in der akuten Phase der Erkrankung eine höhere suppressive Kapazität auf (GILBERT et al., 2018). Vor allem ein Ungleichgewicht zwischen Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen soll in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen (ZHANG und ZHANG, 2023). Bei Patienten mit Morbus Behçet-assoziiertes Uveitis beispielsweise wurde noch vor Auftreten einer okulären Entzündung ein signifikanter Rückgang der regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu gesunden Individuen festgestellt (NANKE et al., 2008). Außerdem zeigten die PBL von Patienten mit Morbus Behçet signifikant erhöhte IL-17A-Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollen (SONMEZ et al., 2018). Diese Ergebnisse weisen auf ein Ungleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und regulierenden Immunmechanismen hin.

Bestimmte Autoantigene, die für die Pathogenese der autoimmunen Uveitis eine Rolle spielen, überlappen mit denen der ERU (DEGROOTE und DEEG, 2021). Zu diesen gehören das S-Antigen und das IRBP, die bereits 1990 bei Patienten mit nicht-infektiöser Uveitis als Autoantigene nachgewiesen wurden (DE SMET et al., 1990). Zusätzlich dazu wurde das Autoantigen cRALBP, das zuerst im Pferd identifiziert wurde, ebenfalls als Autoantigen bei der humanen autoimmunen Uveitis detektiert (DEEG et al., 2006b; DEEG et al., 2007c). Aufgrund der schmerzhaften Symptomatik und der Gefahr schwerer Komplikationen wie Netzhautablösung, Katarakt, Glaukom und anschließendem Sehverlust ist die autoimmune Uveitis von hoher klinischer Relevanz (DICK et al., 2016; WU et al., 2023b). Da die initialen Auslöser wie bei der ERU nach wie vor nicht bekannt sind, zielt die Therapie hauptsächlich darauf ab, die intraokuläre Entzündung zu unterdrücken und Komplikationen zu vermeiden. Kortikosteroide gelten als erste Wahl in der Therapie, um die intraokuläre Entzündung zu lindern (PRETE et al., 2016; WU et al., 2023b). Die Langzeitgabe von Kortikosteroiden ist jedoch stets mit Komplikationen verbunden (WU et al., 2023b).

Zurzeit umfassen die Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit autoimmuner Uveitis vor allem Implantate mit depotfreisetzenden Kortikosteroiden, systemische Immunmodulatoren, biologische Wirkstoffe (Biologics) wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-Inhibitoren sowie in schweren Fällen systemische Kortikosteroide (WU et al., 2023b). Neben Kortikosteroiden kommen auch Immunsuppressiva wie Cyclosporin und Tacrolimus zum Einsatz, die die Aktivierung von T-Zellen über die Hemmung von Calcineurin verhindern (WU et al., 2023b). Die autoimmune Uveitis kann nach wie vor nicht vollständig geheilt werden, was die Entwicklung besserer, ursachenbezogener Therapien erforderlich macht.

### **2.2.2 Tiermodelle mit induzierter autoimmuner Uveitis**

Tiermodelle sind unverzichtbare Werkzeuge in der medizinischen Forschung, da sie die Möglichkeit bieten, die komplexen Abläufe von Krankheiten und die Wirksamkeit potenzieller Therapien in einem lebenden biologischen System zu untersuchen, was einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu *in vitro* Modellen bietet. Die EAU ist das am häufigsten verwendete Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen (WU et al., 2023b). Anfangs wurde eine Uveitis bei Meerschweinchen durch die periphere Injektion homologer Netzhautsuspensionen ausgelöst, wobei das spezifische Antigen, das die Entzündung auslöste, zunächst unbekannt war (WACKER und LIPTON, 1965). Darauf aufbauend konnte schließlich das S-Antigen aus boviner Retina isoliert und teilweise charakterisiert werden (WACKER et al., 1977). Durch die Immunisierung von Meerschweinchen mit diesem Autoantigen wurde eine Uveitis in diesen ausgelöst, die durch zelluläre Infiltrationen im Uvealtrakt und eine gezielte Zerstörung der Photorezeptoren gekennzeichnet war (WACKER et al., 1977). Anschließend konnte dieses Modell erfolgreich auf andere Tierarten, wie Rhesusaffen (NUSSENBLATT et al., 1981), Kaninchen (KALSOW und WACKER, 1986) und Ratten (DE KOZAK et al., 1981) übertragen werden, wodurch es als vielseitiges Tiermodell etabliert wurde. Dennoch war die Nützlichkeit des Rattenmodells aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit immunologischer Reagenzien sowie des Fehlens genetisch definierter und manipulierter Stämme eingeschränkt (CASPI, 2011). Zudem ist das Rattenmodell der EAU meist durch eine akute monophasische Uveitis gekennzeichnet, die den Verlauf der menschlichen Erkrankung unzureichend widerspiegelt (DIEDRICHS-MÖHRING et al., 2008; KAUFMANN et al., 2012). Mäuse erwiesen sich jedoch als

resistent gegenüber der Krankheitsinduktion mit S-Antigen (CASPI, 2011). Im Jahr 1986 konnte schließlich bei Lewis-Ratten durch die Immunisierung mit aufgereinigtem bovinem IRBP im Freund'schen Adjuvans eine Uveoretinitis und Pinealitis induziert werden (GERY et al., 1986). Die periphere Injektion geringer Mengen des Autoantigens löste eine bilaterale Panuveitis in diesen Tieren aus, deren Beginn und Schweregrad dosisabhängig war (GERY et al., 1986). Die histopathologischen Veränderungen ähnelten der durch S-Antigen induzierten EAU bei Lewis-Ratten (GERY et al., 1986). Daraufhin wurde im Jahr 1988 in den USA das IRBP-induzierte Mausmodell für die EAU etabliert (CASPI et al., 1988). Relativ hohe Dosen des Autoantigens lösten in diesen Mäusen eine Uveitis aus, die der menschlichen autoimmunen Uveitis durch ihren chronischeren Verlauf und die fokalen, statt diffusen retinalen Veränderungen stärker ähnelte als andere Modelle (CASPI et al., 1988). Die IRBP-induzierte EAU konnte auch für andere Tierarten etabliert werden, darunter Kaninchen (EISENFELD et al., 1987) und Pferde (DEEG et al., 2002). Das Mausmodell der EAU wurde seither von zahlreichen Forschern modifiziert und verschiedene Modelle geschaffen, darunter das "humanisierte" EAU-Modell in MHCII-transgenen Mäusen, bei denen das S-Antigen als uveitogenes Selbstantigen erkannt wird (PENNESI et al., 2003). Weitere Varianten umfassen die EAU, die durch Injektion von antigenbeladenen dendritischen Zellen ausgelöst wird (TANG et al., 2007) und die spontane Uveitis, die in Autoimmunregulator-defizienten Mäusen auftritt (DEVOSS et al., 2006). Es wurden bereits zahlreiche Erkenntnisse zur Pathogenese der autoimmunen Uveitis unter der Verwendung dieser Modelle gewonnen. In adoptiven Transferexperimenten werden Immunzellen, meist Antigen-spezifische T-Zellen, von einem zuvor immunisierten Spender aus dem peripheren Blut auf einen naiven Empfänger ebenfalls peripher übertragen (CASPI et al., 1986; PENG et al., 2024). Sie sind eine etablierte Methode, um die Rolle spezifischer Immunzellen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu untersuchen und kausal nachzuweisen (CASPI et al., 1986; PENG et al., 2024). Alternative Ursachen lassen sich durch diese Technik zudem weitgehend ausschließen (CASPI et al., 1986; PENG et al., 2024). Bei der autoimmunen Uveitis konnte durch adoptiven Transfer gezeigt werden, dass periphere, aktivierte T-Zellen, die spezifisch gegen retinale Autoantigene gerichtet sind, zentrale Treiber der Autoimmunreaktion darstellen: In adoptiven Transferexperimenten an Lewis-Ratten wurden infolge der Immunisierung mit S-

Antigen autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* produziert, deren periphere Injektion in gesunde Empfängertiere eine meist einseitige Uveitis in diesen auslösten, deren pathologische Merkmale der durch aktive Immunisierung ausgelösten EAU ähnelten (CASPI et al., 1986). Diese adoptiven Transferexperimente konnten belegen, dass die autoimmune Uveitis von der Peripherie ausgeht und dass mit 5 bis 10x10<sup>6</sup> Zellen/Ratte bei peripherer Injektion bereits eine sehr geringe Menge autoaggressiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausreichte, um die Erkrankung zu induzieren (CASPI et al., 1986). Eine Untersuchung der Zytokinexpression intraokulärer Zellen in einem Rattenmodell der EAU ergab zudem, dass die T-Zellen im Auge während einer monophasischen EAU vor allem IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 und FoxP3 exprimierten, während bei einer für Ratten seltenen rezidivierenden EAU die Expression von IFN- $\gamma$  dominierte und die IL-17-Expression abnahm (KAUFMANN et al., 2012). In Mausmodellen der EAU wurde detailliert untersucht, welche Zelltypen zu verschiedenen Zeitpunkten die dominierenden infiltrierenden Zellen darstellen (KERR et al., 2008). Während des initialen Entzündungsschubs wurden vor allem Granulozyten und Th17-Zellen als dominierende Zelltypen identifiziert, wohingegen Th1-Zellen während der späteren Entzündungsphase überwiegen (KERR et al., 2008). Interessanterweise fiel dabei der Höhepunkt der Neutrophilen-Infiltration mit der höchsten Anzahl infiltrierender Th17-Zellen zusammen (KERR et al., 2008). Th17-Zellen wird daher eine Rolle bei der Mobilisierung und Migration von Neutrophilen in der frühen Phase der Entzündung zugeschrieben, während Th1-Zellen mit ihrer charakteristischen IFN- $\gamma$ -Produktion wahrscheinlich eine wichtige Funktion im fortschreitenden und wiederkehrenden Entzündungsgeschehen einnehmen (KERR et al., 2008; KAUFMANN et al., 2012). Die intraokuläre Injektion von IFN- $\gamma$  verstärkte die EAU in einem Rattenmodell und führte zu wiederkehrenden Krankheitsschüben (KAUFMANN et al., 2012). In adoptiven Transferexperimenten konnten allerdings sowohl Th1- als auch Th17-Zellen unabhängig voneinander eine EAU in Mäusen auslösen (LUGER et al., 2008).

Die Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus Tiermodellen auf den Menschen ist jedoch stets mit Einschränkungen verbunden (WU et al., 2023b). Bei der spontanen Entwicklung der autoimmunen Uveitis des Menschen sind verschiedene Autoantigene und Epitope beteiligt, während die Immunantwort in der EAU auf ein spezifisches retinales Autoantigen ausgerichtet ist (WU et al., 2023b). Diese definierte Immunantwort und die kontrollierten Laborumgebungen machen die Untersuchung der

Ätiologie an Mausmodellen problematisch. Ein weiterer entscheidender Unterschied besteht darin, dass eine Lymphozyten-Reaktion auf das retinale S-Antigen bei Uveitis-Patienten festgestellt wurde, wohingegen bei Mäusen keine EAU durch die Immunisierung mit S-Antigen ausgelöst werden konnte (CASPI et al., 2008; WU et al., 2023b). Beim Pferd hingegen konnte eine Uveitis durch die Immunisierung mit S-Antigen ausgelöst werden, die klinisch und histopathologisch jedoch Unterschiede zu der autoimmunen Uveitis und der ERU aufwies (siehe Kapitel 2.1.4) (DEEG et al., 2004a). Dieser Unterschied verdeutlicht die erhebliche immunologische Diskrepanz zwischen Mäusen und anderen Säugetieren. Darüber hinaus unterscheiden sich die Immunsysteme von Ratten, Mäusen und Menschen signifikant (MESTAS und HUGHES, 2004). Murine B-Zellen zeigen unter anderem deutliche Unterschiede in ihrer Entwicklung und Antikörperproduktion im Vergleich zu menschlichen B-Zellen (WU et al., 2023b) und auch die T-Zellen weisen signifikante Speziesunterschiede auf (MESTAS und HUGHES, 2004; SIEGERS et al., 2007). Auch anatomische Unterschiede wie eine deutlich dickere Choroidea im menschlichen Auge beeinflussen die Antikörperproduktion und die Bildung lymphoider Strukturen (WU et al., 2023b). Die autoimmune Uveitis des Menschen kann daher durch die Nutzung von experimentellen Maus- und Rattenmodellen nur eingeschränkt nachgebildet werden.

### **2.2.3 Die ERU als spontanes Modell für die humane autoimmune Uveitis**

Experimentelle Tiermodelle sind hilfreich, um die Pathogenese der humanen autoimmunen Uveitis zu untersuchen, weisen jedoch relevante Einschränkungen auf. So fehlt es den experimentell induzierten Uveitis-Modellen an Spontanität, da sie durch klar definierte Auslöser hervorgerufen werden (CHEN et al., 2015). Auch Umwelteinflüsse, die im natürlichen Verlauf der Erkrankung eine Rolle spielen könnten (ZHAO und YU, 2024), bleiben in der kontrollierten Laborumgebung unbeachtet. Inzuchtstämme, die häufig in solchen Experimenten verwendet werden, ermöglichen zwar adoptive Transferexperimente (CASPI et al., 1986), allerdings schließen sie die Entwicklung der vielfältigen, komplexen Varianten aus, die bei Patienten in realen Umgebungen zu beobachten sind (WU et al., 2023b). Um die Komplexität der autoimmunen Uveitis besser zu erfassen, sollte daher eine Kombination verschiedener Tiermodelle genutzt werden (CHEN et al., 2015). Das Pferd bietet mit der ERU ein spontanes Modell, das die Charakteristika der menschlichen Erkrankung am besten

widerspiegelt, da es mit den spontan auftretenden und wiederkehrenden Entzündungen die größte Ähnlichkeit zum Verlauf der menschlichen autoimmunen Uveitis aufweist (DEEG et al., 2008). Das Immunsystem des Pferdes weist zudem bemerkenswerte Gemeinsamkeiten mit dem des Menschen auf (KARAGIANNI et al., 2021; PATEL et al., 2021). Eine Einzelzell-RNA (scRNA)-Sequenzierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) von gesunden Pferden verschiedener Rassen, Altersgruppen und Geschlechter ergab, dass viele Zellpopulationen der PBMC von Pferden denen menschlicher PBMC sehr ähnlich sind (PATEL et al., 2021). Insbesondere die Makrophagen beider Spezies wiesen signifikante Ähnlichkeiten auf (PATEL et al., 2021). Diese Gemeinsamkeiten könnten unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass Pferde wie Menschen tagaktiv sind (KARAGIANNI et al., 2021). Im Gegensatz dazu zeigen nachtaktive Tiere wie Mäuse und Ratten andere immunologische Merkmale, was auf mögliche evolutionäre Anpassungen hinweist (KARAGIANNI et al., 2021). Auch die beteiligten Autoantigene überschneiden sich: Neben dem S-Antigen und IRBP, die für die Uveitis sowohl bei Pferden als auch beim Menschen relevant sind (DE SMET et al., 1990; DEEG et al., 2001; DEEG et al., 2002), wurde cRALBP zuerst beim Pferd (DEEG et al., 2006b) und später auch in der menschlichen Retina als Autoantigen identifiziert (DEEG et al., 2007c) (siehe Kapitel 2.1.4). Diese Gemeinsamkeiten in der Pathogenese zusammen mit der spontanen Entstehung der Erkrankung, der genetischen Heterogenität, dem wiederkehrenden Verlauf der Entzündung, der langen Lebensspanne von Pferden und der natürlichen Umgebung, in der die Pferde gehalten werden, unterstreichen das Potenzial des Pferdes als translationales Modell, um wertvolle Einblicke in die autoimmune Uveitis des Menschen zu geben. Dank der hohen Prävalenz der ERU in der Pferdepopulation und der leichten Verfügbarkeit von Blut-, Glaskörper- und frischen Netzhautproben bietet die Forschung an Pferden entscheidende Vorteile und die Möglichkeit, metabolische und proteomische Untersuchungen durchzuführen, die potenziell zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen können.

### **2.3 Der T-Zell Metabolismus**

T-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des erworbenen Immunsystems. Ihr Metabolismus beeinflusst ihre Differenzierung und unterstützt die klonale Expansion sowie die jeweiligen Effektorfunktionen, die für eine effektive Immunabwehr

erforderlich sind (LIN et al., 2024; MA et al., 2024). Zur Ausführung dieser Funktionen benötigen sie Energie, die die T-Zellen von Säugetierspezies wie Maus und Mensch vor allem aus dem Abbau von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Fettsäuren beziehen (YANG et al., 2022). Abhängig von ihrem Aktivitätsstatus und ihrer Funktion bevorzugen sie verschiedene Nährstoffquellen und Stoffwechselwege, wodurch sie sich an unterschiedliche Anforderungen anpassen können, was als metabolische Flexibilität bezeichnet wird (CHEN et al., 2023a). Sie reagieren dabei nicht nur passiv auf ihre Zellumgebung, sondern beeinflussen diese auch aktiv, beispielsweise über die Produktion von Laktat (MA et al., 2024). So sind T-Zellen in der Lage, mit den Zellen in ihrer Umgebung indirekt zu kommunizieren, da diese durch die veränderten Bedingungen ebenfalls beeinflusst werden (MA et al., 2024).

### **2.3.1 Abbauege verschiedener Substrate in T-Zellen**

#### **2.3.1.1 Kohlenhydratstoffwechsel**

Glukose wird in eukaryotischen Zellen über Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen (HOCHREIN et al., 2022). Vierzehn GLUT-Varianten wurden in menschlichen Zellen identifiziert, während die Maus zwölf davon homolog exprimiert (HOCHREIN et al., 2022). Bei Pferden konnten die Transporter GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT6, GLUT8, GLUT10 und GLUT12 nachgewiesen werden, während GLUT7, GLUT9, GLUT11, GLUT13 und GLUT14 in Pferden bisher nicht entdeckt wurden (LACOMBE, 2014; VALBERG et al., 2023; VIDAL MORENO DE VEGA et al., 2023). Diese GLUT-Varianten werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert, in Experimenten an murinen und humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde zum Beispiel gezeigt, dass GLUT1 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung dieser Zellen spielt (MACINTYRE et al., 2014; CHEN et al., 2023b). Im Zytoplasma der Zelle findet die Glykolyse statt, bei der Glukose in zehn enzymatisch katalysierten Schritten zu Pyruvat abgebaut wird. Dabei gibt es gewisse Unterschiede zwischen Spezies, unter anderem in der katalytischen Funktion der beteiligten Enzyme (STEIN et al., 2010), insgesamt ist dieser Prozess jedoch speziesübergreifend hochkonserviert (DANDEKAR et al., 1999). Im Anschluss an die Glykolyse wird das entstandene Pyruvat entweder über den mitochondrialen Pyruvat-Carrier in das Mitochondrium transportiert, wo es in Form von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) dem Citratzyklus

zugeführt wird, oder es wird im Zytoplasma weiter zu Laktat abgebaut und daraufhin an den Extrazellularraum abgegeben (YANG et al., 2022). Dieser Schritt wird von der Laktatdehydrogenase katalysiert (YANG et al., 2022). Da beim Abbau von Glukose zu Pyruvat lediglich zwei Moleküle Adenosintriphosphat (ATP) entstehen, liefert dieser Abbauweg deutlich weniger Energie als der mitochondriale Abbau von Pyruvat (NOBLE et al., 2024). Im Gegensatz zu der mitochondrialen Verstoffwechslung von Pyruvat wird hierfür kein Sauerstoff benötigt (NOBLE et al., 2024). Allerdings wurde die Annahme, dass der Abbau von Pyruvat zu Laktat ausschließlich unter anaeroben Bedingungen stattfindet, im Jahr 1956 durch Otto Warburg widerlegt (WARBURG, 1956). Dieser zeigte, dass Krebszellen auch in Anwesenheit von Sauerstoff Pyruvat zu Laktat abbauen, anstatt das Pyruvat im Mitochondrium zu verstoffwechseln (WARBURG, 1956). Diese Entdeckung wurde von da an als „Warburg-Effekt“ bezeichnet, oder als „aerobe Glykolyse“, wenn von proliferierenden Immunzellen die Rede ist, bei denen später derselbe Mechanismus entdeckt wurde (WANG et al., 1976). Eine gesteigerte aerobe Glykolyse ist erwiesenermaßen essenziell für die Aktivierung von humanen und murinen T-Effektor-Zellen (WANG et al., 1976; STENTZ und KITABCHI, 2005; JACOBS et al., 2008; TANG et al., 2024). So führte ein Defizit des Transporters GLUT1 zu einer eingeschränkten Proliferation von humanen T-Zellen und verringerte in Versuchen an Mäusen die Expansion von Effektor-T-Zellen und die Entzündungsantwort *in vivo* (MACINTYRE et al., 2014). Die Aktivierung von humanen und murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird durch die Erkennung von Antigenen durch den T-Zell-Rezeptor getriggert, die von MHCII-Molekülen in der Membran antigenpräsentierender Zellen präsentiert werden (PISHESHA et al., 2022; BLANCO und KAPLAN, 2023). Mechanistic target of rapamycin class 1 (mTORC1) ist ein konservierter positiver Regulator der Glykolyse in T-Zellen, durch den der aktivierungs-induzierte metabolische Wechsel von der OXPHOS zur aeroben Glykolyse ausgelöst wird (SALMOND, 2018; POMPURA et al., 2022; LIN et al., 2024). Der Begriff der „aeroben Glykolyse“ kann unterschiedlich interpretiert werden, im Rahmen dieser Arbeit bezieht er sich jedoch auf den Abbau von Glukose zu Laktat unter aeroben Bedingungen. Diese gesteigerte aerobe Glykolyse ermöglicht eine schnelle Produktion von ATP und biosynthetischen Vorstufen, die ein schnelles Zellwachstum und die Produktion von Zytokinen ermöglichen (CHANG et al., 2013; WU et al., 2023a; LIN et al., 2024). Die OXPHOS wird jedoch als Folge des metabolischen Switch zur Glykolyse in T-Effektor-

Zellen nicht herunterreguliert (ALMEIDA et al., 2021). Tatsächlich ist die OXPHOS in humanen und murinen T-Zellen für die Aktivierung und Proliferation dieser Zellen ebenfalls unerlässlich (WANG et al., 1976; CHANG et al., 2013). Durch die Aktivierung von T-Zellen wird zwar das Verhältnis von OXPHOS zu Glykolyse zugunsten der Glykolyse verringert, jedoch bleibt die OXPHOS weiterhin aktiv (CHANG et al., 2013; NOBLE et al., 2024). Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Untersuchungen überein, in denen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden sowohl eine gesteigerte aerobe Glykolyse als auch eine erhöhte OXPHOS-Aktivität aufwiesen (BARFUSSER et al., 2021). Dies deutet darauf hin, dass diese Prozesse in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pferden ähnlich ablaufen und unterstreicht zudem den aktivierten Phänotyp dieser Zellen im Rahmen der ERU. Eine gesteigerte aerobe Glykolyse führt auch zu einer erhöhten Produktion von Laktat (FAN et al., 2023; HUANG et al., 2024). Die extrazelluläre Akkumulation von Laktat geht mit einer Ansäuerung des umliegenden Milieus einher und beeinflusst benachbarte Zellen auf unterschiedlichen Wegen (MA et al., 2024). So wird beispielsweise bei verschiedenen Immun-medierten Erkrankungen extrazelluläres Laktat als präferiertes Substrat von Immunzellen genutzt, indem es zu Pyruvat umgewandelt und anschließend über Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust wird (PUCINO et al., 2019; MANOSALVA et al., 2022; HUANG et al., 2024). Außerdem wurde eine neue posttranslationale Modifikation bei Proteinen entdeckt, die als Lactylierung (*engl.* lactylation) bezeichnet wird (ZHANG et al., 2019; GU et al., 2022). Diese tritt vor allem in laktatreichen Umgebungen auf, wozu sowohl Tumorgewebe, als auch entzündete Gewebe gehören (JIANG et al., 2024). In verschiedenen murinen und humanen Zelllinien, wie unter anderem HeLa-Zellen und verschiedenen Krebszellen, konnten 28 Lactylierungsstellen an Histonen identifiziert werden (ZHANG et al., 2019). Aktuell wird die Rolle der Lactylierung im Rahmen der autoimmunen Uveitis erforscht (FAN et al., 2023; HUANG et al., 2024). Mithilfe eines murinen EAU-Modells konnten erste Untersuchungen zeigen, dass die Lactylierung in CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Fortschreiten der Erkrankung zunahm und dass eine Hemmung dieser Modifikation die Differenzierung von Th17-Zellen unterdrückte und die Entzündung reduzierte (FAN et al., 2023). Dabei wurde festgestellt, dass die Lactylierung von Genen, welche die Differenzierung von Th17-Zellen fördern, eine entscheidende Rolle spielte (FAN et al., 2023). Die Lactylierung von Yin Yang 1, einem Transkriptionsfaktor, der in Säugetierzellen ubiquitär exprimiert wird (VERHEUL et al.,

2020), führte zudem in einem EAU-Mausmodell zur Dysfunktion von Mikrogliazellen, indem sowohl die Ausschüttung entzündlicher Zytokine als auch die Migration und Proliferation dieser Zellen verstärkt wurde (HUANG et al., 2024). Alternativ zum Abbau zu Pyruvat oder Laktat kann die Glukose auch dem Pentosephosphatweg zugeführt werden, der von proliferierenden  $CD4^+$  T-Zellen in Säugetieren benötigt wird, um Vorläufer für die Nukleotid- und Aminosäuresynthese zu produzieren (GHERGUROVICH et al., 2020; KATES und SAIBIL, 2024). Im Pentosephosphatweg entstehen Ribose-5-Phosphat, ein wichtiger Vorläufer für die Nukleotidsynthese, sowie Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), ein zentrales Reduktionsmittel der Zelle (YANG et al., 2016; KATES und SAIBIL, 2024). Das gebildete NADPH ist unter anderem essenziell für die Umwandlung von oxidiertem Glutathion in seine reduzierte Form und somit wichtig für die Neutralisierung von ROS (KATES und SAIBIL, 2024). Die  $CD4^+$  T-Zellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis beispielsweise leiten Glukose vermehrt in den Pentosephosphatweg um, was mit einem hohen Gehalt an NADPH und metabolischen Zwischenmolekülen einhergeht (YANG et al., 2016; MASOUMI et al., 2023). Für die  $CD4^+$  T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden ist bereits bekannt, dass sie im basalen Zustand sogar eine verminderte Glykolyse aufweisen, die jedoch als Antwort auf eine Hemmung der mitochondrialen Atmung kompensatorisch signifikant mehr gesteigert werden kann als bei gesunden Kontrollen (BARFUSSER et al., 2021). Diese Zellen scheinen somit im basalen Zustand nicht vermehrt auf die aerobe Glykolyse angewiesen zu sein, können sie jedoch bei Bedarf steigern (BARFUSSER et al., 2021). Ob eine Abhängigkeit von Glukose als mitochondrialem Substrat vorliegt, ist für die  $CD4^+$  T-Zellen von sowohl gesunden als auch an ERU erkrankten Pferden bisher nicht bekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckt werden.

### **2.3.1.2 Aminosäurestoffwechsel**

Im Gegensatz zur Glykolyse erfolgt der Abbau der meisten Aminosäuren im Mitochondrium. Glutamin ist innerhalb der Zelle die Aminosäure mit der höchsten Konzentration und wird durch Glutaminasen zu Glutamat abgebaut und anschließend in  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt, das den Citratzyklus speist. Für die ATP-Bereitstellung in T-Effektorzellen ist dieser Glutamin-abhängige, mitochondriale Metabolismus entscheidend (YANG et al., 2023). Außerdem wird Glutamat für die *de novo*-Synthese

von Glutathion und Proteinen genutzt (FENG et al., 2022). Eine Störung der Glutathion-Synthese führte beispielsweise in murinen T-Zellen zu einer Erhöhung der ROS-Werte und einer gestörten Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (LIAN et al., 2018; YANG et al., 2023). Für die peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pferden wurde der mitochondriale Glutamin-Metabolismus bislang nicht genau untersucht (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 26.11.2024). Eine Abhängigkeit vom Glutamin-Stoffwechsel wurde jedoch bereits in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen (SENER et al., 2016). Die Proliferation dieser Zellen war von der Anwesenheit von Glutamin abhängig und die Abwesenheit von Glutamin verhinderte die Proliferation vollständig (SENER et al., 2016). Außerdem erzeugte die Aktivierung von naiven murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einer Glutamin-defizienten Umgebung sogar in Gegenwart von Th1-polarisierenden Zytokinen regulatorische T-Zellen (Klysz, Tai et al. 2015, Xu, Li et al. 2024). Die Proliferation, Differenzierung und Funktion von humanen und murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist demnach abhängig von Glutamin (Klysz, Tai et al. 2015, Xu, Li et al. 2024), ein Effekt, der für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pferden noch untersucht werden muss.

### **2.3.1.3 Fettsäurestoffwechsel**

Fettsäuren werden im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut, welches anschließend in den Citratzyklus eintreten kann. Es wird unterschieden zwischen kurz-, mittel- und langkettigen Fettsäuren, die zuerst vom Zytosol ins Mitochondrium gelangen müssen, um im Rahmen der FAO verstoffwechselt zu werden. Kurz- und mittelkettige Fettsäuren können aufgrund ihrer hohen Membranpermeabilität die Mitochondrienmembran durch passive Diffusion überqueren. Der Transport von langkettigen Fettsäuren in die mitochondriale Matrix wird in eukaryotischen Zellen durch das Carnitin-Shuttle-System reguliert, das sich aus der Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) 1 und 2 und der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase zusammensetzt. Die CPT1 katalysiert die Bindung von Fettsäuren an Carnitin an der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Acylcarnitin entsteht, welches anschließend von der Translokase ins Mitochondrium befördert werden kann. Die Reaktion der CPT1 stellt den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt der FAO dar und wird daher meist angesteuert, wenn die FAO manipuliert werden soll (SCHLAEPFER und JOSHI, 2020; ZHOU et al., 2023). Im Mitochondrium kommt es im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation zur Entfernung von 2-Kohlenstoffeinheiten, wobei Acetyl-CoA entsteht.

Neben Acetyl-CoA entstehen während der  $\beta$ -Oxidation auch die reduzierten Formen von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH<sub>2</sub>), die ihre Elektronen an die Elektronentransportkette abgeben und auf diese Weise zur Energiegewinnung beitragen.

### **2.3.2 Mitochondrialer Metabolismus in T-Zellen**

Der mitochondriale Metabolismus spielt eine zentrale Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie der ERU, da er nicht nur die Energieversorgung der T-Zellen sichert, sondern auch direkt die Differenzierung und Funktion von Immunzellen beeinflusst (MA et al., 2024). Veränderungen im mitochondrialen Stoffwechsel können unter anderem die Balance zwischen pro-inflammatorischen T-Zellen und regulatorischen T-Zellen verschieben, was zu einer verstärkten Immunantwort und Entzündung beiträgt (YANG et al., 2022; LIN et al., 2024). Diese Mechanismen machen den mitochondrialen Metabolismus zu einem wichtigen Forschungsgebiet und vielversprechenden Ziel für therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen.

#### **2.3.2.1 Der Citratzyklus**

Der Citratzyklus ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und fungiert als zentraler Punkt im Zellstoffwechsel. In ihm werden die Abbauprodukte des Glukose-, Aminosäure- und Fettsäurestoffwechsel zusammengeführt. Diese gelangen überwiegend in Form von Acetyl-CoA in den Citratzyklus, wobei die Quelle des Acetyl-CoA je nach Zelltyp und Aktivierungsstatus variieren kann (ARNOLD und FINLEY, 2023). Auch Speziesunterschiede beeinflussen die bevorzugten Substratquellen, wobei die Zellen von Maus und Mensch vor allem den Abbau von Glukose zu Pyruvat als Quelle bevorzugen (O'NEILL et al., 2016). Für die T-Zellen von Pferden ist nicht bekannt, ob sie bestimmte Substrate bevorzugt nutzen (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 18.11.2024). Im Citratzyklus selbst wird zwar weder Sauerstoff verbraucht noch nennenswerte Mengen an ATP produziert, jedoch liefert er Elektronen, die bei der Oxidation von Substraten wie Acetyl-CoA zu Kohlenstoffdioxid freigesetzt werden. Diese Elektronen werden von NAD<sup>+</sup> und FAD aufgenommen, wodurch die Reduktionsäquivalente NADH und FADH<sub>2</sub> entstehen, die dann schließlich die Elektronen an die Elektronentransportkette weiterleiten. Die Mitochondrien von T-

Zellen nutzen den Citratzyklus, um Reduktionsäquivalente wie NADH und FADH<sub>2</sub> bereitzustellen, die für die Atmungskette und damit die ATP-Produktion erforderlich sind (O'NEILL et al., 2016). Gleichzeitig liefert er biosynthetische Vorstufen für Prozesse, die für die Aktivierung und Funktion von T-Zellen notwendig sind (O'NEILL et al., 2016).

### 2.3.2.2 Die Atmungskette

Die Atmungskette ist in eukaryotischen Zellen in direkter Nähe zum Citratzyklus in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und läuft spezieübergreifend hochkonserviert ab (MEYER et al., 2019). Sie besteht aus vier Komplexen: der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I), der Succinatdehydrogenase (Komplex II), der Ubiquinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) und der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) (VERCELLINO und SAZANOV, 2022). Zusätzlich gibt es noch Komplex V, auch bekannt als ATP-Synthase, der für die Synthese von ATP verantwortlich ist (OKOYE et al., 2023). Die Reduktionsäquivalente NADH und FADH<sub>2</sub> geben ihre Elektronen entweder an Komplex I oder Komplex II der Atmungskette ab (NOLFI-DONEGAN et al., 2020). Komplex I oxidiert NADH und reduziert dabei Ubichinon zu Ubichinol in einer protonengekoppelten Elektronenübertragung (OKOYE et al., 2023). Die Elektronen werden dabei über eine Kette von Kofaktoren, darunter ein Flavinmononukleotid und sieben Eisen-Schwefel-Cluster, an Ubichinon weitergeleitet (NOLFI-DONEGAN et al., 2020). Im Komplex II werden die beim Abbau von Succinat freigesetzten Elektronen von FADH<sub>2</sub> über Eisen-Schwefel-Cluster auf Ubichinon übertragen, wodurch der Citratzyklus direkt mit der Atmungskette verbunden ist (NOLFI-DONEGAN et al., 2020). Am Komplex II kommt es dabei nicht zum Pumpen von Protonen (NOLFI-DONEGAN et al., 2020). Ubichinol wird anschließend von Komplex III oxidiert und von diesem werden die Elektronen einzeln auf Cytochrom c übertragen (OKOYE et al., 2023). Das reduzierte Cytochrom c fungiert als mobiler Elektronenüberträger und liefert die Elektronen an Komplex IV ab, wo zellulärer Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor fungiert und zu Wasser reduziert wird (OKOYE et al., 2023). Dieser Elektronenfluss treibt den Transport von Protonen von der Matrix in den Intermembranraum an (NOLFI-DONEGAN et al., 2020). Insgesamt werden infolge des Elektronentransports zehn Protonen, zwei aus Komplex III und jeweils vier aus den Komplexen I und IV, von der Matrix in den Intermembranraum

gepumpt (NOLFI-DONEGAN et al., 2020). Dort erzeugen sie einen elektrochemischen Protonengradienten, der als mitochondriales Membranpotenzial bezeichnet wird (NOLFI-DONEGAN et al., 2020). Die resultierende Protonenbewegung durch Komplex V entlang des Protonengradienten in Richtung der mitochondrialen Matrix wird von Komplex V genutzt, um ATP zu erzeugen (OKOYE et al., 2023). Der Begriff OXPHOS bezeichnet den kombinierten Prozess der Atmungskette und der ATP-Synthese durch Komplex V (OKOYE et al., 2023). Die Atmungskette ist essenziell für die Energieversorgung von T-Zellen und steuert deren Aktivierung und Funktion (MA et al., 2024). Ihre Rolle geht dabei über die ATP-Produktion hinaus, indem sie die Produktion von ROS reguliert, die als Signalmoleküle in der T-Zell-Aktivierung dienen (GÜLOW et al., 2024). Im Rahmen der ERU könnte die erhöhte OXPHOS in CD4<sup>+</sup> T-Zellen (BARFUSSER et al., 2021) sowohl auf eine Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette als auch auf eine aktivierungsinduzierte Steigerung der OXPHOS-Aktivität hinweisen.

### **2.3.3 Die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei der T-Zell Aktivierung**

Früher wurden ROS als unerwünschte Nebenprodukte enzymatischer Reaktionen betrachtet (GÜLOW et al., 2024). Heute ist bekannt, dass ROS in humanen und murinen Zellen eine zentrale Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen spielen. Dazu zählen die Regulierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort, die Differenzierung und Autophagie sowie die Abwehr von Pathogenen (OKOYE et al., 2023; GÜLOW et al., 2024). Bei Pferden sind die genauen Mechanismen, wie ROS die T-Zell-Aktivierung beeinflussen, bislang nicht erforscht (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 18.11.2024). Dass Antioxidantien die Aktivierung menschlicher und muriner T-Zellen inhibieren, wurde bereits vor längerer Zeit nachgewiesen (NOVOGRODSKY et al., 1982; CHAUDHRI et al., 1988; BAUER et al., 1998). In humanen und murinen T-Zellen induzierte zudem die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors eine ROS-Produktion (DEVADAS et al., 2002). Später wurde spezifisch die Funktion von ROS aus Komplex III für die T-Zell-Aktivierung untersucht (SENA et al., 2013). Die T-Zellen von Mäusen mit einer T-Zell-spezifischen Reduktion im Rieske-Iron-Sulfur-Protein, welches eine Untereinheit von Komplex III der Atmungskette darstellt, konnten aufgrund der fehlenden ROS-Produktion in Komplex III keine antigenspezifische T-Zell-Expansion *in vivo* einleiten (SENA et al., 2013). In diesem Versuch konnte zudem

belegt werden, dass mitochondriale ROS für die Aktivierung von NFAT und die anschließende Induktion von IL-2 notwendig sind (SENA et al., 2013). Inzwischen ist bekannt, dass das oxidative Signal in T-Zellen über mehrere Schritte abläuft: Die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors führt in humanen und murinen T-Zellen zu einer kontrollierten ROS-Produktion durch Komplex I und Komplex III der Atmungskette (KAMINSKI et al., 2007; KAMINSKI et al., 2010; GÜLOW et al., 2024). Zusätzlich wird die NADPH-Oxidase 2 aktiviert, die in den T-Zellen von Menschen und Mäusen ebenfalls ROS produziert und so ein konstantes ROS-Signal aufrechterhält und die Signaltransduktion stabilisiert (JACKSON et al., 2004; KAMIŃSKI et al., 2013; GÜLOW et al., 2024). Dieses oxidative Signal aktiviert Signaltransduktionskaskaden wie den Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Weg, der die Proliferation und Differenzierung von humanen und murinen T-Zellen fördert (COPPOLA et al., 2020; GÜLOW et al., 2024). Außerdem wird die Aktivität Redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren wie des nuklearen Faktors Kappa B (NF- $\kappa$ B) gesteigert, der die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine induziert und dessen gesteigerte Aktivität unter anderem mit der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (ILCHOVSKA und BARROW, 2021) und auch der EAU in Mäusen (HSU et al., 2020) in Verbindung gebracht wird. Die initiale Aktivierung des oxidativen Signals hängt auch mit einer gesteigerten aeroben Glykolyse zusammen (KAMIŃSKI et al., 2012), die für die Aktivierung von murinen und menschlichen T-Zellen erwiesenermaßen erforderlich ist (WANG et al., 1976; STENTZ und KITABCHI, 2005; JACOBS et al., 2008; TANG et al., 2024). Diese gesteigerte glykolytische Aktivität führt zu einem erhöhten Aufkommen von reduziertem NADH und FADH<sub>2</sub>, die wiederum einen gesteigerten Elektronenfluss durch die Atmungskette begünstigen und somit die Bildung von ROS durch Komplex I und III induzieren (KAMIŃSKI et al., 2013; SENA et al., 2013; GÜLOW et al., 2024). Als Folge der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung wechselt die Funktion der Atmungskette in humanen und murinen T-Zellen so von der Haupt-Quelle des zellulären ATP zur Quelle des oxidativen Signals für die T-Zell-Aktivierung, während die aerobe Glykolyse die energetischen Anforderungen der Zellen erfüllt (KAMIŃSKI et al., 2013; SENA et al., 2013; GÜLOW et al., 2024; LIN et al., 2024). Die gesteigerte aerobe Glykolyse als Folge der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung ist demnach ein essenzieller Schritt für die Aktivierung des oxidativen Signals in humanen T-Zellen (KAMIŃSKI et al., 2012; GÜLOW et al., 2024). Um eine Überproduktion von ROS zu

begrenzen und oxidativen Stress zu verhindern, regulieren der Transkriptionsfaktor Nrf2 (*engl.* nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) und antioxidative Proteine wie Superoxiddismutasen (SODs) die Signalintensität und können das oxidative Signal bei Bedarf beenden (GÜLOW et al., 2024; SONG et al., 2024). SOD1 und SOD2 sind hochkonservierte Enzyme, die in Säugetierzellen die Umwandlung von Superoxid in Wasserstoffperoxid katalysieren (MARKLUND, 1984; ZELKO et al., 2002; GÜLOW et al., 2024). SOD1 erfüllt diese Aufgabe im Zytosol und im Intermembranraum der Mitochondrien und SOD2 in der mitochondrialen Matrix (ZELKO et al., 2002; GÜLOW et al., 2024). Das zentrale zelluläre Antioxidans in Säugetieren ist das Glutathion, das in seiner reduzierten Form Wasserstoffperoxid direkt reduzieren kann (AVERILL-BATES, 2023; GÜLOW et al., 2024). Glutathion ist in verschiedenen Zellkompartimenten wie dem Zytoplasma, endoplasmatischem Retikulum, Peroxisomen, Vakuolen und Mitochondrien aktiv (GÜLOW et al., 2024). Oxidativer Stress entsteht, wenn ein Ungleichgewicht zwischen diesen antioxidativen Prozessen und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies besteht (DAMMAK et al., 2023). Für die Pathogenese der autoimmunen Uveitis wird schon seit längerem eine Rolle von oxidativem Stress angenommen (JIANG et al., 2023). In EAU-Mausmodellen zeigte sich, dass Mäuse mit einem Defizit im neutrophilen zytosolischen Faktor 1, einem zentralen Bestandteil der NADPH-Oxidase 2, eine reduzierte retinale Lipidperoxidation aufwiesen (HSU et al., 2020). Dies führte zu einer signifikant mildereren Krankheitsausprägung mit einer verringerten Expression proinflammatorischer Zytokine in der Retina und einer verminderten Aktivität von NF- $\kappa$ B (HSU et al., 2020), was auf eine zentrale Rolle von ROS in der Pathogenese der EAU bei Mäusen hinweist. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der ROS-Produktion in T-Zellen und der Pathogenese der ERU ist bisher nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchung.

#### **2.3.4 Respirometrische Messung des Immunzellmetabolismus**

Messungen des zellulären Sauerstoffverbrauchs (*engl.* oxygen consumption rate, OCR) in lebenden Immunzellen tragen dazu bei, die Stoffwechseleigenschaften spezifischer Zellpopulationen zu charakterisieren (DESOUZA et al., 2023). Der Seahorse XF Analyzer von Agilent eignet sich für diese Charakterisierung, da er ein geschlossenes System bietet, in dem die OCR in regelmäßigen Abständen über eine festgelegte Zeitspanne gemessen wird (DIVAKARUNI et al., 2014; ANDERSON et al.,

2018). Die OCR wird in pmol O<sub>2</sub>/min gemessen und ist ein Indikator für die mitochondriale Atmung (DESOUSA et al., 2023). Die Messung der Oxidation einzelner Substrate mithilfe des Seahorse XF Analyzer bietet zusätzlich Einblicke in die spezifischen Stoffwechselpräferenzen von Immunzellen (VOSS et al., 2021). Durch die Verwendung von Inhibitoren, die den Import von Glukose, Glutamin oder langkettigen Fettsäuren in die Mitochondrien hemmen, kann die mitochondriale Abhängigkeit von jedem spezifischen Substrat bestimmt werden, also zu welchem Grad die Zellen in der Lage sind, die mitochondriale Atmung über die Oxidation alternativer Substrate aufrechtzuerhalten (EBELING et al., 2021; VOSS et al., 2021). Die Kapazität für ein Substrat wiederum beschreibt, in welchem Umfang die Zellen in der Lage sind, dieses Substrat für die mitochondriale Energiegewinnung zu nutzen, wenn andere Stoffwechselwege blockiert sind (EBELING et al., 2021). Die Flexibilität wird als Differenz aus Kapazität und Abhängigkeit berechnet und erlaubt Rückschlüsse auf die metabolische Flexibilität dieser Zellen (ANDERSON et al., 2018).

### 3 PUBLIKATION

#### Titel

Enhanced ROS Production and Mitochondrial Metabolic Shifts in CD4<sup>+</sup> T Cells of an Autoimmune Uveitis Model

#### Autoren

Ronja Söth, Anne L. C. Hoffmann, Cornelia A. Deeg

#### Journal

International Journal of Molecular Sciences

#### Status

Published.

*Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25(21), 11513.

doi: 10.3390/ijms252111513

<https://doi.org/10.3390/ijms252111513>



## Article

# Enhanced ROS Production and Mitochondrial Metabolic Shifts in CD4<sup>+</sup> T Cells of an Autoimmune Uveitis Model

Ronja Söth, Anne L. C. Hoffmann and Cornelia A. Deeg \* 

Chair of Physiology, Department of Veterinary Sciences, Ludwig Maximilian University of Munich, D-82152 Martinsried, Germany

\* Correspondence: cornelia.deeg@lmu.de

**Abstract:** Equine recurrent uveitis (ERU) is a spontaneously occurring autoimmune disease and one of the leading causes of blindness in horses worldwide. Its similarities to autoimmune-mediated uveitis in humans make it a unique spontaneous animal model for this disease. Although many aspects of ERU pathogenesis have been elucidated, it remains not fully understood and requires further research. CD4<sup>+</sup> T cells have been a particular focus of research. In a previous study, we showed metabolic alterations in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases, including an increased basal oxygen consumption rate (OCR) and elevated compensatory glycolysis. To further investigate the underlying reasons for and consequences of these metabolic changes, we quantified reactive oxygen species (ROS) production in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases and compared it to healthy controls, revealing significantly higher ROS production in ERU-affected horses. Additionally, we aimed to define mitochondrial fuel oxidation of glucose, glutamine, and long-chain fatty acids (LCFAs) and identified significant differences between CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases and controls. CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases showed a lower dependency on mitochondrial glucose oxidation and greater metabolic flexibility for the mitochondrial oxidation of glucose and LCFAs, indicating an enhanced ability to switch to alternative fuels when necessary.

**Keywords:** equine recurrent uveitis (ERU); autoimmune uveitis; neuroinflammation; autoimmunity; immunometabolism; CD4<sup>+</sup> T cell; reactive oxygen species; metabolic flexibility

check for  
updates

**Citation:** Söth, R.; Hoffmann, A.L.C.; Deeg, C.A. Enhanced ROS Production and Mitochondrial Metabolic Shifts in CD4<sup>+</sup> T Cells of an Autoimmune Uveitis Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 11513. <https://doi.org/10.3390/ijms252111513>

Academic Editor: Marcella Reale

Received: 24 September 2024

Revised: 22 October 2024

Accepted: 24 October 2024

Published: 26 October 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The metabolism of immune cells in autoimmune diseases has attracted increasing interest in recent years. Depending on metabolic needs and activation status, immune cells can quickly adapt and switch between dominating metabolic pathways [1,2]. These include the two primary pathways for generating adenosine triphosphate (ATP): oxygen-consuming oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the mitochondria and glycolysis in the cytoplasm, where glucose is converted to pyruvate [1,3]. This pyruvate can then either enter the tricarboxylic acid (TCA) cycle in the mitochondria or undergo conversion to lactate in the cytoplasm, which is independent of oxygen [1,3]. Metabolism of glucose to lactate was originally thought to occur only under anaerobic conditions until Otto Warburg discovered the Warburg effect, demonstrating that cancer cells switch from OXPHOS to glycolysis for ATP production even in the presence of sufficient oxygen [4]. This process, known as ‘aerobic glycolysis’, is also observed in activated immune cells [1,5,6]. This metabolic reprogramming enables immune cells to achieve full effector function by rapidly generating energy to meet the increased demands for proliferation, while also providing pyruvate as a key metabolic intermediate [7,8]. For example, in both humans and mice, activated T helper 1 (Th1), Th2, and Th17 cells primarily rely on glycolysis [9], whereas naïve T cells and anti-inflammatory cells such as memory CD8<sup>+</sup> T cells and T regulatory cells (Tregs) prefer OXPHOS and fatty acid oxidation (FAO) for ATP production [2,10,11]. Glucose, glutamine, and fatty acids are the primary energy substrates for immune cells, including

CD4<sup>+</sup> T cells [6]. End products of their metabolism feed into the TCA cycle, where they are oxidized to CO<sub>2</sub>, generating electrons that fuel the electron transport chain (ETC) via NADH and FADH<sub>2</sub> [1]. Electron movement through ETC complexes I, III, and IV drives proton (H<sup>+</sup>) transfer across the inner mitochondrial membrane, creating a proton gradient that delivers the energy needed for ATP production by complex V [12]. The entirety of this process is referred to as OXPHOS, which is elevated in activated CD4<sup>+</sup> T cells, but with the OXPHOS/glycolysis ratio being lower in activated compared to naïve murine CD4<sup>+</sup> T cells [1,13].

Elevated OXPHOS in immune cells not only provides increased energy, but also contributes to a greater generation of reactive oxygen species (ROS), primarily produced by complexes I and III of the ETC [11,14]; other significant sources of mitochondrial ROS (mROS) include enzymes such as the alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase complexes [15–17]. Non-mitochondrial sources of ROS that should be considered include the NADPH oxidase (NOX) family, which is a major producer of cytoplasmic ROS, as well as the endoplasmic reticulum and peroxisomes [15,18,19]. These ROS act as key signaling molecules in T cell activation [11,15,20]. However, excessive ROS production can cause oxidative stress, leading to mitochondrial damage, dysfunction, and altered metabolism [21]. These double-sided effects of ROS are thought to contribute to the development of autoimmune diseases [15,22]. For example, in a recent study using a murine model for psoriasis, Nicotinamide mononucleotide (NMN), a precursor of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), significantly reduced ROS levels, mitochondrial dysfunction, and autoimmune inflammation in HEK293T and HaCaT cells [23]. Novel strategies to target ROS production and the oxidative stress they induce are continuously emerging.

Autoimmune uveitis in humans is a sight-threatening disease characterized by recurring episodes of intraocular inflammation [24,25]. Pathogenesis involves the breakdown of the blood-retinal barrier, allowing autoreactive cells, predominantly CD4<sup>+</sup> T cells, to infiltrate the immune-privileged eye and cause neuroinflammation [26–28]. Equine recurrent uveitis (ERU) serves as a spontaneous animal model for studying autoimmune uveitis due to its strong similarities in disease onset and pathogenesis [29,30]. Like human autoimmune uveitis, ERU exhibits a spontaneous onset and a remitting-relapsing nature, with the involvement of autoreactive lymphocytes [31,32]. These parallels, along with the accessibility of peripheral blood cells from ERU-affected horses that are not undergoing systemic treatment, establish ERU as a valuable translational model for autoimmune uveitis [30,33,34]. Thus, studying peripheral blood cells from ERU cases is beneficial for exploring the molecular mechanisms underlying the development of both ERU and autoimmune uveitis.

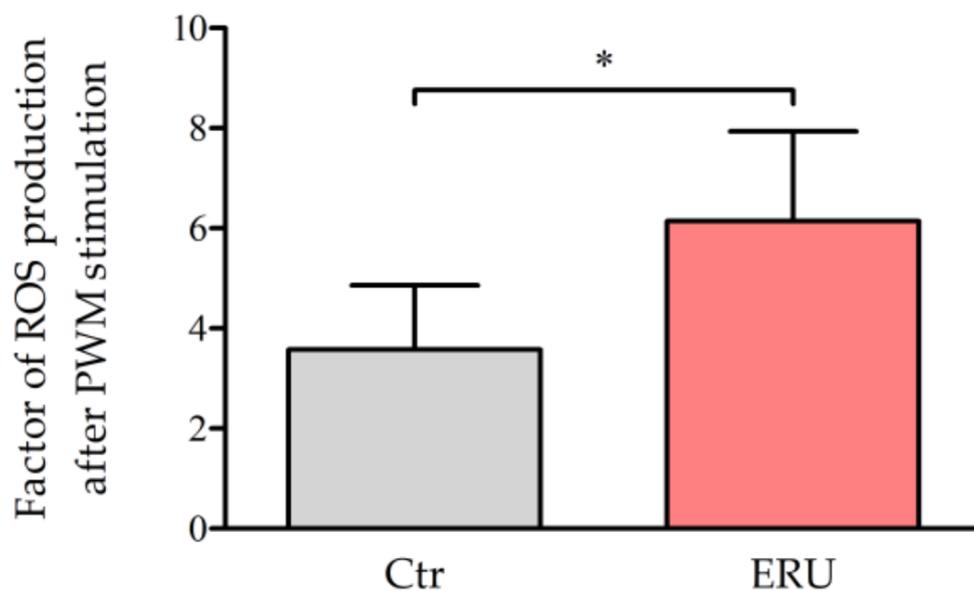
In previous studies performed in our research group, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases showed a distinct metabolic phenotype compared to healthy control cells, with one of these alterations being an increased OXPHOS [35]. In addition, our work group discovered that CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases exhibited decreased basal glycolysis [35]. However, after mitochondrial inhibition, glycolysis was increased to compensate for the energy deficit, with CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases showing significantly higher rates of compensatory glycolysis [35]. Since CD4<sup>+</sup> T cells are the driving force of ERU and exhibit the metabolic changes described, we decided to continue focusing on this cell population.

Our study aimed to unravel potential differences in ROS production and mitochondrial metabolism, particularly focusing on the oxidation of glucose, glutamine, and fatty acids. Variations in the metabolism of auto-aggressive cells may help to identify future therapeutic targets for autoimmune diseases such as ERU and autoimmune uveitis at a molecular level, while also contributing to understanding the complex relationship between metabolism and neuroinflammation.

## 2. Results

### 2.1. CD4<sup>+</sup> T Cells from ERU Cases Showed Increased Production of ROS After Stimulation with PWM

To determine whether the elevated OXPHOS in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases [35] leads to higher ROS production, we measured ROS production after stimulation of CD4<sup>+</sup> T cells from healthy controls and ERU horses with the polyclonal T and B cell mitogen Pokeweed Mitogen (PWM) [36]. Using flow cytometry, ROS production was visualized with 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) staining, which converts to fluorescent 2',7'-Dichlorofluorescein upon oxidation by ROS. In controls, the mean factor of ROS production after PWM stimulation was calculated at 3.6, while cells from ERU cases exhibited a significantly higher ROS production with a mean factor of 6.1, representing a 1.7-fold increase in ROS production in ERU cases (Figure 1). In a mouse model with reduced mitochondrial reactive oxygen species (mROS) production in T cells, it has been demonstrated that ROS from mitochondrial complex III serve as signaling molecules essential for T cell activation [14,37]. However, in excessive amounts, ROS have been observed to cause mitochondrial dysfunction [38]. For example, this has been demonstrated in CD4<sup>+</sup> T cells of humans living with HIV who are undergoing antiretroviral therapy [38]. Therefore, we decided to look more closely at the mitochondrial metabolism of CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases in the following experiments.

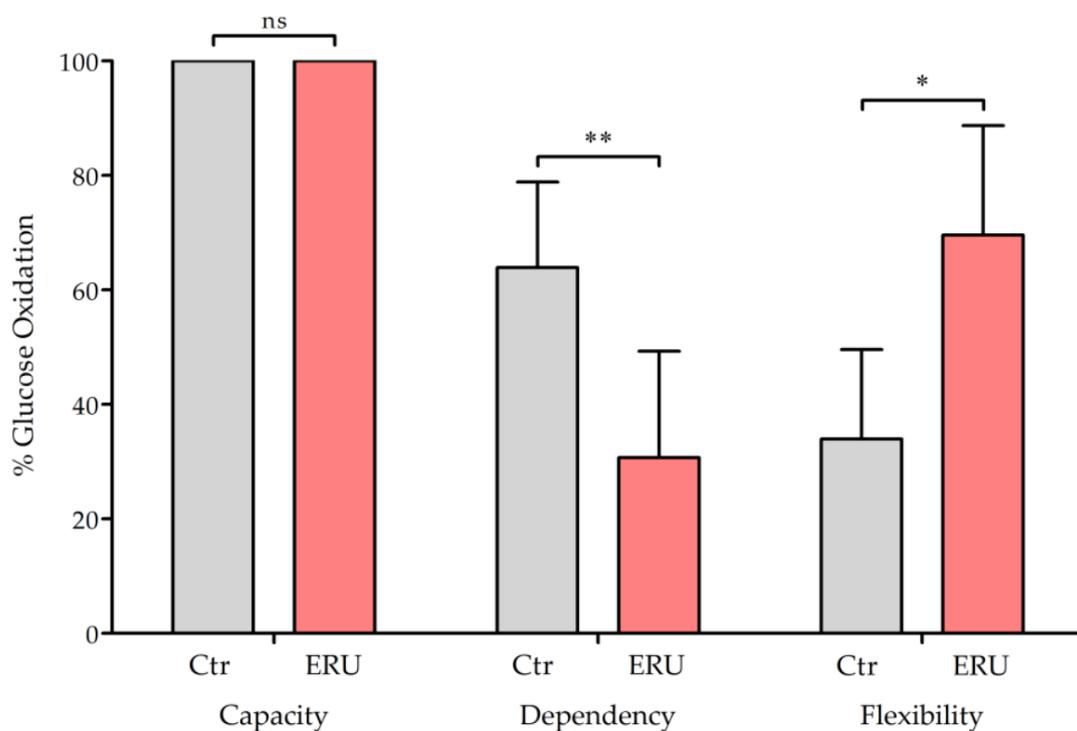


**Figure 1.** CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases produced higher levels of reactive oxygen species (ROS) after stimulation with pokeweed mitogen (PWM). Bar graphs display the factor of ROS production in CD4<sup>+</sup> T cells from healthy horses (Ctr, gray,  $n = 6$ ) and equine recurrent uveitis cases (ERU, red,  $n = 5$ ) after 90 min of stimulation with PWM. The mean value is shown as a factor and the error bars correspond to the standard deviation. The factor of ROS production in control cells was determined at 3.6, while ERU cases exhibited a factor of 6.1. To compare the factor of ROS production between CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases and healthy control cells, Student's *t*-test was used (\*  $p = 0.023$ ).

### 2.2. Reduced Dependency on and Higher Flexibility for Mitochondrial Glucose Oxidation in CD4<sup>+</sup> T Cells from ERU Cases

To investigate the underlying reasons for and consequences of the previously observed differences in CD4<sup>+</sup> T cell metabolism in ERU, such as the increased basal oxygen consumption rate (OCR), lower basal glycolytic rates, increased compensatory glycolysis [35], and greater production of ROS (Figure 1), we decided to define mitochondrial fuel utilization of glucose in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases. Both healthy horses and ERU cases showed

100% capacity to use glucose as a mitochondrial fuel, which describes the ability of the cell's mitochondria to oxidize a fuel when other fuel pathways are inhibited (Figure 2). The dependency on mitochondrial glucose oxidation indicates the extent to which specific cells rely on this fuel source for energy production and their inability to compensate by oxidizing alternative fuels. The dependency on glucose oxidation was significantly lower in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases (ERU = 30.7%) compared to controls (Ctr = 66.05%), suggesting that mitochondria in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases have an enhanced ability to compensate for impaired glucose oxidation by utilizing alternative fuel sources. Since flexibility is calculated by subtracting dependency from capacity, this resulted in greater flexibility in ERU cases (ERU = 69.3%) to use glucose for mitochondrial respiration compared to controls (Ctr = 34.0%) (Figure 2). We hypothesized that a lower dependency on glucose oxidation requires these cells to increase their ability to use alternative mitochondrial fuels such as amino acids or fatty acids. Therefore, we subsequently focused on validating this potential metabolic shift.

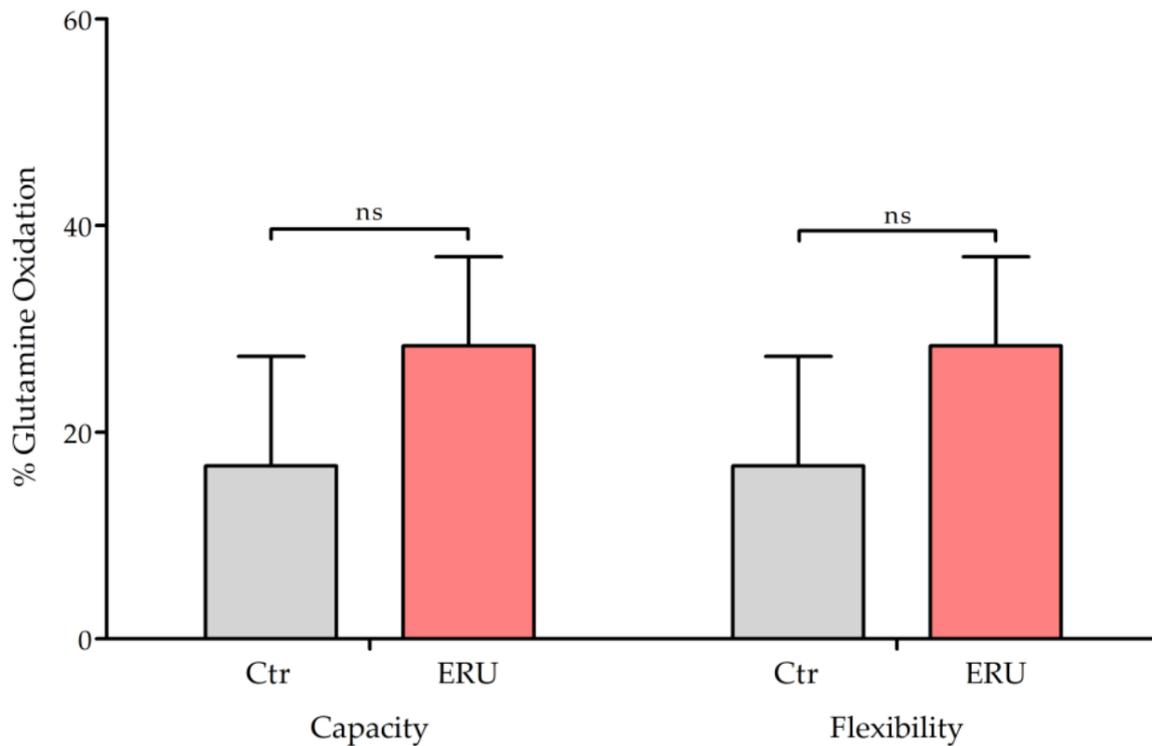


**Figure 2.** Lower dependency on and higher flexibility for mitochondrial oxidation of glucose in ERU cases. Bar graphs show the percentage of dependency on mitochondrial glucose oxidation in CD4<sup>+</sup> T cells from healthy controls (gray,  $n = 6$ ) and ERU cases (red,  $n = 5$ ) as well as capacity and flexibility from healthy controls (gray,  $n = 5$ ) and ERU cases (red,  $n = 5$ ). The mean value is presented as a percentage, and the error bars correspond to the standard deviation. Both groups showed 100% capacity to use glucose for mitochondrial oxidation (ns = not significant), whereas CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases were significantly (\*\*  $p = 0.009$ ) less dependent and exhibited significantly (\*  $p = 0.012$ ) greater flexibility to use glucose as a mitochondrial fuel compared to controls. Student's *t*-test was used to test for statistical significance.

### 2.3. Glutamine Metabolism Showed No Significant Differences Between ERU Cases and Controls

To determine whether CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases compensated for their observed lower dependency on mitochondrial glucose metabolism (Figure 1) by upregulating amino acid oxidation, we determined the dependency, capacity, and flexibility of these cells for glutamine oxidation. Mitochondrial respiration was measured following inhibition of the glutamine oxidation pathway, as well as after blocking glucose and fatty acid oxidation

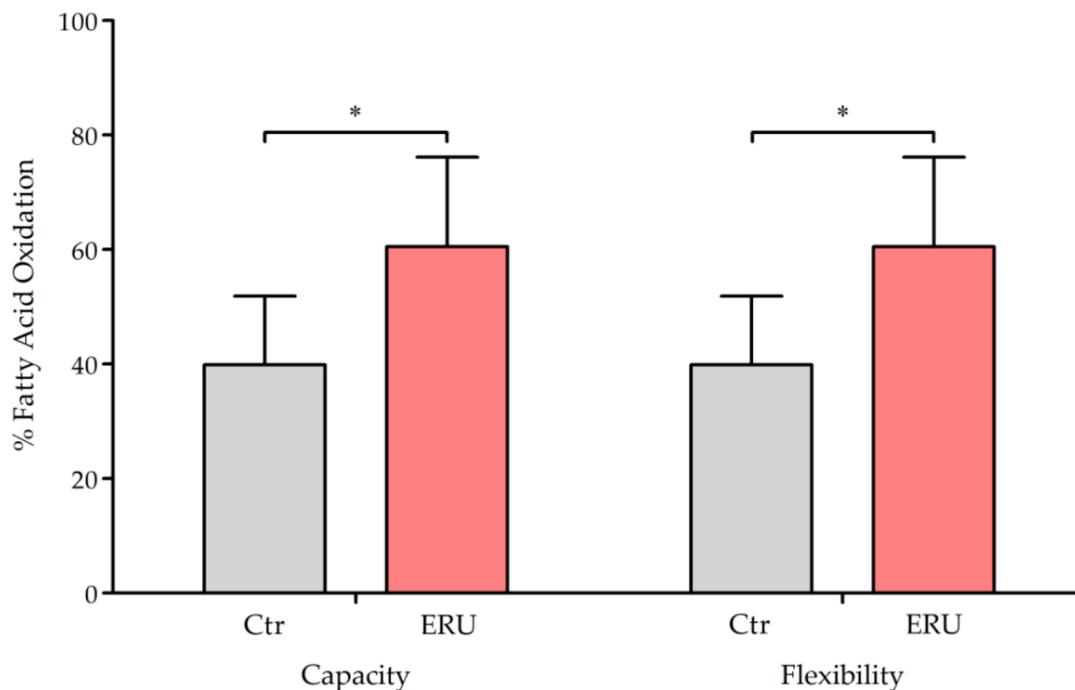
pathways, to evaluate how these cells adapt their metabolic processes. Differences in capacity (ERU = 31.3%, Ctr = 16.7%) and flexibility (ERU = 31.3%, Ctr = 16.7%) between ERU cases and controls were not significant. Data on dependency were measured at 0% in all animals, resulting in flexibility directly corresponding to capacity (Figure 3).



**Figure 3.** Mitochondrial fuel utilization of glutamine did not show significant differences in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases. Bar graphs show the percentage of capacity and flexibility of mitochondrial glutamine oxidation in CD4<sup>+</sup> T cells from healthy controls (gray,  $n = 6$ ) and ERU cases (red,  $n = 5$ ). Flexibility was calculated by subtracting the dependency from the capacity (flexibility% = capacity% – dependency%). The mean value is shown as a percentage and the error bars correspond to the standard deviation. Student's *t*-test revealed no statistically significant (ns  $p = 0.066$ ) differences in capacity or flexibility of substrate utilization of glutamine.

#### 2.4. CD4<sup>+</sup> T Cells from ERU Cases Showed Increased Capacity and Flexibility for Mitochondrial Oxidation of Long-Chain Fatty Acids

Our next step was to investigate whether fatty acids were used to fuel OXPHOS at a higher rate in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases to compensate for the lower dependency on mitochondrial glucose oxidation (Figure 1). Long-chain fatty acid (LCFA) metabolism was inhibited by blocking carnitine palmitoyl-transferase 1a (CPT1a) of the outer mitochondrial membrane using Etomoxir. This enzyme is crucial for transporting palmitate, an LCFA, into the mitochondrion [39]. The decrease in OCR was measured after inhibiting both the fatty acid oxidation pathway and the alternative pathways of glucose and glutamine oxidation. The analysis revealed no dependency on mitochondrial LCFA oxidation in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases (ERU = 0%) and controls (Ctr = 0%). Consequently, these cells were able to fully compensate for the blocked utilization of LCFAs. The capacity to use LCFAs for mitochondrial respiration was significantly higher in ERU cases (ERU = 62.8%) compared to controls (Ctr = 39.9%). Since the dependency on fatty acids was 0% in all animals, flexibility also corresponded to capacity (ERU = 62.8%, Ctr = 39.9%) (Figure 4), revealing an increased ability of CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases to use LCFAs for mitochondrial respiration.



**Figure 4.** CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases showed greater capacity and flexibility to utilize long-chain fatty acids (LCFAs) for mitochondrial energy production. Bar graphs represent the percentage of capacity and flexibility for mitochondrial oxidation of LCFAs in CD4<sup>+</sup> T cells from healthy controls (gray,  $n = 6$ ) and ERU cases (red,  $n = 5$ ). Flexibility was calculated by subtracting the dependency from the capacity (flexibility% = capacity% – dependency%). The mean value is shown as a percentage and the error bars correspond to the standard deviation. ERU cases showed significantly (\*  $p = 0.041$ ) higher capacity and flexibility to use LCFAs for mitochondrial oxidation. Student's t-test was used to test for statistical significance.

### 3. Discussion

The metabolism of CD4<sup>+</sup> T cells has been extensively studied to elucidate the pathogenesis of various autoimmune diseases, including autoimmune-mediated uveitis in humans [6,25]. Autoimmune uveitis is characterized by non-infectious ocular inflammations with recurring and remitting episodes, driven by CD4<sup>+</sup> T cells crossing the blood-retinal barrier and contributing to inflammation [25]. Despite species differences, there are notable parallels in the pathogenesis of ERU and autoimmune uveitis, along with significant similarities in immune system composition and function [40], making the horse a valuable model for studying autoimmune-mediated uveitis [29,30,33]. Although many aspects of CD4<sup>+</sup> T cell metabolism in ERU-affected horses still remain unanswered, some metabolic alterations have already been identified. Based on our previous findings of increased OXPHOS activity in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases [35], we aimed to determine whether this elevated OXPHOS led to enhanced ROS production in these cells. We demonstrated that CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases produced significantly higher amounts of ROS compared to control cells following stimulation with PWM (Figure 1). Given that an activated metabolism with heightened oxygen consumption has been shown to be accompanied by elevated ROS production via the ETC complexes in both humans and mice [11,14,41], these new findings in equine CD4<sup>+</sup> T cells are consistent with our previous study [35]. However, it is important to acknowledge that the DCF-DA probe used in this study is not exclusively specific to mitochondria-derived ROS [42]. Upon T cell activation, the ETC complexes generate ROS in the mitochondria, while NOX proteins simultaneously produce substantial amounts of cytoplasmic ROS, supporting ROS signaling during activation [11,15,43,44]. Consequently, other sources, such as cytoplasmic NOX proteins and peroxisomes, also

contribute to overall ROS production [11,18]. Nevertheless, studies have demonstrated that DCF-DA can effectively detect mitochondria-derived ROS [45,46]. Given our previous finding of elevated OXPHOS [35], we hypothesize that the majority of the detected ROS are of mitochondrial origin. To determine which specific cellular compartments contributed to the elevated ROS levels, future studies will be necessary. For example, MitoSOX Red is a dye used to measure superoxide production in the mitochondrial matrix, though its use has limitations, including cyto- and mitotoxicity [42]. Subsequent studies could include a differential proteome analysis of isolated CD4<sup>+</sup> T cell mitochondrial proteins, a highly sensitive and targeted approach with the potential to provide detailed insights into altered proteins associated with ROS in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU-affected horses.

ROS play a crucial role in various cellular functions [14,47]. Upon T cell receptor (TCR) activation, ROS signaling helps regulate T cell activation through several mechanisms [11]. These include the regulation of transcription factors and the modulation of signaling pathways such as the nuclear factor-kappa B (NF-κB) pathway, which was demonstrated in human T cells [11,48]. For example, mROS generated by complex III of the ETC are essential for T cell activation through nuclear factor of activated T cells (NFAT) [37]. This was proved by Sena et al. in research involving *Uqcrrfs*-knock-out mice with a T cell-specific reduction in Rieske iron sulfur protein (RISP), a subunit of mitochondrial complex III, which led to reduced mROS production in T cells and impaired T cell activation through NFAT [37]. These mice exhibited an inability to induce antigen-specific T cell expansion in vivo, highlighting the crucial role of mROS in T cell activation [37]. Notably, another study in mice with superoxide-deficient T cells showed a reduced Th1 cell response [49]. In line with this, the elevated ROS production observed in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases may contribute to their activated pro-inflammatory Th1 phenotype, as indicated by the increased expression of interferon-gamma (IFNγ) in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU horses [50].

A link between elevated ROS levels and the Th17/Treg balance has been explored in CD4<sup>+</sup> T cells from patients with *Chlamydia psittaci pneumonia* (CPP). Compared to healthy controls, CPP patients exhibited higher ROS levels in peripheral blood, an increased abundance of Th17 cells, and a reduced abundance of Tregs [51]. Treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> led to an increase in Th17 cell differentiation and a further decrease in Treg differentiation, indicating that ROS play a role in regulating the balance between Th17 and Treg cells in CPP [51]. This relationship has also been observed in other models. For instance, in a murine model of asthma, elevated ROS levels and a disrupted Th17/Treg balance were identified, while treatment with vitamin D downregulated ROS levels and restored this balance [52]. Additionally, in Henoch-Schonlein purpura, a form of recurrent immunoglobulin A-mediated vasculitis, increased ROS levels have similarly been linked to a Th17/Treg imbalance [53]. Th17 cells are considered key players in the development of various autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) [54]. This is supported by the presence of interleukin-17 (IL-17), the hallmark cytokine of Th17 cells, in the synovial fluid of RA patients, which has been associated with disease severity [54,55]. Moreover, SLE patients exhibit increased IL-17 production compared to healthy controls, with plasma IL-17 levels showing a positive correlation with disease activity [54,56]. These findings underscore the crucial role of Th17 cells in autoimmune diseases [54]. We hypothesize that the elevated ROS production observed in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU-affected horses may similarly influence the Th17/Treg balance. This hypothesis warrants further investigation. While Th17 cells have not been directly identified in horses, their involvement in ERU is suggested by matching cytokine patterns in equine iris and ciliary bodies [57], which align with findings from rodent models for experimental autoimmune uveitis (EAU), where Th17 cells have been implicated in driving inflammatory processes in autoimmune uveitis [58]. In particular, Th17/Treg balance, with Th17 cells promoting inflammation and Tregs working to control it, is being actively investigated in the context of autoimmune disease development [10,15,59]. During acute inflammatory episodes, Tregs were found to be less abundant in the peripheral blood of patients with autoimmune uveitis compared to healthy controls and patients in clinical remission [59,60]. Consequently, Tregs

are believed to play a role in the remitting-relapsing nature of autoimmune uveitis [59–61]. To our knowledge, these differences have not yet been detected in the peripheral blood of ERU-affected horses. However, the involvement of Tregs in ERU disease remission remains very likely [61], making the effect of ROS on Th17/Treg balance a compelling area of research for both ERU and autoimmune uveitis. Moreover, the potential impact of the interleukin-33/interleukin-31 (IL-33/IL-31) axis should also be considered in this context. A study in lupus-prone mice demonstrated that IL-33 inhibition can reduce SLE progression by promoting Treg expansion and suppressing Th17 cells [62,63]. In patients with Behçet's disease-associated uveitis, elevated serum levels of IL-33 and IL-31 have been reported, with IL-33 playing a role in the progression of experimental autoimmune uveitis (EAU) [62,64]. However, the precise role of the IL-33/IL-31 axis in equine recurrent uveitis (ERU) and autoimmune uveitis remains unclear and warrants further investigation.

Oxidative stress, which results from an imbalance between ROS and the ability of cellular antioxidant mechanisms to neutralize them [65], has already been identified as a factor that exacerbates disease progression in a murine model of EAU [66,67]. ROS-deficient mice exhibited lower EAU disease scores compared to wild-type mice [68]. Additionally, these mice showed reduced cytokine levels in the retina and decreased NF- $\kappa$ B activity, suggesting that similar mechanisms may be relevant to autoimmune uveitis in humans [68]. However, the validation of higher ROS production in our spontaneous equine animal model [34] of autoimmune uveitis validates the role of oxidative stress in this disease and lays the groundwork for further investigations into the metabolic consequences of these ROS.

When ROS production becomes excessive, it can cause cellular damage, particularly to the mitochondria, leading to mitochondrial dysfunction [21,38]. The inability of mitochondria to function properly causes impaired energy production, disruption of OXPHOS, increased production of mROS, and an enhanced inflammatory response [15,69,70]. A similar effect was observed in CD4<sup>+</sup> T cells from patients with SLE [41]. It was hypothesized that this resulted from mitochondrial damage caused by the chronic activation of these cells, leading to a less efficient metabolism and greater ROS generation [41]. This exhausted phenotype could be hypothesized for CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases as well, providing an alternative explanation for the enhanced OXPHOS.

To summarize, increased ROS production in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases may result in chronic activation, promote Th1 and Th17-mediated inflammation, disrupt the Th17/Treg balance, and induce mitochondrial damage, leading to an altered mitochondrial metabolism. Further studies are needed to determine whether the elevated ROS production in these cells has resulted in a generally more active and efficient metabolism, or if chronic activation has caused mitochondrial impairments leading to the observed changes. For example, experiments to assess OXPHOS effectiveness through proton leak measurements could provide additional insights [41].

Based on activation status, oxygen availability, or to compensate for impairments in mitochondrial ATP production, immune cells have to undergo significant alterations in their metabolism [1,71]. To identify alterations in mitochondrial metabolism potentially associated with the elevated ROS levels in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases, we analyzed mitochondrial utilization of glucose, glutamine, and fatty acids of respective cells, as these are the primary metabolic fuel sources in immune cells [6]. The capacity to use glucose for mitochondrial oxidation was 100% in both ERU cases and controls, indicating that the cells' mitochondria retained their full ability to oxidize glucose when other fuel pathways were inhibited (Figure 2). Interestingly, CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases exhibited a significantly lower dependency on mitochondrial glucose oxidation compared to control cells (Figure 2). We hypothesize that this is due to the elevated levels of aerobic glycolysis previously observed in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases [35]. These cells appear to favor the breakdown of glucose to lactate in the cytoplasm rather than oxidizing glucose to CO<sub>2</sub> via pyruvate in the mitochondria. Mitochondrial oxidation of pyruvate is more efficient, providing higher rates of ATP through OXPHOS [72]. However, glycolysis is faster and supplies

pyruvate as an important metabolic intermediate, making it the preferred pathway for activated, proliferating cells [7]. These alterations resulted in a greater flexibility for glucose oxidation in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases, supporting the hypothesis of an activated and metabolically flexible phenotype of these cells [35] (Figure 2).

Although we demonstrated that CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases did not show a significantly different glutamine oxidation compared to controls (Figure 3), the capacity to use glutamine as a mitochondrial fuel was still slightly higher in cells from ERU cases (ERU = 31.25%, Ctr = 16.77%, ns  $p = 0.0662$ ), suggesting that these cells may nevertheless utilize amino acids for mitochondrial oxidation to a greater extent, which merits further investigations. This observation aligns with the known behavior of activated T cells, for instance Th1 cells, which depend on glutaminolysis to support proliferation and IFN $\gamma$  production [1,73]. Specifically, activated T cells have been shown to increase the expression of glutamine transporters [74] and glutamine starvation has been demonstrated to reduce T cell proliferation and cytokine secretion [1,75]. Our data show 0% dependency on glutamine oxidation in both ERU cases and controls, which means that these cells were able to fully compensate for the blocked glutamine pathway by oxidizing alternative fuels, such as glucose and LCFAs.

Regarding these alternative fuels, we were able to demonstrate that CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases showed a significantly higher capacity and flexibility for the mitochondrial oxidation of LCFAs (Figure 4). The dependency on mitochondrial FAO was calculated at 0%, indicating that these cells could fully compensate for blocked FAO by using alternative fuels for mitochondrial respiration. The 0% dependency on glutamine oxidation and FAO is consistent with the fact that these cells had a 100% capacity to utilize glucose for mitochondrial oxidation when other pathways were inhibited. Therefore, any dependency on other fuel sources would be contradictory. A limitation of these findings is that they do not extend to short- and medium-chain fatty acids (SCFAs, MCFAs), which can enter the mitochondria through passive diffusion [76,77]. Consequently, the inhibition of CPT1a with Etomoxir did not affect the mitochondrial oxidation of SCFAs and MCFAs. This may have contributed to the 100% capacity for glucose oxidation, since molecules that enter the mitochondrion via passive diffusion were not addressed in this study. However, as indicated by the significantly higher capacity, CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases appeared to utilize LCFAs for mitochondrial oxidation to a greater extent. This might provide an additional explanation for the observed lower dependency on glucose oxidation (Figure 2). We conclude that the increased ability of these cells to compensate for blocked mitochondrial glucose oxidation could potentially be explained by elevated aerobic glycolysis levels [35], as well as a higher capacity and flexibility for mitochondrial FAO (Figure 4), or the utilization of different alternative fuel sources.

We theorize that the increased capacity and flexibility identified for FAO in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases may be attributed to the chronic activation of these cells, which attempt to meet the high energy demands associated with activation. For that purpose, cells may upregulate FAO, which produces more than twice as many ATP molecules through mitochondrial oxidation compared to glucose or amino acid catabolism [78]. This effect was observed in B-cell lymphomas, which upregulated mitochondrial FAO, likely to meet the high energy demands for rapid growth [79,80]. Furthermore, in CD4<sup>+</sup> tissue-resident memory T (T<sub>RM</sub>) cells from Crohn's disease (CD) patients, an elevated FAO phenotype has been detected, likely due to NF- $\kappa$ B pathway activation [81]. This activation increases the transcription of genes involved in FAO, contributing to a pro-inflammatory and apoptosis-resistant phenotype in these cells [81]. Considering the Th17/Treg balance, the discovery of an enhanced capacity to oxidize LCFAs in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases is particularly intriguing. In a murine model for autoimmune encephalomyelitis (EAE), LCFAs have been shown to promote the differentiation of naïve T cells into Th1 and Th17 cells in vivo, thereby exacerbating the disease [10,82]. Conversely, SCFAs have been found to promote Treg expansion, which improved EAE symptoms [10,82]. In summary, the elevated capacity to oxidize LCFAs in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases may lead to enhanced energy production,

contribute to a pro-inflammatory and apoptosis-resistant phenotype, and promote the expansion of Th1 and Th17 cells in ERU.

Considering therapeutic perspectives, the observed differences in ROS production and mitochondrial oxidation of glucose and fatty acids provide multiple avenues that require further investigation and refinement. Inhibition of FAO through Etomoxir should be explored for ERU-affected horses, as this successfully reversed the FAO-driven altered phenotype in CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> cells in Crohn's disease by reducing their inflammatory capacity and enhancing their apoptosis susceptibility [81]. Modulating the oxidation of LCFAs and SCFAs in CD4<sup>+</sup> T cells also holds promise for the treatment of autoimmune uveitis and ERU by regulating the Th17/Treg balance, potentially enhancing the immunoregulatory effects of Tregs [10,15,59]. Furthermore, we hypothesize that inhibition of mitochondrial respiration or ROS production may offer a strategy to prevent the activation and differentiation of autoreactive T cells, like Th1 and Th17 cells, in ERU-affected horses before they become activated in the peripheral bloodstream and infiltrate the eye. Inhibition of ROS production might also be beneficial in regulating the Th17/Treg balance and preventing the activation of NF- $\kappa$ B [11,81,83]. For example, Fe-curcumin nanozymes, which consist of natural curcumin molecules and ferric ions with superoxide dismutase (SOD)-like enzyme properties, have been tested in a rat model of EAU [66]. In this model, Fe-curcumin effectively suppressed the inflammatory cytokine response of IFN $\gamma$ , IL-17, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release, and inhibited the differentiation of Th1 and Th17 cells [66]. Additionally, vitamin D has gained recognition for its immunomodulatory effects, with low levels being associated with increased severity in Alzheimer's disease [84]. Furthermore, vitamin D supplementation has demonstrated protective effects against oxidative stress in diabetic retinopathy [85]. These findings position vitamin D as a promising subject for further research in the treatment of autoimmune diseases linked to oxidative stress, such as ERU and autoimmune uveitis.

In summary, inhibition of mitochondrial FAO, modulation of the LCFA/SCFA ratio, and inhibition of mitochondrial respiration and ROS production represent promising options for influencing CD4<sup>+</sup> T cell metabolism in ERU-affected horses. These approaches require intensive research to explore their potential for therapeutic intervention in both ERU and autoimmune uveitis.

We conclude that the observed lower dependency on mitochondrial glucose oxidation as well as the higher flexibility for mitochondrial oxidation of glucose and LCFAs might be attributed to an activated metabolic phenotype and higher metabolic flexibility of CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases. This flexibility allows these cells to adapt and sustain energy production even when specific metabolic pathways are inhibited. A higher metabolic flexibility was previously hypothesized for CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases, as these cells exhibited lower basal glycolytic rates, but upon inhibition of mitochondrial respiration, demonstrated increased compensatory glycolysis compared to controls [35]. This suggests that CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases are capable of shifting their metabolic pathways to maintain energy production, highlighting a metabolically flexible phenotype. This flexibility is likely advantageous for sustaining the energy demands necessary for driving an autoimmune response, highlighting the adaptive capabilities of CD4<sup>+</sup> T cells in the context of autoimmune diseases and contributing to their persistence and pathogenicity in conditions like uveitis. The elevated ROS production in CD4<sup>+</sup> T cells from ERU cases is likely both a cause and a consequence of the metabolic alterations, making it a promising target for therapeutic interventions.

Further research is necessary to uncover the underlying causes of the observed metabolic changes, identify the specific cell population responsible, and develop therapeutic strategies to remodel the metabolism of CD4<sup>+</sup> T cells in ERU cases, with a focus on the already identified alterations in glycolysis, OXPHOS, FAO, and ROS production.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Animals, Isolation of Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Ethics Approval for Animal Research

In total, blood from 10 different control horses and 10 different ERU cases was collected for the experiments within this study. Two of the control horses were used in both assays, the other horses were used in either DCF-DA staining or Seahorse XF Mito Fuel Flex Tests. More precisely, CD4<sup>+</sup> T cells from 6 controls and 5 ERU cases were used for the DCF-DA staining. CD4<sup>+</sup> T cells from 6 controls and 5 ERU cases were analyzed in the Seahorse XF Mito Fuel Flex Test. All ERU cases were in a quiescent stage of disease during blood withdrawal. Diagnosis of ERU was conducted by experienced clinicians at the Equine Hospital of LMU Munich, based on typical clinical signs characteristic for uveitis and a documented health history of multiple (two or more) episodes of inflammation in the affected eye that are pivotal signs of ERU [31]. At the time of blood withdrawal, no clinical symptoms of uveitis were present, as these horses were in the quiescent stage of ERU, allowing us to rule out pathogen-associated endophthalmitis. The quiescent intervals between inflammatory episodes can vary from weeks to several months, gradually shortening over time [86]. During acute uveitic episodes, horses are treated with systemic nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and topical immunosuppressive agents but remain untreated during quiescent periods [31,87,88]. Systemic immunosuppressive therapy is reserved for severe cases that are unresponsive to conventional anti-inflammatory treatment [29]. Given the relatively long intervals between acute uveitic episodes [86], the short elimination half-life of NSAIDs [89], and the topical application of corticosteroids [90], these drugs are not present in the blood of the quiescent cases and did not interfere with the peripheral cells. Horses were considered eye-healthy if the owner reported no history of eye inflammations and a routine clinical examination revealed no pathophysiological changes in the eye. Equine whole blood samples were taken from the *vena jugularis* and collected in tubes with heparin sodium (50 I.U. per ml blood; Ratiopharm, Ulm, Germany). Following the sedimentation of blood components, the leukocyte-rich plasma was used for density gradient centrifugation (room temperature (RT), 350× g, 25 min, brake off) with Pancoll separation solution (PanBiotec, Aidenbach, Germany). Lymphocytes were collected from the intermediate phase and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) (4 °C, 800× g, 5 min). Cells were then counted with trypan blue solution (VWR Life Science, Darmstadt, Germany) and used the same day. No experimental animals were used in this study. Collection of blood samples was permitted by the local authority (Regierung von Oberbayern, permit number: ROB-55.2-2532.Vet\_03-22-37).

### 4.2. Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) of CD4<sup>+</sup> T Cells Using LS Columns

To obtain the CD4<sup>+</sup> T cell fraction,  $1 \times 10^8$  lymphocytes were washed (4 °C, 800× g, 5 min) and resuspended in 10 mL MACS buffer (phosphate-buffered saline (pH 7.2), supplemented with 2 mM EDTA (AppliChem, Darmstadt, Germany) and 0.5% bovine serum albumin (Serva, Heidelberg, Germany)). Five µL of mouse anti-horse CD4 antibody (clone CVS4, Biorad, Feldkirchen, Germany, 1:2000) were added and incubated for 20 min at 4 °C. Ten ml of MACS buffer were added and after another washing step (4 °C, 800× g, 5 min), cells were resuspended in 80 µL MACS buffer per  $1 \times 10^7$  cells before adding 20 µL of anti-mouse IgG1 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) per  $1 \times 10^7$  cells, which was incubated for 15 min at 4 °C. After that, the cells were washed again (4 °C, 300× g, 10 min) and resuspended in 500 µL MACS buffer to perform cell sorting. LS columns were used to perform magnetic separation (Miltenyi Biotec). Unlabeled CD4<sup>-</sup> T cells were washed through the columns by adding 3 mL of MACS buffer 3 times, while magnetically labeled CD4<sup>+</sup> T cells remained in the column. To collect the remaining CD4<sup>+</sup> T cells, the column was removed from the magnetic field and rinsed with 5 mL of MACS buffer. The purity of the CD4<sup>+</sup> T cell fraction was tested via flow cytometry after staining of  $2 \times 10^5$  cells of each fraction with 30 µL mouse anti-horse

CD4 FITC labeled antibody (clone MCA1078F, Biorad, Feldkirchen, Germany, 1:10), which resulted in a mean purity of  $98\% \pm 1.7\%$  SD. (Supplementary Figure S1).

#### 4.3. Flow Cytometric Analysis

CD4<sup>+</sup> T cells from controls and ERU cases were stained in 96-well round-bottom plates with  $4 \times 10^5$  cells per well. To quantify ROS production, cells were stained with  $10 \mu\text{M}$  of 2',7'-Dichlor-dihydrofluorescein-diacetate (DCF-DA; Merck, Darmstadt, Germany). After incubation for 30 min at RT, cells were measured before and after 90 min of stimulation with PWM (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany;  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Measurements were performed with a NovoCyte Quanteon flow cytometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Unstimulated cells were set to 1 and the ROS factor of stimulated cells was determined in relation accordingly. Data were analyzed using NovoExpress Software version 1.5.0 (Agilent Technologies). A representative gating strategy is shown in Supplementary Figure S2.

#### 4.4. Real-Time Cell Metabolic Analysis by Seahorse XFe Analyzer

The mitochondrial metabolism of equine CD4<sup>+</sup> T cells (6 controls, 5 ERU cases) was analyzed in eleven independent experiments by measuring the OCR using a Seahorse XFe Analyzer (Agilent Technologies). Dependency (Ctr,  $n = 6$ ; ERU,  $n = 5$ ), capacity, and flexibility (Ctr,  $n = 5$ ; ERU,  $n = 5$ ) were determined. One day before the assay, 24-well plates were coated with  $52 \mu\text{L}$  of Poly-D-Lysine (Merck) according to the manufacturer's protocol. A 1:1000 pre-dilution of the FCCP stock solution (carbonyl cyanide-4-phenylhydrazone; Sigma-Aldrich;  $0.1 \text{ M}$ ) was prepared using a sterile XF assay buffer (Seahorse XF RPMI Medium, pH 7.4; Agilent Technologies). FCCP was then added to the cell suspension at a final concentration of  $1 \mu\text{M}$  for mitochondrial uncoupling.  $8 \times 10^5$  cells were seeded per well in  $200 \mu\text{L}$  of sterile XF assay buffer, which had been supplemented with  $1 \text{ mM}$  pyruvate,  $10 \text{ mM}$  glucose, and  $2 \text{ mM}$  L-glutamine (all three Merck). At least four wells were filled with medium to serve as background correction. Analyses were performed with three technical replicates per horse. The mean values of the technical replicates were then used for further statistical analysis. OCR was reported in units of  $\text{pmol}/\text{min}$ . After cell seeding, the plate was centrifuged at  $2000 \text{ rpm}$  for  $1 \text{ min}$  with low acceleration and low break to ensure the cells were evenly distributed across the bottom of each well. To achieve a final volume of  $500 \mu\text{L}$  per well, all wells were supplemented with  $300 \mu\text{L}$  of XF medium. The cell plate was incubated in a  $\text{CO}_2$ -free incubator for  $20 \text{ min}$  before the assay. Meanwhile, the calibration plate was prepared according to the manufacturer's instructions. Following baseline measurement, the three pathway inhibitors were sequentially injected to determine the percentage of OCR reduced by either a single inhibitor or a combination of the others. These inhibitors included  $120 \mu\text{M}$  BPTES (Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethylsulfide), targeting the glutamine pathway,  $160 \mu\text{M}$  Etomoxir for long-chain fatty acid pathway inhibition, and  $80 \mu\text{M}$  UK5099, a mitochondrial pyruvate carrier inhibitor (all three from Merck). For dependency measurement, the pathway of interest was inhibited during the first injection, followed by inhibition of the two alternative pathways. For capacity, the order was reversed. Through this, the capacity and dependency were assessed for glucose, glutamine, and LCFAs using the Seahorse XF Mito Fuel Flex Test (Agilent Technologies), which allowed for the calculation of the flexibility for each fuel source. Data analysis and interpretation was carried out using the WAVE 2.6 software in accordance with the manufacturer's manual (both Agilent Technologies).

#### 4.5. Statistical Analysis

The Kolmogorov–Smirnov (KS) test was used to determine Gaussian distribution. Since analyzed data showed normal distribution (KS test was not significant;  $p > 0.05$ ), Student's *t*-test was used to test for statistical significance. The results were considered not significant (ns) at  $p > 0.05$  and significant at  $p \leq 0.05$ . Significances are indicated by asterisks with \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , and \*\*\*  $p \leq 0.001$ . GraphPad Prism software

(version 5.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis and graph creation.

**Supplementary Materials:** The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms252111513/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.A.D.; methodology, C.A.D., R.S. and A.L.C.H.; formal analysis, R.S.; investigation, C.A.D., R.S. and A.L.C.H.; resources, C.A.D.; data curation, C.A.D. and R.S.; writing—original draft preparation, C.A.D. and R.S.; writing—review and editing, C.A.D., R.S. and A.L.C.H.; visualization, R.S.; supervision, C.A.D.; project administration, C.A.D.; funding acquisition, C.A.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG DE 719/4-4 (to C.A.D.).

**Institutional Review Board Statement:** No experimental animals were used in this study. Horses were treated according to the ethical principles and guidelines in the ARVO statement for the use of animals in Ophthalmic and Vision research. Collection of blood samples was permitted by the local authority (Regierung von Oberbayern, permit number: ROB-55.2-2532.Vet\_03-22-37, date of approval: 16 January 2023, permit effective from 20 January 2023).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors want to thank the staff from LMU Munich equine clinic for supplying equine blood samples, Tanja Weisser, Ursula Cramer and Jonas Liedl for technical assistance and Roxane Degroote, Felix Gard, Adrian Schmalen and Heidi Duda for critical discussion.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Noble, J.; Macek Jilkova, Z.; Aspor, C.; Malvezzi, P.; Fribourg, M.; Riella, L.V.; Cravedi, P. Harnessing Immune Cell Metabolism to Modulate Alloresponse in Transplantation. *Transpl. Int.* **2024**, *37*, 12330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wu, H.A.-O.; Zhao, X.; Hochrein, S.M.; Eckstein, M.; Gubert, G.A.-O.X.; Knöpper, K.A.-O.; Mansilla, A.M.; Öner, A.; Doucet-Ladevèze, R.; Schmitz, W.A.-O.; et al. Mitochondrial dysfunction promotes the transition of precursor to terminally exhausted T cells through HIF-1 $\alpha$ -mediated glycolytic reprogramming. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 6858. [[CrossRef](#)]
3. Shang, E.; Nguyen, T.T.T.; Westhoff, M.A.; Karpel-Massler, G.; Siegelin, M.D. Targeting cellular respiration as a therapeutic strategy in glioblastoma. *Oncotarget* **2023**, *14*, 419–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [[CrossRef](#)]
5. Tang, X.; Mao, X.; Ling, P.; Yu, M.; Pan, H.; Wang, J.; Liu, M.; Pan, H.; Qiu, W.; Che, N.; et al. Glycolysis inhibition induces anti-tumor central memory CD8(+)T cell differentiation upon combination with microwave ablation therapy. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 4665. [[CrossRef](#)]
6. Yang, W.A.-O.; Yu, T.; Cong, Y.A.-O. CD4(+) T cell metabolism, gut microbiota, and autoimmune diseases: Implication in precision medicine of autoimmune diseases. *Precis. Clin. Med.* **2022**, *5*, pbac018. [[CrossRef](#)]
7. Hochrein, S.M.; Wu, H.; Eckstein, M.; Arrigoni, L.; Herman, J.S.; Schumacher, F.; Gerecke, C.; Rosenfeldt, M.; Grün, D.; Kleuser, B.; et al. The glucose transporter GLUT3 controls T helper 17 cell responses through glycolytic-epigenetic reprogramming. *Cell Metab.* **2022**, *34*, 516–532. [[CrossRef](#)]
8. Muri, J.; Kopf, M. Redox regulation of immunometabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 363–381. [[CrossRef](#)]
9. Macintyre, A.N.; Gerriets, V.A.; Nichols, A.G.; Michalek, R.D.; Rudolph, M.C.; Deoliveira, D.; Anderson, S.M.; Abel, E.D.; Chen, B.J.; Hale, L.P.; et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 61–72. [[CrossRef](#)]
10. Ma, S.; Ming, Y.; Wu, J.; Cui, G. Cellular metabolism regulates the differentiation and function of T-cell subsets. *Cell Mol. Immunol.* **2024**, *21*, 419–435. [[CrossRef](#)]
11. Gülow, K.; Tümen, D.; Heumann, P.; Schmid, S.; Kandulski, A.; Müller, M.; Kunst, C. Unraveling the Role of Reactive Oxygen Species in T Lymphocyte Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 6114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Nolfi-Donagan, D.; Braganza, A.; Shiva, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* **2020**, *37*, 101674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Chang, C.H.; Curtis, J.D.; Maggi, L.B.; Faubert, B.; Villarino, A.V.; O'Sullivan, D.; Huang, S.C.-C.; van der Windt, G.J.W.; Blagih, J.; Qiu, J.; et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* **2013**, *153*, 1239–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Maduka, C.V.; Kuhnert, M.M.; Habeeb, O.M.; Tundo, A.; Makela, A.V.; Goodman, S.B.; Contag, C.H. Elevated oxidative phosphorylation is critical for immune cell activation by polyethylene wear particles. *J. Immunol. Regen. Med.* **2023**, *19*, 100069. [[CrossRef](#)]
15. Shu, P.; Liang, H.; Zhang, J.; Lin, Y.; Chen, W.; Zhang, D. Reactive oxygen species formation and its effect on CD4(+) T cell-mediated inflammation. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1199233. [[CrossRef](#)]
16. Starkov, A.A.; Fiskum, G.; Chinopoulos, C.; Lorenzo, B.J.; Browne, S.E.; Patel, M.S.; Beal, M.F. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 7779–7788. [[CrossRef](#)]
17. Long, D.L.; McCall, C.E.; Poole, L.B. Glutathionylation of pyruvate dehydrogenase complex E2 and inflammatory cytokine production during acute inflammation are magnified by mitochondrial oxidative stress. *Redox Biol.* **2023**, *65*, 102841. [[CrossRef](#)]
18. Liu, Y.; Chen, W.; Li, C.; Li, L.; Yang, M.; Jiang, N.; Luo, S.; Xi, Y.; Liu, C.; Han, Y.; et al. DsbA-L interacting with catalase in peroxisome improves tubular oxidative damage in diabetic nephropathy. *Redox Biol.* **2023**, *66*, 102855. [[CrossRef](#)]
19. Diaz, J.M.; Shi, X. NOX-like ROS production by glutathione reductase. *iScience* **2022**, *25*, 105093. [[CrossRef](#)]
20. Kowalczyk, P.; Sulejczak, D.; Kleczkowska, P.; Bukowska-Osko, I.; Kucia, M.; Popiel, M.; Wietrak, E.; Kramkowski, K.; Wrzosek, K.; Kaczynska, K. Mitochondrial Oxidative Stress-A Causative Factor and Therapeutic Target in Many Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13384. [[CrossRef](#)]
21. Wang, L.; Lu, Z.; Zhao, J.; Schank, M.; Cao, D.; Dang, X.; Nguyen, L.N.; Nguyen, L.N.T.; Khanal, S.; Zhang, J.; et al. Selective oxidative stress induces dual damage to telomeres and mitochondria in human T cells. *Aging Cell* **2021**, *20*, e13513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Abad, C.; Pinal-Fernandez, I.; Guillou, C.; Bourdenet, G.; Drouot, L.; Cosette, P.; Giannini, M.; Debrut, L.; Jean, L.; Bernard, S.; et al. IFN $\gamma$  causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in myositis. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 5403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhang, Z.; Cheng, B.; Du, W.; Zeng, M.; He, K.; Yin, T.; Shang, S.; Su, T.; Han, D.; Gan, X.; et al. The Role of Nicotinamide Mononucleotide Supplementation in Psoriasis Treatment. *Antioxidants* **2024**, *13*, 186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Huang, J.; Wang, X.; Li, N.; Fan, W.; Li, X.; Zhou, Q.; Liu, J.; Li, W.; Zhang, Z.; Liu, X.; et al. YY1 Lactylation Aggravates Autoimmune Uveitis by Enhancing Microglial Functions via Inflammatory Genes. *Adv. Sci.* **2024**, *11*, 2470110. [[CrossRef](#)]
25. Zhang, M.; Zhang, X. T cells in ocular autoimmune uveitis: Pathways and therapeutic approaches. *Int. Immunopharmacol.* **2023**, *114*, 109565. [[CrossRef](#)]
26. Zhang, C.; Liu, X.; Xiao, J.; Jiang, F.; Fa, L.; Jiang, H.; Zhou, L.; Su, W.; Xu, Z.  $\gamma\delta$  T cells in autoimmune uveitis pathogenesis: A promising therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* **2023**, *213*, 115629. [[CrossRef](#)]
27. Chen, Y.H.; Eskandarpour, M.; Zhang, X.; Galatowicz, G.; Greenwood, J.; Lightman, S.; Calder, V.A.-O. Small-molecule antagonist of VLA-4 (GW559090) attenuated neuro-inflammation by targeting Th17 cell trafficking across the blood-retinal barrier in experimental autoimmune uveitis. *J. Neuroinflamm.* **2021**, *18*, 49. [[CrossRef](#)]
28. Sharma, M.; Pal, P.; Gupta, S.K. Microglial mediators in autoimmune Uveitis: Bridging neuroprotection and neurotoxicity. *Int. Immunopharmacol.* **2024**, *136*, 112309. [[CrossRef](#)]
29. Hoffmann, A.L.C.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A.; Degroote, R.L. Pre-Activated Granulocytes from an Autoimmune Uveitis Model Show Divergent Pathway Activation Profiles upon IL8 Stimulation In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9555. [[CrossRef](#)]
30. Degroote, R.L.; Schmalen, A.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. Unveiling Differential Responses of Granulocytes to Distinct Immunostimulants with Implications in Autoimmune Uveitis. *Biomedicines* **2024**, *12*, 19. [[CrossRef](#)]
31. Deeg, C.A.; Kaspers, B.; Gerhards, H.; Thurau, S.R.; Wollanke, B.; Wildner, G. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 393–398. [[PubMed](#)]
32. Kingsley, N.A.-O.; Sandmeyer, L.A.-O.; Bellone, R.A.-O. A review of investigated risk factors for developing equine recurrent uveitis. *Vet. Ophthalmol.* **2022**, *26*, 86–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Malalana, F.; Stylianides, A.; McGowan, C. Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives. *Vet. J.* **2015**, *206*, 22–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Deeg, C.A.; Hauck, S.M.; Amann, B.; Pompetzki, D.; Altmann, F.; Raith, A.; Schmalzl, T.; Stangassinger, M.; Ueffing, M. Equine recurrent uveitis—a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res.* **2008**, *40*, 151–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Barfusser, C.; Wiedemann, C.; Hoffmann, A.L.C.; Hirmer, S.; Deeg, C.A. Altered Metabolic Phenotype of Immune Cells in a Spontaneous Autoimmune Uveitis Model. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 601619. [[CrossRef](#)]
36. Mellstedt, H. In vitro activation of human T and B lymphocytes by pokeweed mitogen. *Clin. Exp. Immunol.* **1975**, *19*, 75.
37. Sena, L.A.; Li, S.; Jairaman, A.; Prakriya, M.; Ezponda, T.; Hildeman, D.A.; Wang, C.R.; Schumacker, P.T.; Licht, J.D.; Perlman, H.; et al. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* **2013**, *38*, 225–236. [[CrossRef](#)]
38. Schank, M.; Zhao, J.; Wang, L.; Nguyen, L.N.; Zhang, Y.; Wu, X.Y.; Zhang, J.; Jiang, Y.; Ning, S.; El Gazzar, M.; et al. ROS-Induced Mitochondrial Dysfunction in CD4 T Cells from ART-Controlled People Living with HIV. *Viruses* **2023**, *15*. [[CrossRef](#)]
39. Schlaepfer, I.R.; Joshi, M. CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Endocrinology* **2020**, *161*, bqz046. [[CrossRef](#)]

40. Horohov, D.W. The equine immune responses to infectious and allergic disease: A model for humans? *Mol. Immunol.* **2015**, *66*, 89–96. [[CrossRef](#)]
41. Wincup, C.; Wilkinson, M.; Radziszewska, A.; Robinson, G.; Rahman, A. POS0295 CD4+ T cells demonstrate metabolic reprogramming characterised by increased reactive oxygen species formation and enhanced atp generation in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **2023**, *82*, 389. [[CrossRef](#)]
42. Wojtala, A.; Bonora, M.; Malinska, D.; Pinton, P.; Duszynski, J.; Wieckowski, M.R. Chapter Thirteen—Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. In *Methods in Enzymology*; Galluzzi, L., Kroemer, G., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; Volume 542, pp. 243–262.
43. Jackson, S.H.; Devadas, S.; Kwon, J.; Pinto, L.A.; Williams, M.S. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 818–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kaminski, M.; Kießling, M.; Süß, D.; Krammer, P.H.; Gülow, K. Novel role for mitochondria: Protein kinase C $\theta$ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol. Cell Biol.* **2007**, *27*, 3625–3639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. de Haan, L.R.; Reiniers, M.J.; Reeskamp, L.F.; Belkouz, A.; Ao, L.; Cheng, S.; Ding, B.; van Golen, R.F.; Heger, M. Experimental Conditions That Influence the Utility of 2'7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH2-DA) as a Fluorogenic Biosensor for Mitochondrial Redox Status. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lee, C.; Nam, J.S.; Lee, C.G.; Park, M.; Yoo, C.-M.; Rhee, H.-W.; Seo, J.K.; Kwon, T.-H. Analysing the mechanism of mitochondrial oxidation-induced cell death using a multifunctional iridium(III) photosensitiser. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 26. [[CrossRef](#)]
47. Lin, W.; Shen, P.; Song, Y.; Huang, Y.; Tu, S. Reactive Oxygen Species in Autoimmune Cells: Function, Differentiation, and Metabolism. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 635021. [[CrossRef](#)]
48. Schreck, R.; Rieber, P.; Baeuerle, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **1991**, *10*, 2247–2258. [[CrossRef](#)]
49. Padgett, L.E.; Tse, H.M. NADPH Oxidase-Derived Superoxide Provides a Third Signal for CD4 T Cell Effector Responses. *J. Immunol.* **2016**, *197*, 1733–1742. [[CrossRef](#)]
50. Saldinger, L.K.; Nelson, S.G.; Bellone, R.R.; Lassaline, M.; Mack, M.; Walker, N.J.; Borjesson, D.L. Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells in vitro. *Vet. Ophthalmol.* **2020**, *23*, 160–170. [[CrossRef](#)]
51. Jiang, R.; Zhou, H.; Kong, X.; Zhou, Z. Reactive Oxygen Species Modulate Th17/Treg Balance in Chlamydia psittaci Pneumonia via NLRP3/IL-1 $\beta$ /Caspase-1 Pathway Differentiation. *Folia Biol.* **2024**, *70*, 74. [[CrossRef](#)]
52. Ma, J.G.; Wu, G.J.; Xiao, H.L.; Xiao, Y.M.; Zha, L.A.-O. Vitamin D has an effect on airway inflammation and Th17/Treg balance in asthmatic mice. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2021**, *37*, 1113–1121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Xie, Y.; Deng, Q.; Guo, M.; Li, X.; Xian, D.; Zhong, J. Proanthocyanidins: A novel approach to Henoch-Schonlein purpura through balancing immunity and arresting oxidative stress via TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway (Review). *Exp. Ther. Med.* **2023**, *25*, 300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Murdaca, G.; Colombo, B.M.; Puppo, F. The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Intern. Emerg. Med.* **2011**, *6*, 487–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ziolkowska, M.; Koc, A.; Luszczkiewicz, G.; Ksiezopolska-Pietrzak, K.; Klimczak, E.; Chwalinska-Sadowska, H.; Maslinski, W. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 2832–2838. [[CrossRef](#)]
56. Crispin, J.C.; Oukka, M.; Bayliss, G.; Cohen, R.A.; Van Beek, C.A.; Stillman, I.E.; Kytтары, V.C.; Juang, Y.-T.; Tsokos, G.C. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 8761–8766. [[CrossRef](#)]
57. Regan, D.P.; Aarnio, M.C.; Davis, W.S.; Carmichael, K.P.; Vandenplas, M.L.; Lauderdale, J.D.; Moore, P.A. Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Vet. Ophthalmol.* **2012**, *15*, 145–152. [[CrossRef](#)]
58. Luger, D.; Silver, P.B.; Tang, J.; Cua, D.; Chen, Z.; Iwakura, Y.; Bowman, E.P.; Sgambellone, N.M.; Chan, C.-C.; Caspi, R.R. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: Conditions of disease induction affect dominant effector category. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 799–810. [[CrossRef](#)]
59. Ruggieri, S.; Frassanito, M.A.; Dammacco, R.; Guerriero, S. Treg lymphocytes in autoimmune uveitis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **2012**, *20*, 255–261. [[CrossRef](#)]
60. Yeh, S.; Li, Z.; Forooghian, F.; Hwang, F.S.; Cunningham, M.A.; Pantanelli, S.; Nussenblatt, R.B. CD4+Foxp3+ T-regulatory cells in noninfectious uveitis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **2009**, *127*, 407–413. [[CrossRef](#)]
61. Degroote, R.L.; Deeg, C.A. Immunological Insights in Equine Recurrent Uveitis. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 609855. [[CrossRef](#)]
62. Murdaca, G.; Greco, M.; Tonacci, A.; Negrini, S.; Borro, M.; Puppo, F.; Gangemi, S. IL-33/IL-31 Axis in Immune-Mediated and Allergic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Li, P.; Lin, W.; Zheng, X. IL-33 Neutralization Suppresses Lupus Disease in Lupus-Prone Mice. *Inflammation* **2014**, *37*, 824–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Barbour, M.; Allan, D.; Xu, H.; Pei, C.; Chen, M.; Niedbala, W.; Fukada, S.Y.; Besnard, A.-G.; Alves-Filho, J.C.; Tong, X.; et al. IL-33 attenuates the development of experimental autoimmune uveitis. *Eur. J. Immunol.* **2014**, *44*, 3320–3329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lin, Q.; Li, K.; Chen, Y.; Xie, J.; Wu, C.; Cui, C.; Deng, B.A.-O. Oxidative Stress in Diabetic Peripheral Neuropathy: Pathway and Mechanism-Based Treatment. *Mol. Neurobiol.* **2023**, *60*, 4574–4594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

66. Jiang, Z.; Liang, K.; Gao, X.; Cao, F.; An, G.; Gui, S.; Tang, W.; Du, L.; Tao, L.; Wang, X.A.-O.X. Fe-curcumin nanozyme-mediated immunosuppression and anti-inflammation in experimental autoimmune uveitis. *Biomater. Res.* **2023**, *27*, 131. [[CrossRef](#)]
67. Ung, L.; Pattamatta, U.; Carnit, N.; Wilkinson-Berka, J.L.; Liew, G.; White, A.J.R. Oxidative stress and reactive oxygen species: A review of their role in ocular disease. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 2865–2883. [[CrossRef](#)]
68. Hsu, S.-M.; Yang, C.-H.; Teng, Y.-T.; Tsai, H.-Y.; Lin, C.-Y.; Lin, C.-J.; Shieh, C.-C.; Chen, S.-H. Suppression of the Reactive Oxygen Response Alleviates Experimental Autoimmune Uveitis in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*. [[CrossRef](#)]
69. Moradi Vastegani, S.; Nasrolahi, A.; Ghaderi, S.; Belali, R.; Rashno, M.; Farzaneh, M.; Khoshnam, S.E. Mitochondrial Dysfunction and Parkinson’s Disease: Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Neurochem. Res.* **2023**, *48*, 2285–2308. [[CrossRef](#)]
70. Zong, Y.; Li, H.; Liao, P.A.-O.; Chen, L.; Pan, Y.; Zheng, Y.; Zhang, C.; Liu, D.; Zheng, M.A.-O.; Gao, J.A.-O. Mitochondrial dysfunction: Mechanisms and advances in therapy. *Nature* **2024**, *9*, 124. [[CrossRef](#)]
71. Chakrabarti, R.A.-O.; Fung, T.A.-O.; Kang, T.A.-O.X.; Elonkirjo, P.W.; Suomalainen, A.A.-O.; Usherwood, E.A.-O.; Higgs, H.A.-O. Mitochondrial dysfunction triggers actin polymerization necessary for rapid glycolytic activation. *J. Cell Biol.* **2022**, *221*, e202201160. [[CrossRef](#)]
72. Psarras, A.; Clarke, A. A cellular overview of immunometabolism in systemic lupus erythematosus. *Oxf. Open Immunol.* **2023**, *4*, iqad005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Xu, Y.; Li, M.; Lin, M.; Cui, D.; Xie, J. Glutaminolysis of CD4(+) T Cells: A Potential Therapeutic Target in Viral Diseases. *J. Inflamm. Res.* **2024**, *17*, 603–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Carr, E.L.; Kelman, A.; Wu, G.S.; Gopaul, R.; Senkevitch, E.; Aghvanyan, A.; Turay, A.M.; Frauwirth, K.A. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 1037–1044. [[CrossRef](#)]
75. Hammami, I.; Chen, J.; Bronte, V.; DeCrescenzo, G.; Jolicoeur, M. L-glutamine is a key parameter in the immunosuppression phenomenon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *425*, 724–729. [[CrossRef](#)]
76. Schönfeld, P.; Wojtczak, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 943–954. [[CrossRef](#)]
77. Cucchi, D.; Camacho-Muñoz, D.; Certo, M.; Pucino, V.; Nicolaou, A.; Mauro, C. Fatty acids—from energy substrates to key regulators of cell survival, proliferation and effector function. *Cell Stress* **2019**, *4*, 9. [[CrossRef](#)]
78. Zhou, X.; Zhu, X.; Zeng, H. Fatty acid metabolism in adaptive immunity. *FEBS J.* **2021**, *290*, 584–599. [[CrossRef](#)]
79. De Oliveira, M.P.; Liesa, M. The Role of Mitochondrial Fat Oxidation in Cancer Cell Proliferation and Survival. *Cells* **2020**, *9*, 2600. [[CrossRef](#)]
80. Caro, P.; Kishan, A.U.; Norberg, E.; Stanley, I.A.; Chapuy, B.; Ficarro, S.B.; Polak, K.; Tondera, D.; Gounarides, J.; Yin, H.; et al. Metabolic Signatures Uncover Distinct Targets in Molecular Subsets of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 547–560. [[CrossRef](#)]
81. Liang, G.; Huang, J.; Chen, J.; Wen, X.; Li, R.; Xie, H.; Zhang, Z.; Chen, Z.; Chen, Y.; Xian, Z.; et al. Fatty Acid Oxidation Promotes Apoptotic Resistance and Proinflammatory Phenotype of CD4(+) Tissue-resident Memory T cells in Crohn’s Disease. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2024**, *17*, 939–964. [[CrossRef](#)]
82. Haghikia, A.; Jörg, S.; Duscha, A.; Berg, J.; Manzel, A.; Waschbisch, A.; Hammer, A.; Lee, D.-H.; May, C.; Wilck, N.; et al. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity* **2015**, *43*, 817–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Ming, S.; Tian, J.; Ma, K.; Pei, C.; Li, L.; Wang, Z.; Fang, Z.; Liu, M.; Dong, H.; Li, W.; et al. Oxalate-induced apoptosis through ERS-ROS–NF- $\kappa$ B signalling pathway in renal tubular epithelial cell. *Mol. Med.* **2022**, *28*, 88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Murdaca, G.; Banchemo, S.; Tonacci, A.; Nencioni, A.; Monacelli, F.; Gangemi, S. Vitamin D and Folate as Predictors of MMSE in Alzheimer’s Disease: A Machine Learning Analysis. *Diagnostics* **2021**, *11*, 940. [[CrossRef](#)]
85. Valle, M.A.-O.; Russo, C.A.-O.; Malaguarnera, L.A.-O. Protective role of vitamin D against oxidative stress in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2021**, *37*, e3447. [[CrossRef](#)]
86. Wollanke, B.; Gerhards, H.; Ackermann, K. Infectious Uveitis in Horses and New Insights in Its Leptospiral Biofilm-Related Pathogenesis. *Microorganisms* **2022**, *10*, 387. [[CrossRef](#)]
87. Voelter, K.; Vial, Z.; Pot, S.A.; Spiess, B.M. Leptospiral antibody prevalence and surgical treatment outcome in horses with Equine Recurrent Uveitis (ERU) in Switzerland. *Vet. Ophthalmol.* **2020**, *23*, 648–658. [[CrossRef](#)]
88. McMullen, R.J., Jr.; Fischer, B.M. Medical and Surgical Management of Equine Recurrent Uveitis. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2017**, *33*, 465–481. [[CrossRef](#)]
89. Knych, H.K. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use in Horses. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2017**, *33*, 1–15. [[CrossRef](#)]
90. Gilger, B.C.; Michau, T.M. Equine recurrent uveitis: New methods of management. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2004**, *20*, 417–427. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 4 DISKUSSION

Die ERU ist eine Autoimmunerkrankung mit hoher Prävalenz bei Pferden weltweit, die sich durch die Beteiligung autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen auszeichnet (DEEG et al., 2001; GERDING und GILGER, 2016). Diese werden auf bisher unbekannte Weise im peripheren Blut aktiviert und wandern zu Beginn eines jeden Entzündungsschubs ins Auge ein, wo sie mit retinalen Autoantigenen reagieren und uveitische Episoden auslösen (DEEG et al., 2001; DEEG et al., 2004a; DEEG et al., 2006b; WIEDEMANN et al., 2020). Aus diesem Grund stehen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Fokus der ERU-Forschung. Der Metabolismus von T-Zellen beeinflusst ihre Differenzierung und Funktion (MA et al., 2024). Eine Fehlsteuerung dieser Prozesse wird daher mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht und ein Eingreifen in diesen fehlgesteuerten Zellmetabolismus ermöglicht potenziell neue Therapieansätze (LIN et al., 2024). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Metabolismus von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut von an ERU erkrankten Pferden detaillierter zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollte ermittelt werden, ob die gesteigerte OXPHOS-Aktivität, die bereits in früheren Experimenten für diese Zellen ermittelt wurde (BARFUSSER et al., 2021), zu einer erhöhten Produktion von ROS in diesen Zellen führt. Zu diesem Zweck wurde die ROS-Produktion in den peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und gesunden Kontrollpferden quantifiziert. Diese Untersuchungen offenbarten eine 1,7-fach erhöhte ROS-Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden (Publikation, Figure 1). Die vorliegende Arbeit beschreibt somit zum ersten Mal, dass bei Pferden, die an ERU erkrankt sind, eine erhöhte Produktion von ROS in peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorliegt. Beim Pferd sind die genauen Mechanismen, die zur Entstehung von ROS in T-Zellen beitragen, bislang nicht umfassend untersucht worden (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 07.12.2024). Angesichts dieser Wissenslücke ist es sinnvoll, Erkenntnisse aus der humanen Forschung heranzuziehen. Beim Menschen entstehen ROS bei verschiedenen enzymatischen und nicht-enzymatischen Prozessen, insgesamt gibt es mindestens 41 ROS-produzierende Enzyme in der menschlichen Zelle (SIES und JONES, 2020). Die Entstehung von ROS wird dabei durch den Umstand gefördert, dass die einstufige Elektronenreduktion von Sauerstoff thermodynamisch gegenüber der zweistufigen Elektronenreduktion begünstigt ist

(OKOYE et al., 2023). Die einstufige Reduktion von molekularem Sauerstoff führt zur Bildung von Superoxid, welches entweder spontan oder durch SODs rasch zu Wasserstoffperoxid umgesetzt wird (RETH, 2002; GILL und LEVINE, 2013; OKOYE et al., 2023). Wird Wasserstoffperoxid einer einstufigen Elektronenreduktion unterzogen, entsteht das hochreaktive Hydroxylradikal (OKOYE et al., 2023). Obwohl Wasserstoffperoxid kein Radikal ist, zählt es zu den reaktiven Sauerstoffspezies (OKOYE et al., 2023; GÜLOW et al., 2024). Es hat eine längere Halbwertszeit als Superoxid und kann Zellmembranen speziesübergreifend durch Aquaporin-vermittelte Diffusion passieren (FINN und CERDA, 2015; BESTETTI et al., 2020; WANG et al., 2020). Diese Eigenschaften ermöglichen es Wasserstoffperoxid, in menschlichen T-Zellen als sekundärer Botenstoff zu wirken, der an der T-Zell-Rezeptor-initiierten Signaltransduktion beteiligt ist (RETH, 2002; GILL und LEVINE, 2013). In den Mitochondrien von Säugetieren wurden insgesamt elf Produktionsstätten für Superoxid und Wasserstoffperoxid identifiziert, die mit der Substratoxidation, dem Elektronentransport und der OXPHOS zusammenhängen (BRAND, 2016). Ein erhöhter Elektronenfluss durch die mitochondriale Atmungskette korreliert in Immunzellen von Menschen und Mäusen mit einer gesteigerten ROS-Produktion, die hauptsächlich durch die Komplexe I und III der Atmungskette entsteht (KAMINSKI et al., 2010; KAMIŃSKI et al., 2013; OKOYE et al., 2023). In humanen T-Zellen sind die Mitochondrien daher eine zentrale Quelle für zelluläre ROS (KAMINSKI et al., 2010; KAMIŃSKI et al., 2013; SIES und JONES, 2020). Unsere Funde einer gesteigerten OXPHOS-Aktivität (BARFUSSER et al., 2021) und einer erhöhten ROS-Produktion in peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden legen demnach nahe, dass die mitochondriale Atmungskette eine zentrale Rolle bei der pathologisch erhöhten ROS-Produktion spielen könnte. Da die Messung der ROS-Produktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht Mitochondrien-spezifisch war, sondern die zelluläre Gesamt-ROS-Produktion erfasste, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Quellen zu der erhöhten ROS-Produktion beigetragen haben. In den T-Zellen von Pferden wurde die ROS-Produktion außerhalb der Mitochondrien bisher nicht genau untersucht (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 09.12.2024). Beim Menschen gehören zu den 41 identifizierten ROS-produzierenden Enzymen in der Zelle unter anderem auch solche, die im endoplasmatischen Retikulum, in den Peroxisomen und der Plasmamembran aktiv sind (SIES und JONES,

2020). Besonders hervorzuheben sind darunter die NADPH-Oxidasen, die vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert sind und in Immunzellen von Menschen und Mäusen eine zentrale Rolle bei der kontrollierten Produktion von ROS spielen (KAMIŃSKI et al., 2013; SIES und JONES, 2020). Bei Pferden gibt es bislang keine spezifischen Informationen zur Aktivität von NADPH-Oxidasen in T-Zellen (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 09.12.2024). In murinen T-Zellen trägt die NADPH-Oxidase 2 als Folge der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung durch eine kontrollierte ROS-Produktion zur Aufrechterhaltung des oxidativen Signals bei, das essenziell ist für die T-Zell-Aktivierung (JACKSON et al., 2004; GÜLOW et al., 2024). Humane T-Zellen zeigten im Vergleich dazu nur eine geringe Aktivität der NADPH-Oxidase 2, was auf artspezifische Unterschiede bei der Regulation der ROS-Produktion hinweist (KAMIŃSKI et al., 2013). Die Aktivität der NADPH-Oxidase 2 wurde jedoch bereits bei Patienten mit Multipler Sklerose untersucht (TAVASSOLIFAR et al., 2020). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit Multipler Sklerose, die sich im wiederkehrenden Schub befanden, zeigten eine signifikant höhere ROS-Produktion im Vergleich zu Patienten in der Remissionsphase und gesunden Kontrollpersonen (TAVASSOLIFAR et al., 2020). Zusätzlich war auch die ROS-Produktion von Patienten in der Remissionsphase höher als die von gesunden Individuen (TAVASSOLIFAR et al., 2020). Die PBL von Patienten im akuten Schub wiesen außerdem eine signifikant höhere Expression des Gens für die NADPH-Oxidase 2 auf, was eine zentrale Rolle dieses Enzyms bei der erhöhten ROS-Produktion nahelegte (TAVASSOLIFAR et al., 2020). Bei Pferden wurde eine Aktivität der NADPH-Oxidase 2 bisher lediglich in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen (DEROCHETTE et al., 2013). Dennoch ist es denkbar, dass auch bei Pferden die NADPH-Oxidase 2 eine Rolle bei der aktivierungsinduzierten ROS-Produktion in T-Zellen spielt. Um den Ursprung der detektierten ROS genauer zu bestimmen, wären Mitochondrien-spezifische Messungen der ROS-Produktion erforderlich, beispielsweise durch den Einsatz von mitochondrialem Superoxid-Indikator, einem fluoreszierenden Farbstoff, der spezifisch mitochondriale ROS detektiert (WOJTALA et al., 2014). Dieser ist jedoch aufgrund von toxischen Eigenschaften auf die Zellen und die Mitochondrien mit Einschränkungen verbunden (WOJTALA et al., 2014). Alternativ könnten nachfolgende Studien eine differenzierte Proteomanalyse isolierter mitochondrialer Proteine von CD4<sup>+</sup> T-Zellen umfassen. Diese hochsensible Methode könnte detaillierte Einblicke in veränderte

Proteine liefern, die mit der gesteigerten ROS-Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden assoziiert sind. Solche Untersuchungen würden klären, ob eine gezielte Inhibierung der mitochondrialen Atmung sinnvoll wäre, um die ROS-Produktion zu hemmen, oder ob der Einsatz allgemeiner Antioxidantien erforderlich ist, um die gesamte zelluläre ROS-Produktion zu adressieren.

Da eine erhöhte ROS-Produktion bisher weder in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit autoimmuner Uveitis noch in anderen Pferdmodellen beschrieben wurde (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 07.12.2024), kann ihre Rolle in der Pathogenese der ERU aktuell nur gemutmaßt werden. Betrachtet man jedoch andere Autoimmunerkrankungen und Tiermodelle, liefern diese Hinweise darauf, dass die erhöhte ROS-Produktion in Kombination mit der gesteigerten OXPHOS-Aktivität (BARFUSSER et al., 2021) in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden auf einen aktivierten Phänotyp mit mitochondrialen Schäden hinweist, der die Autoimmunreaktion begünstigt: Bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes wurde beispielsweise eine signifikant erhöhte Produktion mitochondrialer ROS festgestellt (TAN et al., 2024). Darüber hinaus zeigten diese Zellen ein gesteigertes mitochondriales Membranpotential sowie eine mittels quantitativer PCR nachgewiesene höhere Anzahl an mitochondrialen DNA-Kopien im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (TAN et al., 2024). Auch eine gesteigerte OXPHOS-Aktivität mit erhöhtem Protonenverlust innerhalb der mitochondrialen Atmungskette konnte für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Lupus-Patienten festgestellt werden (WINCUP et al., 2023). Die genaue Bedeutung dieser Befunde ist unklar, allerdings wurde aufgrund der erhöhten Protonenverluste und der mitochondrialen Schäden die Hypothese aufgestellt, dass der chronisch aktivierte Zustand dieser Zellen einen erschöpften Phänotyp begünstigt hat, der dann in einem ineffizienteren Energiemetabolismus mit kompensatorisch gesteigerter OXPHOS-Aktivität und erhöhter ROS-Produktion resultierte (WINCUP et al., 2023; TAN et al., 2024). Schädliche Effekte von erhöhten ROS-Werten auf die Mitochondrien von equinen T-Zellen wurden bisher nicht nachgewiesen (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 07.12.2024). In humanen T-Zellen schädigt jedoch eine Überproduktion von ROS erwiesenermaßen die Mitochondrien, unter anderem über eine Oxidation der mitochondrialen DNA (WANG et al., 2021). Das menschliche mitochondriale Genom kodiert 13 Polypeptide, die Bestandteile der OXPHOS sind (SHANG et al., 2023). Dazu

gehören sieben Polypeptide aus Komplex I der Atmungskette, ein Polypeptid aus Komplex III, drei aus Komplex IV sowie zwei Polypeptide der ATP-Synthase (SHANG et al., 2023). An Jurkat-T-Zellen, einer humanen Zelllinie, wurden die schädlichen Effekte von ROS auf Mitochondrien untersucht: Eine Überproduktion von ROS schädigte die Mitochondrien, was mitochondriale Dysfunktionen nach sich zog (WANG et al., 2021). Diese mitochondrialen Dysfunktionen waren charakterisiert durch ein beeinträchtigt mitochondrial Membranpotential, eine Verringerung der maximalen respiratorischen Kapazität und der respiratorischen Reservekapazität im Vergleich zu Kontrollen (WANG et al., 2021). Um die Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden zu bewerten, wurde bereits die maximale respiratorische Kapazität dieser Zellen untersucht (BARFUSSER et al., 2021). Diese Untersuchung ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Zellen gesunder Kontrollpferde (BARFUSSER et al., 2021). Demnach scheinen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden in der Lage zu sein, die OXPHOS effektiv zu nutzen, was gegen eine mitochondriale Dysfunktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden spricht (BARFUSSER et al., 2021). Zur Bestätigung dieser Annahme wären jedoch weitere Untersuchungen sinnvoll, wie die Untersuchung des mitochondrialen Membranpotenzials über die Anwendung von MitoTracker Orange, einem Fluoreszenzfarbstoff, der die Mitochondrien in lebenden Zellen färbt und dessen Anreicherung vom Membranpotential abhängt (AGNELLO et al., 2008). Zudem wäre eine Analyse der mitochondrialen DNA mittels quantitativer PCR hilfreich, um Schäden durch oxidativen Stress festzustellen (WANG et al., 2021). Zusätzlich könnte die bereits erwähnte differenzierte Proteomanalyse isolierter mitochondrialer Proteine von CD4<sup>+</sup> T-Zellen Proteine identifizieren, die mit der gesteigerten ROS-Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden in Verbindung stehen. Insbesondere könnte untersucht werden, ob Proteine, die mit mitochondrialer Dysfunktion assoziiert sind, in den Mitochondrien der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden verändert vorliegen. Dazu gehören beispielsweise Komponenten der Komplexe der Atmungskette oder Enzyme des antioxidativen Systems. Auf diese Weise könnte final geklärt werden, ob die chronische Aktivierung und erhöhte ROS-Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden eine mitochondriale Dysfunktion auslöst, die zu einer kompensatorisch erhöhten OXPHOS führt, oder ob die gesteigerte OXPHOS und ROS-Produktion im Gegensatz dazu Ausdruck eines aktivierten und effizienten Stoffwechsels dieser

Zellen sind. Die Differenzierung dieser Mechanismen ist entscheidend, da die therapeutischen Strategien zur Normalisierung des veränderten Phänotyps stark davon abhängen, ob die Veränderungen auf eine mitochondriale Dysfunktion oder auf eine gezielte metabolische Anpassung zurückzuführen sind. Während mitochondriale Dysfunktionen durch Antioxidantien oder Substanzen zur Stabilisierung der mitochondrialen Funktion behandelt werden könnten, würde ein aktivierter Phänotyp eher Ansätze erfordern, die die metabolische Aktivität und Proliferation der Zellen gezielt modulieren.

Bei Pferden liegen bisher keine Untersuchungen über den Einfluss einer erhöhten ROS-Produktion auf die Aktivierung und Funktion von T-Zellen vor (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 08.12.2024). Beim Menschen und bei Mäusen liegen jedoch bereits Erkenntnisse vor, die ROS mit der Aktivierung und Zytokinproduktion von T-Zellen in Verbindung bringen: In humanen T-Zellen führte die T-Zell-Rezeptor-Aktivierung nachweislich zu einer ROS-Produktion am Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (KAMINSKI et al., 2007). Diese Komplex-I-abhängigen ROS führten zur Aktivierung von humanen T-Zellen und einer gesteigerten Genexpression der Zytokine IL-2 und IL-4 (KAMINSKI et al., 2007). Die Hemmung des Komplexes I durch Rotenon wiederum reduzierte das oxidative Signal und führte zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Induktion dieser Zytokine (KAMINSKI et al., 2010). Die ROS-Produktion am Komplex I der Atmungskette ist demnach essenziell für die Aktivierung humaner T-Zellen (KAMINSKI et al., 2010). In Mäusen sind mitochondriale ROS aus Komplex III der Atmungskette ebenfalls essenziell für die Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (SENA et al., 2013). Eine T-Zell-spezifische Reduktion des Rieske-Iron-Sulfur-Proteins, eines Schlüsselproteins von Komplex III, verhinderte die Aktivierung und Proliferation von murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen über den Transkriptionsfaktor NFAT und die nachfolgende Produktion von IL-2 *in vitro* (SENA et al., 2013). Beim Menschen wurde diese Abhängigkeit von Komplex-III-generierten ROS nicht im gleichen Maße nachgewiesen (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 10.12.2024). Allerdings verstärkte eine Hemmung der Komplexe III oder IV in humanen T-Zellen die aktivierungsinduzierte ROS-Signalkaskade (KAMIŃSKI et al., 2012). Dies wurde auf eine erhöhte Anreicherung von reduziertem Ubichinon sowie eine mögliche ROS-Freisetzung aus Komplex I und teilweise aus Komplex III zurückgeführt (KAMIŃSKI et al., 2012). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch Komplex III sowohl in murinen als

auch in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle bei der aktivierungsinduzierten ROS-Produktion spielen könnte (KAMIŃSKI et al., 2013; SENA et al., 2013). Da Untersuchungen des Einflusses von ROS auf die Aktivierung und Funktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pferden mit ERU oder Patienten mit autoimmuner Uveitis bisher fehlen (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 10.12.2024), bietet ein Blick auf andere Autoimmunerkrankungen und Tiermodelle wertvolle Hinweise. Ein Beispiel ist der systemische Lupus erythematoses, bei dem die ROS-Produktion die T-Zell-Aktivierung und Zytokinfreisetzung beeinflusst: In den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Lupus-Patienten wurden erhöhte Werte mitochondrialer ROS, mitochondriale Dysfunktionen und ein deutlicher Anstieg der Apoptose- und Aktivierungswerte nachgewiesen (TAN et al., 2024). Dieser aktivierte Phänotyp war unter anderem durch erhöhte Konzentrationen der Zytokine IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  gekennzeichnet (TAN et al., 2024). Eine Reduktion der Produktion mitochondrialer ROS in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Lupus-Patienten reduzierte die Aktivierungs- und Zytokinwerte (TAN et al., 2024). Außerdem verstärkte ein Ungleichgewicht zwischen oxidativem Stress und Th1-assoziierten Zytokinen in den PBMC von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses die Schwere der Erkrankung deutlich (SHAH et al., 2010). Dabei korrelierten die IFN- $\gamma$ -Werte der PBMC positiv mit der gemessenen Lipidperoxidation und der Krankheitsintensität der Patienten (SHAH et al., 2010). Aufgrund der Erkenntnis, dass die ROS-Produktion die Zytokinexpression in PBMC von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses beeinflusst (SHAH et al., 2010), wird inzwischen angenommen, dass die beobachtete mitochondriale Dysfunktion mit gesteigerter OXPHOS und mitochondrialer ROS-Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Lupus-Patienten maßgeblich zur chronischen Entzündung bei dieser Erkrankung beiträgt (WINCUP et al., 2023; TAN et al., 2024). Ein ähnlicher Ansatz zur Untersuchung der Rolle von ROS in T-Zellen, insbesondere im Hinblick auf deren Auswirkungen auf die intraokuläre Entzündung, findet sich auch im experimentellen Modell der EAU bei Mäusen. Da für die autoimmune Uveitis des Menschen schon länger eine Rolle von ROS in der Pathogenese angenommen wird, sollte in einem IRBP-induzierten Mausmodell der EAU die Wirkung von ROS auf die Aktivierung von Th1- und Th17-Zellen untersucht werden: Zu diesem Zweck wurde die periphere Injektion von Antioxidantien getestet, die bei diesen Mäusen *in vivo* zu einer signifikanten Verringerung der ROS-Produktion in peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte

(HUANG et al., 2022). Diese reduzierte ROS-Produktion ging mit einer abgeschwächten intraokulären Entzündung, einer reduzierten Aktivierung peripherer CD4<sup>+</sup> T-Zellen und einer verminderten Proliferation von Th1- und Th17-Zellen einher (HUANG et al., 2022). Da auch die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden gekennzeichnet sind durch einen aktivierten Phänotyp mit erhöhter IFN- $\gamma$ -Expression (SALDINGER et al., 2020), gesteigerter OXPHOS-Aktivität (BARFUSSER et al., 2021) und erhöhter ROS-Produktion (Publikation, Figure 1), könnte hier ein ähnlicher Mechanismus vorliegen wie bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Lupus-Patienten (SHAH et al., 2010; TAN et al., 2024). Die ERU wird als eine Th1-vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen, da sowohl eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Expression in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch erhöhte Serumspiegel von IFN- $\gamma$  bei betroffenen Pferden nachgewiesen wurden (CURTO et al., 2016; SALDINGER et al., 2020). Aufgrund der beschriebenen Erkenntnisse aus der Forschung an Lupus-Patienten und EAU-Mäusen ist es demnach naheliegend, dass die in dieser Arbeit festgestellte erhöhte ROS-Produktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden mit dem aktivierten Phänotyp der autoreaktiven Th1-Zellen in Verbindung steht. Um zu prüfen, ob die gesteigerte ROS-Produktion tatsächlich den aktivierten Phänotyp dieser Zellen unterstützt, könnte ein erster Ansatz darin bestehen, die ROS-Produktion *in vitro* gezielt zu hemmen und anschließend die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden mit der gesunder Kontrollpferde zu vergleichen. Dies könnte durch den Einsatz von Antioxidantien wie N-Acetylcystein oder Coenzym Q10 erfolgen, die über eine Reduktion von oxidativem Stress bereits Potenzial zur Behandlung des systemischen Lupus erythematoses zeigten (POZNYAK et al., 2024). Zudem sollte der Einfluss einer gezielten Hemmung der Komplexe I und III der mitochondrialen Atmungskette auf die ROS-Produktion und Funktion dieser Zellen untersucht werden. Dabei könnten spezifische Inhibitoren wie Rotenon oder Metformin zur Blockade von Komplex I sowie Antimycin A zur Hemmung von Komplex III eingesetzt werden. Zusätzlich sollten Funktionsexperimente durchgeführt werden, die die Auswirkungen spezifischer mitochondrialer Inhibitoren oder Antioxidantien auf den Metabolismus und die Funktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersuchen. Diese könnten beispielsweise einen Effekt auf die Migration, Überlebensrate und Zytokinproduktion dieser Zellen beinhalten. Solche Experimente könnten dazu beitragen, den Einfluss von ROS auf die Funktion der autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pferden mit ERU zu entschlüsseln und potenziell Wege aufzeigen,

den aktivierten Phänotyp dieser autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen über eine Inhibierung der ROS-Produktion zu regulieren.

Da ROS hochreaktive Moleküle sind, die aufgrund ihrer ungepaarten Elektronen leicht mit anderen Molekülen reagieren können (SHU et al., 2023), könnte oxidativer Stress im Rahmen der ERU zur retinalen Schädigung beitragen. Als Folge der retinalen Degeneration könnte es innerhalb der entzündlichen Umgebung im Auge zur Freilegung neuer retinaler Autoantigene kommen (DEEG et al., 2006a; ADAMUS, 2018). Dies würde einen potenziellen Mechanismus für wiederkehrende Schübe bei dieser rezidivierenden Autoimmunerkrankung darstellen, indem die Freilegung neuer Autoantigene die Autoimmunreaktion verstärkt und den rezidivierenden Charakter der Erkrankung fördert (DEEG et al., 2006a). Im Kontext der ERU wurde bisher kein retinaler oxidativer Stress nachgewiesen (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 08.12.2024). Für die autoimmune Uveitis des Menschen wird jedoch, vorwiegend basierend auf Erkenntnissen aus Tiermodellen, seit Längerem eine Schlüsselrolle von oxidativem Stress diskutiert (YAMADA et al., 1986; SARASWATHY und RAO, 2008; JIANG et al., 2023). In einem IRBP-induzierten Mausmodell der EAU wurden differenziell abundante Proteine in retinalen Mitochondrien identifiziert, die mit oxidativem Stress assoziiert sind (SARASWATHY und RAO, 2009). Dazu gehörte unter anderem die SOD2, die in retinalen Mitochondrien von EAU-Mäusen hochreguliert war, was darauf hindeutete, dass diese Mitochondrien einer erhöhten ROS-Produktion ausgesetzt waren (SARASWATHY und RAO, 2009). Zudem war die ATP-Synthase in den retinalen Mitochondrien von EAU-Mäusen herunterreguliert, was auf Schäden in der mitochondrialen Funktion schließen ließ (SARASWATHY und RAO, 2009). In einem murinen EAU-Modell wurde zudem oxidativer Stress in retinalen Mitochondrien der Photorezeptoren festgestellt, charakterisiert durch Schäden an der mitochondrialen DNA, die bereits vor der Infiltration von Makrophagen beobachtet wurden (RAJENDRAM et al., 2007; SARASWATHY und RAO, 2008). Die Ursache für diese oxidativen Schäden blieb unklar, da primär Makrophagen als Hauptquelle für oxidativen Stress angesehen wurden (SARASWATHY und RAO, 2008). Allerdings wurden CD3<sup>+</sup> T-Zellen und eine erhöhte Expression von CD28 in der Retina nachgewiesen, was auf die Anwesenheit aktivierter T-Zellen hindeutete (SARASWATHY und RAO, 2008). Zudem fand sich eine verstärkte Genexpression der Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , wobei IFN- $\gamma$  für die Anwesenheit von Th1-Zellen sprach

(SARASWATHY und RAO, 2008). Diese Untersuchungen an Tiermodellen der autoimmunen Uveitis kombiniert mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie zur ERU sprechen dafür, dass eine gesteigerte ROS-Produktion in autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen oxidative Schäden an der Retina verursachen könnte, die bereits vor der Infiltration von Makrophagen auftreten. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wäre es sinnvoll, in einem weiterführenden Experiment die ROS-Produktion von vitrealen Lymphozyten von ERU-Pferden zu analysieren, die aus Glaskörpern im Rahmen der Pars-plana-Vitrektomie gewonnen werden können. Eine solche Untersuchung könnte klären, ob die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden nicht nur im peripheren Blut, sondern auch während ihrer intraokulären Phase eine erhöhte ROS-Produktion zeigen, die potenziell zur Schädigung retinaler Strukturen beiträgt. Darüber hinaus könnten Koinkubationsexperimente mit retinalen Explantaten und isolierten retinalen Zellen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und Kontrolltieren durchgeführt werden, um zu prüfen, ob die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der ERU-Pferde verstärkt retinale Schäden durch ROS verursachen. Solche Analysen könnten durch den Einsatz von fluoreszenzbasierten ROS-Detektionsmethoden und die Messung mitochondrialer Schäden, wie der Messung des mitochondrialen Membranpotenzials und einer Analyse der mitochondrialen DNA in den retinalen Zellen, erfolgen. Zur weiteren Validierung sollte der Einfluss von Antioxidantien wie SOD1, SOD2 oder Glutathion auf die Koinkubationen getestet werden, um mögliche protektive Effekte gegen oxidative Schäden zu evaluieren. Solche Ansätze könnten wertvolle Einblicke in die Rolle von retinalem oxidativem Stress bei der Pathogenese der ERU liefern.

Insgesamt legen diese neuen Erkenntnisse einer erhöhten ROS-Produktion in den peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden nahe, dass diese eng mit dem aktivierten Phänotyp dieser Zellen verknüpft ist. Eine mögliche Ursache dieser gesteigerten ROS-Produktion ist ein aktivierungs-induzierter verstärkter Elektronenfluss durch die mitochondriale Atmungskette im Rahmen der verstärkten OXPHOS-Aktivität dieser Zellen (BARFUSSER et al., 2021). Des Weiteren könnten mitochondriale Dysfunktionen innerhalb der Atmungskette eine Rolle bei der Induktion der erhöhten ROS-Produktion spielen, wobei diese mitochondrialen Schäden wiederum durch oxidativen Stress weiter verstärkt werden würden. Unabhängig von der genauen Quelle dieser erhöhten ROS-Werte scheint das oxidative Signal den aktivierten Phänotyp dieser autoreaktiven Zellen zu fördern. Ein gezieltes Eingreifen in dieses

oxidative Signal könnte daher ein vielversprechender Ansatz sein, um die Aktivierung dieser autoreaktiven Zellen zu hemmen. Zudem müssen auch innerhalb des Auges retinale oxidative Schäden durch die erhöhten ROS-Werte in Betracht gezogen werden, da die CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der akuten Entzündungsschübe auch intraokulär zu finden sind.

Im Rahmen dieser Studie sollte als nächstes untersucht werden, welche Substrate die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden bevorzugt nutzen, um den gesteigerten Elektronenbedarf für ihre erhöhte OXPHOS-Aktivität (BARFUSSER et al., 2021) zu decken. Zu diesem Zweck wurde die Kapazität, Abhängigkeit und Flexibilität dieser Zellen für die Nutzung von Glukose, Glutamin und langkettigen Fettsäuren als mitochondriale Substrate in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und Kontrollen bestimmt. Im Rahmen dieser Untersuchungen ergaben sich signifikante Unterschiede für die bevorzugte mitochondriale Substratoxidation dieser Zellen. Sowohl gesunde Kontrollpferde als auch an ERU erkrankte Pferde zeigten eine Kapazität von 100 % für die Nutzung von Glukose als mitochondriales Substrat, während an ERU erkrankte Pferde eine signifikant reduzierte Abhängigkeit sowie eine gesteigerte Flexibilität für den mitochondrialen Glukose-Stoffwechsel aufwiesen (Publikation, Figure 2). Diese reduzierte Abhängigkeit wird dadurch definiert, dass diese Zellen den inhibierten mitochondrialen Glukose-Stoffwechsel zu einem größeren Anteil durch die Oxidation alternativer Substrate kompensieren konnten, was sich in einer geringeren Abnahme der zellulären Sauerstoffverbrauchsrates äußerte. Eine solche erhöhte Flexibilität für den mitochondrialen Glukose-Stoffwechsel von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde bisher weder bei der autoimmunen Uveitis des Menschen noch in Tiermodellen dieser Erkrankung festgestellt (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 10.12.2024). Frühere Untersuchungen zeigten jedoch bereits, dass diese autoreaktiven Zellen bei Pferden eine ausgeprägte metabolische Anpassungsfähigkeit aufweisen: Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden zeigten eine verringerte basale Glykolyse im Vergleich zu gesunden Kontrollpferden, die jedoch nach einer Inhibierung der mitochondrialen Atmung im Vergleich zu Kontrollen signifikant höher anstieg (BARFUSSER et al., 2021). Die Zellen betroffener Pferde zeigten somit eine signifikant gesteigerte Fähigkeit, die aerobe Glykolyse bei Bedarf zu steigern, was die metabolische Flexibilität dieser Zellen unterstreicht (BARFUSSER et al., 2021). Die im Rahmen dieser Studie festgestellte höhere Flexibilität für den mitochondrialen Glukose-

Stoffwechsel zeigt jetzt, dass diese Zellen nicht nur zu einem gesteigerten Ausmaß in der Lage sind, zwischen zytosolischen und mitochondrialen ATP-produzierenden Prozessen, sondern auch zwischen verschiedenen mitochondrialen Substraten zu wechseln. Ein Zweck dieser gesteigerten Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Atmung unabhängig von der Nutzung von Glukose als Substrat könnte darin bestehen, die Glukose bei Bedarf vermehrt im Zytoplasma innerhalb der aeroben Glykolyse zu verstoffwechseln, anstatt im Mitochondrium. Der Nutzen dieser gesteigerten Fähigkeit zur Erhöhung der aeroben Glykolyse in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pferden ist bislang nicht bekannt (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 10.12.2024). Eine gesteigerte aerobe Glykolyse ist jedoch erwiesenermaßen essenziell für die Aktivierung und Proliferation von murinen und menschlichen Effektor-T-Zellen (WANG et al., 1976; STENTZ und KITABCHI, 2005; JACOBS et al., 2008). Dies wurde beispielsweise in Experimenten deutlich, in denen ein Defizit des Glukosetransporters GLUT1 zu einer eingeschränkten Proliferation von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte und in murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Expansion von Effektor-T-Zellen und die Entzündungsantwort *in vivo* verringerte (MACINTYRE et al., 2014). Eine gesteigerte aerobe Glykolyse in T-Zellen liefert neben ATP zudem auch Laktat als metabolisches Zwischenprodukt. Der Einfluss einer gesteigerten Laktat-Konzentration auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde im Rahmen der ERU bisher nicht untersucht (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 11.12.2024). Allerdings belegten neue Untersuchungen im Rahmen der autoimmunen Uveitis einen Einfluss von erhöhten Laktat-Werten auf die T-Zell-Funktion: In den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit dem Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom, das wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben in Verbindung mit der autoimmunen Uveitis auftritt, wurde eine Aktivierung der Stoffwechselwege aerobe Glykolyse, T-Zell-Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen sowie eine signifikant höhere Expression des Gens für die Laktatdehydrogenase A festgestellt (PENG et al., 2024). Mittels Durchflusszytometrie wurden zudem erhöhte Werte der Laktatdehydrogenase A in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von erkrankten Personen festgestellt, was die erhöhte Expression bestätigte (PENG et al., 2024). Die Laktatdehydrogenase A ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse und katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat, wobei NAD<sup>+</sup> regeneriert wird. Um die Rolle der Laktatdehydrogenase A bei der autoimmunen Uveitis zu untersuchen, wurden *in vitro*-Experimente mit PBMC von Vogt-Koyanagi-Harada-Patienten durchgeführt, in denen eine Hemmung der Laktatdehydrogenase A

eine reduzierte Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bewirkte (PENG et al., 2024). Wie genau die Akkumulation von Laktat die Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst, ist jedoch weitgehend unklar (FAN et al., 2023). Eine kürzlich entdeckte posttranslationale Modifikation, die als Lactylierung bezeichnet wird (ZHANG et al., 2019), liefert jedoch neue Hinweise: In einem IRBP-induzierten Mausmodell der EAU wurde eine erhöhte Laktatkonzentration in peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen, die mit einer gesteigerten Lactylierung einherging, einer posttranslationalen Modifikation, bei der es zur Lactylierung von Histonen kommt (FAN et al., 2023). Die Lactylierung nahm mit dem Fortschreiten der Erkrankung zu und konnte schließlich auch in den intraokulären CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden (FAN et al., 2023). Die Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase mit Dichloracetat verringerte die Laktatproduktion, führte zu einer reduzierten Lactylierung in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen und hemmte das Fortschreiten der klinischen Symptome der EAU (FAN et al., 2023). Im Gegensatz dazu erhöhte die Blockade der mitochondrialen Atmung mit Rotenon die Lactylierung in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von EAU-Mäusen und verstärkte die pathologischen Veränderungen (FAN et al., 2023). Ob ein ähnlicher Mechanismus in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden vorliegt, ist derzeit nicht bekannt. Ein erster Ansatzpunkt wäre, die Konzentration der Laktatdehydrogenase A in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und gesunden Kontrollen zu bestimmen, was sich mittels spezifischer Antikörper in der Durchflusszytometrie ausführen ließe. Anschließend könnte die Lactylierung in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und gesunden Kontrollpferden vergleichend untersucht werden und der Effekt einer Inhibierung der Laktatdehydrogenase A auf die Lactylierung getestet werden. Dies ließe sich mittels quantitativer Western-Blot-Analysen durchführen, wobei spezifische Antikörper eingesetzt werden könnten, um die Lactylierungsniveaus zu bestimmen. Zusätzlich sollte eine Inhibierung der mitochondrialen Atmung mit Rotenon und Antimycin A sowie der Glykolyse, beispielsweise durch 2-Desoxy-D-Glukose, durchgeführt werden, um den Einfluss dieser Stoffwechselwege auf die Lactylierungsniveaus zu untersuchen. Ergänzend wäre eine vergleichende Analyse der Aktivierungswerte und Proliferation dieser Zellen sinnvoll, um mögliche Korrelationen zwischen erhöhten Lactylierungswerten und einer verstärkten Zellaktivierung zu identifizieren. Solche Untersuchungen könnten wertvolle Einblicke in den Einfluss des Glukosestoffwechsels und der Lactylierung auf die T-Zellfunktion bei ERU-Pferden liefern.

Die reduzierte Abhängigkeit vom mitochondrialen Glukose-Stoffwechsel deutet zusätzlich darauf hin, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pferden mit ERU verstärkt Substrate wie Glutamin oder Fettsäuren zur mitochondrialen Oxidation nutzen können, um die mitochondriale Atmung aufrechtzuerhalten. Da sowohl Kontrollen als auch ERU-Pferde eine Kapazität von 100 % für den mitochondrialen Glukosestoffwechsel zeigten (Publikation, Figure 2), konnte Glukose zudem nicht als das Substrat identifiziert werden, das die vermehrt benötigten Elektronen für die gesteigerte OXPHOS-Aktivität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden bereitstellt. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden müssten daher zusätzlich in der Lage sein, Glutamin oder Fettsäuren in gesteigertem Ausmaß für die mitochondriale Substratoxidation zu nutzen, um sowohl die geringere Abhängigkeit von Glukose als auch die gesteigerte OXPHOS-Aktivität zu kompensieren.

Aus diesem Grund wurde die mitochondriale Substratoxidation von Glutamin analysiert, indem die Umwandlung von Glutamin zu Glutamat durch die Hemmung der Glutaminase 1 mithilfe von Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES) gezielt blockiert wurde. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und gesunden Kontrollen identifiziert werden. Interessanterweise wiesen jedoch die Zellen der an ERU erkrankten Pferde eine geringgradig erhöhte Kapazität und Flexibilität für die Nutzung von Glutamin als mitochondrialem Substrat auf (Publikation, Figure 3). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Zellen in der Lage sind, diesen Stoffwechselweg in gewissem Maße verstärkt zu aktivieren, wenn andere Stoffwechselwege beeinträchtigt oder blockiert sind. Dass für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden keine Abhängigkeit vom Glutamin-Stoffwechsel festgestellt werden konnte, ist angesichts der 100 %igen Kapazität für die mitochondriale Glukoseoxidation sinnvoll (Publikation, Figure 2). Diese Kapazität für die Nutzung von Glukose als mitochondriales Substrat ermöglicht eine vollständige Kompensation bei einem Ausfall des mitochondrialen Glutamin- oder Fettsäurestoffwechsels. Außerdem wurde im Rahmen dieser Studie ausschließlich die Glutaminase 1 mithilfe von BPTES gehemmt. Dies lässt die Möglichkeit einer Kompensation durch die Glutaminase 2 offen. Diese mögliche Redundanz im Glutamin-Metabolismus könnte erklären, warum keine signifikante Abhängigkeit vom mitochondrialen Glutamin-Stoffwechsel festgestellt wurde. Eine Abhängigkeit vom Glutamin-Stoffwechsel wurde jedoch in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

nachgewiesen (SENER et al., 2016). Die Proliferation dieser Zellen war sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen von der Anwesenheit von Glutamin abhängig, die Abwesenheit von Glutamin verhinderte die Proliferation vollständig (SENER et al., 2016). Außerdem führte die Hemmung der Glutaminase 1 durch BPTES in diesen Zellen zu einer signifikant eingeschränkten Proliferation und einer reduzierten Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 und IL-17 (SENER et al., 2016). Diese Befunde unterstreichen die zentrale Rolle des Glutamin-Stoffwechsels für die Funktion und Differenzierung von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Um diesen Zusammenhang bei Pferden weiter zu untersuchen, wäre ein Vergleich der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und gesunden Kontrollpferden in Zellkulturmedien ohne Glutamin und mit Glutamin in verschiedenen Konzentrationen sinnvoll. Solche Experimente könnten detaillierter aufzeigen, ob Glutamin eine größere Bedeutung für die Zellen von ERU-Pferden hat und ob spezifische metabolische Unterschiede zwischen den Zellpopulationen bestehen.

Sowohl im Rahmen der ERU-Forschung als auch in anderen Pferdmodellen und bei der autoimmunen Uveitis des Menschen wurde der mitochondriale Glutamin-Metabolismus in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und seine Bedeutung für die Differenzierung dieser Zellen bisher nicht untersucht (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 26.11.2024). Die leicht erhöhte Kapazität für den Glutamin-Metabolismus bei ERU-Pferden könnte jedoch im Zusammenhang mit der erhöhten ROS-Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen stehen. Bisher wurde ein solcher Zusammenhang weder bei Pferden noch im Kontext der autoimmunen Uveitis festgestellt (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 10.12.2024). Es gibt jedoch Erkenntnisse aus der Lupus-Forschung, die auf eine mögliche Verbindung zwischen dem Glutamin-Metabolismus und der ROS-Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinweisen (HISADA et al., 2022). Bei der Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes sind eine unzureichende IL-2-Produktion und erhöhte ROS-Werte im Zytoplasma von CD4<sup>+</sup> T-Zellen Schlüsselfaktoren (TSOKOS, 2020; HISADA et al., 2022). In den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Lupus-Mäusen und von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes bewirkte die Überexpression der Glutaminase 2, aber nicht der Glutaminase 1, eine Verringerung der ROS-Konzentration und eine Wiederherstellung der IL-2-Aktivität (HISADA et al., 2022). Diese Ergebnisse konnten belegen, dass die Glutaminase 2 in humanen und murinen T-Zellen erhöhte ROS-Spiegel korrigiert und die IL-2-Produktion in den betroffenen T-

Zellen wiederherstellt (HISADA et al., 2022). Dieser Zusammenhang wurde dadurch erklärt, dass die Reaktion der Glutaminase 2 Glutamat als Vorstufe für die Glutathion-Synthese bereitstellt (HISADA et al., 2022; XU et al., 2024). Die Wechselwirkung zwischen dem Glutamin-Stoffwechsel und der ROS-Abwehr durch Glutathion könnte somit relevant für die Funktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden sein, die ebenfalls einer erhöhten ROS-Produktion ausgesetzt sind. Eine erhöhte Glutathion-Synthese könnte diese autoreaktiven Zellen in ihrem entzündlichen Prozess stärken, indem ihre Aktivität und Funktionalität stabilisiert wird. Aus diesem Grund sollte abschließend geklärt werden, ob die Nutzung von Glutamin als biosynthetische Vorstufe für die Glutathion-Synthese den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pferden mit ERU einen erhöhten Schutz vor ROS bietet und ob die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden auf Glutathion als essenzielles zelluläres Antioxidans angewiesen sind, um ihre Zellintegrität und Funktion zu bewahren. Da im Rahmen dieser Studie nur die Glutaminase 1 gehemmt wurde, aber der Effekt auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Lupus-Mäusen und von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses durch die Überexpression der Glutaminase 2 vermittelt wurde (HISADA et al., 2022), sollten zukünftige Untersuchungen die Glutaminase 2 berücksichtigen. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte beispielsweise die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und gesunden Kontrollen in verschiedenen Medien getestet werden: einem Medium mit physiologischer Glutamin-Konzentration, einem Glutamin-freien Medium sowie einem Glutamin-freien Medium, das mit Vorstufen der Glutathion-Synthese ergänzt wurde. Zusätzlich könnten die CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Wasserstoffperoxid behandelt werden, um ihre Fähigkeit zur Abwehr von oxidativem Stress zu prüfen. Anschließend sollten die intrazellulären ROS-Werte und die Überlebensrate der Zellen gemessen werden. Solche Experimente könnten wertvolle Einblicke in die Beziehung zwischen dem Glutamin-Stoffwechsel, der Glutathion-Synthese und der ROS-Produktion in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden liefern.

Um zu klären, ob die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden verstärkt Fettsäuren für die mitochondriale Substratoxidation nutzen und so die geringere Abhängigkeit von Glukose (Publikation, Figure 2) und die gesteigerte OXPHOS-Aktivität (BARFUSSER et al., 2021) kompensieren, wurde abschließend die Nutzung dieser Substrate für den mitochondrialen Stoffwechsel untersucht. Da kurz- und mittelkettige Fettsäuren die Mitochondrienmembran durch passive Diffusion überwinden können, beziehen sich

die Ergebnisse aus diesem Versuch ausschließlich auf langkettige Fettsäuren, da der Import dieser Fettsäuren spezifisch durch die CPT1 vermittelt wird. Durch die Hemmung der CPT1 mit Etomoxir wurde innerhalb dieses Versuchs somit gezielt der mitochondriale Stoffwechsel langkettiger Fettsäuren untersucht. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden zeigten in diesen Versuchen eine signifikant höhere Kapazität und Flexibilität für die mitochondriale Substratoxidation langkettiger Fettsäuren (Publikation, Figure 4). Es wurde sowohl bei Kontrollen als auch bei ERU-Pferden keine Abhängigkeit von der mitochondrialen Substratoxidation langkettiger Fettsäuren identifiziert, was einerseits dadurch zu erklären ist, dass diese Zellen eine Kapazität von 100 % für den mitochondrialen Glukose-Stoffwechsel zeigten und andererseits auf eine mögliche Kompensation über die Oxidation kurz- und mittelkettiger Fettsäuren zurückzuführen ist, die von der Blockierung der CPT1 durch Etomoxir nicht betroffen waren. Die Ergebnisse einer signifikant höheren Kapazität und Flexibilität für die mitochondriale Oxidation langkettiger Fettsäuren deuten jedoch darauf hin, dass die geringere Abhängigkeit vom mitochondrialen Glukose-Stoffwechsel wahrscheinlich durch eine gesteigerte Kapazität für die Nutzung langkettiger Fettsäuren zur mitochondrialen Oxidation entsteht. Auch der erhöhte Elektronenbedarf, der durch die verstärkte OXPHOS-Aktivität in diesen Zellen entsteht (BARFUSSER et al., 2021), wird somit vermutlich über eine Steigerung der mitochondrialen Oxidation langkettiger Fettsäuren gedeckt.

Eine gesteigerte Fähigkeit zur Oxidation langkettiger Fettsäuren wurde bisher weder in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit autoimmuner Uveitis noch in anderen Pferdmodellen nachgewiesen, weshalb die zugrundeliegenden Mechanismen derzeit nicht bekannt sind (Stand der PubMed Literaturrecherche: 29.11.2024). Die T-Zellen von Säugetierspezies wie Maus und Mensch zeigen jedoch eine ähnliche Fähigkeit, zwischen dem Abbau von Glukose, Glutamin und Fettsäuren zu wechseln, um ihre Effektorfunktionen in veränderten Mikroumgebungen, wie beispielsweise in entzündetem Gewebe, aufrechtzuerhalten (MANOSALVA et al., 2022; CHEN et al., 2023a; MA et al., 2024). Diese ausgeprägte Anpassungsfähigkeit von T-Zellen wird als metabolische Flexibilität bezeichnet (CHEN et al., 2023a; MA et al., 2024). Unsere Studie zeigt, dass diese Fähigkeit bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden besonders ausgeprägt ist, vor allem in Bezug auf den Stoffwechsel von Glukose und langkettigen Fettsäuren. Diese erhöhte metabolische Flexibilität könnte diesen Zellen einen

entscheidenden Vorteil bieten, um sich während der akuten Uveitis-Schübe an die immunsuppressive Mikroumgebung des Auges anzupassen (STREILEIN, 2003; TAYLOR und NG, 2018). Das intraokulare Immunprivileg, das nicht nur von der physischen Barriere der Blut-Retina-Schranke, sondern auch von einer immunsuppressiven Mikroumgebung im Auge aufrechterhalten wird, stellt eine bedeutende Herausforderung für infiltrierende Immunzellen dar (STREILEIN, 2003; TAYLOR und NG, 2018). Diese Mikroumgebung, die unter anderem durch immunsuppressive Faktoren im Kammerwasser geprägt ist, kann immunologische Reaktionen unterdrücken (STREILEIN, 2003). Die Fähigkeit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden, sich durch eine verstärkte Oxidation langkettiger Fettsäuren metabolisch anzupassen, könnte ihnen in dieser immunsuppressiven Umgebung einen Vorteil verschaffen. Um diese Hypothese zu testen, könnten gezielte Experimente durchgeführt werden, bei denen CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und gesunden Kontrollen mit dem Kammerwasser von Pferden inkubiert werden. Anschließend sollten die Überlebensraten und Apoptosewerte der Zellen gemessen werden, um festzustellen, ob die Zellen von ERU-Pferden weniger anfällig für die immunsuppressiven Effekte des Kammerwassers sind. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen unter denselben Bedingungen zu untersuchen. Ein Vergleich mit den Zellen gesunder Kontrollpferde könnte zeigen, ob die metabolische Flexibilität der ERU-Zellen ihre Resistenz gegenüber den unterdrückenden Effekten des Kammerwassers verbessert. Dieselben Experimente sollten zudem unter Blockierung der Oxidation langkettiger Fettsäuren über die Hemmung der CPT1 mit Etomoxir durchgeführt werden. Eine solche Blockade würde es ermöglichen zu untersuchen, ob die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden ohne diesen metabolischen Pfad eine erhöhte Anfälligkeit für die immunsuppressiven Effekte des Kammerwassers zeigen.

Die Effekte von langkettigen Fettsäuren auf die Funktion und Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden bisher bei Pferden nicht untersucht (Stand der PubMed-Litertaturrecherche: 15.12.2024). Interessanterweise spielt jedoch die Kettenlänge der Fettsäuren, die für die FAO genutzt werden, eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von humanen und murinen T-Zellen (HAGHIKIA et al., 2015). Die Kultivierung humaner naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit langkettigen Fettsäuren erhöhte die Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen (HAGHIKIA et al., 2015). Die Kultivierung

muriner CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit langkettigen Fettsäuren hingegen förderte die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th1- und Th17-Zellen (HAGHIKIA et al., 2015). Diese Effekte von langkettigen Fettsäuren wurden anschließend in einem Mausmodell der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis getestet, in dem eine Diät reich an lang- und mittelkettigen Fettsäuren die Symptome *in vivo* verschlechterte (HAGHIKIA et al., 2015). Bei der anschließenden Untersuchung der Rückenmarksinfiltrate zeigte sich, dass bei diesen Mäusen die Häufigkeit von Th17-Zellen erhöht war, während die Zahl der Th1-Zellen unverändert blieb (HAGHIKIA et al., 2015). Da langkettige Fettsäuren beim Menschen im Gegensatz dazu bevorzugt die Differenzierung von Th1-Zellen förderten (HAGHIKIA et al., 2015), liegen hier signifikante Speziesunterschiede zwischen Menschen und Mäusen vor. Um zu testen, wie sich die verstärkte Nutzung langkettiger Fettsäuren auf die Funktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei ERU-Pferden und gesunden Kontrollpferden auswirkt, sollten weiterführende Versuche durchgeführt werden. Diese könnten die *in vitro*-Kultivierung dieser Zellen mit langkettigen und mit kurzkettigen Fettsäuren beinhalten, bei der anschließend die Proliferation der Zellen gemessen wird. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Kultivierung mit langkettigen Fettsäuren die ROS-Produktion in diesen Zellen beeinflusst. Eine Blockade der FAO über den CPT1-Inhibitor Etomoxir mit anschließender Messung der intrazellulären ROS-Werte könnte aufdecken, ob eine Hemmung der Oxidation langkettiger Fettsäuren die ROS-Produktion in den Zellen von ERU-Pferden senkt. Abschließend sollten die Aktivierungswerte der Zellen ermittelt werden, um den Zusammenhang zwischen FAO, ROS-Produktion und Zellaktivierung in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden weiterführend zu untersuchen. Solche Versuche könnten dabei helfen aufzuklären, wie sich das Nutzen langkettiger Fettsäuren auf die T-Zellfunktion bei ERU-Pferden auswirkt. Da eine erhöhte Kapazität für die Oxidation langkettiger Fettsäuren in CD4<sup>+</sup> T-Zellen bisher weder bei Pferden mit ERU noch bei Patienten mit autoimmuner Uveitis nachgewiesen wurde (Stand der PubMed-Literaturrecherche: 13.12.2024), kann ein Blick auf Tiermodelle der Multiplen Sklerose Hinweise auf die möglichen zugrundeliegenden Mechanismen liefern: In einem experimentellen Mausmodell wurde der Einfluss einer Inhibierung der CPT1-medierten FAO auf den Verlauf der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis untersucht (SHRIVER und MANCHESTER, 2011). Die Behandlung mit Etomoxir reduzierte die klinischen

Symptome signifikant und führte zu einer verminderten Entzündung im Zentralnervensystem (SHRIVER und MANCHESTER, 2011). Diese abgeschwächte Entzündung äußerte sich unter anderem in einer verringerten Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (SHRIVER und MANCHESTER, 2011). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die Wirkung von Etomoxir auf die Zytokinproduktion und Apoptose von murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter Bedingungen untersucht, die entweder die Glykolyse begünstigten oder reduzierten (SHRIVER und MANCHESTER, 2011). Dabei sollte die Reduktion der Glykolyse metabolischen Stress induzieren, der den Fettsäurestoffwechsel begünstigt (SHRIVER und MANCHESTER, 2011). Während in Glukose-reichen Umgebungen keine signifikanten Auswirkungen auf die T-Zell-Funktion festgestellt wurden, führte die Hemmung der FAO unter Glukose-armen Bedingungen zu einer erhöhten Apoptoserate der autoreaktiven T-Zellen (SHRIVER und MANCHESTER, 2011). Zusätzlich zeigte sich, dass Etomoxir in Glukose-armen Umgebungen die Produktion von IFN- $\gamma$  reduzierte (SHRIVER und MANCHESTER, 2011). Insgesamt konnten diese Untersuchungen zeigen, dass die CPT1-medierte FAO unter Bedingungen mit eingeschränkter Glukose-Verfügbarkeit eine wesentliche Rolle für das Überleben und die Funktion von murinen autoreaktiven T-Zellen spielt (SHRIVER und MANCHESTER, 2011). Bezogen auf unsere neuen Erkenntnisse, die eine geringere Abhängigkeit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pferden mit ERU vom mitochondrialen Glukose-Stoffwechsel und gleichzeitig eine erhöhte Kapazität sowie Flexibilität für die CPT1-vermittelte FAO zeigen, könnten hier ähnliche Wechselwirkungen zwischen dem Stoffwechsel von Glukose und Fettsäuren und der Auswirkung auf die Funktion dieser autoreaktiven T-Zellen vorliegen. Zukünftige Studien sollten darauf abzielen, die funktionelle Bedeutung dieser metabolischen Veränderungen näher zu beleuchten. Ein Ansatz könnte der gezielte Einsatz von CPT1-Inhibitoren wie Etomoxir sein, um zu untersuchen, wie diese Hemmung die Proliferation und Überlebensfähigkeit der Zellen beeinflusst, insbesondere unter stressreichen Bedingungen sowie bei variierender Glukoseverfügbarkeit. Des Weiteren könnten Transmigrationsexperimente aufbauend auf früheren Studien durchgeführt werden, die eine gesteigerte Migration der PBL von Pferden mit ERU in Richtung spezifischer ERU-Autoantigene und Zytokine zeigten (WIEDEMANN et al., 2020). Um die metabolischen Abhängigkeiten dieser Migration besser zu verstehen, könnte der Einsatz von CPT1-Inhibitoren wie Etomoxir sowie Glykolyse-Inhibitoren auf

die Migration der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden und gesunden Kontrollen untersucht werden. Diese Experimente könnten Aufschluss darüber geben, wie stark die Migration dieser autoreaktiven Zellen von der FAO oder der Glykolyse abhängig ist und ob eine Modulation dieser Stoffwechselwege die Transmigration beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der veränderte metabolische Phänotyp (BARFUSSER et al., 2021) der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden genauer charakterisiert. In einer früheren Studie wurde bereits eine gesteigerte Aktivität der OXPHOS in diesen Zellen nachgewiesen (BARFUSSER et al., 2021). In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass diese erhöhte OXPHOS-Aktivität nicht durch eine verstärkte mitochondriale Oxidation von Glukose oder Glutamin gefördert wird, sondern vielmehr durch eine verbesserte Fähigkeit zur Oxidation langkettiger Fettsäuren. Interessanterweise besitzen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden zudem eine signifikant gesteigerte Fähigkeit, im Falle einer Hemmung der mitochondrialen Atmung die kompensatorische Glykolyse zu erhöhen (BARFUSSER et al., 2021). Diese metabolische Flexibilität könnte auf die in dieser Studie festgestellte reduzierte Abhängigkeit von der mitochondrialen Glukoseoxidation zurückzuführen sein. Bei Bedarf kann die Glukose somit verstärkt im Rahmen der aeroben Glykolyse im Zytoplasma verstoffwechselt werden, anstatt über Acetyl-CoA in den mitochondrialen Citratzyklus eingespeist zu werden. Welche funktionellen Vorteile diese metabolischen Anpassungen im Kontext der Pathogenese der ERU bieten, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass dieser flexible und aktivierte Stoffwechsel eine Rolle dabei spielt, den CD4<sup>+</sup> T-Zellen das Überwinden der Blut-Retina-Schranke zu erleichtern und daraufhin im Auge über die Reaktion mit retinalen Autoantigenen die entzündlichen Prozesse im Rahmen der ERU zu initiieren. Die genauen Zusammenhänge zwischen dem veränderten Metabolismus und der Pathogenese sollten jedoch durch funktionelle Experimente weiter aufgeklärt werden. Die identifizierte erhöhte ROS-Produktion spielt zudem wahrscheinlich eine zentrale Rolle in den beschriebenen Prozessen und scheint sowohl Ursache als auch Folge der metabolischen Veränderungen in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden und somit bedeutend für die Aufrechterhaltung des pathologischen Phänotyps zu sein. Zukünftige Experimente sollten darauf abzielen, den Einfluss der erhöhten ROS-Produktion auf die Funktion und den Stoffwechsel der T-Zellen von ERU-Pferden

genauer zu untersuchen. Dabei wäre es insbesondere wichtig zu klären, ob eine Reduktion der ROS-Produktion den aktivierten Phänotyp und den veränderten Stoffwechsel dieser Zellen normalisieren kann. Die identifizierten Unterschiede im metabolischen Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden könnten somit nicht nur zur phänotypischen Abgrenzung von gesunden Zellen genutzt werden, sondern auch als Ansatzpunkt für therapeutische Strategien dienen. Selbst außerhalb akuter Entzündungsschübe eröffnen sie die Möglichkeit, diese Zellen gezielt anzusprechen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine weltweit verbreitete, immunvermittelte Erkrankung mit hoher Prävalenz. Sie ist gekennzeichnet durch wiederkehrende Entzündungsschübe des Uvealtrakts, die von symptomfreien Intervallen unterbrochen werden. Der progressive Verlauf dieser Erkrankung führt langfristig zur Zerstörung intraokularer Strukturen, insbesondere der Retina, und unbehandelt letztlich zur Erblindung betroffener Pferde. Da die Ätiologie der ERU bis heute nicht geklärt ist, existiert keine kausale Therapie, wodurch eine vollständige Heilung aktuell nicht möglich ist.

Im Zentrum der Pathogenese der ERU stehen autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Diese aus der Peripherie stammenden Zellen überwinden die Blut-Retina-Schranke und dringen in das immunprivilegierte Augeninnere ein. Dort reagieren sie mit retinalen Autoantigenen und tragen maßgeblich zur Entstehung der autoimmunen Entzündung bei. Die initialen Mechanismen, die zur Aktivierung dieser Zellen führen, sind nach wie vor ungeklärt. In den symptomfreien Phasen sind diese autoaggressiven Zellen in der Peripherie nachweisbar, was eine phänotypische Charakterisierung dieser Zellen aus dem peripheren Blut ermöglicht. Die peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen weisen charakteristische metabolische Veränderungen auf, die dazu beitragen könnten, die Blut-Retina-Schranke zu überwinden und die Entzündung durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zu fördern. Frühere Studien zeigten unter anderem, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden eine verstärkte oxidative Phosphorylierung sowie eine erhöhte kompensatorische Glykolyse als Reaktion auf die Hemmung der mitochondrialen Atmung aufweisen. Ziel dieser Arbeit war es, den Stoffwechsel dieser Zellen eingehender zu untersuchen, mit einem Fokus auf die mitochondriale Substratoxidation von Glukose, Glutamin und langkettigen Fettsäuren sowie die Frage, ob die gesteigerte oxidative Phosphorylierung mit einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in diesen Zellen einhergeht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ERU-Pferden eine 1,7-fach erhöhte ROS-Produktion im Vergleich zu gesunden Kontrollpferden aufweisen. Mithilfe einer Echtzeit-Analyse des Stoffwechsels konnte zudem nachgewiesen werden, dass diese Zellen signifikante Unterschiede bei der mitochondrialen Oxidation von Glukose und langkettigen Fettsäuren zeigen. Die CD4<sup>+</sup>

T-Zellen von ERU-Pferden waren weniger abhängig vom mitochondrialen Glukose-Stoffwechsel. Weiterhin zeigten sie eine gesteigerte Flexibilität bei der Nutzung des mitochondrialen Glukosestoffwechsels, was darauf hindeutet, dass sie bei einer Hemmung der mitochondrialen Pyruvatoxidation stärker auf alternative Stoffwechselwege zurückgreifen können, um die mitochondriale Atmung aufrechtzuerhalten. Zudem zeigten sie eine signifikant höhere Kapazität und Flexibilität für die Oxidation langkettiger Fettsäuren, was auf eine gesteigerte Fähigkeit hindeutet, Fettsäuren als Energiequelle zu nutzen, wenn andere Stoffwechselwege blockiert sind.

Diese metabolischen Anpassungen deuten darauf hin, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden über einen flexiblen Stoffwechsel verfügen, der es ihnen ermöglicht, sich an veränderte Anforderungen anzupassen. Dies könnte ihnen einen Vorteil verschaffen, um die Blut-Retina-Schranke zu überwinden, die Autoimmunreaktion im Auge zu initiieren und die Energie bereitzustellen, die für die Aufrechterhaltung der intraokularen Entzündung erforderlich ist. Zusätzlich könnte die gesteigerte ROS-Produktion die Aktivierung dieser Zellen fördern, indem sie zelluläre Signaltransduktionskaskaden beeinflusst und proinflammatorische Mechanismen verstärkt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die genauen Mechanismen zu klären, durch die der veränderte Metabolismus die Funktion autoreaktiver T-Zellen bei der ERU beeinflusst. Insbesondere sollten die Auswirkungen der erhöhten ROS-Produktion und der veränderten Verstoffwechslung mitochondrialer Substrate auf die T-Zell-Funktion untersucht werden. So kann ermittelt werden, ob der veränderte metabolische Phänotyp den Zellen einen funktionellen Vorteil bei der Autoimmunreaktion verschafft. Die identifizierten Unterschiede könnten zudem dazu beitragen, diese Zellen im peripheren Blut phänotypisch abzugrenzen. Solche Erkenntnisse könnten therapeutische Interventionen ermöglichen, die den Stoffwechsel gezielt modulieren und so den Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei ERU-erkrankten Pferden normalisieren, um eine Remission der autoimmunen Entzündung zu fördern.

## 6 SUMMARY

Equine recurrent uveitis (ERU) is a highly prevalent immune-mediated disease. It is characterized by recurrent episodes of intraocular inflammation, interrupted by asymptomatic intervals. The progressive nature of this disease leads to the destruction of intraocular structures, particularly the retina, which, if left untreated, ultimately results in blindness. Since the etiology of ERU remains unknown, no causal therapy exists, making a complete cure for the disease currently impossible.

At the center of ERU pathogenesis are autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells. Once activated, these cells, originating from the periphery, cross the blood-retinal barrier and infiltrate the immune-privileged eye. There, they react with retinal autoantigens, significantly contributing to the development of autoimmune inflammation. However, the initial mechanisms that trigger the activation of these cells remain unclear. These autoreactive cells can be found in the periphery during asymptomatic phases, enabling their phenotypic characterization from peripheral blood. Peripheral CD4<sup>+</sup> T cells display distinct metabolic alterations that may support their ability to cross the blood-retinal barrier and promote intraocular inflammation by releasing pro-inflammatory cytokines. Previous studies have shown that CD4<sup>+</sup> T cells from ERU-affected horses exhibit enhanced oxidative phosphorylation and increased compensatory glycolysis in response to inhibition of mitochondrial respiration. This study aimed to investigate the metabolism of these cells in greater detail, focusing on mitochondrial substrate oxidation of glucose, glutamine, and long-chain fatty acids, as well as examining whether increased oxidative phosphorylation is associated with heightened reactive oxygen species production in these cells.

The results revealed that CD4<sup>+</sup> T cells from ERU-affected horses exhibited a 1.7-fold increase in reactive oxygen species production compared to healthy control horses. Furthermore, real-time metabolic analysis demonstrated significant differences in mitochondrial oxidation of glucose and long-chain fatty acids. CD4<sup>+</sup> T cells from ERU-affected horses were less dependent on mitochondrial glucose metabolism. They also showed increased flexibility in utilizing mitochondrial glucose metabolism, indicating a greater ability to rely on alternative metabolic pathways when mitochondrial pyruvate oxidation is inhibited, thus maintaining mitochondrial respiration. Additionally, these cells displayed significantly higher capacity and flexibility in oxidizing long-chain fatty

acids, suggesting an enhanced ability to utilize fatty acids as an energy source when other metabolic pathways are blocked. These metabolic adaptations suggest that CD4<sup>+</sup> T cells from ERU-affected horses possess a flexible metabolism, enabling them to adapt to changing demands. This metabolic flexibility may provide them with an advantage in crossing the blood-retinal barrier, initiating the autoimmune response in the eye, and supplying the energy required to sustain intraocular inflammation. Furthermore, increased ROS production could enhance the activation of these cells by influencing cellular signal transduction cascades and amplifying pro-inflammatory mechanisms.

Further investigations are necessary to elucidate the precise mechanisms by which altered metabolism impacts the function of autoreactive T cells in ERU-affected horses. Specifically, the effects of elevated ROS production and altered mitochondrial substrate metabolism on T cell function should be explored. This could help determine whether the altered metabolic phenotype provides these cells with a functional advantage during the autoimmune response. The identified differences may also contribute to the phenotypic distinction of these cells in peripheral blood. Such insights could pave the way for therapeutic interventions aimed at modulating metabolism, thereby normalizing the phenotype of CD4<sup>+</sup> T cells in ERU-affected horses to promote remission of autoimmune inflammation.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adamus G. Are Anti-Retinal Autoantibodies a Cause or a Consequence of Retinal Degeneration in Autoimmune Retinopathies? *Front Immunol* 2018; 9: 765.
- Agnello M, Morici G, Rinaldi AM. A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology* 2008; 56: 145-9.
- Almeida L, Dhillon-LaBrooy A, Carriche G, Berod L, Sparwasser T. CD4+ T-cell differentiation and function: Unifying glycolysis, fatty acid oxidation, polyamines NAD mitochondria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2021; 148: 16-32.
- Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, Gery I, Lee YS, Egwuagu CE. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 2007; 13: 711-8.
- Anderson C, Aivazidis S, Kuzyk C, Jain A, Roede J. Acute Maneb Exposure Significantly Alters Both Glycolysis and Mitochondrial Function in Neuroblastoma Cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2018; 165
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; 204: 1849-61.
- Arnold PK, Finley LWS. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *J Biol Chem.* 2023;
- Averill-Bates DA. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm* 2023; 121: 109-41.
- Aydin SE, Kilic SS, Aytekin C, Kumar A, Porras O, Kainulainen L, Kostyuchenko L, Genel F, Kutukculer N, Karaca N, Gonzalez-Granado L, Abbott J, Al-Zahrani D, Rezaei N, Baz Z, Thiel J, Ehl S, Marodi L, Orange JS, Sawalle-Belohradsky J, Keles S, Holland SM, Sanal O, Ayvaz DC, Tezcan I, Al-Mousa H, Alsum Z, Hawwari A, Metin A, Matthes-Martin S, Honig M, Schulz A, Picard C, Barlogis V, Gennery A, Ifversen M, van Montfrans J, Kuijpers T, Bredius R, Duckers G, Al-Herz W, Pai SY, Geha R, Notheis G, Schwarze CP, Tavil B, Azik F, Bienemann K, Grimbacher B, Heinz V, Gaspar HB, Aydin R, Hagl B, Gathmann B, Belohradsky BH, Ochs HD, Chatila T, Renner ED, Su H, Freeman AF, Engelhardt K, Albert MH, inborn errors working party of E. DOCK8 deficiency: clinical and immunological phenotype and treatment options - a review of 136 patients. *J Clin Immunol* 2015; 35: 189-98.
- Barfusser C, Wiedemann C, Hoffmann ALC, Hirmer S, Deeg CA. Altered Metabolic Phenotype of Immune Cells in a Spontaneous Autoimmune Uveitis Model. *Front Immunol* 2021; 12: 601619.
- Barrie W, Yang Y, Irving-Pease EK, Attfield KE, Scorrano G, Jensen LT, Armen AP, Dimopoulos EA, Stern A, Refoyo-Martinez A, Pearson A, Ramsøe A, Gaunitz C, Demeter F, Jørkov MLS, Møller SB, Springborg B, Klassen L, Hyldgård IM, Wickmann N, Vinner L, Korneliussen TS, Allentoft ME, Sikora M, Kristiansen K, Rodriguez S, Nielsen R, Iversen AKN, Lawson DJ, Fugger L, Willerslev E. Elevated genetic risk for multiple sclerosis emerged in steppe pastoralist populations. *Nature* 2024; 625: 321-8.
- Bauer MKA, Vogt M, Los M, Siegel J, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. Role of Reactive Oxygen Intermediates in Activation-induced CD95 (APO-1/Fas) Ligand Expression \*. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 8048-55.
- Bestetti S, Galli M, Sorrentino I, Pinton P, Rimessi A, Sitia R, Medrano-Fernandez I. Human aquaporin-

- 11 guarantees efficient transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across the endoplasmic reticulum membrane. *Redox Biol* 2020; 28: 101326.
- Blanco LP, Kaplan MJ. Metabolic alterations of the immune system in the pathogenesis of autoimmune diseases. *PLOS Biology* 2023; 21: e3002084.
- Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med* 2016; 100: 14-31.
- Busch M, Wefelmeyer KL, Walscheid K, Rothaus K, Bauer D, Deeg CA, Degroote RL, Ackermann D, König S, Thanos S, Kasper M, Heiligenhaus A. Identification of Ocular Autoantigens Associated With Juvenile Idiopathic Arthritis-Associated Uveitis. *Front Immunol* 2019; 10: 1793.
- Caspi RR, Roberge FG, McAllister CG, el-Saied M, Kuwabara T, Gery I, Hanna E, Nussenblatt RB. T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J Immunol* 1986; 136: 928-33.
- Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, Lando Z, Nussenblatt RB. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 1988; 140: 1490-5.
- Caspi RR, Silver PB, Luger D, Tang J, Cortes LM, Pennesi G, Mattapallil MJ, Chan CC. Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* 2008; 40: 169-74.
- Caspi RR. Understanding autoimmune uveitis through animal models. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 1872-9.
- Chang C-H, Curtis Jonathan D, Maggi Leonard B, Faubert B, Villarino Alejandro V, O'Sullivan D, Huang Stanley C-C, van der Windt Gerritje JW, Blagih J, Qiu J, Weber Jason D, Pearce Edward J, Jones Russell G, Pearce Erika L. Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell* 2013; 153: 1239-51.
- Chaudhri G, Hunt NH, Clark IA, Ceredig R. Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin. *Cellular Immunology* 1988; 115: 204-13.
- Chen C, Zheng H, Horwitz EM, Ando S, Araki K, Zhao P, Li Z, Ford ML, Ahmed R, Qu C-K. Mitochondrial metabolic flexibility is critical for CD8<sup>+</sup> T cell antitumor immunity. *Science Advances* 2023a; 9: eadf9522.
- Chen J, Qian H, Horai R, Chan CC, Caspi RR. Mouse Models of Experimental Autoimmune Uveitis: Comparative Analysis of Adjuvant-Induced vs Spontaneous Models of Uveitis. *Curr Mol Med* 2015; 15: 550-7.
- Chen Z, Vaeth M, Eckstein M, Delgobo M, Ramos G, Frantz S, Hofmann U, Gladow N. Characterization of the effect of the GLUT-1 inhibitor BAY-876 on T cells and macrophages. *Eur J Pharmacol*. 2023b; 945: 175552.
- Coppola C, Hopkins B, Huhn S, Du Z, Huang Z, Kelly WJ. Investigation of the Impact from IL-2, IL-7, and IL-15 on the Growth and Signaling of Activated CD4(+) T Cells. *Int J Mol Sci* 2020; 21
- Curto E, Messenger KM, Salmon JH, Gilger BC. Cytokine and chemokine profiles of aqueous humor and serum in horses with uveitis measured using multiplex bead immunoassay analysis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2016; 182: 43-51.
- Dammak A, Pastrana C, Martin-Gil A, Carpena-Torres C, Peral Cerda A, Simovart M, Alarma P, Huete-Toral F, Carracedo G. Oxidative Stress in the Anterior Ocular Diseases: Diagnostic and

- Treatment. *Biomedicines* 2023; 11
- Dandekar T, Schuster S, Snel B, Huynen M, Bork P. Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem J* 1999; 343 Pt 1: 115-24.
- de Kozak Y, Sakai J, Thillaye B, Faure JP. S antigen-induced experimental autoimmune uveo-retinitis in rats. *Curr Eye Res* 1981; 1: 327-37.
- de Smet MD, Yamamoto JH, Mochizuki M, Gery I, Singh VK, Shinohara T, Wiggert B, Chader GJ, Nussenblatt RB. Cellular immune responses of patients with uveitis to retinal antigens and their fragments. *Am J Ophthalmol* 1990; 110: 135-42.
- Deeg CA, Kaspers B, Gerhards H, Thurau SR, Wollanke B, Wildner G. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 393-8.
- Deeg CA, Thurau SR, Gerhards H, Ehrenhofer M, Wildner G, Kaspers B. Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2598-606.
- Deeg CA, Reese S, Gerhards H, Wildner G, Kaspers B. The Uveitogenic Potential of Retinal S-Antigen in Horses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004a; 45: 2286-92.
- Deeg CA, Marti E, Gaillard C, Kaspers B. Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9. *Equine Vet J* 2004b; 36: 73-5.
- Deeg CA, Amann B, Raith AJ, Kaspers B. Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006a; 47: 652-6.
- Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, Hauck SM, Amann B, Suppmann S, Goebel TW, Olazabal U, Gerhards H, Reese S, Stangassinger M, Kaspers B, Ueffing M. Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 2006b; 5: 1462-70.
- Deeg CA, Altmann F, Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Ueffing M. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* 2007a; 7: 1540-8.
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Kremmer E, Stangassinger M, Ueffing M. Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Mol Immunol* 2007b; 44: 3291-6.
- Deeg CA, Raith AJ, Amann B, Crabb JW, Thurau SR, Hauck SM, Ueffing M, Wildner G, Stangassinger M. CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol* 2007c; 2007: 39245.
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Pompetzki D, Altmann F, Raith A, Schmalzl T, Stangassinger M, Ueffing M. Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res* 2008; 40: 151-3.
- Degroote RL, Hauck SM, Kremmer E, Amann B, Ueffing M, Deeg CA. Altered expression of talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics* 2012; 75: 4536-44.
- Degroote RL, Hauck SM, Treutlein G, Amann B, Frohlich KJ, Kremmer E, Merl J, Stangassinger M, Ueffing M, Deeg CA. Expression changes and novel interaction partners of talin 1 in effector cells of autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 2013; 12: 5812-9.

- Degroote RL, Hauck SM, Amann B, Hirmer S, Ueffing M, Deeg CA. Unraveling the equine lymphocyte proteome: differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis. *PLoS One* 2014; 9: e91684.
- Degroote RL, Uhl PB, Amann B, Krackhardt AM, Ueffing M, Hauck SM, Deeg CA. Formin like 1 expression is increased on CD4+ T lymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics* 2017; 154: 102-8.
- Degroote RL, Deeg CA. Immunological Insights in Equine Recurrent Uveitis. *Front Immunol* 2021; 11: 609855.
- Degroote RL, Schmalen A, Hauck SM, Deeg CA. Unveiling Differential Responses of Granulocytes to Distinct Immunostimulants with Implications in Autoimmune Uveitis. *Biomedicines* 2023; 12
- Derochette S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Ceusters J, Deby-Dupont G, Lejeune JP, Neven P, Serteyn D. Curcumin and resveratrol act by different ways on NADPH oxidase activity and reactive oxygen species produced by equine neutrophils. *Chem Biol Interact* 2013; 206: 186-93.
- Desousa BR, Kim KK, Jones AE, Ball AB, Hsieh WY, Swain P, Morrow DH, Brownstein AJ, Ferrick DA, Shirihai OS, Neilson A, Nathanson DA, Rogers GW, Dranka BP, Murphy AN, Affourtit C, Bensinger SJ, Stiles L, Romero N, Divakaruni AS. Calculation of ATP production rates using the Seahorse XF Analyzer. *EMBO Rep* 2023; 24: e56380.
- Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. Discrete Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide by T Cell Receptor Stimulation : Selective Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Fas Ligand Expression. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195: 59-70.
- DeVoss J, Hou Y, Johannes K, Lu W, Liou GI, Rinn J, Chang H, Caspi RR, Fong L, Anderson MS. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med* 2006; 203: 2727-35.
- Dick AD, Tundia N, Sorg R, Zhao C, Chao J, Joshi A, Skup M. Risk of Ocular Complications in Patients with Noninfectious Intermediate Uveitis, Posterior Uveitis, or Panuveitis. *Ophthalmology* 2016; 123: 655-62.
- Diedrichs-Möhring M, Hoffmann C, Wildner G. Antigen-dependent monophasic or recurrent autoimmune uveitis in rats. *International Immunology* 2008; 20: 365-74.
- Divakaruni AS, Rogers GW, Murphy AN. Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode. *Curr Protoc Toxicol* 2014; 60: 25 2 1-16.
- Ebeling MC, Geng Z, Kapphahn RJ, Roehrich H, Montezuma SR, Dutton JR, Ferrington DA. Impaired Mitochondrial Function in iPSC-Retinal Pigment Epithelium with the Complement Factor H Polymorphism for Age-Related Macular Degeneration. *Cells* 2021; 10
- Egwuagu CE, Alhakeem SA, Mbanefo EC. Uveitis: Molecular Pathogenesis and Emerging Therapies. *Frontiers in Immunology* 2021; 12
- Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Saari JC. Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Exp Eye Res* 1987; 44: 425-38.
- Fan W, Wang X, Zeng S, Li N, Wang G, Li R, He S, Li W, Huang J, Li X, Liu J, Hou S. Global lactylome reveals lactylation-dependent mechanisms underlying T(H)17 differentiation in experimental autoimmune uveitis. *Sci Adv* 2023; 9: eadh4655.

- Farrar JD, Smith JD, Murphy TL, Leung S, Stark GR, Murphy KM. Selective loss of type I interferon-induced STAT4 activation caused by a minisatellite insertion in mouse Stat2. *Nat Immunol* 2000; 1: 65-9.
- Feng X, Li X, Liu N, Hou N, Sun X, Liu Y. Glutaminolysis and CD4+ T-cell metabolism in autoimmunity: From pathogenesis to therapy prospects. *Frontiers in Immunology* 2022; 13
- Finn RN, Cerda J. Evolution and functional diversity of aquaporins. *Biol Bull* 2015; 229: 6-23.
- Fischer BM, Brehm W, Reese S, McMullen Jr RJ. Equine recurrent uveitis—A review. *Equine Veterinary Education* 2022; 35: 254-64.
- Fruhauf B, Ohnesorge B, Deegen E, Boeve M. Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy. *Vet Ophthalmol* 1998; 1: 137-51.
- Gerding JC, Gilger BC. Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. *Equine Vet J* 2016; 48: 290-8.
- Gery I, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Crawford MA, Vistica BP, Chader GJ. Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 1296-300.
- Ghergurovich JM, Garcia-Canaveras JC, Wang J, Schmidt E, Zhang Z, TeSlaa T, Patel H, Chen L, Britt EC, Piqueras-Nebot M, Gomez-Cabrera MC, Lahoz A, Fan J, Beier UH, Kim H, Rabinowitz JD. A small molecule G6PD inhibitor reveals immune dependence on pentose phosphate pathway. *Nat Chem Biol* 2020; 16: 731-9.
- Gilbert RM, Zhang X, Sampson RD, Ehrenstein MR, Nguyen DX, Chaudhry M, Mein C, Mahmud N, Galatowicz G, Tomkins-Netzer O, Calder VL, Lightman S. 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* 2018; 9: 907.
- Gilger BC, Malok E, Cutter KV, Stewart T, Horohov DW, Allen JB. Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999; 71: 17-28.
- Gilger BC, Michau TM. Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2004; 20: 417-27, vii.
- Gilger BC, Salmon JH, Wilkie DA, Cruysberg LP, Kim J, Hayat M, Kim H, Kim S, Yuan P, Lee SS, Harrington SM, Murray PR, Edelhauser HF, Csaky KG, Robinson MR. A novel bioerodible deep scleral lamellar cyclosporine implant for uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 2596-605.
- Gilger BC. Equine recurrent uveitis: The viewpoint from the USA. *Equine Veterinary Journal* 2010; 42: 57-61.
- Gilger BC, Deeg C. Chapter 8 - Equine Recurrent Uveitis. In: *Equine Ophthalmology (Second Edition)*. Gilger BC, ed. Saint Louis: W.B. Saunders 2011: 317-49.
- Gill T, Levine AD. Mitochondria-derived hydrogen peroxide selectively enhances T cell receptor-initiated signal transduction. *J Biol Chem* 2013; 288: 26246-55.
- Gu J, Zhou J, Chen Q, Xu X, Gao J, Li X, Shao Q, Zhou B, Zhou H, Wei S, Wang Q, Liang Y, Lu L. Tumor metabolite lactate promotes tumorigenesis by modulating MOESIN lactylation and enhancing TGF- $\beta$  signaling in regulatory T cells. *Cell Rep.* 2022;
- Gülöw K, Tümen D, Heumann P, Schmid S, Kandulski A, Müller M, Kunst C. Unraveling the Role of Reactive Oxygen Species in T Lymphocyte Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 2024; 25

- Haghikia A, Jörg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, Hammer A, Lee D-H, May C, Wilck N, Balogh A, Ostermann Annika I, Schebb NH, Akkad Denis A, Grohme Diana A, Kleinewietfeld M, Kempa S, Thöne J, Demir S, Müller Dominik N, Gold R, Linker Ralf A. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity* 2015; 43: 817-29.
- Hamza E, Gerber V, Steinbach F, Marti E. Equine CD4(+) CD25(high) T cells exhibit regulatory activity by close contact and cytokine-dependent mechanisms in vitro. *Immunology* 2011; 134: 292-304.
- Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Gerhards H, Ueffing M, Deeg CA. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 2007; 6: 2121-31.
- Hisada R, Yoshida N, Orite SYK, Umeda M, Burbano C, Scherlinger M, Kono M, Krishfield S, Tsokos GC. Role of Glutaminase 2 in Promoting CD4+ T Cell Production of Interleukin-2 by Supporting Antioxidant Defense in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 2022; 74: 1204-10.
- Hochrein SM, Wu H, Eckstein M, Arrigoni L, Herman JS, Schumacher F, Gerecke C, Rosenfeldt M, Grün D, Kleuser B, Gasteiger G, Kastenmüller W, Ghesquière B, Van den Bossche J, Abel ED, Vaeth M. The glucose transporter GLUT3 controls T helper 17 cell responses through glycolytic-epigenetic reprogramming. *Cell Metab.* 2022;
- Hoek A, Rutten VP, Kool J, Arkesteijn GJ, Bouwstra RJ, Van Rhijn I, Koets AP. Subpopulations of bovine WC1(+) gammadelta T cells rather than CD4(+)CD25(high) Foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Vet Res* 2009; 40: 6.
- Hollander GA, Bierer BE, Burakoff SJ. Molecular and biological actions of cyclosporin A and FK506 on T cell development and function. *Transfus Sci* 1994; 15: 207-20.
- Hsu S-M, Yang C-H, Teng Y-T, Tsai H-Y, Lin C-Y, Lin C-J, Shieh C-C, Chen S-H. Suppression of the Reactive Oxygen Response Alleviates Experimental Autoimmune Uveitis in Mice. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21
- Huang J, Li Z, Hu Y, Li Z, Xie Y, Huang H, Chen Q, Chen G, Zhu W, Chen Y, Su W, Chen X, Liang D. Melatonin, an endogenous hormone, modulates Th17 cells via the reactive-oxygen species/TXNIP/HIF-1alpha axis to alleviate autoimmune uveitis. *J Neuroinflammation* 2022; 19: 124.
- Huang J, Wang X, Li N, Fan W, Li X, Zhou Q, Liu J, Li W, Zhang Z, Liu X, Zeng S, Yang H, Tian M, Yang P, Hou S. YY1 Lactylation Aggravates Autoimmune Uveitis by Enhancing Microglial Functions via Inflammatory Genes. *Adv Sci (Weinh)* 2024; 11: e2308031.
- Ilchovska D, Barrow DM. An Overview of the NF-kB mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF-kB ligand RANKL and related nutritional interventions. *Autoimmunity Reviews* 2021; 20: 102741.
- Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-33.
- Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nature Immunology* 2004; 5: 818-27.
- Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ, Rathmell JC. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent

- pathways. *J Immunol* 2008; 180: 4476-86.
- Jiang R, Ren WJ, Wang LY, Zhang W, Jiang ZH, Zhu GY. Targeting Lactate: An Emerging Strategy for Macrophage Regulation in Chronic Inflammation and Cancer. *Biomolecules* 2024; 14
- Jiang Z, Liang K, Gao X, Cao F, An G, Gui S, Tang W, Du L, Tao L, Wang X. Fe-curcumin nanozyme-mediated immunosuppression and anti-inflammation in experimental autoimmune uveitis. *Biomater Res* 2023; 27: 131.
- Kalsow CM, Wacker WB. Rabbit ocular and pineal autoimmune response to retina antigens. *Curr Eye Res* 1986; 5: 579-86.
- Kaminski M, Kiessling M, Suss D, Krammer PH, Gulow K. Novel role for mitochondria: protein kinase C $\theta$ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3625-39.
- Kaminski MM, Sauer SW, Klemke CD, Suss D, Okun JG, Krammer PH, Gulow K. Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and IL-4 expression: mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression. *J Immunol* 2010; 184: 4827-41.
- Kamiński Marcin M, Sauer Sven W, Kamiński M, Opp S, Ruppert T, Grigaravičius P, Grudnik P, Gröne H-J, Krammer Peter H, Gülow K. T cell Activation Is Driven by an ADP-Dependent Glucokinase Linking Enhanced Glycolysis with Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation. *Cell Reports* 2012; 2: 1300-15.
- Kamiński MM, Röth D, Krammer PH, Gülow K. Mitochondria as Oxidative Signaling Organelles in T-cell Activation: Physiological Role and Pathological Implications. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2013; 61: 367-84.
- Karagianni AE, Lisowski ZM, Hume DA, Scott Pirie R. The equine mononuclear phagocyte system: The relevance of the horse as a model for understanding human innate immunity. *Equine Vet J* 2021; 53: 231-49.
- Kates M, Saibil SD. Reprogramming T-cell metabolism to enhance adoptive cell therapies. *Int Immunol* 2024; 36: 261-78.
- Kaufmann U, Diedrichs-Mohring M, Wildner G. Dynamics of intraocular IFN-gamma, IL-17 and IL-10-producing cell populations during relapsing and monophasic rat experimental autoimmune uveitis. *PLoS One* 2012; 7: e49008.
- Kerr EC, Raveney BJ, Copland DA, Dick AD, Nicholson LB. Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals multiple regulatory cell populations. *J Autoimmun* 2008; 31: 354-61.
- Kingsley NB, Sandmeyer L, Bellone RR. A review of investigated risk factors for developing equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 2022;
- Kleinwort KJ, Amann B, Hauck SM, Feederle R, Sekundo W, Deeg CA. Immunological Characterization of Intraocular Lymphoid Follicles in a Spontaneous Recurrent Uveitis Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57: 4504-11.
- Kulbrock M, Borstel M, Rohn K, Distl O, Ohnesorge B. Occurrence and severity of equine recurrent uveitis in warmblood horses - A comparative study. *Pferdeheilkunde* 2013; 29: 27-36.
- Lacombe VA. Expression and regulation of facilitative glucose transporters in equine insulin-sensitive tissue: from physiology to pathology. *ISRN Vet Sci* 2014; 2014: 409547.
- Lian G, Gnanaprakasam JR, Wang T, Wu R, Chen X, Liu L, Shen Y, Yang M, Yang J, Chen Y, Vasiliou V,

- Cassel TA, Green DR, Liu Y, Fan TW, Wang R. Glutathione de novo synthesis but not recycling process coordinates with glutamine catabolism to control redox homeostasis and directs murine T cell differentiation. *Elife* 2018; 7
- Lin L, Ren R, Xiong Q, Zheng C, Yang B, Wang H. Remodeling of T-cell mitochondrial metabolism to treat autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2024;
- Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA, Rao A. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* 1996; 271: 10884-91.
- Lopez-Lee C, Torres ERS, Carling G, Gan L. Mechanisms of sex differences in Alzheimer's disease. *Neuron* 2024; 112: 1208-21.
- Lorenz L, Amann B, Hirmer S, Degroote RL, Hauck SM, Deeg CA. NEU1 is more abundant in uveitic retina with concomitant desialylation of retinal cells. *Glycobiology* 2021a; 31: 873-83.
- Lorenz L, Hirmer S, Schmalen A, Hauck SM, Deeg CA. Cell Surface Profiling of Retinal Muller Glial Cells Reveals Association to Immune Pathways after LPS Stimulation. *Cells* 2021b; 10
- Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, Bowman EP, Sgambellone NM, Chan C-C, Caspi RR. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *Journal of Experimental Medicine* 2008; 205: 799-810.
- Ma S, Ming Y, Wu J, Cui G. Cellular metabolism regulates the differentiation and function of T-cell subsets. *Cell Mol Immunol* 2024; 21: 419-35.
- Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, Michalek RD, Rudolph MC, Deoliveira D, Anderson SM, Abel ED, Chen BJ, Hale LP, Rathmell JC. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.* 2014;
- Malalana F. What's new in equine recurrent uveitis? *In Practice* 2020; 42: 348-53.
- Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 453-79.
- Manosalva C, Quiroga J, Hidalgo AI, Alarcón P, Anseoleaga N, Hidalgo MA, Burgos RA. Role of Lactate in Inflammatory Processes: Friend or Foe. *Front Immunol.* 2022;
- Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 1984; 222: 649-55.
- Martin de Bustamante M, Gomez D, MacNicol J, Hamor R, Plummer C. The Fecal Bacterial Microbiota in Horses with Equine Recurrent Uveitis. *Animals* 2021; 11: 745.
- Masoumi M, Alesaeidi S, Khorramdelazad H, Behzadi M, Baharlou R, Alizadeh-Fanalou S, Karami J. Role of T Cells in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Focus on Immunometabolism Dysfunctions. *Inflammation* 2023; 46: 88-102.
- McMullen RJ, Jr., Fischer BM. Medical and Surgical Management of Equine Recurrent Uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2017; 33: 465-81.
- Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004; 172: 2731-8.
- Meyer EH, Welchen E, Carrie C. Assembly of the Complexes of the Oxidative Phosphorylation System in Land Plant Mitochondria. *Annu Rev Plant Biol* 2019; 70: 23-50.
- Miao Y, Zhang C, Yang L, Zeng X, Hu Y, Xue X, Dai Y, Wei Z. The activation of PPARgamma enhances

- Treg responses through up-regulating CD36/CPT1-mediated fatty acid oxidation and subsequent N-glycan branching of TbetaRII/IL-2Ralpha. *Cell Commun Signal* 2022; 20: 48.
- Minns D, Smith KJ, Alessandrini V, Hardisty G, Melrose L, Jackson-Jones L, MacDonald AS, Davidson DJ, Gwyer Findlay E. The neutrophil antimicrobial peptide cathelicidin promotes Th17 differentiation. *Nat Commun* 2021; 12: 1285.
- Morén S, Kallberg M, Strom L. Equine uveitis: Outcome and adverse effects after one or two intravitreal low-dose gentamicin injections. *Equine Veterinary Journal* 2023;
- Nanke Y, Kotake S, Goto M, Ujihara H, Matsubara M, Kamatani N. Decreased percentages of regulatory T cells in peripheral blood of patients with Behcet's disease before ocular attack: a possible predictive marker of ocular attack. *Modern Rheumatology* 2008; 18: 354-8.
- Noble J, Macek Jilkova Z, Aspod C, Malvezzi P, Fribourg M, Riella LV, Cravedi P. Harnessing Immune Cell Metabolism to Modulate Alloresponse in Transplantation. *Transpl Int* 2024; 37: 12330.
- Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol* 2020;
- Novogrodsky A, Ravid A, Rubin AL, Stenzel KH. Hydroxyl radical scavengers inhibit lymphocyte mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 1171-4.
- Nussenblatt RB, Kuwabara T, de Monasterio FM, Wacker WB. S-antigen uveitis in primates. A new model for human disease. *Arch Ophthalmol* 1981; 99: 1090-2.
- O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 553-65.
- Ohira K, Nakahara A, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Maekawa N, Ikebuchi R, Kohara J, Murata S, Ohashi K. Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF-beta secretion from regulatory T cells. *Immun Inflamm Dis* 2016; 4: 52-63.
- Okoye CN, Koren SA, Wojtovich AP. Mitochondrial complex I ROS production and redox signaling in hypoxia. *Redox Biol.* 2023;
- Paschalis-Trela K, Cywińska A, Trela J, Czopowicz M, Kita J, Witkowski L. The prevalence of ocular diseases in polish Arabian horses. *BMC Veterinary Research* 2017; 13: 319.
- Patel RS, Tomlinson JE, Divers TJ, Van de Walle GR, Rosenberg BA-O. Single-cell resolution landscape of equine peripheral blood mononuclear cells reveals diverse cell types including T-bet(+) B cells. *BMC Biol.* 2021;
- Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S, Cassatella MA. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010; 115: 335-43.
- Peng X, Li H, Zhu L, Zhao S, Li Z, Li S, DongtingWu, Chen J, Zheng S, Su W. Single-cell sequencing of the retina shows that LDHA regulates pathogenesis of autoimmune uveitis. *J Autoimmun* 2024; 143: 103160.
- Pennesi G, Mattapallil MJ, Sun SH, Avichezer D, Silver PB, Karabekian Z, David CS, Hargrave PA, McDowell JH, Smith WC, Wiggert B, Donoso LA, Chan CC, Caspi RR. A humanized model of experimental autoimmune uveitis in HLA class II transgenic mice. *J Clin Invest* 2003; 111: 1171-80.
- Pishesha N, Harmand TJ, Ploegh HL. A guide to antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 2022; 22: 751-64.

- Pompura SL, Hafler DA, Dominguez-Villar M. Fatty Acid Metabolism and T Cells in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology* 2022; 13
- Poznyak AV, Orekhov NA, Churov AV, Starodubtseva IA, Beloyartsev DF, Kovyanova TI, Sukhorukov VN, Orekhov AN. Mitochondrial Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus: Insights and Therapeutic Potential. *Diseases* 2024; 12
- Prete M, Guerriero S, Dammacco R, Fatone MC, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. Autoimmune uveitis: a retrospective analysis of 104 patients from a tertiary reference center. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2014; 4: 17.
- Prete M, Dammacco R, Fatone MC, Racanelli V. Autoimmune uveitis: clinical, pathogenetic, and therapeutic features. *Clin Exp Med* 2016; 16: 125-36.
- Pucino V, Certo M, Bulusu V, Cucchi D, Goldmann K, Pontarini E, Haas R, Smith J, Headland SE, Blighe K, Ruscica M, Humby F, Lewis MJ, Kamphorst JJ, Bombardieri M, Pitzalis C, Mauro C. Lactate Buildup at the Site of Chronic Inflammation Promotes Disease by Inducing CD4+ T Cell Metabolic Rewiring. *Cell Metabolism* 2019; 30: 1055-74.e8.
- Rajendram R, Saraswathy S, Rao NA. Photoreceptor mitochondrial oxidative stress in early experimental autoimmune uveoretinitis. *Br J Ophthalmol* 2007; 91: 531-7.
- Regan DP, Aarnio MC, Davis WS, Carmichael KP, Vandenplas ML, Lauderdale JD, Moore PA. Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 2012; 15: 145-52.
- Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 2002; 3: 1129-34.
- Rockwell H, Mack M, Famula T, Sandmeyer L, Bauer B, Dwyer A, Lassaline M, Beeson S, Archer S, McCue M, Bellone RR. Genetic investigation of equine recurrent uveitis in Appaloosa horses. *Animal Genetics* 2020; 51: 111-6.
- Rodriguez-Perea AL, Arcia ED, Rueda CM, Velilla PA. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clin Exp Immunol* 2016; 185: 281-91.
- Ruggieri S, Frassanito MA, Dammacco R, Guerriero S. Treg lymphocytes in autoimmune uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 2012; 20: 255-61.
- Saldinger LK, Nelson SG, Bellone RR, Lassaline M, Mack M, Walker NJ, Borjesson DL. Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells in vitro. *Vet Ophthalmol* 2020; 23: 160-70.
- Salmond RJ. mTOR Regulation of Glycolytic Metabolism in T Cells. *Front Cell Dev Biol* 2018; 6: 122.
- Sandmeyer LS, Kingsley NB, Walder C, Archer S, Leis ML, Bellone RR, Bauer BS. Risk factors for equine recurrent uveitis in a population of Appaloosa horses in western Canada. *Veterinary Ophthalmology* 2020; 23: 515-25.
- Saraswathy S, Rao NA. Photoreceptor mitochondrial oxidative stress in experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* 2008; 40: 160-4.
- Saraswathy S, Rao NA. Mitochondrial proteomics in experimental autoimmune uveitis oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 5559-66.
- Schauer M, Kleinwort KJH, Degroote RL, Wiedemann C, Kremmer E, Hauck SM, Deeg CA. Interaction of septin 7 and DOCK8 in equine lymphocytes reveals novel insights into signaling pathways associated with autoimmunity. *Sci Rep* 2018; 8: 12332.

- Schlaepfer IR, Joshi M. CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Endocrinology*. 2020;
- Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, Wang CR, Schumacker PT, Licht JD, Perlman H, Bryce PJ, Chandel NS. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* 2013; 38: 225-36.
- Sener Z, Cederkvist FH, Volchenkov R, Holen HL, Skalhegg BS. T Helper Cell Activation and Expansion Is Sensitive to Glutaminase Inhibition under Both Hypoxic and Normoxic Conditions. *PLoS One* 2016; 11: e0160291.
- Shah D, Kiran R, Wanchu A, Bhatnagar A. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity. *Immunol Lett* 2010; 129: 7-12.
- Shang D, Huang M, Wang B, Yan X, Wu Z, Zhang X. mtDNA Maintenance and Alterations in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Curr Neuropharmacol* 2023; 21: 578-98.
- Shriver LP, Manchester M. Inhibition of fatty acid metabolism ameliorates disease activity in an animal model of multiple sclerosis. *Sci Rep* 2011; 1: 79.
- Shu P, Liang H, Zhang J, Lin Y, Chen W, Zhang D. Reactive oxygen species formation and its effect on CD4(+) T cell-mediated inflammation. *Front Immunol* 2023; 14: 1199233.
- Siegers GM, Swamy M, Fernandez-Malave E, Minguet S, Rathmann S, Guardo AC, Perez-Flores V, Regueiro JR, Alarcon B, Fisch P, Schamel WW. Different composition of the human and the mouse gammadelta T cell receptor explains different phenotypes of CD3gamma and CD3delta immunodeficiencies. *J Exp Med* 2007; 204: 2537-44.
- Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21: 363-83.
- Song C, Wang K, Qian B, Lu J, Qiao M, Qiu Y, Wang B, Yu Y. Nrf-2/ROS/NF-kappaB pathway is modulated by cynarin in human mesenchymal stem cells in vitro from ankylosing spondylitis. *Clin Transl Sci* 2024; 17: e13748.
- Sonmez C, Yucel AA, Yesil TH, Kucuk H, Sezgin B, Mercan R, Yucel AE, Demirel GY. Correlation between IL-17A/F, IL-23, IL-35 and IL-12/-23 (p40) levels in peripheral blood lymphocyte cultures and disease activity in Behcet's patients. *Clin Rheumatol* 2018; 37: 2797-804.
- Spieß BM. Equine recurrent uveitis: the European viewpoint. *Equine Vet J Suppl* 2010;
- Stein M, Gabdoulline RR, Wade RC. Cross-species analysis of the glycolytic pathway by comparison of molecular interaction fields. *Mol Biosyst* 2010; 6: 152-64.
- Stentz FB, Kitabchi AE. Hyperglycemia-induced activation of human T-lymphocytes with de novo emergence of insulin receptors and generation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;
- Streilein JW. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 879-89.
- Tan YN, Jiang GG, Meng XW, Lu ZY, Yan M, Li J, Nan X, Sun XG, Wang Q, Wang X, Jia XY, Zhang M. CMPK2 Promotes CD4(+) T Cell Activation and Apoptosis through Modulation of Mitochondrial Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Biochem Biophys* 2024; 82: 3547-57.
- Tang J, Zhu W, Silver PB, Su SB, Chan CC, Caspi RR. Autoimmune uveitis elicited with antigen-pulsed dendritic cells has a distinct clinical signature and is driven by unique effector mechanisms: initial encounter with autoantigen defines disease phenotype. *J Immunol* 2007; 178: 5578-87.

- Tang X, Mao X, Ling P, Yu M, Pan H, Wang J, Liu M, Pan H, Qiu W, Che N, Zhang K, Bao F, Peng H, Ding Q, Wang S, Zhou W. Glycolysis inhibition induces anti-tumor central memory CD8(+)T cell differentiation upon combination with microwave ablation therapy. *Nat Commun* 2024; 15: 4665.
- Tavassolifar MJ, Moghadasi AN, Esmaeili B, Sadatpour O, Vodjgani M, Izad M. Redox Imbalance in CD4+ T Cells of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 8860813.
- Taylor AW, Ng TF. Negative regulators that mediate ocular immune privilege. *J Leukoc Biol* 2018;
- Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223: 87-113.
- Thorne JE, Suhler E, Skup M, Tari S, Macaulay D, Chao J, Ganguli A. Prevalence of Noninfectious Uveitis in the United States: A Claims-Based Analysis. *JAMA Ophthalmol* 2016; 134: 1237-45.
- Tooley AJ, Gildeen J, Jacobelli J, Beemiller P, Trimble WS, Kinoshita M, Krummel MF. Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 17-26.
- Tsokos GC. Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 2020; 21: 605-14.
- Valberg SJ, Velez-Irizarry D, Williams ZJ, Pagan JD, Mesquita V, Walldridge B, Maresca-Fichter H. Novel Expression of GLUT3, GLUT6 and GLUT10 in Equine Gluteal Muscle Following Glycogen-Depleting Exercise: Impact of Dietary Starch and Fat. *Metabolites* 2023; 13
- Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022; 23: 141-61.
- Verheul TCJ, van Hijfte L, Perenthaler E, Barakat TS. The Why of YY1: Mechanisms of Transcriptional Regulation by Yin Yang 1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8
- Vidal Moreno de Vega C, Lemmens D, de Meeus d'Argenteuil C, Boshuizen B, de Mare L, Leybaert L, Goethals K, de Oliveira JE, Hosotani G, Deforce D, Van Nieuwerburgh F, Devisscher L, Delesalle C. Dynamics of training and acute exercise-induced shifts in muscular glucose transporter (GLUT) 4, 8, and 12 expression in locomotion versus posture muscles in healthy horses. *Front Physiol* 2023; 14: 1256217.
- Vlasova AN, Saif LJ. Bovine Immunology: Implications for Dairy Cattle. *Front Immunol* 2021; 12: 643206.
- Voss K, Hong HS, Bader JE, Sugiura A, Lyssiotis CA, Rathmell JC. A guide to interrogating immunometabolism. *Nat Rev Immunol* 2021; 21: 637-52.
- Wacker WB, Lipton MM. Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* 1965; 206: 253-4.
- Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov JA, Jr., Organisciak DT. Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* 1977; 119: 1949-58.
- Wang H, Schoebel S, Schmitz F, Dong H, Hedfalk K. Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2020; 1862: 183065.
- Wang L, Lu Z, Zhao J, Schank M, Cao D, Dang X, Nguyen LN, Nguyen LNT, Khanal S, Zhang J, Wu XY, El Gazzar M, Ning S, Moorman JP, Yao ZQ. Selective oxidative stress induces dual damage to telomeres and mitochondria in human T cells. *Aging Cell* 2021; 20: e13513.

- Wang T, Marquardt C, Foker J. Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 1976; 261: 702-5.
- Wang X, Yuan W, Yang C, Wang Z, Zhang J, Xu D, Sun X, Sun W. Emerging role of gut microbiota in autoimmune diseases. *Front Immunol* 2024; 15: 1365554.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309-14.
- Weigand M, Hauck SM, Deeg CA, Degroote RL. Deviant proteome profile of equine granulocytes associates to latent activation status in organ specific autoimmune disease. *J Proteomics* 2021; 230: 103989.
- Werry H, Gerhards H. [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax* 1992; 20: 178-86.
- Wiedemann C, Amann B, Degroote RL, Witte T, Deeg CA. Aberrant Migratory Behavior of Immune Cells in Recurrent Autoimmune Uveitis in Horses. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 101.
- Wincup C, Wilkinson M, Radziszewska A, Robinson G, Rahman A. POS0295 CD4+ T CELLS DEMONSTRATE METABOLIC REPROGRAMMING CHARACTERISED BY INCREASED REACTIVE OXYGEN SPECIES FORMATION AND ENHANCED ATP GENERATION IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2023; 82: 389.
- Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Chapter Thirteen - Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. In: *Methods in Enzymology*. Galluzzi L, Kroemer G, eds.: Academic Press 2014: 243-62.
- Wollanke B, Gerhards H, Ackermann K. Infectious Uveitis in Horses and New Insights in Its Leptospiral Biofilm-Related Pathogenesis. *Microorganisms* 2022; 10
- Wu H, Zhao X, Hochrein SM, Eckstein M, Gubert GF, Knopper K, Mansilla AM, Oner A, Doucet-Ladeveze R, Schmitz W, Ghesquiere B, Theurich S, Dudek J, Gasteiger G, Zerneck A, Kobold S, Kastenmuller W, Vaeth M. Mitochondrial dysfunction promotes the transition of precursor to terminally exhausted T cells through HIF-1alpha-mediated glycolytic reprogramming. *Nat Commun* 2023a; 14: 6858.
- Wu X, Tao M, Zhu L, Zhang T, Zhang M. Pathogenesis and current therapies for non-infectious uveitis. *Clin Exp Med*. 2023b;
- Xia X, Cao G, Sun G, Zhu L, Tian Y, Song Y, Guo C, Wang X, Zhong J, Zhou W, Li P, Zhang H, Hao J, Li Z, Deng L, Yin Z, Gao Y. GLS1-mediated glutaminolysis unbridled by MALT1 protease promotes psoriasis pathogenesis. *J Clin Invest* 2020; 130: 5180-96.
- Xu Y, Li M, Lin M, Cui D, Xie J. Glutaminolysis of CD4(+) T Cells: A Potential Therapeutic Target in Viral Diseases. *J Inflamm Res* 2024; 17: 603-16.
- Yamada M, Shichi H, Yuasa T, Tanouchi Y, Mimura Y. Superoxide in ocular inflammation: human and experimental uveitis. *J Free Radic Biol Med* 1986; 2: 111-7.
- Yang L, Chu Z, Liu M, Zou Q, Li J, Liu Q, Wang Y, Wang T, Xiang J, Wang B. Amino acid metabolism in immune cells: essential regulators of the effector functions, and promising opportunities to enhance cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 2023;
- Yang W, Yu T, Cong Y. CD4(+) T cell metabolism, gut microbiota, and autoimmune diseases: implication in precision medicine of autoimmune diseases. *Precis Clin Med* 2022; 5: pbac018.
- Yang Z, Shen Y, Oishi H, Matteson EL, Tian L, Goronzy JJ, Weyand CM. Restoring oxidant signaling suppresses proarthritogenic T cell effector functions in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*.

- 2016;
- Yeh S, Li Z, Forooghian F, Hwang FS, Cunningham MA, Pantanelli S, Lew JC, Wroblewski KK, Vitale S, Nussenblatt RB. CD4+Foxp3+ T-regulatory cells in noninfectious uveitis. *Arch Ophthalmol* 2009; 127: 407-13.
- Yin Y, Choi SC, Xu Z, Perry DJ, Seay H, Croker BP, Sobel ES, Brusko TM, Morel L. Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus. 2015;
- Yin Y, Choi SC, Xu Z, Zeumer L, Kanda N, Croker BP, Morel L. Glucose Oxidation Is Critical for CD4+ T Cell Activation in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 2016; 196: 80-90.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 337-49.
- Zhang C, Liu X, Xiao J, Jiang F, Fa L, Jiang H, Zhou L, Su W, Xu Z.  $\gamma\delta$  T cells in autoimmune uveitis pathogenesis: A promising therapeutic target. *Biochemical Pharmacology* 2023; 213: 115629.
- Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, Liu W, Kim S, Lee S, Perez-Neut M, Ding J, Czyz D, Hu R, Ye Z, He M, Zheng YG, Shuman HA, Dai L, Ren B, Roeder RG, Becker L, Zhao Y. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature* 2019;
- Zhang M, Zhang X. T cells in ocular autoimmune uveitis: Pathways and therapeutic approaches. *International Immunopharmacology* 2023; 114: 109565.
- Zhao F, Yu JS. Overview of dendritic cells and related pathways in autoimmune uveitis. *Open Life Sci.* 2024;
- Zhou X, Zhu X, Zeng H. Fatty acid metabolism in adaptive immunity. *The FEBS Journal* 2023; 290: 584-99.
- Zhu L, Li H, Wang R, Li Z, Zhao S, Peng X, Su W. Identification of Hif1 $\alpha$  as a Potential Participant in Autoimmune Uveitis Pathogenesis Using Single-Cell Transcriptome Analysis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2023; 64: 24-.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

## 8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter, Frau **Prof. Dr. Cornelia A. Deeg** bedanken, die meine Begeisterung für das Forschungsfeld der equinen rezidivierenden Uveitis geweckt hat und mir dieses spannende Forschungsthema anvertraut hat. Ihre außergewöhnlich schnellen und präzisen Korrekturen, die hilfreichen Kommentare sowie ihre stets offene Kommunikation und Erreichbarkeit sind keineswegs selbstverständlich. Vielen Dank für diese zuverlässige und kompetente Betreuung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik für Pferde der LMU München für die zuverlässige Entnahme und Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Blutproben sowie für die jederzeitige Möglichkeit, Blutproben von den Institutspferden zu entnehmen.

Ganz besonders danke ich auch meinen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen, die jeden Arbeitstag zu einer Zeit mit Freunden gemacht haben: **Dr. Adrian Schmalen, Amelie Fleischer, Dr. Anne Hoffmann, Carolin Sprengel, Dr. Felix Gard, Heidi Duda, Ismini Christofi, Dr. Kristina Kleinwort, Lili Flad, Dr. Lucia Korbonits, Dr. Marie Schilloks, Dr. Roxane Degroote, Sabrina Albinger** und **Dr. Ulrich Wilk**. Mein besonderer Dank gilt **Dr. Anne Hoffmann**, die mir mit viel Geduld den Einstieg erleichtert hat und mich besonders gut in unsere Methoden und die ERU-Thematik eingeführt hat. Und insbesondere **Amelie Fleischer**, die von Tag eins an ihr Büro, ihr Mittagessen und alles Leid mit mir geteilt hat, gilt mein ganz besonderer Dank. Ohne sie hätte ich diese Zeit nicht auf dieselbe Weise gemeistert und ich werde unsere gemeinsame Zeit im Büro sehr vermissen. Zudem möchte ich **Dr. Felix Gard** danken, der stets eine Antwort auf meine Fragen und eine Lösung für jedes technische Probleme parat hatte. Auch bei **Sabrina Albinger** und **Carolin Sprengel**, die mir während der gesamten Schreibzeit den Rücken freigehalten und das ERU-Projekt zuverlässig übernommen haben, sowie bei **Lili Flad**, die eine ausgezeichnete Korrekturleserin war, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch den ehemaligen und aktuellen TAs **Bärbl Amann**,

**Jonas Liedl, Lydia Hoffmann, Mirjam Telorac, Sieglinde Hirmer, Steffi Püls, Tanja Weißer** und **Ursula Cramer**, die mich mit großem Engagement unterstützt haben und deren Hilfe unverzichtbar war.

Und schließlich danke ich meinen **Eltern** und meinen **Geschwistern**, die immer an mich glauben und für mich da sind und die mich aus dem fernen Nordfriesland bei meinem Weg durch das Tiermedizinstudium und die Doktorarbeit unterstützt haben.